

平成 21 年 6 月 2 日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19780220
 研究課題名(和文) 間葉系幹細胞から運動器へ分化する過程でのデコリンの関与と機能の解析
 研究課題名(英文) The role of decorin in the process of musculoskeletal differentiation from mesenchymal stem cells
 研究代表者
 保坂 善真 (HOSAKA YOSHINA0)
 鳥取大学・農学部・准教授
 研究者番号： 00337023

研究成果の概要：

研究成果の概要：

マウス間葉系幹細胞 KUSA-A1(A1)のデコリン発現をノックダウンした細胞株(siDT)を用いて、骨分化過程でのデコリンの関与と機能を解析した。siDT を骨芽細胞分化培地で誘導しても骨芽細胞へ分化せずに脂肪細胞へと分化した。A1 および siDT をディフュージョンチャンバーに充填してマウス腹腔内に、あるいは、単独またはコラーゲンゲルとともにマウス皮下に移植して異所性骨化を生体内へ移植したところ、A1 は腹腔内あるいは皮下で骨芽細胞へと分化したが、siDT は骨分化マーカーの産生が低いことや、組織学的解析結果と総合して骨分化は起きていないと判断した。以上の結果は、デコリンが間葉系幹細胞の骨分化への方向付け因子であることを強く示唆する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：間葉系幹細胞、分化と増殖、細胞系譜の決定、デコリン、骨、脂肪、ジーンサイレンシング、siRNA

1. 研究開始当初の背景

獣医療の発展に伴い動物の寿命がのび、高齢動物の運動機能を保持することが重要課題となってきている。このため運動機能に重要な骨格系や筋肉系といった間葉系組織の形成・機能発現・再生修復機構の解明は急務と考える。間葉系組織の前駆細胞は間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)が生みだしており、その分化可能な組織の種類が幅広いことから、今日ではこの MSC

は胚性幹細胞(ES 細胞)と並んで、再生医療で最も重要な研究対象となっている。

ところで、細胞内外に存在するプロテオグリカン(PG)は、コラーゲン細線維の形態形成のみならず、細胞の増殖、移動、接着にも関わっている。加えて、細胞の分化や成熟にも PG が関与する可能性が示唆されつつある。MSC の分化・成熟過程での PG の関与の詳細が明らかにできれば、細胞の分化・成熟ステージのコントロールができ器官や組織の再生が容易になる上に、短期

間に大量の MSC を得られる可能性があり、早期の創傷治癒も望める。

報告者らはこれまでに、PG の一種のデコリンに注目し、その発現を恒常的にノックダウンした線維芽細胞株を作製・応用して、デコリンが興味深い機能を有するプロテオグリカンであることを明らかにしてきた。すなわち、1) デコリンがコラーゲン形態形成において主軸となるプロテオグリカンであること、2) デコリンが、細胞増殖の制御機能を具備している可能性が高いこと、3) 線維芽細胞には細胞外マトリックス中の SLRP バランスの維持機構が存在すること、そして 4) 周囲のコラーゲン密度の感知機能を有することも明らかにした。

しかしながら、デコリンの MSC 分化への関与についての研究は、報告者の知る限り国内外どのグループも全く行っていないのが現状であった。したがって本研究課題では、MSC の分化・成熟過程でのデコリンの関与を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

- 1) デコリンノックダウン MSC を作製し、デコリンの関与が濃厚と考えられる骨細胞に分化誘導する。そして、得られた細胞の性状を比較解析し、MSC の分化へのデコリンの関与を検討する。
- 2) デコリンノックダウン MSC を生体内に移植し、*in vivo* での骨形成能を評価、解析する。

3. 研究の方法

(1) デコリンノックダウン MSC の作製

すでに作成済みであったデコリンに対する RNAi を発現するプラスミド(siDecorin)をマウス MSC である KUSA-A1(A1)にトランスフェクションした。プラスミド導入細胞を選別後、クローン化した細胞に抗デコリン抗体を用いた免疫組織化学を行い、デコリン産生の有無を確認した。デコリン産生が陰性だったものから、さらに数株を選んで、定量 PCR を行い、デコリン mRNA の発現が抑制されているものを siDecorin transfected cell (siDT)として、以降の実験に用いた。

(2) 培養条件

siDT、コントロールである A1 および空ベクターを A1 にトランスフェクションした Empty の各細胞は 37°C、5%二酸化炭素のモイスチャーチャンバー内で培養した。使用した細胞は P3-7 である。増殖および維持に関しては、10%FBS を添加した α MEM

で、骨への分化誘導においては骨分化誘導培地を用いた。なお、培地は 3 日ごとに交換した。

骨細胞へと分化させる際は、分化誘導の 1 日前に 6well あるいは 96well プレートに 21×10^5 個/ml の密度でまいた。その際の培養液の量を 6well は 2mL、96well は 100 μ L とした。その後、培養液を骨分化培地に交換し、交換した日を 0 日目とした。

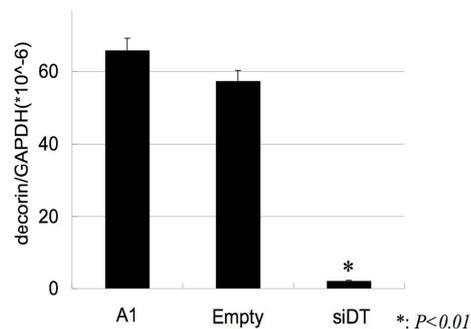
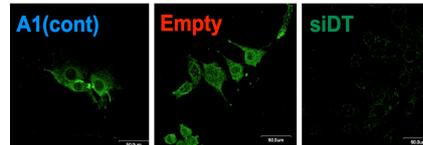


図 1: 本研究に使用した、細胞 (A1, Empty および siDT) の免疫組織化学 (抗デコリン抗体) およびデコリン mRNA の発現量。siDT はデコリン産生が強く抑制されている。

(3) siDT の性状の解析

a) 細胞増殖

96well プレートに 1×10^4 個/ml となるように 100 μ l ずつまき、1-7 日目の細胞の増殖を計測した。細胞数の計測にあたっては、DNA 量を基準とし、試薬は picoGreen assay 法 (励起波長 480nm、蛍光波長 542nm) で計測した。

b) ALP による骨分化程度の評価

分化レベルを確認するために、分化誘導後 1-7 日目の細胞を 96well プレートに播いた細胞に、市販キットを用いて ALP 染色を行うとともに、細胞を 0.5% Triton X-100 水溶液に溶解して細胞溶解液を抽出し、ALP 量を検出した。なお、ALP 量は DNA 量を除いて標準化した。また、siDT は A1 と比較して ALP 産生量が極めて低かったため、10-100ng/ml のデコリンを骨分化培養液中に添加し、デコリン産生が回復するかも確認した。

c) 沈着カルシウム (Ca) 量の計測

6well プレートに播いた骨分化誘導後 7-35 日目の細胞に von Kossa およびアリザリンレッド S 染色を行った。また、アリザ

リン染色した標本は、10%塩化ジセルピニウム水溶液によって、色素を溶出させた後、溶液の吸光度を 582nm で計測した。また、一部の siDT は脂肪細胞様に分化したので、オイルレッド O 染色を行って、脂肪の分布を検出するとともに、染色後、オイルレッド O 色素を抽出して、540nm で吸光度を計測した。さらに、デコリンを 10-1,000ng/ml 添加して培養を継続し、骨および脂肪形成の程度も上述した方法と同様に計測した。

d) 骨芽細胞および脂肪細胞特異マーカー量の測定

骨分化誘導後 28 日目に 6well プレートにまいた細胞のオステオカルシン(OC)およびオステオポンチン(OP)の量を ELISA 法で検出した。

また、1-7 日目の細胞を用いて Runx2 および PPAR γ の発現量を定量 PCR 法で計測した。

(4) 生体内での siDT 分化の解析

a) ディフュージョンチャンバー腹腔内試験

A1 あるいは siDT をニトロセルロース膜(孔径 0.22 μ m) でシールしたディフュージョンチャンバー内に 1X10⁶ 個(0.1ml)充填し C3H/HeN マウスの腹腔内に移植した。1-8 週後にマウスよりチャンバーを摘出し、カルシウム沈着量、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性、グリセロール 3 リン酸脱水素酵素(GPDH)量についてそれぞれの計測キットを用いて測定した。また、チャンバー内の細胞をグルタルアルデヒドおよびオスミウムで二重固定し、厚切り切片と超薄切片を作製して光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡で組織を観察した。

b) 皮下移植試験

A1 および siDT を細胞単独でペレット化あるいはコラーゲンゲルとともに骨分化誘導培地中で 48 時間前培養し、マウス背側皮下に移植した。移植後 1-4 週間後にマウス皮下より移植片を取り出し、X 線で撮影するとともに脱灰後パラフィン包埋切片標本作製して、マッソントリクローム染色、ALP/TRAP 染色、抗 OP 抗体を用いた免疫組織化学を行い、骨形成程度を評価した。さらには移植組織に含まれる細胞数の計測、ALP 活性および GPDH 活性、OP 量の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 骨分化過程における間葉系幹細胞 A1 の *in vitro* での細胞応答の解析

siDT の増殖性は、コントロールである

A1 よりも顕著に促進していた。A1 を骨分化誘導すると、種々の骨芽細胞分化マーカー(ALP や Runx2)を発現し、分化誘導 28 日目には細胞周囲に骨マトリックスを認め、von Kossa 染色およびアリザリンレッド S 染色に強い陽性反応を確認した(図 2、3)。

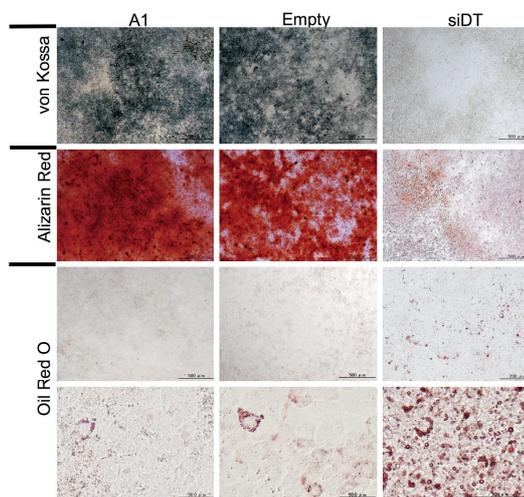


図 2: 骨分化誘導培地で培養した各細胞の von Kossa, アリザリンレッド S, オイルレッド O の染色結果 (28 日目)。

一方 siDT での ALP タンパク量および Runx2 mRNA 発現量は培養期間を通じて弱く、骨マトリックスはほとんど検出されなかった。その一方で、オイルレッド O に陽性を示す脂肪細胞が多数出現した(図 2、3)。また、PPAR γ mRNA 発現量は siDT で有意に高かった。siDT の骨分化培養液中にデコリンを添加して培養を行い ALP 活性の回復を試みたが、デコリン添加量に関係なく siDT の ALP 活性は弱いままであり、培養を継続しても骨マトリックスの形成を認めなかった(図 4)。しかしながら、過剰量のデコリンを添加し、培養を継続したところ、カルシウムの沈着と、脂肪細胞への分化抑制が確認された(図 5)。siDT の脂肪細胞への分化が抑制されたことは、デコリンに脂肪化抑制活性があることを意味する。

以上より、デコリンは ALP の発現調節を遺伝子レベルで行い、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導を制御していること、そして、デコリンが間葉系幹細胞に由来する骨芽細胞と脂肪細胞における細胞系譜の決定機構に重要な役割を担っている可能性が高いと考えられた。

(2) 骨分化過程における間葉系幹細胞 KUSA-A1 の *in vivo* での解析

チャンバー移植実験では A1 の ALP 活性

は実験経過とともに上昇し、細胞間には Ca が沈着したが、siDT では ALP や Ca 量は増加せず低値を維持した。

A1 を容れたチャンバーは細胞が複数の層を形成していた。4 週目にはトルイジン

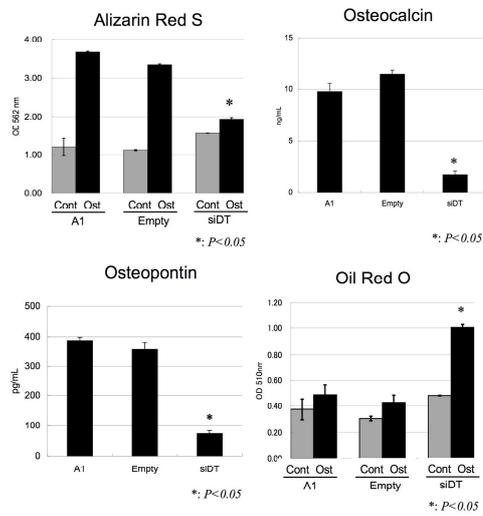


図 3: 骨分化誘導培地で培養した各細胞のカルシウム、骨分化マーカー (OC、OP) および脂肪の量 (28 日目)

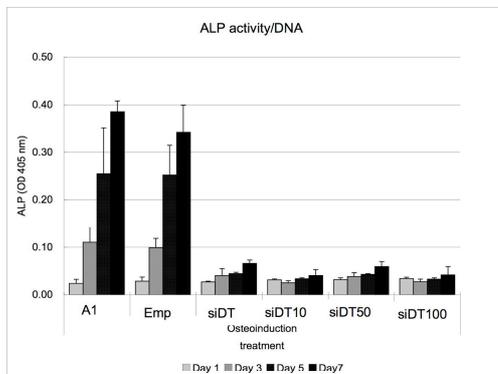
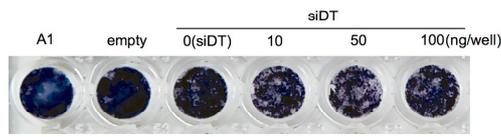


図 4: 骨分化誘導培地にデコリンを添加した場合の siDT の ALP 活性

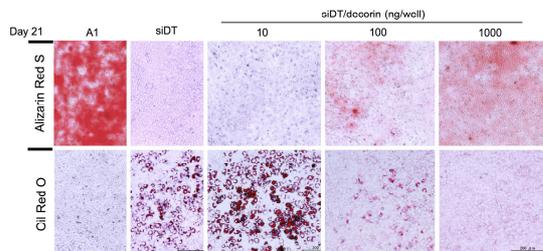


図 5: 骨分化誘導培地にデコリンを添加した場合の siDT の骨および脂肪への分化。過剰量のデコリンの添加で骨分化が回復する。

ブルーに濃染するコラーゲン構造が確認され、カルシウムの沈着が進行していた。一方、siDT を容れたチャンバーは細胞の増殖は低いものであった。2 週目の siDT には電子密度の高い小型の粒子を含む細胞が認められ、4 週目には粒子は大型化していた。オスミウム固定によって黒染すること、および形態学的特徴からこの構造は脂肪滴を

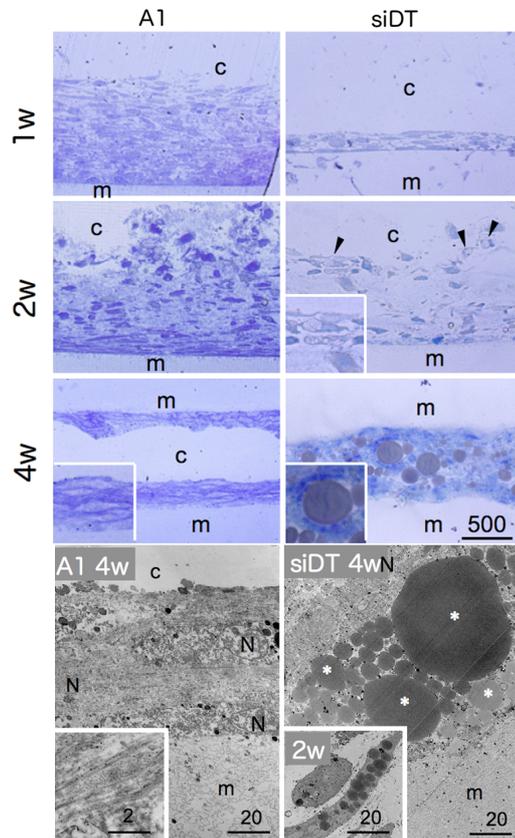
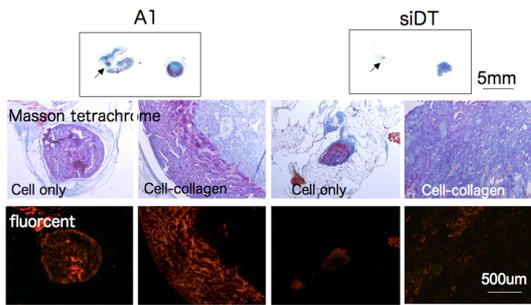


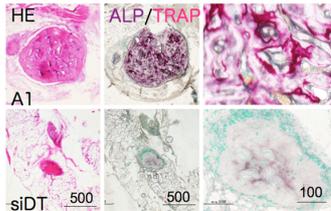
図 6: チャンバー内の細胞の様子。4 週の siDT の細胞内には脂肪細胞が多数存在する。有する細胞(脂肪細胞)であると考えられた (図 6-8)。

皮下移植実験では siDT のみを皮下移植したものは、わずかに結合組織様構造を形成し周囲を脂肪が取り囲んでいた。同構造は対照細胞 A1 が形成した組織と比較して断面積が極めて小さく、ALP 活性や OP の産生レベルも低かった。組織学的解析結果と総合して骨分化は起きていないと判断した。

コラーゲングルとともに A1 を移植すると、大型で ALP および TRAP (破骨細胞マーカー) 活性がともに高い骨組織像を観察したが、siDT をコラーゲングルと移植しても、形成される組織は小型で ALP や TRAP、OP の活性が低く、Ca の沈着もほとんどなかった (図 6-8)。



Cell only (4w)



Cell/collagen (4w)

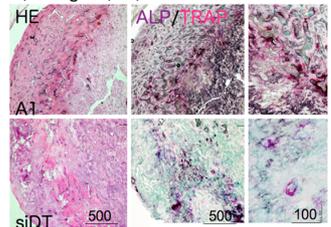


図7: 皮下に移植したA1およびsiDT。生体内にA1を移植すると、骨組織に分化するが、siDTはコラーゲンゲルの有無にかかわらず生体内でも骨組織を形成しない。

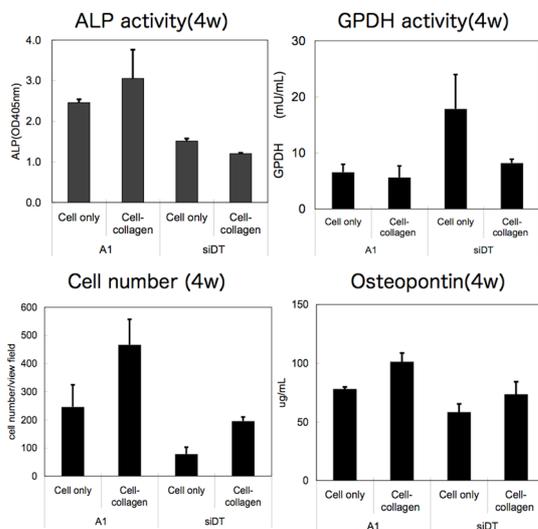


図8: 移植片のALPおよびGPDH活性、細胞数およびOP量

以上の生体内での実験結果は、間葉系幹細胞が細胞系譜を決定するステージにおいて、骨細胞へと分化するためには、デコリンが不可欠な因子であることを改めて示すものである。

報告者はすでに骨分化誘導がデコリン糖鎖による可能性が高いことを明らかにしている。今後は間葉系幹細胞の骨分化に関わ

るデコリン糖鎖種を同定し、その機能を解析すること、そして、その糖鎖を応用した骨組織再生を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Iwasaki S, Hosaka Y, Iwasaki T, Yamamoto K, Nagayasu A, Ueda H, Kokai Y, Takehana K. Modulation of collagen fibril assembly and its structure by decorin: An electron microscopic study. *Arch Histol Cytol* 71:37-44 (2008)
2. Hosaka Y, Kokai Y, Hayashi H, Takehana K, Imagawa T, Uehara M. The role of decorin in the process of osteoblastic differentiation from mouse mesenchymal stem cell, KUSA-A1. *Proceedings of 9th of International Congress on Cell Biology* pp 104 (2008)
3. Sawyer A, Lim XH, Hosaka Y, Rider D, Poh WT, Hui J, Doshi H, Nurcombe V, Cool S, Heparan sulfate promotes human mesenchymal stem cell growth and viability in vitro and stimulates bone repair in vivo. *Proceeding of The 8th World Biomaterials Congress* pp52 (2008)
4. Sawyer A, Lim XH, Susanro E, Hosaka Y, Rider D, Poh WT, Hutmacher DW, Nurcombe V, Cool SM, Passively adsorbed heparan sulfate maintains bioactivity and promotes human mesenchymal stem cell growth and viability within collagen scaffolds. *Proceedings of ICCMB 2007* (2007)

[学会発表] (計5件)

1. 保坂善真、小海康夫、今川智敬、上原正人：間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化過程でのデコリンの関与と役割。第63回日本解剖学会中国・四国地方会 (2008年10月25日、出雲)
2. Hosaka Y, Kokai Y., Hayashi H., Takehana K., Imagawa T., Uehara M. The role of decorin in the process of osteoblastic differentiation from mesenchymal stem cells. 9th of International Congress on Cell Biology (2008年10月8日、ソウル、韓国)

3. 保坂善真、小海康夫、今川智敬、上原正人：間葉系幹細胞から骨へ分化する過程でのデコリンの役割と機能. 第 146 回日本獣医学会学術集会 (2008 年 9 月 25 日, 宮崎)
4. Sawyer A, Lim XH, Hosaka Y, Rider D, Poh WT, Hui J, Doshi H, Nurcombe V, Cool S, Heparan sulfate promotes human mesenchymal stem cell growth and viability *in vitro* and stimulates bone repair *in vivo*. (2008 年 5 月 30 日, アムステルダム, オランダ)
5. Sawyer A, Lim XH, Susanro E., Hosaka Y., Rider D, Poh WT, Hutmacher DW., Nurcombe V, Cool SM, Passively adsorbed heparan sulfate maintains bioactivity and promotes human mesenchymal stem cell growth and viability within collagen scaffolds. ICCMB 2007 (2007 年 12 月 11 日, シンガポール)

[図書] (計 0 件)
[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<http://muses.muses.tottori-u.ac.jp/staff/y-hosaka.htm>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
保坂 善真 (HOSAKA YOSHINAO)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号：00337023

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：