

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462798

研究課題名(和文) 骨芽細胞の脱分化・多能性再獲得機構の解明

研究課題名(英文) An investigation into the mechanisms of dedifferentiation and acquisition of pluripotency for osteoblasts

研究代表者

三上 剛和 (Mikami, Yoshikazu)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80434075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞の脱分化・多能性獲得機能を検討した。一度骨芽細胞へ分化させた間葉系幹細胞を、酵素処理によって単離し、*in vitro*で再培養した。再培養後の細胞は骨芽細胞マーカーの発現が消失し、多分化能を有していた。さらに、骨芽細胞へ分化過程ではPannexin3を含む数種類の細胞接着因子の発現が増加し、それらは再培養によって減少した。また、Pannexin3の発現を抑制した細胞では、骨芽細胞への分化が抑制され、未分化状態が維持された。これらの結果から、Pannexin3を構成要素にもつ細胞間接着が骨芽細胞への分化や維持に必要であり、この細胞間接着を阻害することで脱分化が誘導される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism in which osteoblasts dedifferentiated and obtained pluripotency. Mesenchymal stem cells (MSCs) were differentiated to osteoblasts by osteogenic induction medium. After the MSCs differentiated to osteoblasts, they were isolated each other and re-cultured onto the cell culture dishes. The expressions of osteogenic markers in the MSCs (osteoblasts) were decreased during the re-culture, and then the re-cultured MSCs obtained pluripotency. Osteogenic differentiation of the MSCs was accompanied by the increase of several cell adhesion molecules including Pannexin3, which was decreased after the re-culture. In addition, the MSCs in which pannexin3 expression was inhibited by shRNA failed to differentiate to osteoblasts. On the basis of these results, it was suggested that cell-cell adhesion by Pannexin3 was required for osteogenic differentiation and maintenance of osteoblasts, and attenuation of the cell adhesion induced the dedifferentiation of osteoblasts.

研究分野：細胞生物学

キーワード：骨芽細胞 脱分化 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、特定遺伝子の強制発現によって、分化した体細胞から全能性をもつ未分化な細胞 (iPS 細胞) を作出することが可能になった (Takahashi and Yamanaka, Cell 2006)。さらに、脂肪細胞においては、遺伝子導入を行わなくても、間葉系幹細胞と同等の多能性をもつ未分化細胞へ脱分化することが明らかになった (Matsumoto et al., J Cell Physiol 2008)。しかし、分化細胞がどのようにして脱分化・リプログラミングされ、多能性を再獲得するのか、あるいは、幹細胞の未分化性がどのように維持されているのかについては不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

松本ら (Matsumoto et al., J Cell Physiol 2008) は、成熟した脂肪細胞を、脂肪組織から単離し、天井培養という方法で *in vitro* 培養すると、遺伝子導入や特別な試薬を用いなくても脱分化することを報告した。この脱分化細胞は、間葉系幹細胞と同等の多能性をもつ。これは、人為的に遺伝子導入を行う iPS 細胞は例外として、「終末分化した体細胞は可塑しない」というこれまでの定説を覆すものである。もし、同様の現象が他の分化細胞でも認められれば、ある種の分化細胞は、体性幹細胞レベルまでならば、比較的容易に可塑することを示すことになる。これは、幹細胞を対象とした基礎研究のみならず、再生医療をはじめとする臨床研究においても重要な意味をもつ。そこで、我々は、脂肪細胞と同じく間葉系幹細胞から分化する骨芽細胞に着目し、脱分化能の有無を検討するとともに、脱分化するのであれば、どのように脱分化・リプログラミングされ、多能性を再獲得するのか、その分子機序の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 脱分化誘導

脂肪細胞は、脂肪組織から単離し、*in vitro* 培養することで脱分化する。そこで、骨芽細胞の脱分化誘導について同様の方法を用いた。まず、マウス由来間葉系幹細胞様の C3H10T1/2 細胞、あるいはヒト歯髄組織から

単離した幹細胞 (Dental Pulp Stem Cells: DPSC) を骨芽細胞分化誘導培地で培養し、骨芽細胞へ分化させた。骨芽細胞への分化はその指標である Alkaline Phosphatase (ALP) の生産と石灰化物の形成によって確認した。次に、この石灰化物が形成された培養ディッシュ中に存在する骨芽細胞をコラゲナーゼおよびトリプシン処理によって単離し、30~50%コンフルエントになるように再度ディッシュに播種して通常培地で培養 (再培養) した。再培養を開始した細胞は、定期的にその一部について ALP 染色を行い、ALP 陰性への変化を脱分化の指標とした。さらに、ALP 陰性となった DPSC について、脂肪細胞、軟骨細胞への分化誘導を行い、多能性の有無について確認した。

(2) 遺伝子発現解析

再培養によって脱分化し、多能性を再獲得するまでの各ステージにおいて、遺伝子発現量の変化を網羅的に解析した。解析にはマイクロアレイを用いた。発現量の変動が著しい因子をリストアップし、既存のデータベース上の遺伝子機能情報を参考に脱分化関連因子の候補を絞り込んだ。

(3) 脱分化関連因子の機能解析

遺伝子発現解析でリストアップされた脱分化関連候補因子について、その強制発現や siRNA などによる発現抑制を行い、それらの分化・脱分化や細胞増殖能等に対する影響を解析した。また脱分化に関与することが予想されるシグナル伝達経路については、そのシグナルを遮断する薬剤等を用いて、影響を検討した。

(4) 細胞間情報伝達

細胞の分化・未分化状態の維持には隣接する細胞間の情報伝達が重要な役割を担うことが報告されている (Gonzalez-Nieto et al., Blood, 2012)。そこで、未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞と共培養し、その遺伝子発現や分化状態の変動を解析した。また、パッチクランプアッセイやインジェクション法を用いて細胞間情報伝達様式について解析した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞の脱分化

再培養された DPSC および C3H10T1/2 細胞は徐々に増殖をはじめ、数回の継代の後には、ALP 陰性を示した (図 1)。また、ALP と同様に Osteocalcin や Bone sialoprotein といったその他の骨芽細胞マーカーの発現も再培養後には、骨芽細胞分化誘導前の未分化な状態とほぼ同レベルまで減少した。

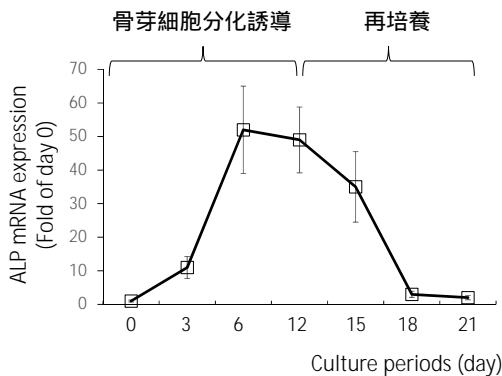


図 1 . ALP 発現量の変動 . C3H10T1/2 細胞を骨芽細胞分化誘導および再培養し、各培養時間ごとに ALP の発現量をリアルタイム PCR 法を用いて解析した。

興味深いことに、骨芽細胞へ分化させたままの状態の細胞は、増殖せず、他の細胞系譜への分化能を失っているにもかかわらず、再培養後の細胞は、分化誘導前の C3H10T1/2 と同様の自己増殖能と多分化能を有していた (図 2)。

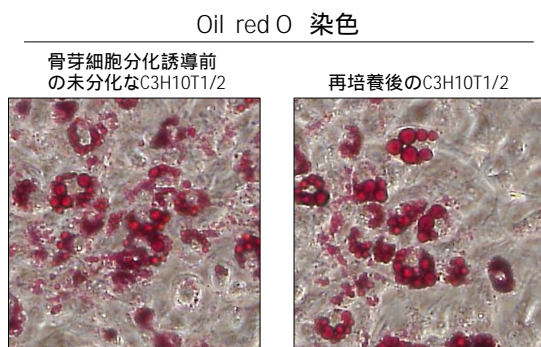


図 2 . 脂肪細胞への分化誘導 .

骨芽細胞への分化誘導前の未分化な C3H10T1/2 細胞と再培養後の C3H10T1/2 細胞を脂肪細胞へ分化誘導した。両者の間に脂肪細胞の指標とされる脂肪滴の形成に差は認められない。

次に、Cre-LoxP システムを用いて、ALP 発現履歴を GFP の発現で追跡できる C3H10T1/2

細胞を樹立した。この細胞を用いて、再培養後の ALP 陰性で多分化能を有した細胞が脱分化した細胞なのか、未分化状態が維持された細胞なのかを解析した。その結果、再培養後に増殖した細胞は、GFP を発現していることが明らかになった。これは、一度、ALP を発現した細胞、つまり、骨芽細胞へ分化した細胞であることを示している。これらの結果から、本実験の条件下では、骨芽細胞は脱分化すると考えられる。

(2) 遺伝子発現パターンの変動

C3H10T1/2 細胞は、骨芽細胞への分化に伴い、骨芽細胞分化マーカーの他に、Pannexin3 を含む数種類の細胞接着因子の発現が増加し、これらの発現は再培養によって再び減少することが明らかになった。また、再培養した細胞では、上皮系がん細胞が浸潤能を獲得し、悪性化する際に発現が増加する遺伝子のいくつかが同じように発現増加していた。上皮系がん細胞の悪性化過程は上皮細胞がその細胞特性を失い、間葉系様の細胞へと変化する過程 (上皮間葉転換) であることから、骨芽細胞の脱分化とがん細胞の上皮間葉転換には共通のシグナル伝達経路が関与している可能性が示唆された。

(3) Pannexin3 の発現抑制

C3H10T1/2 細胞を用いて Pannexin3 の発現抑制を行った結果、骨芽細胞分化誘導培地での培養後も骨芽細胞への分化が抑制され (図 3)、その後、再培養を行わなくても脂肪細胞へ分化させることが可能であった。



図 3 . Pannexin3(Panx3)の発現抑制 .

shRNA を用いて Panx3 の発現を抑制した C3H10T1/2 を樹立し、この細胞を骨芽細胞分化誘導培地で培養した。培養後、骨芽細胞分化の指標である石灰化物の形成を Alizarin red S 染色によって検出した。

さらに、パッチクランプアッセイとピオシチンのインジェクションアッセイから、骨芽細胞へ分化させた C3H10T1/2 細胞間では、隣接する細胞間の細胞質が直接つながるギャップジャンクションが形成されているのに対し、Pannexin3 の発現を抑制した C3H10T1/2 細胞間では、骨芽細胞分化誘導培地で培養後もギャップジャンクションの形成は認められなかった。これらの結果から、Pannexin3 を構成要素にもつギャップジャンクションが骨芽細胞への分化や維持に必要であり、再培養によって、この細胞間接着が阻害されることで、脱分化が誘導されることが示唆された。

<引用文献>

Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 2008, 215:210-222.

Gonzalez-Nieto D, Li L, Kohler A, Ghiaur G, Ishikawa E, Sengupta A, Madhu M, Arnett JL, Santho RA, et al. Connexin-43 in the osteogenic BM niche regulates its cellular composition and the bidirectional traffic of hematopoietic stem cells and progenitors. *Blood.* 2012, 19:5144-5154.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006, 126:663-676.

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3件)

Mikami Y, Fukushima A, Komiyama Y, Iwase T, Tsuda H, Higuchi Y, Hayakawa S, Kuyama K, Komiyama K. Human uterus

myoma and gene expression profiling: A novel in vitro model for studying secretory leukocyte protease inhibitor-mediated tumor invasion. *Cancer Lett.* 2016, 379:84-93. 査読有
DOI: 10.1016/j.canlet.2016.05.028.

Nishikawa Y, Akiyama Y, Yamamoto K, Kobayashi M, Watanabe E, Watanabe N, Shimizu N, Mikami Y, Komiyama K. Osteocytes up-regulate the terminal differentiation of pre-osteoblasts via gap junctions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015, 456:1-6. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.10.128.

Mikami Y, Yamamoto K, Akiyama Y, Kobayashi M, Watanabe E, Watanabe N, Asano M, Shimizu N, Komiyama K. Osteogenic gene transcription is regulated via gap junction-mediated cell-cell communication. *Stem Cells Dev.* 2015, 15;24:214-27. 査読有
DOI: 10.1089/scd.2014.0060.

[学会発表](計5件)

三上剛和, 福島敦史, 水谷祐輔, 早津学, 小宮山一雄, 牛木辰男. Secretory leukocyte protease inhibitor による細胞移動能の制御機構にかんする研究. 第122回日本解剖学会総会全国学術集会. 2017年3月28日~30日. 長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市).

Mikami Y, Tduda H, Hayasaka S. Human uterus myoma and gene expression profiling: A novel in vitro model for studying secretory leukocyte protease inhibitor-mediated tumor invasion. 第45回日本免疫学会学術集会. 2016年12月7日. 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市).

三上剛和. 骨芽細胞と隣接細胞間におけるギャップジャンクションを介した細胞間コミュニケーションの役割. 2016年3月. 第121回日本解剖学会総会全国

学術集会．2016年3月30日．ビッグパ
レットふくしま（福島県郡山市）．

三上剛和，秋山祐子，山本清文，小林
真之，渡辺恵理，渡辺信和，清水典佳，
福島敦史．骨芽細胞による間葉系幹細胞
の遺伝子発現制御機構の検討．第1回日
本骨免疫学会．2015年6月30日．ホテ
ルブリーズバイマリーナ（沖縄県宮古
市）．

Mikami Y，Asano M，Komiyama K．
Osteoblasts regulate osteogenic gene
transcription in mesenchymal stem
cells via gap junctional cell-cell
communication．第104回日本病理学会
総会．2015年4月30日．名古屋国際会
議場（愛知県名古屋市）．

6．研究組織

(1)研究代表者

三上 剛和（MIKAMI，Yoshikazu）
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：80434075

(2)研究分担者

渡辺 信和（WATANABE，Nobukazu）
福岡大学・医学部医学科・研究員
研究者番号：10334278