

平成 27 年 4 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689070

研究課題名(和文)象牙質・歯髄複合体再生療法に新生面を開く基盤研究

研究課題名(英文)The innovative research toward the establishment of regenerative therapy for dentin-pulp complex.

研究代表者

伊藤 祥作 (Shousaku, Itoh)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：90360495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、間葉系幹細胞から分化する過程で細胞表面マーカーの発現が変動することに着目し、変動量の違いにより幹細胞特異的マーカーを特定できると考えた。しかしながら、骨芽細胞が分化中に産生する石灰化物はフローサイトメーターによる解析を困難にしていたため、この石灰化物を除去して、分化した細胞を回収する方法の開発に着手し、成功した。これにより、間葉系幹細胞マーカーの解析が可能となる。一方で、LIFの骨芽細胞分化における機能解析をおこなったところ、LIF-JAK-STAT3シグナル伝達経路により発現が誘導されるSOCS3により、骨芽細胞の分化を抑制的に制御することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The clue to establish a new modified method to purify pure MSCs is to know the expression pattern of surface markers on not only heterogeneous MSCs, but also committed cells, such as osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes. But there is one obstacle to know the expression patterns of surface markers, that is mineral deposits produced by osteoblasts during culturing period. We developed a new method, which separates differentiated cells from mineral deposits using Percoll gradients. This new technique is a helpful tool to identify MSC surface markers. On the other hand, we analyzed LIF function on osteoblast differentiation. SOCS3 expression was induced by LIF/STAT3 signaling. SOCS3 knockdown demonstrated that shSOCS3-BMSCs almost completely abrogated the LIF suppressive effect. Our results demonstrated that LIF suppresses osteoblast differentiation through the LIF/STAT3/SOCS3 signaling pathway.

研究分野：医歯薬学

キーワード：間葉系幹細胞 分化制御機構

### 1. 研究開始当初の背景

う蝕や外傷そして歯周病などにより失われた象牙質・歯髄複合体や歯周組織を回復する治療法として組織再生療法が有効であると提唱されてはいるが、その治療法は未だ完全には確立されていない。近年、幹細胞研究の進展により幹細胞を用いた組織再生療法について様々な領域で研究がすすめられている。歯科においては、間葉系幹細胞が重要な幹細胞として位置づけられている。その理由として、象牙質・歯髄複合体や歯周組織(歯槽骨や歯根膜など)に分化することができる幹細胞として考えられているからである。間葉系幹細胞は、骨格筋や骨そして脂肪などの間葉系組織への多分化能を有する幹細胞であり、幹細胞を含む細胞集団は、様々な組織から得られることが報告されている。そして、間葉系幹細胞は主に骨髄中の微小環境内に存在し、間葉系の恒常性の維持のみならず、造血幹細胞の増殖や分化の制御も行っていることが明らかとなってきている。このような間葉系幹細胞が有する多様な働きは、組織再生療法における有力な細胞供給源として期待されており、また、倫理的観点や拒絶反応といった問題点についても自己の骨髄細胞を用いることで解消できることから、間葉系幹細胞は臨床応用に適した幹細胞といえる。しかしながら、その性状については依然として不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究課題は、間葉系幹細胞の分化過程における細胞表面マーカーの発現量の変化に着目することで、間葉系幹細胞の特定や分化の詳細なメカニズムの解明につながると考えた。しかしながら、骨芽細胞が分化中に産生する石灰化物がフローサイトメーターによる細胞表面マーカーの解析を困難にしていた。そこで、この石灰化物を除去して、分化した骨芽細胞を回収する方法を開発し、間葉系幹細胞に特異的な細胞表面マーカーを検討することを本研究の目的とした。また一方で、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を制御している機構についても明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 間葉系幹細胞集団の精製

C57BL/6J マウスより大腿骨と脛骨を採取し、シリンジを用いて $\alpha$ -MEMを骨髄腔内に注入し骨髄を得た。セルストレーナーを用いて軟組織を除去した後、細胞培養皿にて10%FCSと1%抗生物質を含む $\alpha$ -MEMにて培養を開始し、3日後にPBSを用いて浮遊細胞を除去した。その後、3日ごとに培養液を交換し、2週間後にTrypsin-EDTA処理にて付着細胞を回収した。回収した骨

髄ストローマ細胞と、血球系細胞のマーカー分子に対する抗体(抗CD5, 抗CD45, 抗CD11b, 抗Gr-1, 抗7-4, 抗Ter-119, 抗CD45R)を結合したマグネティックビーズとを反応させた。反応後、細胞をマグネティックカラムに注入し、カラムから流出させ、回収した細胞集団(HipOPs: highly purified osteoprogenitors)を、間葉系幹細胞として以下の実験に用いた。(2)石灰化物を除去し、骨芽細胞を回収する方法の開発

#### 骨芽細胞への分化の確認

10%FCS含有 $\alpha$ -MEMに50 $\mu$ g/ml ascorbic acidと $10^{-8}$ M dexamethasoneを添加した骨芽細胞分化誘導培地中でHipOPsを1週間培養した。分化したHipOPsに対し、alkaline phosphatase (ALP) 染色と von Kossa 染色およびFACS解析を行った。Percoll<sup>®</sup>の適正濃度の設定

10%おきに10%から80%のPercoll R グラジュエントを作製し、そこに骨芽細胞分化誘導培地にて1週間培養した細胞を填塞し、遠心分離を行った。各界面の細胞層を回収し、FACS解析した。

#### (3) 骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞分化に対するLIFの機能解析

10%FCS含有 $\alpha$ -MEMに50 $\mu$ g/ml ascorbic acidと10mM  $\beta$ -glycerophosphateそして $10^{-8}$ M dexamethasone (Dex)を含む骨芽細胞分化誘導培地を調整した。これに50ng/mlのLIFを含むものと含まない培地を用いて24well dishにて $5 \times 10^5$ /well,  $4 \times 10^5$ /well,  $3 \times 10^5$ /wellの細胞数で3週間培養したのち、ALP染色および von Kossa 染色を行い

#### Colony-forming

units-osteoblast (CFU-0)の数を計測し石灰化能に対するLIFの効果を調べた。

と同様の骨芽細胞分化誘導培地に50ng/ml, 5ng/ml, 0.5ng/mlのLIFを含む培地とLIFを含まない培地を用いて3週間培養したのち、ALP染色および von Kossa 染色を行いCFU-0の数を計測した。

と同様の骨芽細胞分化誘導培地に50ng/mlのLIFを含むものと含まない培地で2週間培養した細胞からセパゾールを用いてmRNAを回収し、逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、これを用いてreal-time PCRを行い骨芽細胞分化マーカーである

ALP, Col1a, BSP, OCN, Runx2, OsxのmRNA発現量を定量した。

LIFを作用させたのち、骨髄ストローマ細胞を回収してlysis bufferにて細胞を溶解し細胞質中のタンパクを抽出し

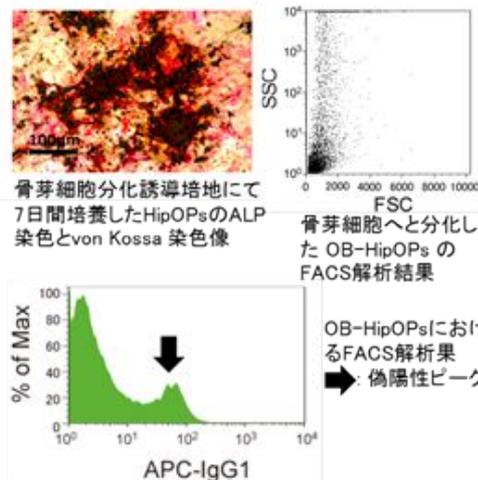
SDS ページにてタンパクを分離しメンブレンに転写した。そして、抗リン酸化 STAT3 抗体を反応させてリン酸化 STAT3 の検出を行った。

JAK-STAT3 シグナル伝達経路により転写される SOCS3 について、この SOCS3 の発現を確認するために と同様に骨芽細胞分化誘導培地に LIF を含むものと含まないものにて培養した骨髄ストローマ細胞から mRNA およびタンパクを回収し、それぞれ real-time PCR および western blotting の実験を行い、SOCS3 の mRNA および SOCS3 タンパク質の発現を確認した。

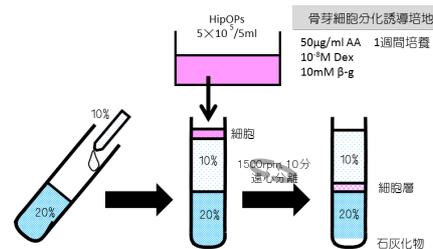
この SOCS3 の骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞分化における働きを調べるために、shRNA 法を用いて SOCS3 をノックダウンし実験を行った。5×10<sup>5</sup> transducing units(TU)の SOCS3 Lentiviral Transduction Particles (シグマアルドリッチ)にて、骨髄ストローマ細胞に shRNA を導入し SOCS3 の発現をノックダウンした。この細胞を用いて と同様に骨芽細胞分化誘導培地に LIF を含むものと含まない培地にて3週間培養したのち、CFU-0 の数を計測した。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究では Itoh らの方法で濃縮した HipOPs を間葉系幹細胞集団として用いた。この間葉系幹細胞集団 HipOPs を骨芽細胞分化誘導培地にて7日間培養し、ALP 染色および von Kossa 染色を行ったところ、Colony-forming units-osteoblast (CFU-0) の形成が確認された。そして、HipOPs を骨芽細胞分化誘導培地にて7日間培養し、骨芽細胞へと分化した HipOPs (Osteoblastic-HipOPs: OB-HipOPs) を回収し、FACS 解析を行ったところ、Y 軸近傍に偏在するパターンを示した。この結果は、石灰化物のみが検出され、生細胞を検出することができなかったことを示している。さらに、OB-HipOPs を biotin-抗 IgG1 抗体と反応させたのち、APC-ストレプトアビジンにて発色させ、FACS 解析を行った。その結果、抗 IgG1 抗体蛍光強度で展開したヒストグラムにおいて、IgG1 抗体がコントロール抗体であるにも関わらず、偽陽性のピークが検出されることがわかった。以上の結果から、分化した骨芽細胞の細胞表面タンパクを解析するためには、産生された石灰化物を除去することが必須条件であることが明らかとなった。

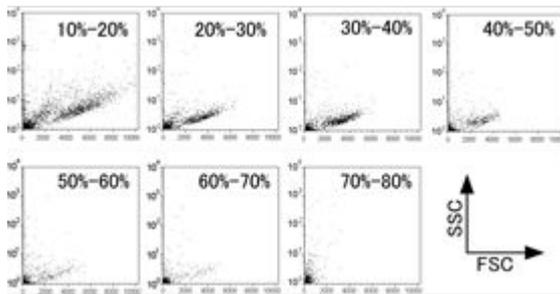


(2) 石灰化物を除去する方法として、目的の細胞を分離するために多くの分野で広く用いられている Percoll® 密度勾配遠心分離法に着目した。図に Percoll® 密度勾配遠心分離法の1例として、10%と20%のPercoll®濃度勾配を用いて分化した骨芽細胞と産生された石灰化物を分離する方法の概略図を示す。まず、Percoll® を HBSS にて希釈して10%と20%のPercoll® 溶液を作成する。そして、高濃度の20%Percoll® 溶液を遠沈管へ静かに注入し、次に20%Percoll® 溶液の上に低濃度の10%Percoll® 溶液を静かに注入して、10%と20%の異なった濃度の2層の濃度勾配を作製した。次に、HipOPs を骨芽細胞分化誘導培地にて培養し、骨芽細胞へと分化した OB-HipOPs を回収後、HBSS にて懸濁した。この OB-HipOPs 細胞懸濁液を10%-20%Percoll® 密度勾配上へ静かに注入した後、遠心分離した。すると、石灰物は沈殿し、10%と20%の層の界面に、細胞層の存在が観察された。

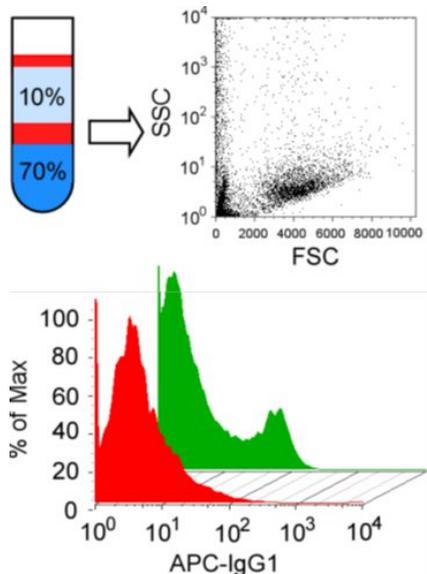


(3) 同様に、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80%のPercoll®の濃度勾配を用いて細胞分離を行ったところ、石灰化物の沈殿および界面に細胞層の存在が観察された。そして、界面の細胞層から回収した骨芽細胞 (OB-HipOPs) に対してFACS 解析を行った。図に示すように、X 軸を FSC にて Y 軸を SSC にて展開したところ、回収された OB-HipOPs は、生細胞が検出される領域に分布していることがわかった。そして、10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%の界面からも生細胞が検出される結果が得られた。しかしながら、70%-80%の界面から生細胞は検出されなかった。これらの結果から、Percoll® 密

度勾配遠心分離法を用いることで、石灰化物が除去され、分化した骨芽細胞を 10% から 70% の界面から回収できることがわかった。

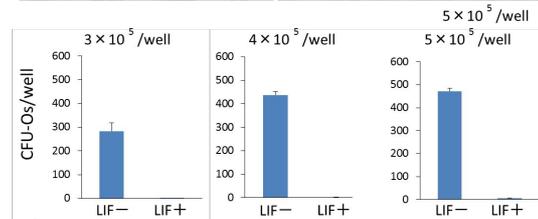
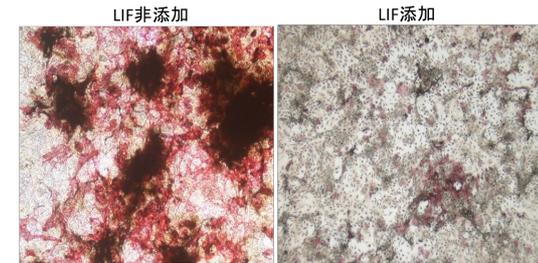


(4) 次に、OB-HipOPs は 10% から 70% までの濃度勾配から回収されることから、10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-80% の Percoll® 濃度勾配を作成しなくとも 10% と 70% の 2 層の Percoll® 濃度勾配だけで石灰化物と OB-HipOPs を分離することが可能なのではないかと考えた。そこで、10% と 70% の 2 層の Percoll® 濃度勾配を遠沈管に作成し、OB-HipOPs を填入し、遠心分離したところ、石灰物の沈殿および、10% と 70% の界面に細胞層を確認することができた。そして、FACS 解析の結果、生細胞が存在することが確認された。さらに、回収した OB-HipOPs を biotin-抗 IgG1 抗体と反応させたのち、APC-ストレプトアビジンにて発色させ、FACS 解析を行った。その結果、石灰化物を除去していない OB-HipOPs で観察されていた偽陽性ピークは、この 10%-70% Percoll® 密度勾配遠心分離法を用いて分離した OB-HipOPs では観察されないことがわかった。この結果から、石灰化物の除去および分化した細胞の回収は、10%-70% Percoll® 密度勾配が最適であることが明らかとなった。

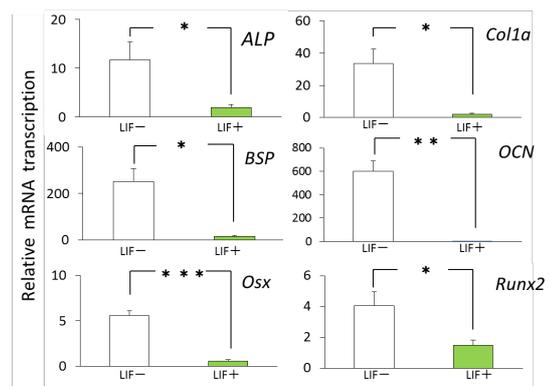


緑: HipOPs  
赤: 10%-70%界面のOB-HipOPs

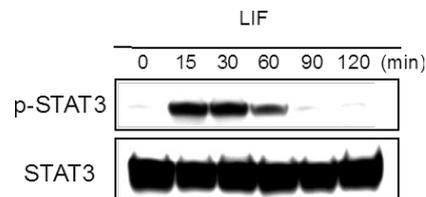
(5) 骨芽細胞分化誘導培地で培養したものは多数の CFU-O を認められるのに対し、LIF を加えたものでは CFU-O がほとんど認められなかった。そして、LIF の効果は  $3 \times 10^5$  /well,  $4 \times 10^5$  /well,  $5 \times 10^5$  /well のいずれの細胞数においても認められた。



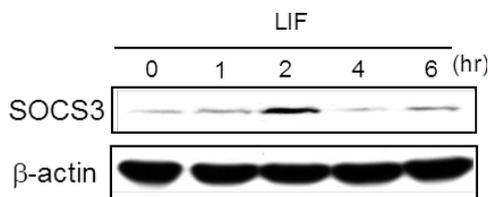
(6) 次に、骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞分化に対する LIF の抑制効果を骨芽細胞分化マーカーである *ALP*, *Col1a*, *BSP*, *OCN*, *Osx*, *Runx2* の発現量について着目し、リアルタイム PCR にて解析した。その結果、LIF はいずれの骨芽細胞分化マーカーの発現量に対しても有意に抑制していた。



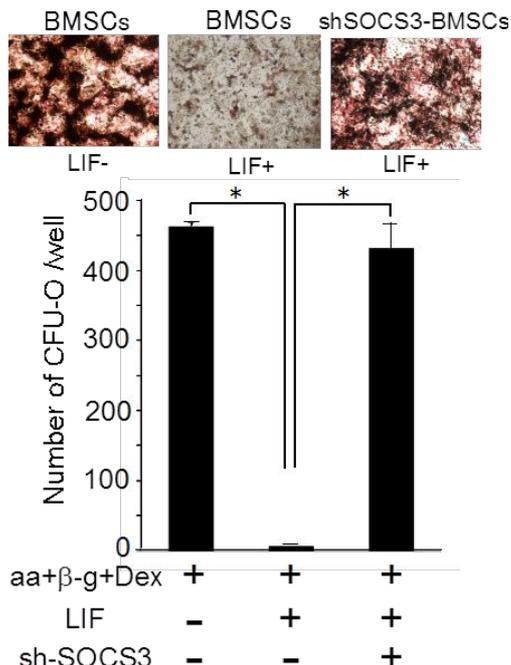
(7) 骨髄ストローマ細胞の LIF 刺激による LIF-STAT3 シグナル伝達経路の活性化について解析を行った。LIF の刺激後、15 分、30 分、60 分後にリン酸化 STAT3 を検出した。



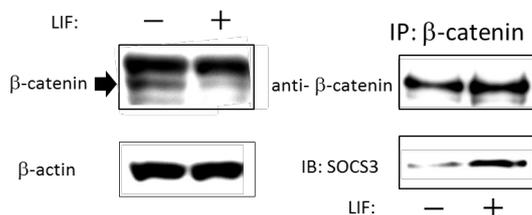
(8) 次に、LIF-STAT3 シグナル伝達経路の活性化により転写される *SOCS3* の発現についてウェスタンブロッティング法にて調べたところ、LIF 刺激 2 時間後に、*SOCS3* のタンパク質を検出した。



(9)次に、この SOCS3 ノックダウン骨髄ストローマ細胞を LIF 添加骨芽細胞分化誘導培地にて3週間培養後、ALP 染色と von Kossa 染色を行った。その結果、LIF 存在下にて培養しても骨芽細胞への分化抑制効果は認められず、骨芽分化誘導培地単独で培養したものと同様に多数の CFU-O が観察された。



10) また、LIF-JAK-STAT3 シグナル伝達経路の活性化による  $\beta$ -catenin の発現量の変化をウエスタンブロッティング法にて解析したところ、LIF を加えて培養した骨髄ストローマ細胞では  $\beta$ -catenin の発現量が減少していることがわかった。このことから、LIF-JAK-STAT3 シグナル伝達経路により誘導される SOCS3 は、 $\beta$ -catenin と会合し、 $\beta$ -catenin をユビキチン化し、分解していることが強く示唆された。この結果から、LIF は骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞への分化を抑制的に制御していることが明らかとなった。



以上の結果から、10%-70% の Percoll® の濃度勾配という簡便な方法を用いることで、分化した骨芽細胞を石灰化物から分離・回収することができた。また、LIF は、骨髄ストローマ細胞において、LIF-STAT3 シグナル伝

達経路を活性化させて SOCS3 を誘導し、SOCS3 により Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路を抑制する。その結果、LIF は骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞分化を抑制的に制御していることを明らかにした。研究目標に対して十分な研究成果が得られたと考えている。

## 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6件)

Matsushita K, Itoh S, Ikeda S, Yamamoto Y, Yamauchi Y, Hayashi M: LIF/STAT3/SOCS3 Signaling Pathway in Murine Bone Marrow Stromal Cells Suppresses Osteoblast Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108:1262-1268, 2014. 査読有 doi: 10.1002/jcb.24777.

Chen F, Guo R, Itoh S, Moreno L, Rosenthal E, Zappitelli T, Zirngibl RA, Flenniken A, Cole W, Grynopas M, Osborne LR, Vogt W, Adamson L, Rossant J, Aubin JE: First mouse model for combined osteogenesis imperfecta and ehlers-danlos syndrome. *Journal of Bone and Mineral Research*, 29(6): 1412-1423, 2014. 査読有 doi: 10.1002/jbmr.2177.

Fujikawa J, Tanaka M, Itoh S, Fukushima T, Kurisu K, Takeuchi Y, Morisaki I, Wakisaka S, Abe M: Kruppel-like factor 4 expression in osteoblasts represses osteoblast-dependent osteoclast maturation. *Cell Tissue Research*, 358:177-187, 2014. 査読有 doi: 10.1007/s00441-014-1931-8. Epub 2014 Jun 15.

呉本勝隆, 前園葉月, 北川蘭奈, 竹田かほる, 新野侑子, 松下健太, 伊藤祥作, 野村由一郎, 林美加子: 歯根の肥大および湾曲を伴う上顎大臼歯の自家移植症例. *日本歯科保存学雑誌*, 57(6):589-596, 2014. 査読有

伊藤祥作, 岩見行晃, 山田朋美, 松下真美, 山口幹代, 北川晴朗, 池田峻, 古谷優, 前園

葉月, 藪根敏晃, 山本洋子, 林 美加子: 修復処置におけるう蝕象牙質除去の客観性についての臨床的評価.

日本歯科保存学雑誌, 56(5):441-453, 2013. 査読有

Itoh S, Matsushita K, Ikeda S, Yamamoto Y, Yamauchi Y, Yoshioka S, Yamamoto R, Ebisu S, Hayashi M, Aubin JE: Bone Marrow-Derived HipOP Cell Population Is Markedly Enriched in Osteoprogenitors. International Journal of Molecular Sciences, 13:10229-10235, 2012. 査読有  
doi: 10.3390/ijms130810229. Epub 2012 Aug 16.

[学会発表](計9件)

板東秀典、熱海 徹、小椋英樹、村上正晃、伊藤祥作、林 美加子: 炎症誘導における新規核内制御因子 NAF1 の解析  
第 141 回日本歯科保存学会秋季学術大会  
平成 26 年 10 月 30 日、山形

山本由美子、伊藤祥作、松下健太、池田峻、山内裕香子、林 美加子: 骨芽細胞の細胞表面マーカー解析法の開発  
第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会  
平成 26 年 6 月 19 日、大津

Yamamoto Y, Itoh S, Matsushita K, Ikeda S, Yamauchi Y, Hayashi M: A novel method for surface marker analysis of mature osteoblasts  
IBMS:2014 Herbert Fleisch Workshop  
平成 26 年 3 月 16-18 日, Brugge (Belgium)

板東秀典、小椋英樹、村上正晃、伊藤祥作、林美加子: 炎症惹起における NAF1 の分子機構解析

第 138 回日本歯科保存学会春季学術大会  
平成 25 年 6 月 28 日、福岡

松下健太、伊藤祥作、池田峻、山本由美子、山内裕香子、林 美加子: SOCS3 は Wnt シグナル伝達経路を阻害することにより骨芽細胞への分化を抑制する  
第 138 回日本歯科保存学会春季学術大会  
平成 25 年 6 月 27 日、福岡

池田 峻、伊藤祥作、松下健太、山本由美子、山内裕香子、林 美加子: 脂肪細胞への分化を LIF は促進する  
第 137 回日本歯科保存学会秋季学術大会  
平成 25 年 11 月 23 日、広島

松下健太、伊藤祥作、池田 峻、山本由美子、山内裕香子、林 美加子、恵比須繁之: LIF-STAT3-SOCS3 シグナル伝達経路は骨芽細胞分化を抑制する  
第 137 回日本歯科保存学会秋季学術大会

平成 25 年 11 月 23 日、広島

伊藤祥作、松下健太、池田 峻、山本由美子、恵比須繁之: 新規幹細胞集団における硬組織再生能の評価

第 135 回日本歯科保存学会秋季学術大会  
平成 24 年 10 月 20 日、大阪

松下健太、伊藤祥作、池田 峻、恵比須繁之: 骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞分化における LIF の機能解析

第 134 回日本歯科保存学会春季学術大会  
平成 24 年 6 月 9 日、浦安

[図書](計1件)

伊藤祥作、林 美加子: DNA 配列を読み解くことが難治性根尖性歯周炎の診断へ繋がる?

DENTAL DIAMOND, 38(550):87, 2013

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 細胞表面マーカーをフローサイトメトリーで分析可能な骨芽細胞又は骨芽細胞に分化し得る細胞を得る方法

発明者: 伊藤祥作, 山本由美子, 林 美加子  
権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: 2013-239313

出願年月日: 2013 年 11 月 19 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤祥作 (ITOH SHOUSAKU)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 90360495