

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462905

研究課題名(和文) 生体高分子ポリリン酸が間葉系幹細胞の分化に及ぼす効果

研究課題名(英文) Effects of bio-polymeric inorganic polyphosphates on the differentiation of mesenchymal stem cells

研究代表者

中田 和彦 (NAKATA, KAZUHIKO)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：70261013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト間葉系幹細胞に対するポリリン酸の効果を検索するため、ヒト骨髄および脂肪由来間葉系幹細胞とsiRNAを用いて骨芽細胞への分化を評価した。その結果、ポリリン酸添加により、MMP-13遺伝子とタンパク質発現および酵素活性が認められた。さらに、骨芽細胞分化マーカーの発現ならびに石灰化の亢進が認められ、MMP-13 siRNA処理により、分化マーカーの発現抑制が確認された。

本研究により、ポリリン酸はヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を誘導し、その分化機構はMMP-13によって制御されることを明示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, small interfering RNA (siRNA) was transfected into human bone marrow or adipose tissue derived mesenchymal stem cells to investigate inorganic polyphosphate [Poly (P)] is associated with cell differentiation into osteogenic cells. These cells developed an osteogenic phenotype with increased expression of Poly(P)-induced expression of matrix metalloproteinase (MMP)-13 mRNA and protein, and increased MMP-13 activity. Poly(P) also enhanced expression of mature osteoblast markers, and increased alkaline phosphatase activity and calcification capacity in these cells. MMP-13 siRNA potently suppressed the expression of osteogenic biomarkers, and blocked osteogenic calcification.

Taken together, Poly(P)-induced MMP-13 regulates differentiation of osteogenic cells from human mesenchymal stem cells.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：ポリリン酸 生体高分子 間葉系幹細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

生体高分子無機ポリリン酸塩 (Bio-polymeric inorganic polyphosphates, 以下、ポリリン酸 [Poly(P)]) は、リン酸が直鎖状に数個から数千個結合した高分子化合物で、微生物から哺乳類に至るまで、あらゆる生物の組織内に存在している。これまでポリリン酸 [Poly(P)] は、微生物が過酷な環境下で生き残るためのエネルギー源として考えられていたが、近年、このポリリン酸 [Poly(P)] が細胞成長因子を安定化することによって、さまざまな細胞の生理活性に影響を与えることが明らかにされ、さらに、骨分化マーカーの発現誘導や石灰化を誘導するとの報告もある。

これまでに申請者らは、自家調製したポリリン酸 [Poly(P)] を至適濃度でラット歯髄細胞に作用させると、その増殖活性を有意に促進し、分化にも関与することを見い出している。

一方、生体に対するポリリン酸 [Poly(P)] の影響に関しては、毒性試験によって無害であることがわかっており、食品添加物として変色防止や結着性向上などの目的で以前から広く使用されているが、その以外についてはまだほとんど解明されていない。

したがって、ポリリン酸 [Poly(P)] は組織再生への応用という観点から、非常に有望な医療用材料となりうる可能性がある。

2. 研究の目的

生体高分子であるポリリン酸 [Poly(P)] は、抗炎症作用や創傷治癒促進作用などを有することから、申請者らは、このポリリン酸 [Poly(P)] が新規な医療用材料として有望であると考え研究を開始し、これまでに歯髄細胞の増殖と分化に有効であるという研究成果を発表している。

本研究課題の目的は、これまでの申請者らの研究をさらに発展させ、ポリリン酸 [Poly(P)] を応用する新たな再生療法の開発

をめざし、間葉系幹細胞の分化に対するポリリン酸 [Poly(P)] の効果について検索することである。

3. 研究の方法

間葉系幹細胞の分化に及ぼす生体高分子ポリリン酸 [Poly(P)] の効果について、その基礎的知見を得るため、マウス iPS 細胞由来高純度象牙芽細胞 (iPS-OD: Mouse induced pluripotent stem cells-derived odontoblast like cells)、ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞 (hBM-MSC: Human bone marrow derived mesenchymal stem cells) およびヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (hAT-MSC: Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells) に作用させ、これらの細胞の増殖と分化に及ぼす効果とともに、抗菌作用についても新たに検索した。

4. 研究成果

(1) Poly-P65 のヒト間葉系幹細胞増殖における至適濃度の検討

ポリリン酸ナトリウム (太平化学産業) を原材料として、エタノール沈殿法を用いて、鎖長 65 の分割ポリリン酸 (Poly-P65) を調製した。iPS-OD を 6-well plate に 1×10^5 cells/well になるように播種し、24 時間培養後 PBS (-) で洗浄した。1% FBS 含有 D-MEM もしくは α -MEM 培地 (Rat KN-3 細胞: Positive control) を加え、Poly-P65 (0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mM) にて 24 時間刺激後、BrdU を用いた cell proliferation ELISA kit (Roche Applied Science) にて細胞増殖活性測定を行った。その結果、0.1mM の Poly-P65 添加群において、統計学的有意な細胞増殖が観察された。

また、hBM-MSC を Poly-P65 同条件下にて 24 時間刺激後、細胞増殖活性測定を行った結果、0.1mM Poly-P65 添加群において、統計学的有意な細胞増殖が観察された。

さらに、hAT-MSC を Poly-P65 同条件下にて

24 時間刺激後、細胞増殖活性を行った結果、0.2mM Poly-P65 添加群において、統計学的有意な細胞増殖が観察された。

(2) Poly-P65 のヒト間葉系幹細胞分化に及ぼす効果の検討

0.1 mM Poly-P65 添加後、7 日間培養で hBM-MSC の骨芽細胞分化マーカーの遺伝子とタンパク質発現が統計的有意に認められたが、象牙芽細胞分化マーカーの発現亢進は見出せなかった。その一方、石灰化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性ならびにアリザリンレッド染色の上昇は認められなかった。さらにマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) について検討した結果、hBM-MSC に 0.1 mM Poly-P65 を添加し、1, 3, 5 および 7 日間反応させたところ、本細胞には MMP-3, MMP-13 の遺伝子とタンパク質発現がみられた。また内因性の MMP 阻害因子である TIMP-1, TIMP-2 の遺伝子およびタンパク質発現がみられた。MMP-13 酵素活性は、添加 3 日目から統計的有意な上昇を認めた一方、MMP-3 活性は、コントロールとほぼ同値であった。

hAT-MSC においては、0.2 mM Poly-P65 添加後 7 日間培養で、骨芽細胞分化マーカーの遺伝子とタンパク質の発現が統計的有意に認められ、石灰化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性ならびにアリザリンレッド染色度の上昇も認められた。さらに、今回新たに MMP-13 についても検索した結果、0.2 mM Poly-P65 は hAT-MSC の MMP-13 遺伝子とタンパク質発現を誘導し、また酵素活性の統計的有意な上昇が認められた。

(3) Poly-P65 の抗菌作用

大腸菌および *Porphyromonas gingivalis* を用い、ディスク法により Poly-P65 の抗菌作用について検索した結果、ヒト間葉系幹細胞において細胞増殖能と骨芽細胞分化能を示した

0.1/0.2mM Poly-P65 では、抗菌作用が認められなかった。

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4件)

Ozeki N, Mogi M, Hase N, Hiyama T, Yamaguchi H, Kawai R, Nakata K.

Polyphosphate-induced matrix metalloproteinase-13 is required for osteoblast-like cell differentiation in human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *BioScience Trends* 査読有, 2016; 10(5): 365-371. DOI:10.5582/bst.2016.01153

Hiyama T, Ozeki N, Hase N, Yamaguchi H, Kawai R, Kondo A, Mogi M, Nakata K.

Polyphosphate-induced matrix metalloproteinase-3-mediated differentiation in rat dental pulp fibroblast-like cells. *BioScience Trends* 査読有, 2015; 9(6): 360-366.

Ozeki N, Yamaguchi H, Hase N, Hiyama T, Kawai R, Kondo A, Nakata K, Mogi M.

Polyphosphate-induced matrix metalloproteinase-3-mediated proliferation in rat dental pulp fibroblast-like cells is mediated by a Wnt5 signaling cascade. *BioScience Trends* 査読有, 2015; 9(3): 160-168.

Ozeki N, Hase N, Yamaguchi H, Hiyama T, Kawai R, Kondo A, Nakata K, Mogi M.

Polyphosphate induces matrix metalloproteinase-3-mediated proliferation of odontoblast-like cells derived from induced pluripotent stem cells. *Experimental Cell Research* 査読有, 333: 303-315, 2015.

[学会発表](計7件)

長谷 奈央子, 尾関伸明, 山口秀幸, 檜山太希, 川合里絵, 茂木 眞希雄, 中田和彦. ポリリン酸誘導マトリックスメタロプロテアーゼ

-13 はヒト骨髄由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を制御する. 日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会 (第 145 回), 2016 年 10 月 28 日, キッセイ文化ホール (長野県松本市)

檜山太希, 尾関伸明, 山口秀幸, 長谷 奈央子, 川合里絵, 中田和彦. ポリリン酸誘導マトリックスメタロプロテアーゼ-3 はラット歯髄細胞の分化を制御する. 第 87 回愛知学院大学歯学会学術大会, 2015 年 12 月 6 日, 愛知学院大学歯学部基礎教育研究棟第一講義室 (愛知県名古屋市)

尾関伸明, 山口秀幸, 檜山太希, 川合里絵, 茂木 眞希雄, 中田和彦. ラット歯髄由来線維芽細胞におけるポリリン酸誘導 MMP-3 は Wnt5-Lrp5 シグナルを介して細胞増殖を制御する. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2015 年 9 月 13 日, 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)

茂木 眞希雄, 尾関伸明, 森田あや美, 中田和彦. マウス iPS 細胞由来象牙芽細胞におけるポリリン酸誘導 MMP-3 は細胞増殖を制御する. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会, 2015 年 7 月 23 日, 京王プラザホテル (東京都新宿区)

尾関伸明, 山口秀幸, 檜山太希, 長谷奈央子, 川合里絵, 中田和彦. ラット歯髄由来線維芽細胞におけるポリリン酸誘導 MMP-3 は Wnt5 シグナルを介して細胞増殖を制御する. 第 36 回日本歯内療法学会学術大会, 2015 年 7 月 11 日, 鶴見大学記念館 (神奈川県横浜市)

長谷 奈央子, 尾関伸明, 山口秀幸, 檜山太希, 川合里絵, 茂木 眞希雄, 中田和彦. ポリリン酸誘導 MMP-3 はマウス iPS 細胞由来象牙芽細胞の細胞増殖を制御する. 日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会 (第 142 回), 2015 年 6 月 26 日, 西日本総合展示場・北九州

国際会議場 (福岡県北九州市)

Mogi M, Ozeki N, Hase N, Yamaguchi H, Hiyama T, Kawai R, Kondo A, Nakata K. Inorganic Polyphosphate Induce MMP-3-Mediated Proliferation in Odontoblasts Derived from iPS Cells. 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015 年 3 月 19 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 和彦 (Nakata Kazuhiko)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号: 70261013

(2) 研究分担者

尾関 伸明 (Ozeki Nobuaki)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号: 70469005

(3) 連携研究者

茂木 眞希雄 (Mogi Makio)
愛知学院大学・薬学部・准教授
研究者番号: 00174334