

令和 3 年 6 月 15 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：2019～2020

課題番号：19K24122

研究課題名(和文) TNF- 短期刺激による骨髄由来間葉系細胞の動態解析

研究課題名(英文) Analysis of cell kinetics by short-term stimulation of TNF- α on bone marrow-derived mesenchymal stem cell

研究代表者

成谷 美緒 (NARITANI, Mio)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・大学専門研究員

研究者番号：70761427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄由来細胞(BMC)にリコンビナントTNF- α (1～100ng/mL)により刺激した。TNF- α が細胞増殖、細胞形態、コロニー形成能に差は認めなかったため、低濃度TNF- α の刺激では細胞挙動に影響を与えなかった。骨髄細胞を骨、軟骨、神経、脂肪の誘導培地にて培養し、各マーカー遺伝子の発現をリアルタイムRT-PCRにて比較検討した。骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞において、コントロール群の方が高い発現量であったが、脂肪細胞マーカーでは有意差は認めなかった。TNF- α による短期刺激によって、BMSCの幹細胞の性質を持つ細胞の割合が増加し、骨分化においては一時的に遅延す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

本研究結果は、歯髄組織に限らず様々な組織における炎症と再生の関連を解明する一助になることは言うまでもない。また、メカニズムを解明することにより、TNF- α 、フッ素を人為的にコントロールし歯髄組織に再生、象牙芽細胞の再活性化を促すことで、歯髄組織の再生、象牙質の再生に結びつけることが可能となれば、抜髄リスクの軽減、う蝕の抑制、歯の延命、さらには、健康寿命の延長につながると考えている。また、間葉系幹細胞へのリプログラミングが他の細胞でも応用できれば、今後再生医療における細胞材料としての幅を広げることができると考える。

研究成果の概要(英文)：BMCs of rats were cultured up to 60% confluence and further incubated with 1-100 ng/ml of recombinant rat TNF- α (rTNF- α) for 2 days for pretreatment experiments with rTNF- α . After reaching sub-confluence, cells were passaged once with accutase to remove rTNF- α completely before assays. As control group, the cells were not stimulated and then passaged. Expression levels of Nanog and Oct4 as stem cell markers were significantly increased in the rTNF- α 10 ng/ml stimulation group. TNF- α stimulation did not affect cell proliferation compared with the control group. On the other hand, cell differentiation was delayed in the TNF- α stimulated group. This study was concluded that a short-term TNF- α stimulation significantly increases the stem cell phenotype of BMCs, but osteogenic cell differentiation may be delayed in TNF- α treated BMCs.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：TNF- 骨髄間葉系幹細胞 短期刺激 細胞増殖能 細胞分化能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

象牙質・歯髄複合体は自己修復能を有しており、う蝕、磨耗、咬耗、支台歯形成などの歯の損傷時には歯髄保護のために象牙質の修復が起きることが知られている。すなわち、象牙質におよぶ歯の損傷は炎症反応を惹起し、炎症性細胞から炎症性サイトカインやケモカインが放出され、それらの刺激により既存の象牙芽細胞が再活性化され象牙質の再生が生じる。一方、歯髄では、歯髄内に存在する前駆細胞や歯髄幹細胞が活性化され、新たに象牙芽細胞に分化し象牙質の再生が生じると考えられているが、これらの現象の生物学的メカニズムは完全には解明されていない。

創傷治癒過程では、炎症性サイトカインの1つである TNF- α は損傷の局所において初期の段階で発現し、さまざまな成長因子やサイトカインの発現の誘導や、細胞の遊走を促進し組織再生に関与している (Glass et al., PNAS 2011)。研究代表者の研究室では、マウス露髄モデルを作成し、前駆細胞や歯髄幹細胞が露髄刺激により誘導されることを間葉系幹細胞のマーカーである CD146 の免疫染色にて確認した (Ueda et al, Stem Cell Res Thera 2014)。また、炎症刺激が幹細胞に与える影響を検討するため、*in vitro*において、歯髄細胞に TNF- α を作用させた。歯髄細胞が未分化な細胞へ誘導された結果、多分化能を有する細胞の比率が上昇するという、大変興味深い結果を得た。このことは、培養ヒト歯髄細胞において TNF- α は間葉系幹細胞の性質を保持した、より多分化能の高い細胞の比率を上昇させる可能性(歯髄細胞のリプログラミング効果)があることを示している。

2. 研究の目的

本研究で歯髄細胞に TNF- α を投与することによりリプログラミング(幹細胞化)することを応用し、炎症性歯髄における幹細胞化の効果を組織学的に検討する。将来的には歯髄組織の修復、回復に効果的な生体材料、さらに象牙質におけるう蝕を抑制する生体材料の開発を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

歯髄細胞に TNF- α を投与することにより幹細胞化することを応用し、炎症性歯髄における幹細胞化の効果を組織学的に検討する。将来的には歯髄組織の修復、回復に効果的な生体材料、さらに象牙質におけるう蝕を抑制する生体材料の開発を行うことを目的としている。

ラット長管骨から骨髄由来細胞(BMSC)を採取し、一方を「コントロール群」として通常通りに培養し、他方は60%コンフルエント時にリコンビナント TNF- α (1~100ng/mL)を添加し、2日間培養した後、TNF- α を培地中から完全に除去するため継代培養を行い、「TNF- α 刺激群」とした。

実験1: rTNF- α 短期刺激による幹細胞特性への影響

2日間の rTNF- α 刺激の後、継代し7日間培養を行い、Quantitative real-time PCR および蛍光免疫染色にて幹細胞マーカーとして Nanog と Oct4 の発現を検討した。

実験2: rTNF- α 刺激が細胞の形態および増殖能に与える影響

2日間の rTNF- α 刺激後に継代した細胞を顕微鏡で観察し、細胞形態の評価を行った。また、培養14日後に CFU-F assay にてコロニー形成能、培養1, 3, 5, 7日後に MTS assay にて生細胞数を測定し増殖能の評価を行った。

実験3：TNF- α による多分化能への影響

BMSCを10ng/mlのTNF- α で2日間刺激した後、継代し骨、軟骨、神経、脂肪の各種分化誘導培地にて7日間培養を行い、Quantitative real-time PCRを行った。各種マーカー遺伝子として骨はOcn, Runx、軟骨はCol2a1、Aggrecan、神経はGfap, Tuj1、脂肪はAP2, Ppar- γ を用いた。

実験4：骨分化の長期観察

骨形成マーカーの一つであるアルカリフォスファターゼ(ALP)の活性を検出するため、WakoのLabAssay™ ALPを用いた。これまでの実験と同様にBMSCを10ng/mlのTNF- α で2日間刺激した後、継代し3, 5, 7日後にALPアッセイを行った。また、培養7, 14, 21日目にアリザリンレッド染色を行い、カルシウム沈着により石灰化した骨結節を染色した。

4. 研究成果

実験1：rTNF- α 短期刺激による幹細胞特性への影響

Quantitative real-time PCRにより、幹細胞マーカーのOCT4

とNanogの遺伝子発現について検討した(図1)。グラフの棒は左からコントロール群、rTNF- α 1、10、50、100ng/mlの各濃度での刺激群である(図1)。10ng/mlによるrTNF- α 刺激によって、コントロール群および他の濃度の刺激群と比較してOCT4、Nanogともに遺伝子発現が有意に上昇した。

次に、NANOGとOCT4の発現について蛍光免疫染色にて検討した(図2、3)。コントロール群と比較して、rTNF- α 10ng/mlによる刺激群では単位面積当たりの陽性細胞の数が有意に増加しました(図2)。OCT4においてもコントロール群と比較して、rTNF- α 10ng/mlによる刺激群では単位面積当たりの陽性細胞の数が有意に増加した(図3)。

実験2：rTNF- α 刺激が細胞の形態および増殖能に与える影響

図1. 幹細胞マーカーの遺伝子発現

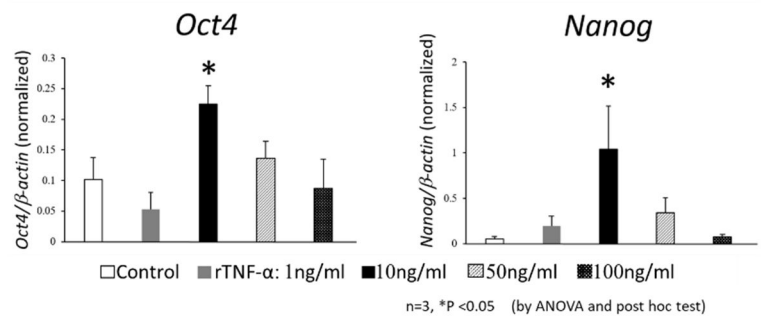


図2 Nanog遺伝子の免疫組織学的染色

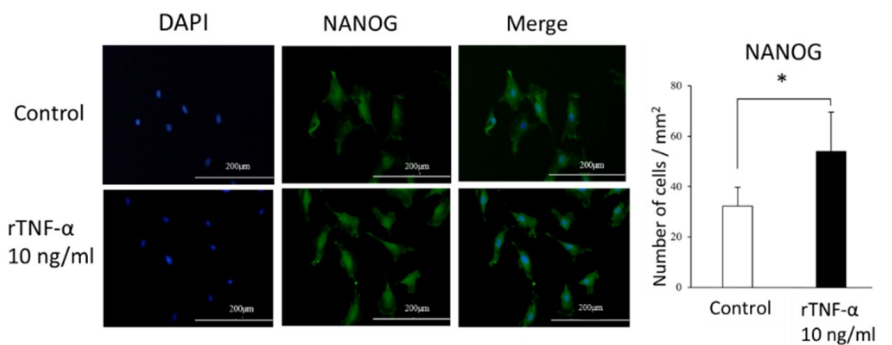


図3 OCT4遺伝子の免疫組織学的染色

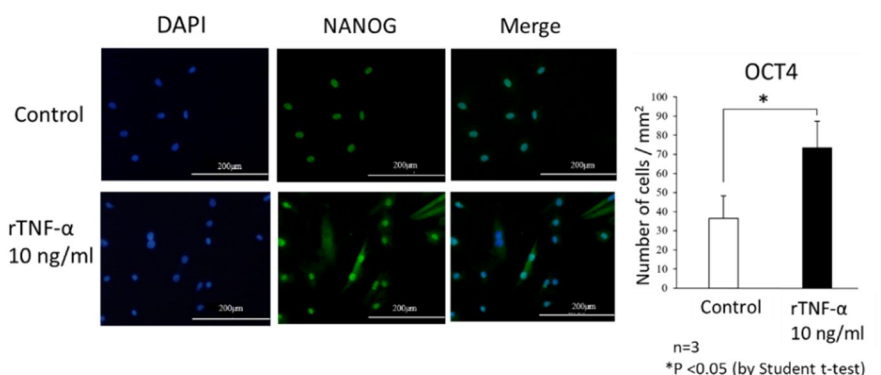
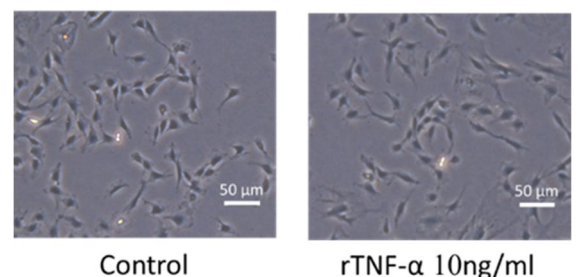


図4 BMSCの細胞形態



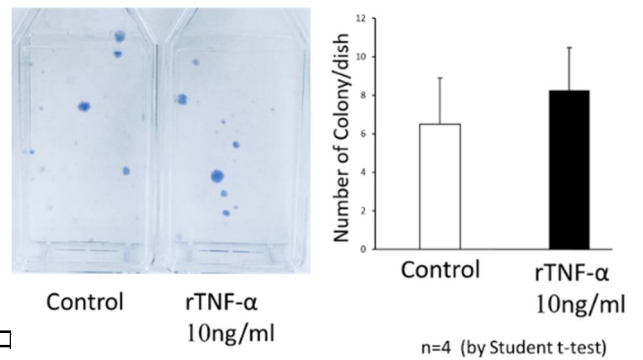
Control

rTNF- α 10ng/ml

BMSCの細胞形態は、コントロール群、rTNF-10ng/ml 刺激群共に紡錘形の細胞形態を示し、rTNF-刺激による細胞形態への影響は認めなかった(図4)。

CFU-F assayは、rTNF-による刺激二日後に、フラスコあたりに100個の濃度で播種し、14日間培養を行った。50個以上の細胞数から形成されたコロニー数を計測し、コロニー形成能の評価とした。コントロール群、rTNF-10ng/ml 刺激群の間に形成されたコロニー数に有意差はなかった(図5)。

図5 CFU-F assay



MTS assayは、1~100ng/mlの各濃度でのrTNF-刺激を行った後、二日後に継代を行い、7日間培養した。

培養1, 3, 5, 7日目にMTS assayにより生細胞数の測定を行った。グラフは左からコントロール群、rTNF-1, 10, 50, 100ng/mlの各濃度での刺激群を示しており、

各日程においてコントロール群、1ng/ml、10ng/mlでの刺激群の間に生細胞数の差はなかったが、3日目以降、50ng/ml、100ng/ml刺激群において、他群と比較して生細胞数は有意に低い値を示した(図6)。

図6 MTS assay

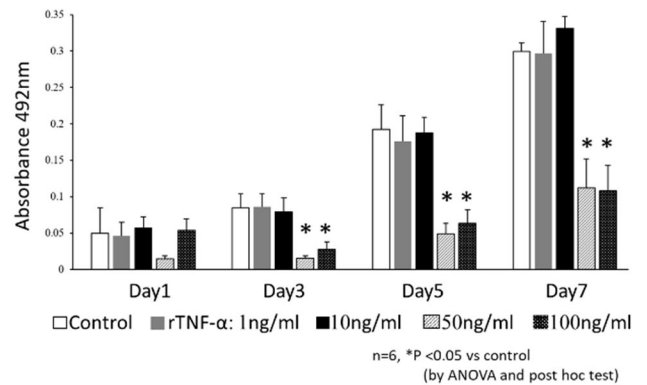
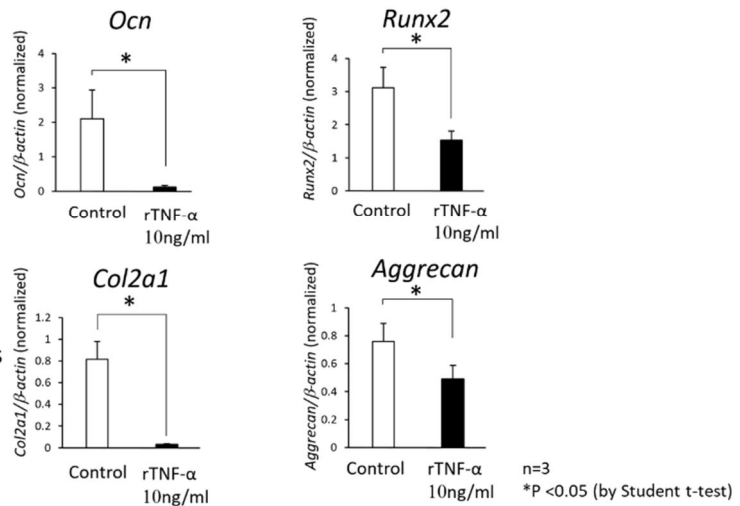


図7 骨細胞、軟骨細胞マーカー遺伝子の定量的RT-PCR

実験3: TNF-による多分化能への影響

TNF-による多分化能への影響を検討するため、Quantitative real-time PCRを行った。BMSCを10ng/mlのTNF-で2日間刺激した後、継代し、骨、軟骨、神経、脂肪の各種分化誘導培地にて7日

Chondrocytes



間培養を行い、実験に用いた。各種マーカー遺伝子として骨はOcn、Runx、軟骨はCol2a1、Aggrecan、神経はGfap、Tuj1、脂肪はAP2、Ppar- γ を用いた。

図7の上段が骨のマーカーであるOcn、Runx、下段が軟骨マーカーであるCol2a1、Aggrecanで、骨、軟骨のいずれのマーカー遺伝子の発現においても、コントロール群と比較して10ng/ml rTNF-刺激群では有意に低い値が示された。

図8の上段が神経のマーカー遺伝子であるGfap、Tuj1、下段が脂肪のマーカー遺伝子であるAP2、Ppar- γ で、神経のマーカー遺伝子の発現においてはコントロール群と比較して10ng/ml rTNF-刺激群では有意に低い値を示したが、脂肪のマーカー遺伝子については両群の間に差は認めなかった。

実験4：骨分化の長期観察

ALP アッセイの結果より、コントロール群と10ng/ml rTNF- 刺激群において、培養3日目のALP活性について差は認めなかったが、5日目、7日目においては刺激群のほうが有意に低い値を示した(図9)。

アリザリンレッド染色において、上段がコントロール群、下段がrTNF- 10ng/mlでの刺激群で、赤く染まっているのはカルシウムが沈着した骨結節を示しており、14日、21日目の段階ではコントロール群と比較して刺激群では染色性が抑制されているが、その後28日目の段階では刺激群の石灰化が進み、コントロール群と比較して同程度以上まで回復している様子が観察された(図10)。

以上の結果より、BMSCに対してrTNF-短期刺激を行うことで、幹細胞特性の発現を有意に促進することが示された。また、段階的に濃度を変え、rTNF- 刺激を行ったところ、他の濃度と比較して10ng/mlによる刺激で最も幹細胞マーカーが上昇を示したことより、rTNF- 刺激には至適濃度が存在することが示唆された。10ng/mlのrTNF- 刺激ではBMSCの細胞形態および増殖能について影響を与えないことが示された。rTNF- 刺激群において、骨、軟骨、神経のマーカー遺伝子の発現が抑制されたこと、骨分化において経時的な観察では一時的に分化が抑制されその後同程度以上まで回復したことから、rTNF- 短期刺激によってBMSCの分化が一時的に遅延することが示唆された。まとめるとTNF- による短期刺激によって、BMSCの幹細胞の性質を持つ細胞の割合が増加し、骨分化においては一時的に遅延する可能性が示唆された。

図8 神経細胞、脂肪細胞マーカー遺伝子の定量的RT-PCR

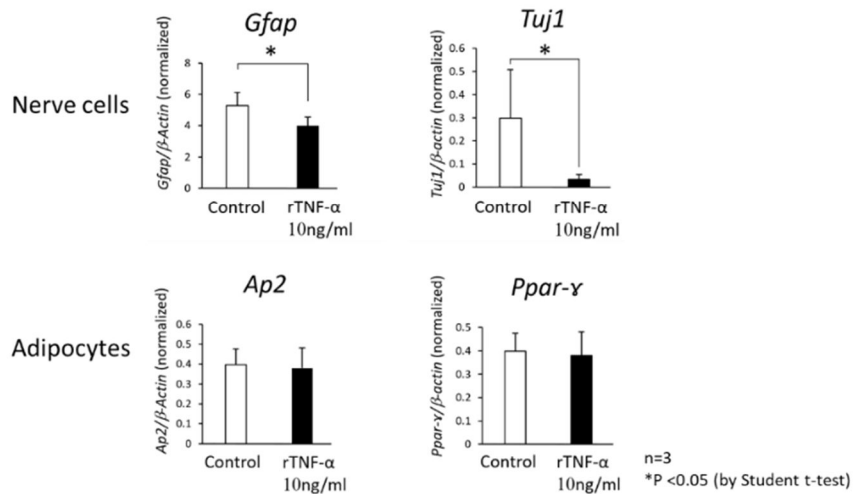


図9 ALP assay

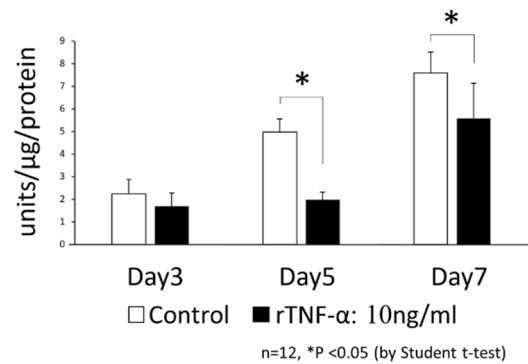
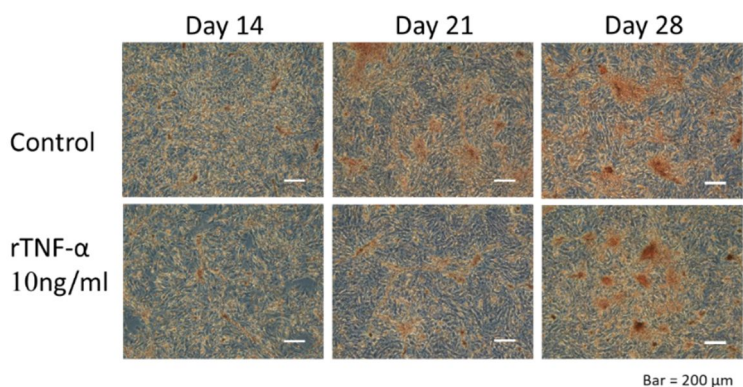


図10 アリザリンレッド染色



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------