

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462886

研究課題名(和文) 脂質メディエーターによる間葉系幹細胞分化機構の解明と硬組織再生治療への臨床的展開

研究課題名(英文) Molecular mechanism of sphingosine-1-phosphate-modulated MSC differentiation for hard tissue regenerative therapy

研究代表者

松崎 英津子 (Matsuzaki, Etsuko)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：20432924

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)： 歯及び歯周組織に存在する多分化能を持つ歯根膜幹細胞・歯髄幹細胞の分化制御による新しい硬組織再生療法を見出すため、幹細胞の分化制御に関わるシグナル分子として、生体内に存在する脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)に着目した。その結果、S1PによるWnt5a分泌促進作用に起因する間葉系幹細胞の骨芽細胞分化促進作用、マウス骨組織におけるS1PR2受容体を介した骨組織形成促進作用を見出した。今後、本研究成果に基づくS1Pによる硬組織形成作用の臨床応用を目指す。

研究成果の概要(英文)： Mesenchymal stem cells (MSC) in periodontal ligament or dental pulp play a crucial role in periodontal tissue regeneration or hard tissue regeneration. Therefore, to regulate the commitment to MSC differentiation is important for regenerative treatment.

S1P regulates many cellular responses, such as migration, growth, and differentiation. In this study, we investigated the mechanism of S1P-modulated MSC differentiation.

We found that S1P enhances Wnt5a expression, which leads to the trigger of osteogenic differentiation in MSC. Furthermore, we found that S1P/S1PR2 signaling promotes osteogenic differentiation and bone formation in vivo. Our results suggest a potential beneficial role of this compound for hard tissue regeneration.

研究分野：歯科保存学

キーワード：骨 分化 スフィンゴシン-1-リン酸 未分化間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

歯髄の保存を可能とする究極の治療法の確立、根尖性歯周炎や歯内歯周病変により失われた歯周組織の再生は、「歯の保存」を介して QOL の向上に大きく貢献する。歯髄組織には多分化能を持つ歯髄幹細胞が存在することが報告されている。また、歯根膜組織にも歯根膜幹細胞が存在する。近年の iPS 細胞あるいは ES 細胞の研究から象徴されるように、幹細胞は組織再生に主要な要素である。しかしながら、歯髄幹細胞及び歯根膜幹細胞分化制御機構に関する分子レベルでの知見は未だ少ない。

間葉系幹細胞は、特異的な転写因子の働きにより骨芽細胞、脂肪細胞、神経細胞等への多分化能を有する。これまでのところ、間葉系幹細胞の分化過程で、骨芽細胞と脂肪細胞は相互に分化を阻害しあうことが示唆されている。歯髄組織、歯根膜組織には、この間葉系幹細胞が豊富に存在しており、象牙芽細胞、セメント芽細胞もこの間葉系幹細胞から分化する。

本研究で注目したスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は生体内、特に血漿中に多く存在する。生体膜を構成するスフィンゴ脂質の代謝産物で、スフィンゴシンキナーゼという酵素により膜から切り出され遊離した後に細胞膜上の受容体に結合し、シグナル伝達分子としての役割を担う。

S1P と硬組織関連の知見として、破骨細胞分化抑制作用、骨吸収抑制作用があるが、我々はこれまでに、*in vitro* における S1P/S1PR1 受容体シグナル伝達経路による骨芽細胞分化促進作用メカニズムを報告した。

本研究では、間葉系幹細胞の分化における制御因子としての S1P の役割の解明を行うことにより、新規の硬組織再生治療法の開発と臨床応用に繋げるべく検討を行った。

2. 研究の目的

(1) 間葉系幹細胞を用いて、分化を制御する一連のシグナル伝達機構における S1P の作用点を分子レベルで明らかにする。骨芽細胞分化と脂肪細胞分化は相互に分化を阻害しあうことが明らかとなっているため、特に S1P が間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化ならびに脂肪細胞への分化に及ぼす影響に焦点を絞り、間葉系幹細胞分化における新規制御因子としての S1P の役割を解明する、(2) 動物モデルを用いて *in vivo* における S1P の硬組織形成促進作用とその作用機序について検証する。

3. 研究の方法

未分化間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞を用いて、(1) S1P による骨芽細胞への分化機構の解明を行う。特に、骨芽細胞分化に重要な Wnt シグナル伝達経路に及ぼす S1P の影響について検討を行う。(2) S1P による脂肪細胞への分化機構の解明を行う。細胞内 cAMP 蓄

積による脂肪細胞分化促進メカニズムが報告されている一方で、S1P は細胞内 cAMP 濃度を減少する作用が知られていることから、脂肪細胞分化において S1P が細胞内 cAMP 濃度に及ぼす影響について検討を行う。また、(3) 動物モデルを用いて、*in vivo* における S1P の硬組織形成促進作用の検証を行う。マウス腹腔内に S1PR1 受容体及び S1PR2 受容体特異的作動薬・阻害薬を投与し、microCT を用いて、脛骨における骨量等の海綿骨各種パラメーターへの影響を解析する。

4. 研究成果

(1) S1P により、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化促進作用が明らかとなった。すなわち、骨芽細胞分化マーカーである Alkaline phosphatase ならびに osteocalcin の遺伝子発現増加を見出した。また、石灰化の亢進を見出した。S1P による Wnt5a 分泌増加作用が、beta-catenin 依存性の標準 Wnt 経路の協働受容体である LRP5/6 の遺伝子発現を増加させた。この現象は Wnt5a 中和抗体により抑制されたことから、S1P による間葉系幹細胞の骨芽細胞分化促進作用には Wnt5a の分泌増加が関与することが示唆された。また、この経路は内在性の beta-catenin 依存性 Wnt 経路に依存しないことも見出した。

(2) S1P により、間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化抑制作用が明らかとなった。すなわち、脂肪細胞分化マーカーである C/EBPbeta、PPARgamma の遺伝子発現の抑制ならびに脂肪滴形成の抑制を見出した。Gi 依存性の S1P/S1PR1 シグナル伝達経路の活性化が cAMP の細胞内蓄積阻害とそれに引き続く PKA 活性抑制ならびに C/EBPbeta、PPARgamma の発現量減少を引き起こし、間葉系幹細胞の脂肪細胞分化を抑制することを明らかにした。

(3) 動物モデルにおいて、S1P が硬組織形成に及ぼす影響について検討するため、まず骨組織における S1P の作用とその機序について、マウス脛骨を用いて S1PR1 および S1PR2 受容体特異的作動薬・阻害薬が海綿骨組織に及ぼす影響について検討した。その結果、S1PR1 受容体のみならず、S1PR2 受容体を介した骨組織形成促進作用を見出した。この S1PR2 受容体を介した骨形成促進作用は、RhoA/ROCK シグナル伝達経路の阻害剤を用いると抑制されたことから、マウス脛骨骨組織における S1P による骨形成促進作用の一部に、S1PR2/RhoA/ROCK シグナル伝達経路の活性化が関与することを明らかにした。

上記(1)-(3)は雑誌論文として世界に先駆けて発表した。本研究により得られた成果は、S1P を用いた骨組織・硬組織再生治療法の新規開発へ臨床応用する基盤となった。

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)

(1) Higashi K, Matsuzaki E, Hashimoto Y, Takahashi-Yanaga F, Takano A, Anan H, Hirata M, Nishimura F, Sphingosine-1-phosphate/S1PR2-mediated signaling triggers Smad1/5/8 phosphorylation and thereby induces Runx2 expression in osteoblasts, Bone, 93:1-11, 2016. 査読有 10.1016/j.bone.2016.09.003

(2) Hashimoto Y, Kobayashi M, Matsuzaki E, Higashi K, Takahashi-Yanaga F, Takano A, Hirata M, Nishimura F, Sphingosine-1-phosphate-enhanced Wnt5a promotes osteogenic differentiation in C3H10T1/2 cells, Cell Biol Int, 40:1129-1136, 2016. 査読有 10.1002/cbin.10652

(3) Hashimoto Y, Matsuzaki E, Higashi K, Takahashi-Yanaga F, Takano A, Hirata M, Nishimura F, Sphingosine-1-phosphate inhibits differentiation of C3H10T1/2 cells into adipocyte, Mol Cell Biochem, 401:39-47, 2015. 査読有 10.1007/s11010-014-2290-1

[学会発表] (計 14 件)

(1) Matsuzaki E, Higashi K, Hashimoto Y, Nishimura F, Anan H, The role of S1PR2/Smad1/5/8 signaling on bone formation, 第 90 回日本薬理学会年会, 2017 年 3 月 15-17 日, 長崎ブリックホール (長崎県・長崎市)

(2) 松崎英津子, 東 克匡, 橋本陽子, 西村英紀, スフィンゴシン-1-リン酸受容体 2 作動薬による骨形成促進作用とそのメカニズム, 第 37 回日本臨床薬理学会学術総会, 2016 年 12 月 1-3 日, 米子コンベンションセンター (鳥取県・米子市)

(3) 松崎英津子, 橋本陽子, 東 克匡, 高野愛子, 西村英紀, スフィンゴシン-1-リン酸による骨芽細胞分化促進メカニズム, 第 23 回日本歯科医学会総会, 2016 年 10 月 21-23 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

(4) Matsuzaki E, Hashimoto Y, Higashi K, Takano A, Nishimura F, Anan H, A novel S1PR1/R2 signaling induces osteoblast differentiation, IADR/PBRG, 2016 年 6 月 26-27 日, 名古屋市工業研究所 (愛知県・名古屋市)

(5) Matsuzaki E, Cell signaling mechanisms of S1P-induced osteoblast and mesenchymal stem cell differentiation, JADR (63rd), 2015 年 10 月 30-31 日, 福岡国際会議場 (福

岡県・福岡市)

(6) Hashimoto Y, Matsuzaki E, Higashi K, Takano A, Nishimura F, The involvement of Wnt5a in sphingosine-1-phosphate-modulated mesenchymal stem cell differentiation into osteoblast, JADR (63rd), 2015 年 10 月 30-31 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

(7) Hashimoto Y, Matsuzaki E, Higashi K, Takano A, Nishimura F, The involvement of Wnt5a in sphingosine-1-phosphate-modulated mesenchymal stem cell differentiation into osteoblast, 第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2015 年 9 月 12-13 日, アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)

(8) Hashimoto Y, Matsuzaki E, Higashi K, Takano A, Nishimura F, S1P suppresses cAMP accumulation and thereby inhibits adipogenic differentiation of C3H10T1/2 cells, 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 18-20 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

(9) 東 克匡, 松崎英津子, 橋本陽子, 西村英紀, スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は S1PR2 受容体を介して骨芽細胞における Smad1/5/8 リン酸化及び Runx2 発現を促進する, 日本歯科保存学会 2014 年度秋季学術大会, 2014 年 10 月 30-31 日, 山形テルサ (山形県・山形市)

(10) 橋本陽子, 松崎英津子, 東 克匡, 高野愛子, 西村英紀, 未分化間葉系幹細胞の脂肪細胞分化における脂質メディエーターの役割, 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会, 2014 年 5 月 23-24 日, 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 英津子 (Etsuko Matsuzaki)
福岡歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 20432924

(2) 研究分担者

高橋 富美 (Fumi Takahashi-Yanaga)
九州大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・講師
研究者番号: 50274436

(3) 研究分担者

西村 英紀 (Fusanori Nishimura)
九州大学・歯学研究科 (研究院)・教授
研究者番号: 80208222

(4) 研究協力者

東 陽子 (Yoko Higashi)
九州大学・歯学研究科 (研究院)・医員
研究者番号 : 90755042

(5) 研究協力者

東 克匡 (Katsumasa Higashi)
九州大学・歯学研究科 (研究院)・医員
研究者番号 : 90778846