上原記念生命科学財団研究報告集, 30 (2016)

138. 成体間葉系幹細胞の個体レベルでの機能解析

宝田　剛志

*金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 薬物学研究室

Key words：間葉系幹細胞，Runx2，Prx1，Sca1

緒　言

間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell、MSC）は、自己複製能と間葉系細胞への多分化能を有する幹細胞であり、骨髄以外にも真皮、骨格筋あるいは脂肪など様々な組織にも存在することが報告されており、各組織の恒常性維持や修復機構に関与する可能性が示唆されている。同幹細胞に由来する骨芽細胞は、骨密度恒常性の維持を担うとともに、骨粗鬆症をはじめとする骨代謝性疾患の病態発症に関与する。私は、MSC の実態を明らかとし、その生理学的･病態生理学的意義を追究することを目的に、MSC から骨芽細胞への分化過程に必須な転写制御因子 Runt-related transcription factor-2（Runx2）に着目している。本研究では、Runx2 を細胞種特異的に欠損させることが可能な遺伝子改変マウス（Runx2 コンディショナル欠損マウス）を利用して、個体レベルにおいて、間葉系幹細胞の動態についての解析を行った。

方法および結果

Runx2 は Core-binding factor β（Cbfb）と 2 量体を形成して核内に移行してその結合配列に結合し、オステオポンチン、オステオカルシンといった細胞外基質、マトリックスメタロプロテアーゼ 13 などの種々の遺伝子の転写を活性化することにより、骨芽細胞の分化過程を制御している。Runx2 を全身的に欠損することで膜性骨化が完全に障害されること[1,2] を考えると、骨形成過程において Runx2 は、間葉系幹細胞から骨芽細胞へのコミットメント、あるいは分化過程において必須の役割を担うことが強く示唆される。開発した Runx2 コンディショナル欠損マウス[3] を使用することで、「どういった間葉系幹細胞で Runx2 が骨を作るのに重要なのか？」といった問いに個体レベルでの答えを出すことができるのではと考えた。

現状では MSC と一言で言っても、多数のマーカーが乱立しており、どのマーカー陽性な MSC が真に骨形成に重要であるのかは不明である。そこで、近年特に注目されている MSC マーカーである Paired related homeobox 1（Prx1）と Nestin に注目した。マウス遺伝学にて、Prx1$^+$細胞（*Prx1-Cre* マウス）、あるいは Nestin $^+$細胞（*Nestin-Cre* マウス）、それぞれの細胞特異的な Runx2 欠損マウスを作製し（*Prx1-Cre;Runx2* $^{flox/flox}$、*Nestin-Cre;Runx2* $^{flox/flox}$）、骨格標本を解析した。その結果、*Nestin-Cre;Runx2* $^{flox/flox}$ では著明な変化認められないのに対して、*Prx1-Cre;Runx2* $^{flox/flox}$ マウスでは、骨格形成に異常が認められ、特に、膜性骨化が行われる頭蓋冠にて骨化が顕著に障害されていることが分かった。つまり、Prx1$^+$細胞の系譜細胞にて Runx2 が、骨化に重要であることが示唆される（図 1）。

*現所属：岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 組織機能修復学分野

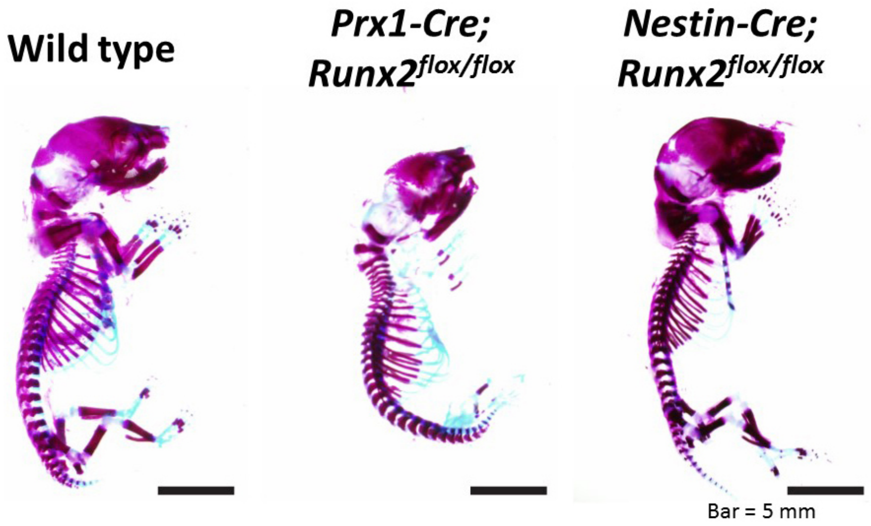

図 1.　Prx1⁺細胞、Nestin ⁺細胞特異的な Runx2 欠損マウスの骨格標本（E18.5）
Nestin ⁺細胞特異的な Runx2 欠損マウスでは著明な変化認められないのに対して、Prx1⁺細胞な Runx2 欠損マウスでは、骨格形成に異常が認められる。特に、MSC から骨芽細胞への直接的な分化による骨化である膜性骨化が行われる頭蓋冠に注目すると、骨形成が顕著に障害されていることが分かる。

そこで次に、Prx1⁺細胞の局在や性質を調べるために、Prx1⁺細胞が GFP にてラベルされる *Prx1-GFP* マウスを使用した。同マウスの頭蓋冠を観察すると、GFP にてラベルされた Prx1⁺細胞が縫合の部位に非常に多く存在することが分かった。この Prx1⁺細胞を頭蓋冠から酵素処理により単離し、各種 MSC マーカー（CD29、CD49e、CD51、CD61、CD90、CD105、PDGFR α、Sca1）の発現を Flow cytometry 法により単一細胞レベルで解析した。その結果、Prx1⁺細胞中での各マーカー陽性な細胞の割合に関しては、高値と低値を示すマーカー種が混在していることが分かり、Prx1⁺細胞は、均一な集団ではなく、ヘテロな集団を構成することが考えられた。そこで次に、Prx1⁺細胞中での陽性細胞の割合が一番低かった Sca1 に注目し、Prx1⁺Sca1⁺細胞と Prx1⁺Sca1⁻細胞とに分けて解析した。その結果、Prx1⁺Sca1⁺細胞では、ほとんどの MSC マーカーに対する陽性細胞の割合が 100 %近くに達し、Prx1⁺Sca1⁻細胞ではそのような傾向は認められなかった。つまり Prx1⁺Sca1⁺細胞は、均一同一な MSC 集団であることが示唆された（図 2）。

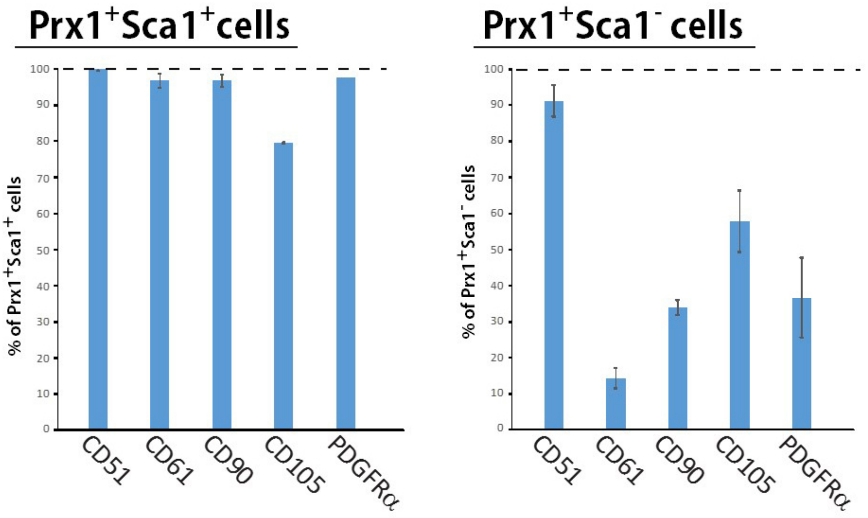

図 2.　Prx1⁺Sca1⁺細胞と Prx1⁺Sca1⁻細胞での MSC 細胞表面マーカーの発現
Prx1⁺Sca1⁺細胞の殆どが、各種 MSC マーカ陽性であるのに対して、Prx1⁺Sca1⁻細胞ではそのような傾向は認められない。つまり Prx1⁺Sca1⁺細胞は、均一同一な Homogeneous な集団であることが示唆される。

更に、Prx1⁺Sca1⁺細胞と Prx1⁺Sca1⁻細胞を、それぞれ Cell Sorter により分取し、自己複製能の指標としての Colony forming unit-fibroblasts（CFU-F）形成率、多分化能の指標としての骨芽細胞系列、脂肪細胞系列への分化実験を実施した。その結果、Prx1⁺Sca1⁺細胞は、Prx1⁺Sca1⁻細胞と比べて、CFU-F の形成率は非常に高く、分化実験においては、骨芽細胞系列だけではなく、脂肪細胞系列への分化も認められた。つまり、Prx1⁺細胞の中でも Prx1⁺Sca1⁺細胞が、自己複製能と多分化能を持つ MSC としての性質をもつことが明らかとなった（図 3）。

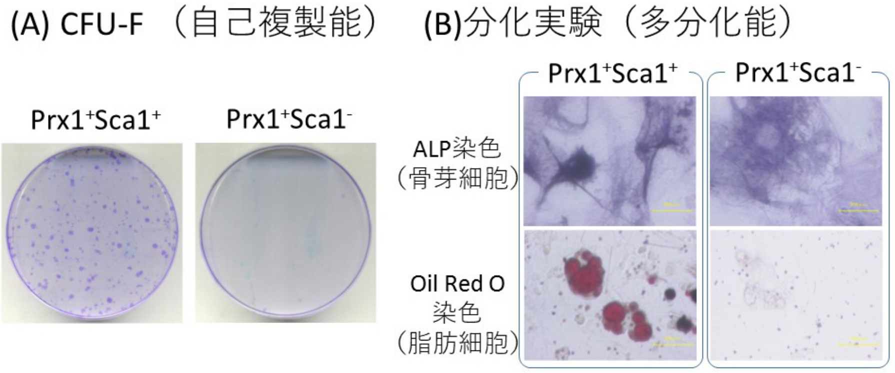

図 3.　Prx1⁺Sca1⁺細胞と Prx1⁺Sca1⁻細胞での自己複製能と多分化能
Prx1⁺Sca1⁺細胞と Prx1⁺Sca1⁻細胞をそれぞれ Cell sorter により分取し、(A）自己複製能の指標としての CFU-F 形成率、(B）多分化能の指標としての骨芽細胞系列、脂肪細胞系列への分化実験を実施した。Prx1⁺Sca1⁺細胞は、Prx1⁺Sca1⁻細胞と比べて、CFU-F の形成率は非常に高く、また、分化実験においては、骨芽細胞系列だけではなく、脂肪細胞系列にも分化することがわかる。

これらの研究結果から、MSC から骨芽細胞に至る分化過程においては、Prx1⁺Sca1⁺細胞、Prx1⁺Sca1⁻細胞、前骨芽細胞マーカーのマーカーである Osterix（Osx）陽性な Prx1⁻Sca1⁻Osx⁺前骨芽細胞、そして Prx1⁻Sca1⁻Collagen(I)⁺成熟骨芽細胞が存在し、これらの細胞が順次分化･成熟化することにより、骨形成が行われることが推察される。では、

Runx2 はどの分化段階までの細胞において、骨化に必須の役割を担うのであろうか。それを調べるために、再度マウス遺伝学の手法を利用して、Osx$^+$細胞（*Osx-Cre* マウス）特異的な Runx2 欠損マウスを作製し、骨格標本を解析した。その結果、同マウスでは著明な骨格形成の異常が認められ、特に、膜性骨化が行われる頭蓋冠では、Runx2 全身欠損マウスと同程度に骨化が顕著に障害されていることがわかった。つまり、Prx1$^-$Sca1$^-$Osx$^+$細胞においても Runx2 が骨化に重要であることがわかる。

従来は、どういった MSC が、前骨芽細胞や骨芽細胞となり、骨形成に関与するのかが分かっておらず、そのため、Runx2 が骨芽細胞分化系列のどういった段階で重要であるのかも長らく不明であった。既存の複数の MSC マーカーを用いた研究の結果から、その内の 2 つ、Prx1 と Sca1 が共陽性な MSC が最も幹細胞性の高い MSC であり、まず Sca1 陰性となり、次に Prx1 陰性 な Osx 陽性細胞となり、そして成熟した骨芽細胞となる、という骨形成への分化過程の詳細を明らかにした。また、Prx1$^+$Sca1$^+$細胞から Prx1$^-$Sca1$^-$Osx$^+$細胞になる段階までの間に、Runx2 が骨形成のうえで必須の働きを持つことが分かった[4]（図 4）。

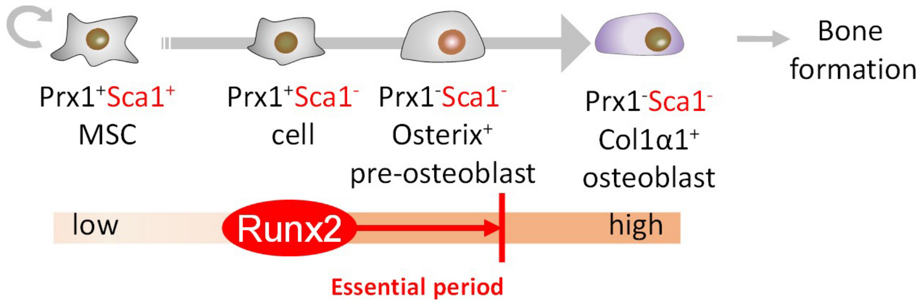

図 4.　骨形成を担う間葉系幹細胞の細胞生物学的な特徴づけ

既存の複数の MSC マーカーを用いた研究の結果から、その内の 2 つ、Prx1 と Sca1 が共陽性な MSC が最も幹細胞性の高い MSC であり、まず Sca1 陰性となり、次に Prx1 陰性な Osterix 陽性細胞となり、そして成熟した骨芽細胞となる、という骨形成過程の詳細を明らかとした。また，従来は，Runx2 がどういった時期で重要なのかがわかっていなかったが、Prx1Sca1 共陽性細胞から Prx1Sca1 共陰性な Osterix 陽性細胞になる段階までの間に、Runx2 が骨を作るうえで必須の働きを持つことが分かった[4]。

考　察

今回得られた情報は、移植再生医療において、MSC のみだけではなく、iPS/ES 細胞などを使用した際の、適切な分化誘導技術を確立するための指標としても重要となると考えられる。また、MSC の特徴づけを実際の生体内で実施しているので、これは移植再生応用のみならず、将来的には新規の薬剤の開発による内在性幹細胞の賦活による再生治療の可能性を広げるものと考える。従来の視点とは異なる分化以前の幹細胞に注目した創薬基礎研究は、有効な治療薬や予防薬の開発が難航している現状に新規な創薬戦略をもたらすことを期待したい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、金沢大学医薬保健研究域薬学系の米田幸雄教授、檜井栄一准教授、中里亮太博士、藤川晃一氏、家崎高志氏、土金あずさ氏である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1) Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M and others. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell 1997;89:755-64. PubMed PMID: 9182763.

2) Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR and others. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. Cell 1997;89:765-71. PubMed PMID: 9182764.

3) Takarada T, Hinoi E, Nakazato R, Ochi H, Xu C, Tsuchikane A, Takeda S, Karsenty G, Abe T, Kiyonari H and others. An analysis of skeletal development in osteoblast-specific and chondrocyte-specific runt-related transcription factor-2 (Runx2) knockout mice. J Bone Miner Res 2013;28:2064-9. doi: 10.1002/jbmr.1945. PubMed PMID: 23553905.

4) Takarada T, Nakazato R, Tsuchikane A, Fujikawa K, Iezaki T, Yoneda Y, Hinoi E. Genetic analysis of Runx2 function during intramembranous ossification. Development 2016;143:211-8. doi: 10.1242/dev.128793. PubMed PMID: 26657773.