

平成21年 5月22日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791370  
 研究課題名（和文） 間葉系幹細胞のシステインリッチペプチドSCRG1はインテグリンシグナルを制御する  
 研究課題名（英文） Regulation of integrin signaling by a cystein-rich peptide, SCRG1, in mesenchymal stem cells.  
 研究代表者  
 帖佐 直幸（CHOSA NAOYUKI）  
 岩手医科大学・歯学部・助教  
 研究者番号：80326694

研究成果の概要：ヒト間葉系幹細胞（MSC）が分泌する機能未知のペプチドSCRG1に着目し、MSCの分化における役割を解析した。その結果、SCRG1がインテグリンを介して骨分化を抑制する可能性が示された。さらに、SCRG1はMSCの浸潤を促進する結果も得られた。MSCの浸潤は、ケモカイン受容体等によって制御されることが知られている。SCRG1はその分子中に多くのシステイン残基を有する。このような特徴はケモカインに共通した特徴であり、SCRG1がMSCの骨分化のみならず、細胞の浸潤にも関与することが強く示唆された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	270,000	3,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：再生医学、細胞・組織、シグナル伝達、生理活性、発生・分化

## 1. 研究開始当初の背景

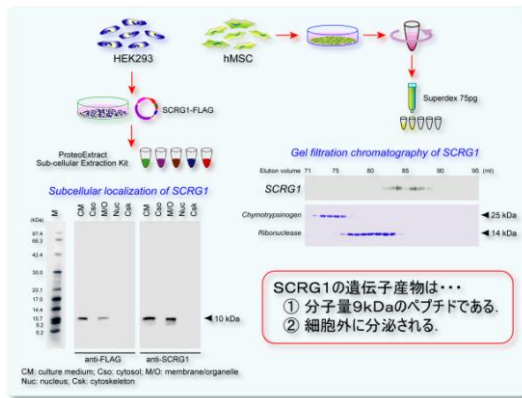
再生医療の実現化には間葉系幹細胞（MSC）の分化を制御することが重要な課題となっている。

(1)申請者はMSCが産生・分泌する機能未知のシステインリッチペプチドSCRG1(Scrapie responsive gene 1)に関する以下の知見を明らかにし、MSCの骨分化にSCRG1が関与し

ている可能性を示唆してきた。

①SCRG1のmRNAは骨分化に伴って経時的に減少することを見出し、その発現量はデキサメタゾン処理で負に制御されることを明らかにした。

②培養細胞にFLAGタグを付加したリコンビナントSCRG1を過剰発現させて生化学的な解析を行ない、ジスルフィド結合を介してダイマーを形成していること、細胞外へ分泌されることを明らかにした(図1)。



(図1) SCRG1の生化学的解析

③siRNAでMSCのSCRG1をノックダウンして骨分化マーカー遺伝子の発現量を解析した結果、SCRG1の減少に伴いアルカリホスファターゼの発現量が増加することを見出した。

④バイオインフォマティクス的手法を用いた解析から、SCRG1は骨、筋、脳、乳腺、前立腺、精巣、子宮等で特異的に発現しており、且つ哺乳動物において高度に保存された遺伝子である。

⑤プロテインアレイの結果より、SCRG1はLadinin 1と結合することが示された。Ladinin 1はヘミデスモゾームと基底膜の接着部位でCollagen XVII、Integrin  $\alpha$ 6、 $\beta$ 4、Laminin 5等とコンプレックスを形成することが知られている。

(2)一方、いくつかの研究グループから以下に示す報告もなされており、生体内に於けるSCRG1の存在が証明されている。

①SCRG1はスクレイピーに感染したマウスの脳で発現が上昇するシステインリッチペプチドとして初めてクローニングされ、脳傷害を受けた時に発現が上昇することが報告されている。

②SCRG1は細胞外マトリックス (ECM) に存在し、軟骨細胞の増殖や分化を促進する。

上述のように、生体におけるSCRG1の存在は証明されているものの、その機能は明らかになっておらず、特に、MSCにおける役割は不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

これまでの実験結果および論文等で明らかになっている諸事実から、「SCRG1はLadinin 1・Collagen XVIIと結合することにより、イン

テグリンシグナルを制御する」という仮説をたて、本研究ではこの仮説の実証を試みることを目的とする。

インテグリンを介して細胞が細胞外マトリックスの接着タンパク質に結合すると、Focal adhesion kinase (FAK) と呼ばれるチロシンキナーゼの自己リン酸化がおこる。このFAKリン酸化シグナルはドッキングタンパク質やアダプタータンパク質を介してMAPK、Akt、Rhoなどのチロシンリン酸化カスケードに分岐しており、それぞれ細胞増殖、生存維持、細胞骨格系の制御に関与することが知られている。

本研究では哺乳動物培養細胞を用いたSCRG1の大量発現系を確立し、SCRG1処理によるFAKのリン酸化を確認する。

## 3. 研究の方法

研究の具体的な方法を以下に示す。

(1)哺乳動物培養細胞を用いた大量発現系の確立

①FreeStyle 293 Expression System [浮遊293細胞を用いた発現系 (Invitrogen社製)] に発現ベクターpCMV-SCRG1-FLAG (作製済) を導入してSCRG1-FLAG (FLAGエピトープタグを付加したリコンビナントSCRG1) を過剰発現させる。

→ 大腸菌の発現系では正常なジスルフィド結合が形成されずに不溶性となることを確認している。よって哺乳動物培養細胞の大量発現に特化した本システムを利用する。なお、293細胞においては正常なジスルフィド結合が形成され可溶性となることも確認済みである。

②培養上清をanti-FLAG M2 Affinity Gel [抗FLAGモノクローナル抗体がコンジュゲートされたアガロースゲル (Sigma社製)] を充填したアフィニティーカラムで精製する。

→ 精製にはÄKTAprimeタンパク質精製システム (GEヘルスケア社製) を使用し、pH勾配による溶出を行う。スモールスケールでの予備実験では、この操作により夾雑物が取り除かれ、精製SCRG1-FLAGが得られることを確認している。

(2)FAKのチロシンリン酸化の検出

①上皮系の細胞株を(1)で精製したSCRG1-FLAGで処理する。

→ 予備実験として様々な細胞株で細胞

外マトリックス成分の mRNA 発現を RT-PCR で解析した。その結果、口腔癌由来の HSC-2、HSC-3、KOSC-2、乳癌由来の HBC-4、大腸癌由来の HT-29 の各上皮系細胞株において Ladinin 1、Collagen XVII、Integrin  $\alpha 6$ 、 $\beta 4$ 、Laminin 5 の発現が認められた。本研究ではこれらの細胞株を用いる。

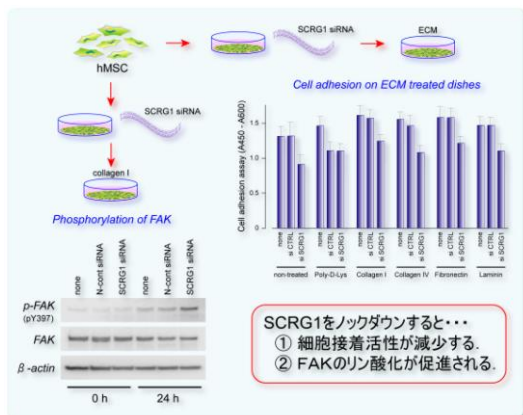
②経時的に細胞可溶化物を調製し抗チロシンリン酸化 FAK 抗体を用いたウェスタンブロットを行う。

→ リン酸化シグナルの検出には高感度な検出方法が必須である。よって本研究では化学発光による検出を行う。

#### 4. 研究成果

本研究期間を通じて以下に示す研究成果を得ることができた。

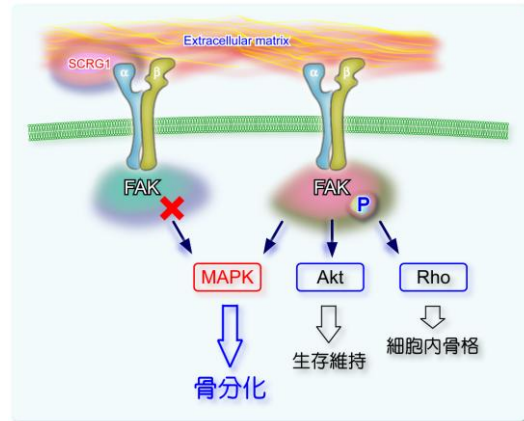
(1) MSC の SCRG1 を siRNA でノックダウンすると細胞接着能が減少するとともに、インテグリンの細胞内シグナル伝達因子である focal adhesion kinase (FAK) のチロシンリン酸化の増加が認められた (図 2)。



(図 2) FAK のリン酸化および細胞接着

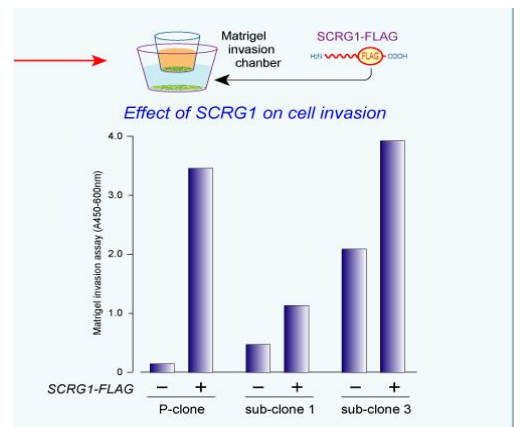
細胞がインテグリンを介して細胞外マトリックスに結合すると、FAK の自己リン酸化がおこる。FAK リン酸化シグナルは MAPK・Akt・Rho などのチロシンリン酸化カスケードに分岐しており、様々なシグナル伝達系の制御に関与する。骨分化に於いては MAPK カスケードが活性化されると骨分化が促進されることが報告されている。これまでの実験結果から、SCRG1 はインテグリンシグナルを負に制御し、MSC の分化を抑制している可能性が示唆された。ごく最近、萌出中の歯根膜で SCRG1 が有意に増加していることが報告された。こ

のことから SCRG1 は骨分化のみならず口腔内組織の発生・分化において非常に興味深い因子である (図 3)。



(図 3) 骨分化における SCRG1 の役割

(2) SCRG1 の骨分化への影響を明らかにする過程で、SCRG1 が MSC の組織内浸潤を促進する実験結果も得られた。すなわち、基底膜を模倣したマトリゲルインベージョンチャンバーの上層に MSC を播種し、下層に SCRG1 を添加すると、MSC がマトリゲルを分解して下層側へと移動した (図 4)。



(図 4) SCRG1 は MSC の浸潤を促進する

Harvard Medical School と Duke University のグループは MSC の浸潤や遊走が CXCR4 や Integrin  $\beta 1$  によって制御されることを明らかにしている。さらに、University of Alberta の Chen らは MSC が様々なサイトカインやケモカインを分泌することを明らかにし、創傷部に MSC の培養上清を投与することで血管形成が増強され、治癒が促進されることを報告している。SCRG1 はその分子中に多くのシステイン残基を有する。このような特徴は様々なサイトカインやケモカインに共通した特徴であり、

SCRG1 が MSC の骨分化のみならず、細胞の浸潤や遊走にも関与している可能性が強く示唆される。しかしながら、本研究において SCRG1 の受容体を同定することはできず、MSC における SCRG1 の役割も不明なままである。今後、SCRG1 受容体の同定および SCRG1 がどのような性質の細胞を浸潤させるのかを明らかにし、MSC における SCRG1 の役割と分泌の意義を明確にすることが期待される。

最近、京都大学の Yamanaka は、皮膚由来の上皮細胞に 4 つの遺伝子 (Oct4, Sox2, Klf4, Myc) を導入することで、多分化能を持つ ES 様細胞 (iPS 細胞) の作製に成功した。また、University of Wisconsin のグループ (米) でも 4 つの遺伝子 (Oct4, Sox2, Nanog, Lin28) を導入することにより、やはり ES 様細胞の作製に成功している。これらの結果は複数の遺伝子導入によって細胞機能の改変が可能であることを示した画期的な成果である。しかしながら、複数の導入遺伝子の発現を人為的に長期にわたってコントロールすることは極めて難しいうえに、遺伝子導入に使用されるウイルスベクターの安全性も確立されていない。また、これら人為的に作製された ES 様細胞は移植によってテラトーマを発生する可能性も高く、臨床応用までには解決されなければならない課題も多い。これらの諸事情からも患者自身の骨髄などから得られる MSC の利用価値は極めて高く、MSC を用いた再生医療も一部では開始されている。一方、MSC の利用は再生医療だけにとどまらない。例えば、造血幹細胞移植後に生じうる致死性の合併症・移植片対宿主病 (GvHD) に MSC の投与が有効である事が Phase II 試験で示され、GvHD を対象にした MSC 製品・Prochymal の Phase III 試験も開始された。さらには全脳虚血が生じたマウスの海馬に MSC を移植すると神経機能が改善して海馬での神経細胞死が大幅に低下したとの報告もなされている。これらの事実は MSC には未知の機能や可能性があることを強く示唆している。本研究では MSC が分泌する SCRG1 が MSC の分化を制御する可能性を示し、さらには MSC の組織内浸潤を促進することを明らかにした。細胞の分化や浸潤は血管新生や上皮-間葉移行などの生命現象にも深く関与している。今後、SCRG1 による MSC の分化や浸潤のメカニズムが詳細に解明されると、再生医療のみならず多くの医療分野における応用の可能性が拡がることが期待できる。

## 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 3 件)

- (1) 帖佐直幸, 石崎明. “骨における血管新生と線溶系”. 日本血栓止血学会誌, (査読無) 20:12-17, 2009.
- (2) 平雅之, 荒木吉馬, 帖佐直幸, 佐藤詔子. “アパタイトの骨再生作用”. セラミックス, (査読無) 43:290-293, 2008.
- (3) Taira M., Chosa N., Sasaki K., Saitoh S., Nezu T., Sato N., Araki Y. “Gene expression analyses of human mesenchymal stem cells cultured in osteogenic differentiation medium for 3, 7, 14 and 21 days by genome focus DNA microarray and real-time PCR”. Journal of Oral Tissue Engineering, (査読有) 5:35-47, 2007.

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 石崎 明 “FGFとTGF- $\beta$ スーパーファミリーの相互作用による未分化間葉系幹細胞の細胞増殖・分化制御機構の解明” 第7回口腔医科学フロンティア学術集会, 2009年3月7日, 徳島.
- (2) 高橋典子 “間葉系幹細胞が分泌するシステインリッチペプチドSCRG1の機能解析” 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会, 2008年12月11日, 神戸.
- (3) 帖佐直幸 “間葉系幹細胞が分泌するシステインリッチペプチドSCRG1の機能解析” 第50回歯科基礎医学会学術大会, 2008年9月24日, 東京.
- (4) 帖佐直幸 “低分子量システインリッチタンパク (SCRG1) はヒト間葉系幹細胞の分化を制御する” 第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会, 2007年12月12日, 横浜.
- (5) 帖佐直幸 “ヒト間葉系幹細胞における低分子量システインリッチタンパク (SCRG1) の役割” 第49回歯科基礎医学会学術大会, 2007年8月31日, 札幌.

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況（計 0 件）

なし

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

帖佐 直幸 (CHOSA NAOYUKI)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：80326694

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし