

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659908

研究課題名(和文)血管性ニッチを応用した徐放型幹細胞療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel cell based regenerative therapy

研究代表者

中村 卓史(Nakamura, Takashi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90585324

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文): 幹細胞を用いた組織再生療法には、幹細胞の維持と再生組織構成細胞の持続的な産生のバランスが非常に重要である。血管内皮細胞は、骨髄組織において造血幹細胞の維持と前駆細胞の産生バランスを保つための微小環境が存在し、血管性ニッチとよばれている。しかしながら、この血管性ニッチが、血管内皮細胞から分泌される様々な因子によって、機能維持されている詳細なメカニズムは不明な点が多い。我々は血管性ニッチにおいても重要な役割を演じていると考えられているWntおよびヘッジホッグシグナルに注目し、未分化間葉細胞における両分子シグナルを解析することにより、効率的な骨芽細胞誘導能を示す新規小分子化合物を発見した。

研究成果の概要(英文): The balance of sustainable production of maintenance and regenerating tissue component cells of stem cells is crucial in the tissue regeneration therapy with stem cells. Vascular endothelial cells, there is microenvironment where keep the production balance and maintain progenitor cells of the hematopoietic stem cells in the bone marrow tissues are called the vascular niche. However, the detail mechanisms of the functional maintenance in vascular niche by various factors secreted from vascular endothelial cells are still not fully understood. We focus on Wnt and Hedgehog signaling which is believed to also play an important role in the vascular niche and analyze both molecular signals in the maintenance of stem cells and cell fate determination in undifferentiated mesenchymal cells. We identified novel small molecules, which promote osteoblastic differentiation in mesenchymal stem cells effectively.

研究分野：医歯薬学

キーワード：幹細胞 組織再生 未分化間葉細胞 小分子化合物 骨芽細胞 ヘッジホッグ 幹細胞ニッチ

1. 研究開始当初の背景

生体内における幹細胞は通常静止状態にあるが、何らかの組織修復が必要な際には、一過性に増殖し、その数を増すことで組織修復に対応する。また増殖した細胞の一部は、再度休止状態を保ち、幹細胞としての機能を維持し、何らかの組織ダメージに備えることになる。

我々は、歯髄中に存在する幹細胞を効率よく培養する方法を考案し、日本小児歯科学会で実施中の「乳歯を用いた再生医療技術開発プロジェクト」における、乳歯歯髄細胞培養法への応用を進めている。また、分化した歯髄細胞を単一の薬剤で、歯髄幹細胞へ誘導する技術の開発に成功した(88th IADR 2010で発表)。これまで歯髄細胞中にわずか0.5-1%程度存在する幹細胞を利用する方法と比較し、すべての歯髄細胞を臨床へ応用できる可能性がでてきた。この技術を応用することで、幹細胞を修復組織に直接注入することや、特定の細胞に分化誘導することで、組織の再生に貢献できるものと期待される。一方で、幹細胞を調整しても、一度組織細胞に分化したものは、何らかの2次的なダメージで、再度組織修復が必要となった場合には、そこには幹細胞が存在しないため、再度幹細胞の注入が必要である。そこで、注入した幹細胞を幹細胞ニッチ環境で維持し、また効率よく分化誘導させる制御法の開発が必要となる。また臨床応用を視野に入れ、潜在的な拒絶反応やアレルギーなどの免疫学的な問題を可及的に回避できる小分子化合物を用いた幹細胞ニッチ環境の開発も並行して進めなければいけない。我々は幹細胞ニッチ環境発現する分子群の生物活性を再現できる小分子化合物を利用した、幹細胞治療の基盤となる研究を行った。

2. 研究の目的

本研究課題では、血管性ニッチに於いても重要な役割を演じていると考えられている Wnt およびヘッジホッグシグナルに注目し、両シグナルのアゴニストの未分化間葉細胞に対する作用を解析した。

3. 研究の方法

(1) マウス間葉系幹細胞の細胞株である C3H10T1/2 細胞に、古典的 Wnt シグナルアゴニストで幹細胞誘導薬剤 BIO (GSK3beta inhibitor IX) を添加、幹細胞マーカー Nanog および Oct3/4 の発現を検討した。コントロールとして、Dimethyl sulfoxide(DMSO)を使用した。

(2) BIO により幹細胞誘導された C3H10T1/2 細胞をセルソーターで回収する目的で、同細胞に Oct3/4 プロモーター-GFP 発現ベクターを導入し発現細胞の回収を試みた。

(3) BIO により幹細胞誘導された C3H10T1/2 細胞に骨形成蛋白 BMP-2 を添加し、幹細胞誘導が同細胞の骨芽細胞誘導効率に及ぼす影響を検討した。

(4) ヘッジホッグシグナルアゴニストは、米国創薬会社 Curis Inc. より供与された Hh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 を用いた。はじめにこれらアゴニストに対する C3H10T1/2 細胞の応答性は、ヘッジホッグシグナルの標的因子 Gli1 の遺伝子発現解析および Gli1 転写因子の DNA 結合領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポーター発現ベクターを用いたレポーター解析を行い評価した。ヘッジホッグシグナルのポジティブコントロールにはリコンビナント Shh-N 蛋白を用いた。また溶媒のコントロールとして、Dimethyl sulfoxide(DMSO)を使用した。

(5) ヘッジホッグシグナルアゴニストによる C3H10T1/2 細胞の骨芽細胞誘導への検討は、アルカリホスファターゼ染色、細胞外に沈着したカルシウム沈着を染色できるアリザリンレッド染色および von Kossa 染色、さらに、骨芽細胞マーカー遺伝子の発現を指標とした。

(6) ヘッジホッグシグナルアゴニストによる C3H10T1/2 細胞の骨芽細胞誘導能をより深く解析するため、BMP 関連遺伝子および骨芽細胞分化のマスター遺伝子である Osterix/Sp7 および Runx2 の遺伝子発現変化を解析した。Runx2 欠失細胞株である RD-127 細胞は、長崎大学大学院医歯薬総合研究科小守壽文教授より供与を受けた。同細胞に 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml の濃度の BMP-2 存在下もしくは非存在下において、Hh-Ag 1.7 と共に 7 日間培養し、骨芽細胞分化をアルカリホスファターゼ染色と同活性で評価した。

4. 研究成果

(1) マウス間葉系幹細胞の細胞株である C3H10T1/2 細胞に、幹細胞誘導薬剤 BIO(2 μM) を添加し実験を行った。BIO を添加すると線維芽細胞様形態をしていた C3H10T1/2 細胞は、より細長い紡錘形の細胞形態へと変化した。また、BIO(2 μM) を添加後 7 2 時間後の mRNA を回収、RT-PCR 解析の結果、幹細胞マーカーである Nanog, Oct3/4 などの発現が増強した。このことから、マウスの組織から得られた初代培養細胞に BIO を添加することにより、幹細胞の性質を保持した細胞群を効率に作成できる可能性が考えられた。

(2) C3H10T1/2 細胞に Oct3/4 プロモーター-GFP、nanog プロモーター-GFP 発現ベクターを導入後、BIO(2 μM) を添加、24、48、72 時間後の GFP 陽性細胞を蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、同実験系により GFP 陽性細胞は確認できなかった。RT-PCR 解析結

果と総合して判断すると、BIO によるマウス間葉系幹細胞の Oct3/4、Nanog 遺伝子発現誘導は、多能性幹細胞である iPS 細胞や ES 細胞で発現している発現レベルに比較すると弱い可能性が示唆された。今後、BIO の濃度や作用時間など改めて条件設定の検討を進めていく予定である。

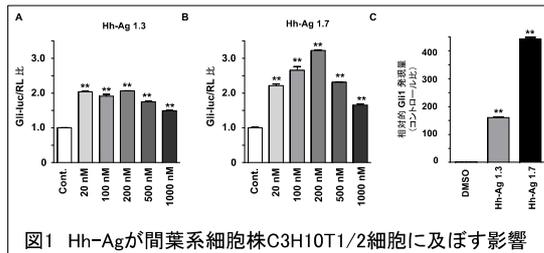


図1 Hh-Agが間葉系細胞株C3H10T1/2細胞に及ぼす影響

(3) C3H10T1/2 細胞を BIO(2 μM)存在下で培養後、骨形成蛋白 BMP-2(200 ng/ml)で骨芽細胞誘導を試みアルカリホスファターゼ活性変化で評価すると、BIO 未処理群に比べて有意に骨芽細胞分化が促進された。興味深いことに、BIO で処理した C3H10T1/2 細胞に、通常では骨芽細胞分化を誘導しない低濃度(20 ng/ml)の BMP-2 を添加した場合も、同細胞の骨芽細胞分化が確認された。つまり、BIO 処理後の幹細胞は、BMP-2 による骨芽細胞への分化をより効率的に行えることが明らかとなった。

(4) 血管性ニッチでの幹細胞維持に重要な役割を演じているヘッジホッグシグナルを活性化する新規の小分子化合物、Hh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 の生物活性を Gli1 レポーターアッセイおよび Gli1 の遺伝子発現誘導で評価した。

その結果 Hh-Ag 1.3 は 20 nM から 1000 nM までの濃度で一定の Gli1 レポーター活性が認められた(図 1 A)。また、Hh-Ag 1.7 では、Hh-Ag 1.3 よりも強い Gli1 レポーター活性が認められ、さらに 200 nM で最も強い活性が発揮されることが明らかとなった(図 1 B)。

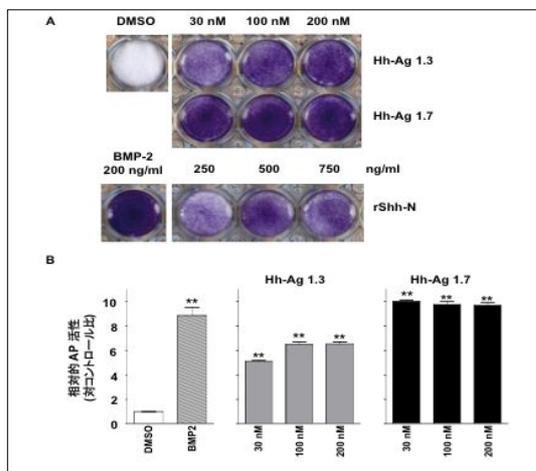


図2 Hh-AgがC3H10T1/2細胞の骨芽細胞分化に与える影響

レポーター解析同様、両アゴニストは内因性の Gli1 発現を上昇させた(図 1 C)

(5) 新規ヘッジホッグシグナルアゴニスト Hh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 は共に 200 nM の濃度で骨芽細胞分化誘導因子ポジティブコントロールである BMP-2(200 ng/ml)と同等の ALPase 染色活性が認められた。また骨芽細胞誘導能を発揮した(図 2 A)。染色実験の結果を指示するべく、両アゴニストは C3H10T1/2 細胞の ALPase 活性を上昇させた(図 2 B)。これらの結果から、両アゴニストは単独で C3H10T1/2 細胞の骨芽細胞分化を促進する働きがあることが明らかとなった。

Hh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 による骨芽細胞分化を遺伝子レベルで確認するため、骨芽細胞マーカー遺伝子を用いて解析した。その結果両アゴニスト共に骨芽細胞のマーカー遺伝子であるステオポンチン(OPN)、オステオカルシン(OCN)、骨シアロ蛋白(IBSP)、アルカリホスファターゼ(AP)発現を誘導させた(図 3 A-D)。また、その作用は Hh-Ag 1.7 が強力であることも明らかとなった。

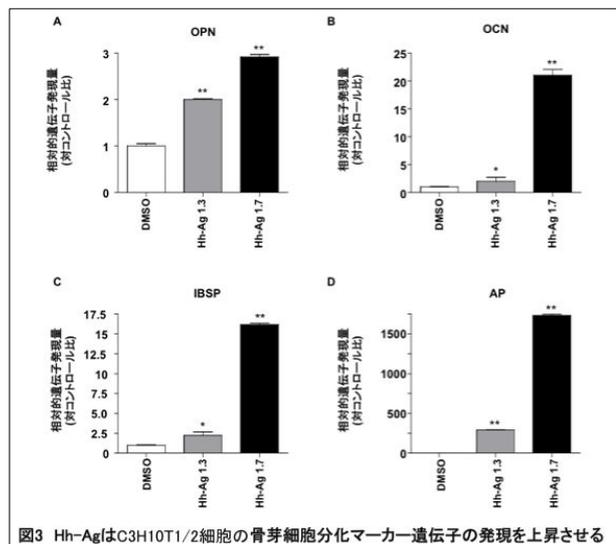


図3 Hh-AgはC3H10T1/2細胞の骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を上昇させる

さらに Hh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 添加した石灰化培地を用いた C3H10T1/2 細胞の石灰化誘導をカルシウム染色により石灰化を評価した。BMP-2, Hh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 単独での刺激では C3H10T1/2 細胞の石灰化は確認できないが、BMP-2 と Hh-Ag 1.3 もしくは Hh-Ag 1.7 存在下では C3H10T1/2 細胞の石灰化が確認できた。特に BMP-2 および Hh-Ag 1.7 での刺激では著しい石灰化が確認できた。以上のことより Hh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 は BMP-2 が有する骨芽細胞誘導能を増強し、さらに Hh-Ag 1.7 は骨芽細胞の成熟に関わる事が示唆された(図 4 A, B)。

(6) Hh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 の C3H10T1/2 細胞における骨芽細胞分化誘導が、Hh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 による BMP シグナル活性化によるものか検討するため、C3H10T1/2 細胞に Hh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 で刺激を行い、内因性の BMP および, BMPR の遺伝子発現変化を指標として、リアルタイム PCR 法を用いて検討した。刺激後 24 時間, 48

時間において BMP-2、BMP-4、BMP- A および BMPR の著しい遺伝子発現変化は認めら

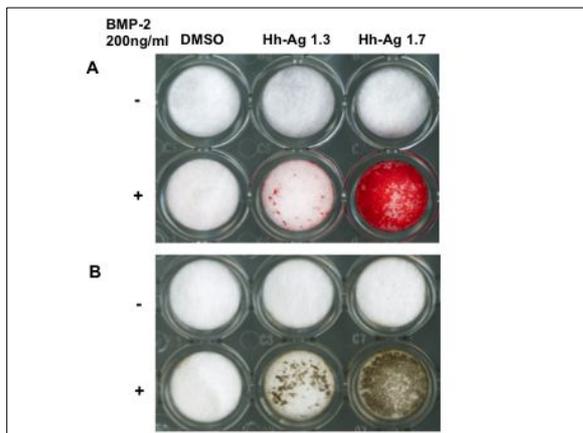


図4 Hh-AgはBMP-2と共にC3H10T1/2細胞の石灰化を促進する

れなかった。以上の結果より、Hh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 は BMP や BMPR の遺伝子発現誘導を介さず、間葉系幹細胞の骨芽細胞分化への運命決定を行う事が示唆された。次に、細胞外で BMP-2 および BMP-4 と結合して BMP

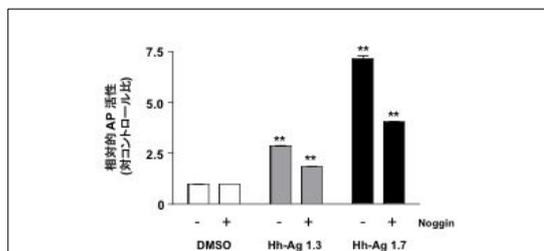


図5 Noggin存在下でのHh-Agによる骨芽細胞分化誘導

の働きを阻害するNogginの存在下でのHh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 の骨芽細胞分化誘導能を評価した。Nogginの存在下では非存在下と比較すると alkaline phosphatase 活性は低下したが、有為な骨芽細胞分化誘導が確認できた(図5)。以上の結果より、Hh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 は BMP や BMPR の遺伝子発現を直接誘導することにより骨芽細胞分化を促進しているのではなく、細胞内 BMP シグナルあるいは新規のシグナル経路を介して骨芽細胞分化誘導を促進している事が示唆された。

Hh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 による骨芽細胞分化誘導の詳細な機構を解明する為に、骨形成や骨芽細胞分化に必須の転写因子である Runx2 と Osx/Sp7 に関して検討した。

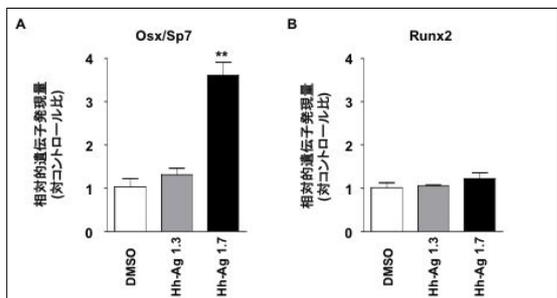


図6 Hh-AgはRunx2下流分子であるOsx/Sp7の発現を亢進させる

C3H10T1/2 細胞を Hh-Ag 1.3 または Hh-Ag 1.7 存在下で5日間培養すると、Runx2の遺伝子発現に変化はみられなかったが、Osx/Sp7の遺伝子発現はHh-Ag 1.3 刺激ではわずかに上昇し、Hh-Ag 1.7 刺激では著しく上昇した(図6)。以上の結果より Hh-Ag 1.3 および Hh-Ag 1.7 は、Runx2 の下流に位置する分子である Osx の発現を制御して骨芽細胞分化誘導を行うことが示唆された。

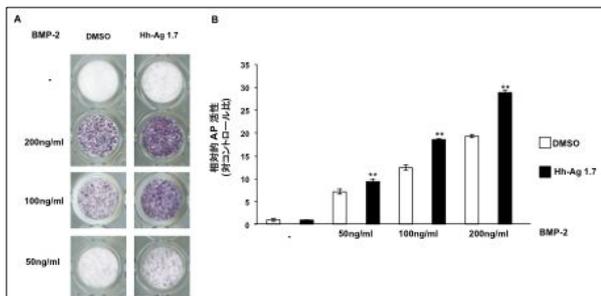


図7 Runx2欠失細胞におけるHh-Ag 1.7による骨芽細胞分化誘導

そこで Hh-Ag 1.7 が、Runx2 欠失細胞株 RD-127 細胞において骨芽細胞分化誘導能を有するかを検討した。RD-127 細胞に対して、高濃度の BMP-2 で刺激を行うと alkaline phosphatase 活性陽性細胞が出現した(図7A)。Hh-Ag 1.7 単独で刺激、もしくは BMP-2 と共に刺激を行うと、同様に alkaline phosphatase 活性陽性細胞が出現し、alkaline phosphatase 活性の上昇が確認できた(図7B)。以上の結果より Hh-Ag 1.7 は BMP-2 と共に作用させる事により RD-127 細胞における骨芽細胞分化誘導を相乗的に回復する事が示された。

本研究課題では、血管性ニッチに於いても重要な役割を演じていると考えられている Wnt およびヘッジホッグシグナルに注目し、これらの小分子化合物が幹細胞の維持、骨芽細胞分化への運命決定、骨芽細胞の成熟に関わることが明らかになった。小児歯科領域で現在注目されている乳歯の歯髄幹細胞の維持、分化誘導に於いても、小分子化合物の重要性が期待されている。今後は、本研究結果を基盤とし、骨芽細胞のみならず神経細胞、血管内皮細胞、軟骨細胞、上皮細胞に誘導する新規小分子化合物の同定も進めていきたいと考えている。

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15件)

1. Nakamura, T., Naruse, M., Chiba, Y., Komori, T., Iwamoto, T., Sasaki, K., and Fukumoto, S. Novel Hedgehog agonists promote osteoblast differentiation in mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 230(4):922-929, 2015 査読有り

DOI: 10.1002/jcp.24823

2. Hino, R., Futagi, M., Yamada, A., Arakaki, M., Saito, K., Sugawara, Y., Ono, M., Fukumoto, E., Nakamura, T., and Fukumoto, S. Establishment of ex vivo mucocele model using salivary gland organ culture. *Pediatr Den J.* 24(2):78-82, 2014 査読有り
DOI:10.1016/j.pdj.2014.03.003
3. Ikeuchi, T., Nakamura, T., Fukumoto, S., and Takada, H. A vitamin D3 analog augmented interleukin-8 production by human monocytic cells in response to various microbe-related synthetic ligands, especially NOD2 agonistic muramyl dipeptide. *Int Immunopharmacol.* 15(1):15-22, 2013 査読有り
DOI: 10.1016/j.intimp.2012.10.027
4. Nakamura, T., Fukumoto, S., and Yamada, Y. Review: The regulation of tooth development and morphogenesis. *Interface Oral Health Science 2011.* 14-21, 2012 査読有り
DOI: 10.1007/978-4-431-54070-0_3
5. Yamada, A., Iwamoto, T., Fukumoto, E., Arakaki, M., Miyamoto, R., Sugawara, Y., Komatsu, H., Nakamura, T., and Fukumoto, S. Epithelial-mesenchymal interaction reduces inhibitory effects of fluoride on proliferation and enamel matrix expression in dental epithelial cells. *Pediatr Den J.* 22(1):1-9, 2012 査読有り
DOI: 10.1016/S0917-2394(12)70253-7

[学会発表](計 26 件)

1. Naruse, M., Saito, K., Fukumoto, S., Nakamura, T. Hedgehog Agonists Regulate Dental Mesenchymal Cell Proliferation and Differentiation, 93rd General Session & Exhibition of the IADR, 2015 年 3 月 11 日 -14 日 Boston, MA USA
2. Yamada, T., Kerever, A., Nakamura, T., Yamada, Y., and Arikawa-Hirasawa, E. FGF-2-Dependent Neurogenesis Is Reduced in Aged Mice and in the Perlecan-Deficient Subventricular Zone of Adult Mice, NIH-Japan-JSPS Symposium Highlights from the frontiers of biomedical science from NIH and Japan NIH, 2014 年 10 月 23 日-24 日 Bethesda, MD USA
3. Nakamura, T. and Fukumoto, S. Novel Smoothed agonists Promote Osteoblast Differentiation in C3H10T1/2 Cells and Osteoblastic Cells from Runx2-Deficient

Mice, International Symposium on Biomineralization, 2014 年 6 月 13 日 Gwangju, Korea

4. Nakamura, T., Naruse, M., Ikeuchi, T., Komori, T., Yamada, A., Iwamoto, M., Fukumoto, S. Novel Compounds Mimic Hedgehog Activity and Promote Osteoblast Differentiation in C3H10T1/2 Cells and Osteoblastic Cells from Runx2-Deficient Mice, 2013 American association for Bone and Mineral Research, 2013 年 10 月 4 日-7 日 Baltimore, MD USA
5. Naruse, M., Ikeuchi, T., Chiba, Y., Fukumoto, S., Nakamura, T. Novel Hedgehog Agonists Regulate Dental Epithelial Cell Proliferation and Differentiation, 2013 American association for Bone and Mineral Research, 2013 年 10 月 4 日-7 日 Baltimore, MD USA
6. Iwamoto, T., Ishikawa, M., Yoshizaki, K., Nakamura, T., Yamada, A., Yamada, Y. and Fukumoto, S. Pannexin 3, a Gap Junction Protein, Regulates Proliferation through AMPK Pathway in Odontoblasts. 2012 ASBMB Annual Meeting, 2012 年 4 月 21 日-25 日 San Diego, CA USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 卓史 (TAKASHI NAKAMURA)
東北大学・歯学研究科(大学院)・准教授

研究者番号 : 90585324