

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592000

研究課題名（和文）スフィンゴシンーリン酸を用いた骨培養効率化

研究課題名（英文） Functional roles of sphingosine-1-phosphate in mesenchymal stem cell migration and proliferation and bone metabolism

研究代表者

佐藤 智也（TOMOYA SATO）

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：10445132

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、間葉系幹細胞から骨形成する際に、細胞レベルで S1P が具体的にどのように機能しているかを明らかにすることである。

RT-PCR により、ヒト間葉系幹細胞において S1PR1 受容体が発現されていることを明らかにした。S1P 投与により間葉系幹細胞の細胞増殖が促進されることを確認した。また細胞遊走は S1P の濃度依存性に促進された。間葉系幹細胞を骨芽細胞分化培地で培養し、培地に S1P を添加した群、しない群を比較した。骨芽細胞への分化は S1P を添加した群、添加しない群の間に差はなかった。

研究成果の概要（英文）：

During bone formation, osteoblasts are derived from mesenchymal stem cells (MSCs) present in the bone marrow. Recent studies have indicated that sphingosine-1-phosphate (S1P) plays a vital role in various tissues; however, its role in bone metabolism remains unclear. Here, we demonstrated that S1P induces proliferation and migration of MSCs.

We detected the mRNA expression of S1P receptor 1 (S1PR1) via reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and determined whether S1P induces proliferation of MSCs. Treatment of MSCs with S1P for 24 h stimulated a dose-dependent increase in DNA synthesis. These data demonstrated that S1P is mitogenic to MSCs in vitro.

S1P produced by osteoclast precursors during differentiation may function in a paracrine manner to MSCs. To explore this possibility, we examined the chemotactic effects of S1P on MSCs. S1P increased chemotaxis of MSCs; however, the differentiation of MSC to osteoblasts was not affected by S1P. These results suggest that S1P plays a possible role in regulating the proliferation and migration of MSCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：間葉系幹細胞、骨代謝、骨芽細胞、再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍切除や外傷により大きな骨欠損を生じた場合、健常部からの自家骨移植が標準的治療のひとつとして広く行われている。この方法は形状や強度に問題を生じることがあるのに加え、骨を採取する健常部への侵襲も大きい。この問題を解決すべく、近年ティッシュエンジニアリングにより人工骨や骨再生誘導などの研究が進められている。現在、幹細胞からの骨形成を促す強力な因子として bone morphogenetic protein(BMP)-2 の存在が知られており、これを用いた骨形成の誘導が試みられている。しかし、現時点において大きな骨欠損へ応用するまでには至っていない。大きな骨組織を得られない原因はそのひとつが骨形成における「シグナル」のメカニズムに未解明の点が多いことと考えられ、さらに一步踏み込んだ知見を得ることが必要不可欠である

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3点である。

- (1) 間葉系幹細胞から骨形成する際に、細胞レベルで S1P が具体的にどのように機能しているかを明らかにすること。
- (2) S1P の生体内での骨形成にどのように機能するか *in vivo* で解析すること
- (3) S1P を使用し、より効率的に大量の骨組織の培養を行う系を確立することである。

## 3. 研究の方法

スフィンゴシン 1 リン酸 (以下 S1P) の受容体発現の解析: S1P の受容体には S1PR1-5 の 5 種類あることが知られており、RT-PCR, ウェスタンブロット法によりどの受容体が発現しているか調べた。

S1P による細胞増殖: Cell proliferation assay kit を用いて S1P が間葉系幹細胞の細胞増殖を促すか調べた。またリンパ球など他の細胞においては、S1P 受容体の下流に p43/44MAP キナーゼ、PI3K/Akt、Ras/ERK、NF- $\kappa$ B などのシグナルがあり、これらを介して細胞の分化、増殖、アポトーシス抑制、細胞遊走などを生じることが知られている。これらの各シグナルの阻害剤を用い、間葉系幹細胞における S1P 受容体の下流のシグナル伝達を解析する。さらに細胞の分化や増殖などがどのシグナルを介して生じているかを解析する。また、複数の受容体サブタイプが発現していた場合には、それぞれのサブタイプについて個別に解析を行い、受容体がそれぞれどの機能を担うか解析した。

S1P による細胞遊走: S1P は化学遊走因子としての機能を持ち、T リンパ球などの細胞が S1P の濃度勾配にしたがって移動することが知られている (Hla T: Science, 309: 1682-1683, 2005)。この機能が間葉系幹細胞に対しても働くか検証するため、S1P 濃度が段階的に異なる培地を準備し、間葉系幹細胞の chemotaxis が濃度依存性になっているか、Cell migration assay kit を用いて調べた。

S1P は間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促進するか: デキザメサゾン・グリセロリン酸・ビタミン C を含んだ骨芽細胞分化培地で培養した。培地に S1P を添加した群、しない群を比較した。

S1P による間葉系幹細胞の遺伝子発現の網羅的解析: S1P を添加した培地と添加しない培地で間葉系幹細胞を 48 時間培養し、それぞれの細胞から total RNA を採取し DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行った。

## 4. 研究成果

・間葉系幹細胞が S1PR1 受容体の mRNA を発現していることを示した。S1PR2、S1PR3、S1PR4、S1PR5 の 4 種類の受容体はいずれも検出されなかった。

・S1P 投与により間葉系幹細胞の細胞増殖が促進されることを確認した。下流シグナルについて、43/44MAPK 経路について、選択的 MEK 阻害剤 U-0126、PI3K/Akt 経路について選択的 PI3K 阻害剤 wortmannin を添加して S1P による細胞増殖作用が抑制されるかを解析した。いずれの阻害剤でも細胞増殖抑制機能は明らかでなかった。

・間葉系幹細胞の細胞遊走は S1P の濃度依存性に促進された。骨芽細胞への分化は石灰化染色、アルカリフォスファターゼ染色で確認した。S1P を添加した群、添加しない群の間で染色の結果に差はなかった。

・S1P による間葉系幹細胞の遺伝子発現の網羅的解析: 現在データ解析を行っている。

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9件)

1. Sato T, Ichioka S: Pressure ulcer occurrence following the great East Japan Earthquake: observations from a disaster medical assistance team. 査読有、Ostomy Wound Manage. 2012;58(4):70-5.

2. Sano H, Ichioka S, Kouraba S, Minamimura A, Sato T, Sekiya N, Yasuta M: Treatment of venous ulcers with bone marrow-impregnated collagen matrix. 査読有、J Plast Surg Hand Surg. 2012;46(1):37-44.

3. Sato T, Ichioka S: How should we manage multiple skin ulcers associated with calciphylaxis? 査読有、J Dermatol. 2012 ;39(11):966-968.

4. Takahashi N, Andoh T, Iseki H, Sato T, Ichioka S, Takeda A: Reconstruction system of rat lymphatic tracts after total iliac lymphadenectomy. 査読有、Hepatogastroenterology. 2011;58(109):1087-1094.

5. Sato T, Hasegawa H, Sugasawa M, Yasuda M, Morita K, Nakahira M, Nakatsuka T: Free jejunal transfer for a 15-year-old girl with synovial sarcoma of the hypopharynx. 査読有、J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2011;64(8):1100-1103.

6. 佐藤智也、市岡 滋: 局所陰圧閉鎖療法を用いた静脈うっ滞性皮膚潰瘍の治療戦略. 査読有、静脈学 in press

7. 佐藤智也、石川昌一、寺部雄太、田嶋沙織、栗原 健、市岡 滋: 外科的デブリードマン直後の創に対する銀含有アルギン酸カルシウムドレッシングの細菌制御効果. 査読有、日本褥瘡学会誌 in press

8. 佐藤智也、市岡 滋、工藤 聡、土屋沙緒、中塚貴志: 高気圧酸素療法による下肢救済 血行再建適応外症例に対する補助療法としての有用性 査読有、日形会誌 2011; 31(7): 442-448

9. 佐藤智也、市岡 滋: 皮膚疾患治療のポイント 局所陰圧閉鎖療法. 査読無、臨床

皮膚科 2011; 65(5):121-124

[学会発表](計11件)

1. Sato T, Ichioka S: Silver-impregnated Calcium Alginate Dressings Reduce the Bacterial Burden in Wounds after Surgical Debridement. The 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies. 2012年9月2日 PACIFICO YOKOHAMA (横浜市)

2. Sato T, Ichioka S: Free Flap Reconstruction for Limb Salvage. The 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies. 2012年9月4日 PACIFICO YOKOHAMA (横浜市)

3. Sato T, Ichioka S: Management of Pressure Ulcers during the Great East Japan Earthquake. The American Professional Wound Care Association APWCA2012 National Clinical Conference 2012年3月30日 Orlando, Florida, USA.

4. 佐藤智也、市岡 滋  
東日本大震災被災地における形成外科医の役割. 第55回日本形成外科学会総会学術集会 2012年4月11日 ホテルニューオータニ (千代田区)

5. 佐藤智也、市岡 滋: 局所陰圧閉鎖療法を用いた静脈鬱滞性皮膚潰瘍の治療戦略. 第32回日本静脈学会総会 2012年6月7日 大宮ソニックシティ (さいたま市)

6. 佐藤智也、市岡 滋: 細菌制御を考慮したデブリードマン後の創傷管理. 第4回日本下肢救済・足病学会学術集会 2012年7月14日 ウィンクあいち (名古屋市)

7. 佐藤智也、寺部 雄太、栗原 健、田嶋沙織、市岡 滋: デブリードマン直後の創に対する銀含有アルギン酸カルシウムドレッシングの細菌制御効果. 第4回日本創傷外科学会総会・学術集会 2012年7月26日 ホテルニューオータニ博多 (福岡市)

8. 廣川 詠子、佐藤 智也、横川 秀樹、市岡 滋: ラットに作成した熱傷モデルにおけるハイドロサージェリーと外科的デブリードマンの比較検討. 第4回日本創傷外科学会総会・学術集会 2012年7月26日 ホテルニューオータニ博多 (福岡市)

9. 佐藤智也、市岡 滋: 肉芽組織の細菌量と褥瘡再建手術後の感染率の関係. 第42回

日本創傷治癒学会 2012年12月2日 かでる  
2・7(札幌市)

10. 佐藤智也、市岡 滋: 遊離組織移植による下肢難治性潰瘍の再建. 第39回日本マイクロサージャリ学会学術集会 2012年12月7日 北九州国際会議場(北九州市)

11. 佐藤智也、市岡 滋: 難治性潰瘍に対する高気圧酸素療法の有効性. 第54回日本形成外科学会総会・学術集会 2011年4月15日 あわぎんホール(徳島市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

氏名 佐藤 智也(TOMOYA SATO)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10445132