

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06293・19K21381

研究課題名（和文）機械的受容体シグナルの再生医療研究および新規再生医療への応用

研究課題名（英文）Research of mechanosensitive ion channel signals and application to new regenerative medicine

研究代表者

杉本 明日菜（SUGIMOTO, Asuna）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・助教

研究者番号：80823830

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：間葉系幹細胞は再生医療の細胞ソースとして期待されるが、その分化運命決定機構は不明な点が多い。本研究では加圧刺激により間葉系幹細胞の骨芽細胞系細胞への分化が誘導されることに着目し、間葉系幹細胞が含まれる骨髄や歯髄中に高い発現を認める圧受容体PIEZ01の役割について解析を行ってきた。今回、PIEZ01が加圧刺激によって硬組織形成に重要な遺伝子の発現を誘導するメカニズムについてさらに解析を進め、そのメカニズムに、PIEZ01のC末領域が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞は多分化能を有しており、再生医療での活躍が期待されているが、その分化運命決定機構についてはまだ不明な点が多い。そのため、間葉系幹細胞の分化運命決定機構の解明は新規の再生医療の技術開発への足掛かりとなりうる。本研究は、骨髄や歯髄中に含まれる間葉系幹細胞の新規の分化運命決定機構について解明を進め、その機構を応用することで、再生医療の新規応用法の開発に繋がるものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：Mesenchymal stem cells are expected as a cell source for regenerative medicine, but their differentiation fate determining mechanism remains unclear. In this study, I focused on the induction of differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblastic cells by mechanical stress. I investigated PIEZO1 mechanosensitive channel, which is highly expressed in bone marrow and dental pulp containing mesenchymal stem cells. I have analyzed the role. In this study, I further investigated the mechanism by which PIEZO1 induces the expression of genes important for hard tissue formation by pressure stimulation, and suggested that the C-terminal region of PIEZO1 might be involved in this mechanism.

研究分野：小児歯科

キーワード：PIEZ01 圧受容体 間葉系幹細胞 分化運命決定

1. 研究開始当初の背景

体性幹細胞は骨髄や歯髄をはじめとする体の様々な部位に存在する多分化能を持つ細胞である。ES 細胞や iPS 細胞と比較し、患者本人の細胞を用いるため拒絶反応がないこと、奇形腫が生じないこと、胚を用いないので倫理的問題がないこと、交換期の脱落乳歯を用いる場合ドナーへの負担が少ないことから再生医療への実用化が期待されている。こうした幹細胞が目的の細胞へ分化するためには、様々な成長因子や細胞培養の環境が複雑に関係しているため、その分化の運命決定機構については、未だに多くの点が不明である。したがって、その分子機構の解明は、再生医療の発展に大きく貢献できる。間葉系幹細胞から目的とする細胞への分化を促進させる因子の役割については多くの研究で明らかにされてきているが、その分化開始点に起こる細胞の変化については不明な点が多い。すなわち、間葉系幹細胞の分化開始の引き金となりうる因子や機構が同定できれば、その因子を制御するだけで、目的の細胞へ分化誘導できる可能性がある(図1)。

そこで研究代表者は細胞外圧に着目した。例えば、宇宙空間など微小重力環境下では骨は骨粗鬆症様の病態を呈し、一方で適度な運動負荷は骨形成を促進する。歯においても切削圧や咬合圧の負荷で新たな象牙質が形成されることが知られている。また、細胞の分化に限らず、圧はそれぞれの組織や臓器でもその恒常性維持においても重要な要素である。

これまでに研究代表者は、加圧刺激により間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化する機構に、圧受容体の1つである PIEZ01 が重要な役割を担っていることを明らかにした (Sugimoto A., et al. *Sci Rep* 2017)。

PIEZ01 を発現抑制した場合や機能阻害した場合に、加圧によって誘導される間葉系幹細胞からの骨芽細胞系細胞への分化が抑制された。このことは加圧によって誘導される間葉系幹細胞の分化に PIEZ01 は必要不可欠な分子であることを示唆している。さらに、PIEZ01 を活性化させた場合、圧力の負荷をかけずに、加圧した場合と同様に、骨芽細胞系細胞への分化を促進することがわかった。このことは、PIEZ01 シグナルを応用することによって、新規の象牙質を含む骨系統疾患の治療法の開発に繋がるものと強く期待している。

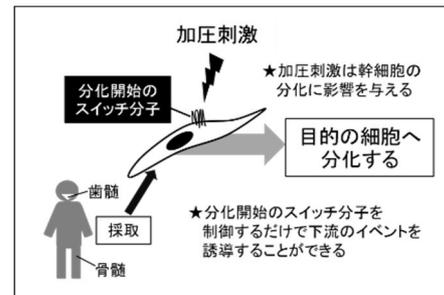


図1. 分化運命決定機構の制御

2. 研究の目的

これまでに研究代表者は間葉系幹細胞において、加圧刺激により PIEZ01 が活性化することで内因性の骨形成因子2 (BMP2) の発現を誘導し骨芽細胞分化が促進することを見出した。さらにこの PIEZ01 の活性化による BMP2 発現誘導に ERK1/2 や p38 シグナル伝達経路が関与しており、間葉系幹細胞の骨芽細胞系細胞への分化における重要なメカニズムの1つであることを明らかにした。そこで本研究では、間葉系幹細胞が骨芽細胞系細胞に分化する際の PIEZ01 の役割についてさらに詳細なメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) カルシウムイオンと PIEZ01 活性化による細胞内シグナル活性との関連

PIEZ01 はカルシウムチャンネルとして機能しているが、間葉系幹細胞の骨芽細胞系細胞への分化における PIEZ01 の役割について、カルシウムチャンネルとしての関連については不明である。そこでカルシウムイオンと PIEZ01 の下流で働く分子との関連について検討を行った。

カルシウムが含有されていない培養液 (S-MEM) を用いて、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 UE7T-13 細胞を PIEZ01 活性化剤にて1分間刺激後、タンパク質を回収し、ERK1/2 のリン酸化をウェスタンブロット法にて解析した。対照群は、alpha-MEM 培地を用い、PIEZ01 活性化剤にて刺激を行った。

また Alpha-MEM 培地にキレート剤を加えた条件で UE7T-13 細胞を PIEZ01 活性化剤にて1分間刺激後、タンパク質を回収し、ERK1/2 のリン酸化をウェスタンブロット法にて解析した。対照群は、alpha-MEM 培地を用い、PIEZ01 活性化剤にて刺激を行った。

(2) Ras タンパク質と PIEZ01 の活性化による細胞内シグナル伝達との関連

PIEZ01 は N 末および C 末が細胞内に存在する 32 回膜貫通型のタンパク質であり、その C 末側

には、R-Ras 結合ドメインと呼ばれるアミノ酸構造を持つ。この領域の果たす役割について検討を行った。

Ras タンパク質阻害剤を作用させた条件で UE7T-13 細胞を PIEZO1 活性化剤にて 1 分間刺激後、タンパク質を回収し、ERK1/2 のリン酸化をウェスタンブロット法にて解析した。対照群は、Ras タンパク質阻害剤非存在下で、PIEZO1 活性化剤にて刺激を行った。

(3) 過剰発現株の作成

さらに C 末側の R-Ras 結合領域の役割について解析をすすめるために、Piezo1 (全長) のプラスミド DNA と Piezo1 の C 末に存在する R-Ras 結合領域を欠失させたプラスミド DNA を作成した。Lipofectamin LTX を用いて HEK293 細胞にトランスフェクションし、過剰発現株を作成した。

4 . 研究成果

(1) カルシウムイオンと PIEZO1 活性化による細胞内シグナル活性との関連

カルシウムイオンの非存在下では、PIEZO1 を活性化した際にみられた ERK1/2 および p38 のリン酸化が抑制された。このことより、PIEZO1 が活性化した際の ERK1/2 および p38 のリン酸化は PIEZO1 のカルシウムチャネルの働きによるものであると考えられた。

(2) Ras タンパク質と PIEZO1 の活性化による細胞内シグナル伝達との関連

UE7T-13 細胞に Ras タンパク質阻害剤を作用させ、Ras タンパク質を阻害すると、PIEZO1 活性化により活性化された ERK1/2 のリン酸化が抑制された。このことより、PIEZO1 活性化による ERK1/2 のリン酸化に、Ras タンパク質が関与する可能性が示唆された。

(3) 過剰発現株の作成

DNA プラスミドを用いて、Piezo1 の過剰発現モデルと Piezo1 の C 末の R-Ras 結合領域を欠失させた変異型モデルを作成した (図 2)。

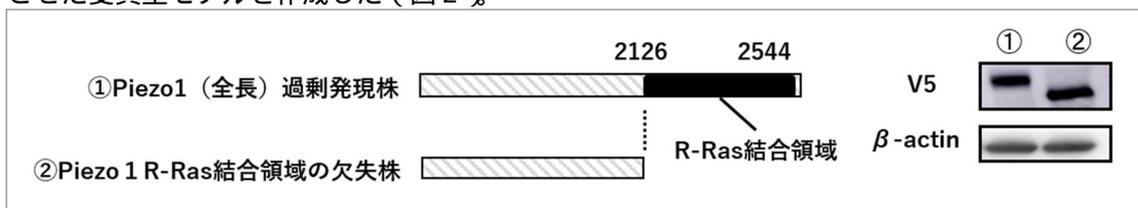


図 2 . 過剰発現モデルおよび変異型モデル

今後、この細胞を用いて、加圧刺激を受容した PIEZO1 の下流における分子メカニズムやカルシウムチャネル機能との関連について、さらなる解明を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉本 明日菜, 宮崎 彩, 河原林 啓太, 岩田 こころ, 黒厚子 璃佳, 赤澤 友基, 長谷川 智一, 上田(山口) 公子, 北村 尚正, 中川 弘, 岩本 勉
2. 発表標題 象牙芽細胞におけるピエゾ型イオンチャネル1 (PIEZ01) の発現とその役割
3. 学会等名 第37回日本小児歯科学会中四国地方会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----