

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592896

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の口腔顎顔面へのホーミング機構の解明とその増殖・分化制御ニッチの同定

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms underlying homing and mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into oral and maxillofacial tissues

研究代表者

石崎 明 (ISHISAKI, AKIRA)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：20356439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)が血行性に口腔・顎顔面領域の各組織内にホーミングするための分子機構を解明するために実施された。まず、開発された強蛍光発現トランスジェニックマウスよりMSCを採取してin vitroで増殖させることに成功した。次に、増殖したMSCを免疫不全マウスに移植して体内動態を追跡した。組織透過性が従来の緑色蛍光より高いとされる赤色蛍光を発現するMSCの移植後の体内動態について、リアルタイムin vivoイメージングシステムにより蛍光トレース観察することにより成功した。現在、移植後のMSCを組織切片から採取し、MSC増殖・分化メカニズムの解析を実施中である。

研究成果の概要(英文)：An aim of this study is to elucidate how bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) home and mobilize into oral and maxillofacial tissues at molecular level. We succeeded in establishment of in vitro culture system optimized for proliferation of BM-MSCs. Then, we tried to detect in vivo kinetics of transplanted BM-MSCs by tracing excited red fluorescence. Then, we succeeded in real time imaging of transplanted BM-MSCs by using IVIS. We are investigating molecular mechanisms underlying how transplanted BM-MSCs home and mobilize into specific tissues by collecting and investigating fluorescent cells from the histological sections.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 歯科応用工学・再生歯学

キーワード：間葉系幹細胞 ホーミング

1. 研究開始当初の背景:

口腔・顎・顔面領域における骨、軟骨、歯根膜、神経あるいは筋肉などの組織修復・再建には、間葉系幹細胞 (以下 MSC) の局所への動員とこの細胞による組織再生作用が不可欠である。近年、口腔・顎顔面領域組織中には幹細胞様機能を有する細胞が存在するという報告が複数見受けられる (総説参照: Huang, G. T. et al., J Dent Res, 88: 792-806, 2009)。我々も、これまでに歯根膜由来未分化間葉系細胞が骨組織だけでなく血管構造を構築することを報告して、口腔由来幹細胞様細胞の多分化能力 (pluripotency) について明らかにし、その組織再生能力の高さを証明してきた (Ibi, M., et al., Arch. Oral Biol., 52: 1002-1008, 2007; Shirai, K. et al., J. Periodontal Res., 44: 238-247, 2009; Okubo, N., et al., J. Vasc. Res., 47: 369-383, 2010)。しかしながら、我々の報告も含め、これまでの報告では、口腔・顎・顔面領域の組織中から採取した細胞集団から fluorescence-activated cell sorting (FACS) などを利用して選別された MSC 自体の増殖・分化能力を探索しているにすぎず、MSC が各口腔・顎・顔面領域の組織中でどのような位置に存在し、MSC 周囲の微小環境の影響により、その走化性、増殖・分化能力がどのような分子メカニズムで制御されているのかについては不明のままである。

2. 研究の目的:

傷害組織に集積する MSC は骨髄由来と考えられており、血流を介して各傷害組織に到達した後、その場で必要な細胞を供給するために増殖・分化して組織修復や再生のために働くと考えられている。しかしながら、これまでに骨髄由来 MSC (以下 BMMSC) が、血行性に各臓器に運ばれて組織修復や再生に働くことが実験的に確認された事例は、肺、心臓あるいは肝臓などの血流量が多い臓器のみである (Zhao, T., et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 296: H976-986, 2009; Kyriakou, C., et al., Haematologica, 93: 1457-1465, 2008)。口腔・顎・顔面領域の組織中のどの部位に骨髄由来 MSC がたどり着いて傷害組織修復・再生や生理的な組織のリモデリングに働くのかは現在のところ全く不明であるが、この BMMSC の集積 (ホーミング) 部位が明らかになれば、BMMSC の口腔・顎・顔面各組織へのホーミング機構ならびにその周囲の様々な微小環境による増殖・分化制御機構を解明する手がかりになることは間違いない。

これらの研究により、BMMSC による口腔・顎・顔面領域の組織再生能力を最大限に高めるための BMMSC 周囲微小環境について解明したい。

3. 研究の方法:

(1) 骨髄由来間葉系幹細胞 (BMMSC) のホーミング先組織の特定:

ホーミング先組織の特定:

新たに開発された強蛍光色発現 TG マウスの下肢脛骨および大腿骨骨髄から、骨髄細胞を採取後、間葉系幹細胞増殖培地を用いて、BMMSC を 2 次元培養する。付着性に増殖した細胞から複数の間葉系幹細胞マーカー陽性細胞を選別して以後の研究に用いる。

実験には初代培養の BMMSC を用いる予定であるが、heterogeneous な細胞集団では BMMSC の体内動態が実験ごとに異なり、再現性が得られないことも予想される。また、初代培養による継代を重ねることで、幹細胞としての性質を失ってしまうことも予想される。これらの場合には、幹細胞マーカー陽性蛍光強発現 BMMSC を株化 (HPV6, E7, hTERT などの不死化遺伝子導入による) してから以後の実験に使用する。

BMMSC を免疫不全マウスに移植する。その後、リアルタイム *in vivo* イメージングシステム (IVIS) により生体内で BMMSC を追跡観察して到達組織を確認後、標的組織の組織切片を作製して BMMSC のホーミングを確認する。

(2) 各組織への BMMSC ホーミング機構の解明:

BMMSC ホーミング先組織の組織切片を作成し、BMMSC を蛍光顕微鏡下で確認する。加えて、H-E 染色などの一般的な組織染色法を同切片に施すことにより、組織中のホーミング部位を形態学的に明らかとする。加えて、組織切片よりホーミングした BMMSC を回収し、ホーミング先組織により特異的に発現が亢進している走化性因子受容体や細胞接着因子等の発現解析を行い、BMMSC の口腔・顎顔面領域ホーミング誘導遺伝子を特定する。

なお、各組織にホーミングした BMMSC の遺伝子発現の比較だけでは目的のホーミング誘導分子を同定することが困難な場合、BMMSC 内の各タンパク質リン酸化の程度の違いについても網羅的に比較検討して、ホーミングに関与する細胞内シグナル伝達経路を明らかにすることにより、ホーミング誘導分子の同定を目指す。

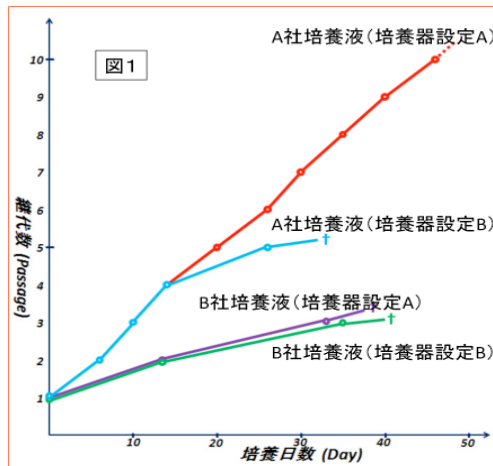
また、各組織に BMMSC がホーミングするためには、それを手助けするためのニッチ細胞が必要である。BMMSC の各ホーミング先組織でのニッチ細胞はそれぞれ異なるとされているが、その全てが同定された訳ではない。BMMSC ホーミング先組織の組織切片を作成し、そこから、蛍光を発する BMMSC の周囲に存在する細胞を回収する。この細胞で発現が亢進している走化性因子や細胞接着因子等の発現解析を行い、ニッチ細胞による BMMSC のホーミング誘導機構の解明を目指す。

4. 研究成果:

(1) 蛍光強発現 TG マウス由来 BMMSC の培養法の確立:

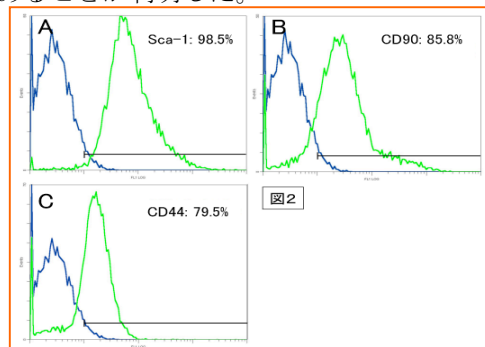
3~4 週齢の蛍光強発現 TG マウスの脛骨あるいは大腿骨より、骨髄組織を採取後、市

販の数種のMSC増殖用培地にて増殖させたところ、培養液の種類によりその増殖効率が著しく異なることが判明した(図1)。また、培養に用いるCO₂インキュベーターの設定条件により、その増殖効率が大きく変化することが判明した。

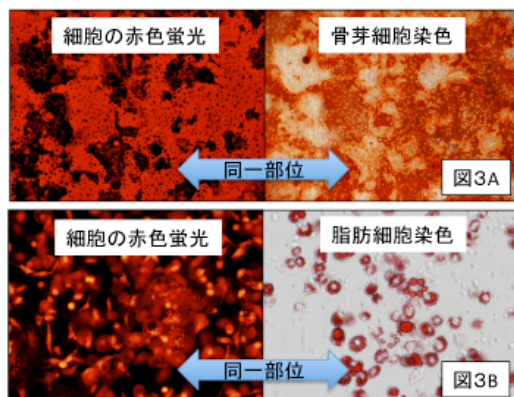


(2) 強赤色蛍光発現 BMMSC の幹細胞マーカーの発現と多分化能力について:

上記(1)で確立したMSC培養方法により継代数2回目の細胞のMSCマーカーの発現をフローサイトメトリーにより観察したところ、Sca-1(図2A)、CD90(図2B)、ならびにCD44(図2C)の発現がいずれも高い細胞集団であることが判明した。



さらに、この細胞が骨芽細胞(図3A)ならびに脂肪細胞(図3B)への多分化能力を有することが判明した。

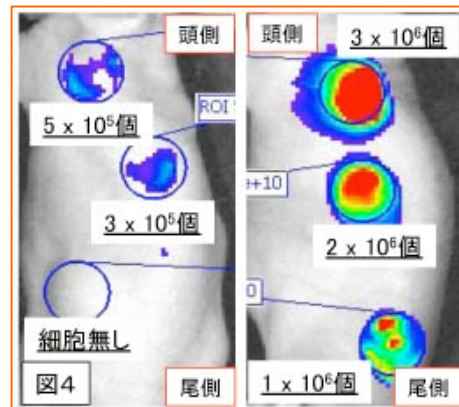


以上の結果から、我々が(1)で確立した細胞培養法により、骨髓組織からマウス骨髓由来赤色強蛍光発現MSCを増殖させることに

成功した。

(3) 強蛍光発現 BMMSC の移植後の *in vivo* リアルタイム観察について:

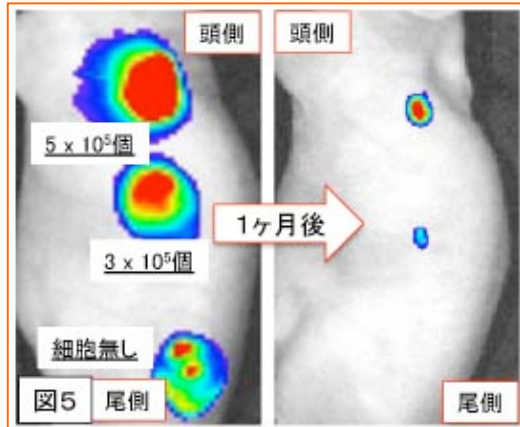
上記(1)と(2)の方法により増殖させた強赤色蛍光発現 BMMSC を免疫不全マウスに静脈注射し、体内動態を追うべく IVIS によりリアルタイム観察を試みるも、IVIS による全身に血行性に飛散する BMMSC の集積を捉える事は困難であった。このため、まずは、この細胞をマウス皮下に移植し、この細胞がどのくらいの数で集積すれば、リアルタイム観察できるかどうかについて調査した。BMMSC から発せられる蛍光は、赤色と緑色とを比較すると赤色蛍光の方が高い体内組織透過性を示すこと(データは示さず)に加え、 10^5 個以上の細胞が集積しなければ、体外から蛍光シグナルを検知することが難しいことが判明した(図4)。この結果より、血行性に



体内深部少数でホーミングしている BMMSC を可視化するためには、組織透過性の高い蛍光を発する BMMSC を開発・作製することが必須であることが判明した。このため、現在、組織透過性の高い近赤外蛍光を発する TG マウスの作製を連携研究者らにより開始している。また、励起波長として近赤外蛍光を発するタンパク質を発現するベクターの作製も進めており、既存の BMMSC 株細胞にこの発現ベクターを導入後、マウス血管内に注入することで BMMSC のホーミング先の特定をリアルタイムに可能にしたい。

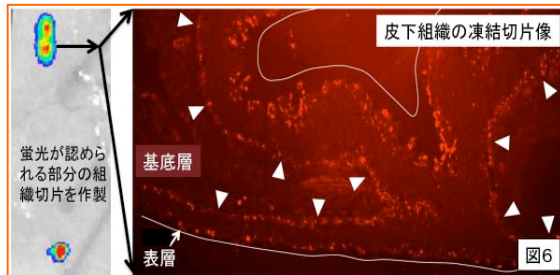
このように、経血管系からの強赤色蛍光 BMMSC の体内深部へのホーミングの観察は、さらなる実験系の開発が必要である一方、皮下などの体内各所へのまとまった細胞数での移植後の BMMSC 動態観察は図4のごとく可能であると考えられた。このため、我々は、図4のごとく皮下に埋入させた BMMSC がその後どのような動態を示すかについて、移植後1ヶ月後の様子について IVIS を用いたリアルタイム観察を試みた。すると、図5に示される通りに、その検知される蛍光強度は低下しているものの、蛍光を発する細胞の存在を確認することができた。この結果から、我々が作製した赤色蛍光強発現マウス由来 BMMSC の体表近くへの移植後の体内動態について、リアルタイムに追跡可能であることが判明

した。



(4) 移植後 BMMSC の組織内分布について :

移植細胞の増殖・分化機構の解明を目的として、移植部位(移植後1ヶ月)の組織切片を作製して観察した。図6は、その凍結切片を蛍光顕微鏡で観察した像である。この結果より、1ヶ月前に移植した BMMSC (赤色蛍光を発する) は、皮下組織の比較的特徴的な部位に集積して層を形成しながら広く分布していることが判明した(矢尻部分)。この結



果より、凍結切片から移植後 BMMSC を選択的に抽出する研究基盤が確立できたと判断された。しかし、問題点として、形態的な組織観察を可能とする一般的な組織染色や、特徴的な細胞の性質を判断する抗体染色の過程で有機溶媒を本切片に作用させると、赤色蛍光タンパク室が溶出してしまふことが明らかとなった。このため、これらの切片上では赤色蛍光が検知できないくらいに現弱してしまい、固定切片上から蛍光を頼りにして BMMSC を削出して採取することが困難であることが判明した。このため、隣接する連続切片を作製後、蛍光観察用(組織採取用)と組織染色用を分けて用意する方法で、移植後の BMMSC の増殖・分化制御機構を解析中である。また、これまでは、初代培養 BMMSC を移植実験の度ごとに TG マウスより採取して用いる方法を実施していたが、実験間での MSC マーカーの発現にばらつきが認められていた。このため、安定した幹細胞マーカー発現と増殖・分化能力を備えた強蛍光発現 BMMSC の細胞株を作製する実験を実施しており、複数のクローン細胞集団を得ている。現在、各クローン細胞の幹細胞マーカーの発現と多分化能力について検証中であり、今後の本研究推進のために活用したい。

一方、一般的に、BMMSC をはじめとした臓器由来幹細胞を移植する際や *in vitro* 実験に用いる際には、その必要数を確保するため、*in vitro* 細胞培養系を利用して細胞増殖させてから用いるが、細胞分裂ごとにその増殖・分化能力が低下してしまうことが明らかとされている。このため、我々は、MSC の増殖・分化に影響を与える分子についても調査を行い、我々の研究の基盤とされる BMMSC の培養技術の向上を行った。その結果、線維芽細胞増殖因子、上皮成長因子などの液性因子には、MSC の増殖を促進すると共にこの細胞を分化させない作用があることを明らかとした。また、トランスフォーミング成長因子- β (TGF- β) は、この細胞の分化を促進することが明らかとされた。これらの研究成果により、本研究に用いる BMMSC の自己複製能力と多分化能力の維持のために有用な情報が多数得られた。

以上の研究成果により、強蛍光発現 BMMSC の自己複製能力と多分化能力の維持に働く細胞培養技術が確立された。加えて、この細胞を利用した BMMSC ホーミング機構を解析するための *in vivo* 蛍光観察研究の基盤を整えることができた。現在、BMMSC ホーミング部位より細胞を採取して、この細胞のホーミング機構や増殖・分化調節機構について解析を進めているところである。今後も本研究活動を継続して実施し、BMMSC による口腔・顎・顔面領域の組織再生能力を最大限に高めるための BMMSC の周囲微小環境についての調査を続けたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計12件)

- ① Aomatsu E, Takahashi N, Sawada S, Okubo N, Hasegawa T, Taira M, Miura H, Ishisaki A, Chosa N. Novel SCRG1/BST1 axis regulates self-renewal, migration, and osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.*, 2014 Jan 13;4:3652. doi: 10.1038/srep03652. 査読有
- ② Yokota J, Chosa N, Sawada S, Okubo N, Takahashi N, Hasegawa T, Kondo H, Ishisaki A. PDGF-induced PI3K-mediated signal enhances TGF- β -induced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in the TGF- β -activated MEK-dependent manner. *Int. J. Mol. Med.*, 33: 534-542, 2013. 査読有
- ③ Kimura H, Okubo N, Chosa N, Kyakumoto S, Kamo M, Miura H, Ishisaki A. EGF positively regulates the proliferation and migration, and negatively regulates the myofibroblast differentiation of periodontal ligament-derived endothelial progenitor cells through MEK/ERK- and JNK-dependent signals. *Cell. Physiol. Biochem.*, 32: 899-914, 2013. 査読有
- ④ Sawada S, Chosa N, Ishisaki A, Naruishi K. Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1 β and IL-6. *Biomed. Res.*, 43:31-40, 2013. 査読有

- ⑤ Takizawa N, Sawada S, Chosa N, Ishisaki A, Naruishi K. Secreted caveolin-1 enhances periodontal inflammation by targeting gingival fibroblasts. *Biomed. Res.*, 43:1-11, 2013. 査読有
- ⑥ Saito D, Kyakumoto S, Chosa N, Ibi M, Takahashi N, Okubo N, Sawada S, Ishisaki A, Kamo M. Transforming growth factor- β 1 induces epithelial-mesenchymal transition and integrin α 3 β 1-mediated cell migration of HSC-4 human squamous cell carcinoma cells through Slug. *J. Biochem.*, 153:303-315, 2013. 査読有
- ⑦ Yoshida M, Okubo N, Chosa N, Hasegawa T, Ibi M, Kamo M, Kyakumoto S, Ishisaki A. TGF- β -operated growth inhibition and translineage commitment into smooth muscle cells of periodontal ligament-derived endothelial progenitor cells through Smad- and p38 MAPK-dependent signals. *Int. J. Biol. Sci.*, 8:1062-1074, 2012. 査読有
- ⑧ Takahashi N, Chosa N, Hasegawa T, Nishihira S, Okubo N, Takahashi M, Sugiyama Y, Tanaka M, Ishisaki A. Dental pulp cells derived from permanent teeth express higher levels of R-cadherin than do deciduous teeth: Implications of the correlation between R-cadherin expression and restriction of multipotency in mesenchymal stem cells. *Arch. Oral Biol.*, 57:44-51, 2012. 査読有
- ⑨ Takahashi M, Okubo N, Chosa N, Takahashi N, Ibi M, Kamo M, Mizuki H, Ishisaki A, Kyakumoto S. Fibroblast growth factor-1-induced ERK1/2 signaling reciprocally regulates proliferation and smooth muscle cell differentiation of ligament-derived endothelial progenitor cell-like cells. *Int. J. Mol. Med.*, 29:357-364, 2012. 査読有
- ⑩ Asakawa T, Chosa N, Yoshimura Y, Asakawa A, Tanaka M, Ishisaki A, Mitome M, Hasegawa T. Fibroblast growth factor 2 inhibits the expression of stromal cell-derived factor 1 α in periodontal ligament cells derived from human permanent teeth in vitro. *Int. J. Mol. Med.*, 29:569-573, 2012. 査読有
- ⑪ 桑島幸紀、大塚正人、石崎明、藤村 朗、赤色蛍光強発現遺伝子導入マウスにおける蛍光発現部位の形態学的検討、*岩手医科大学歯学雑誌*, 37:24-37, 2012. 査読有
- ⑫ 齋藤大嗣、帖佐直幸、客本斉子、高橋典子、大久保直登、衣斐美歩、山口聰、水城春美、石崎明、加茂政晴、ヒト口腔扁平上皮癌細胞における TGF- β による上皮間葉転換に伴う細胞運動性について、*口腔組織培養学会誌*, 21: 23-24, 2011. 査読有

[学会発表] (計 1 2 件)

- ① 青松恵美子、サイトカイン様ペプチド SCRG 1 は間葉系幹細胞の骨ならびに脂肪分化を抑制する、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日、横浜
- ② 木村仁迪、EGF が歯周靭帯由来血管内皮前駆細胞の増殖と筋線維芽細胞分化に与える影響に

ついて、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日、横浜

- ③ 横田潤、複数サイトカインによる同時刺激は間葉系幹細胞の骨分化誘導性を促進する、第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013 年 9 月 22 日、岡山
- ④ 青松恵美子、間葉系幹細胞が分泌する SCRG1 は骨分化を抑制する、第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013 年 9 月 22 日、岡山
- ⑤ 木村仁迪、EGF による PDL 由来 EPC の増殖、分化制御、第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013 年 9 月 22 日、岡山
- ⑥ 古川真司、赤色蛍光強発現 tg マウス唾液腺細胞の蛍光発現に関する研究、第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013 年 9 月 22 日、岡山
- ⑦ 木村仁迪、EGF が歯周靭帯由来血管内皮前駆細胞様細胞の増殖と筋線維芽細胞分化に与える影響について、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡
- ⑧ 吉田茉莉子、歯根膜由来内皮前駆細胞様線維芽細胞における TGF- β 誘導性増殖抑制、平滑筋初期分化への Smad ならびに p38 MAPK 経路の関与、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡
- ⑨ 澤田俊輔、歯肉繊維芽細胞を標的とした新規融合蛋白 IL-1ra-sgp130 の抗炎症効果の検討、日本歯周病学会第 55 回春季学術大会、2012 年 5 月 18 日、札幌
- ⑩ 衣斐美歩、ファイブロサイトに注目した口腔領域疾患発症機構の解明、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡
- ⑪ 齋藤大嗣、ヒト口腔扁平上皮癌細胞における TGF- β による上皮間葉転換について、第 48 回日本口腔組織培養学会学術大会、2011 年 11 月 19 日、浦安
- ⑫ 高橋美香子、歯周靭帯由来線維細胞の増殖と平滑筋分化は FGF で誘導される ERK シグナルにより制御される、第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2011 年 10 月 2 日、岐阜

[図書] (計 2 件)

- ① Hasegawa T, *et al.* Establishment of periodontal ligament cell line derived from human deciduous teeth. *Interface oral health science 2011*, Springer, New York, pp114-116, 2012.
- ② Asakawa T, *et al.* Regulation of SDF-1 expression in periodontal ligament cells derived from human permanent teeth. *Interface oral health science 2011*, Springer, New York, pp107-109, 2012.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

特記事項なし

- 6. 研究組織
- (1) 研究代表者

石崎 明 (ISHISAKI Akira)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：20356439

(2) 研究分担者

近藤尚知 (KONDO Hisatomo)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：70343150

(3) 連携研究者

大塚正人 (OHTSUKA Masato)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：90372945