平成18年度日本レーザー医学会総会賞受賞**AWARDED ARTICLE****解説 REVIEW ARTICLE****レーザーによる骨髄幹細胞の骨分化促進とそのメカニズム**櫛引 俊宏^{1,2}, 栗津 邦男³¹大阪大学大学院工学研究科附属フロンティア研究センター グローバル若手研究者フロンティア研究拠点² (独) 科学技術振興機構 さきがけ「光の創成・操作と展開」研究領域³ 大阪大学大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻

(平成19年6月5日受理, 平成19年6月21日掲載決定)

Enhancement of bone marrow stem cell differentiation with laser technologyToshihiro Kushibiki^{1,2}, Kunio Awazu³¹Frontier Research Base for Global Young Researchers, Frontier Research Center, Graduate School of Engineering, Osaka University²PRESTO, Japan Science and Technology Agency³Division of Sustainable Energy and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Osaka University

(Received June 5, 2007, Accepted June 21, 2007)

要 旨

骨髄から採取できる間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)は自己複製能をもち、さらに骨芽細胞や脂肪細胞といった間葉系の組織細胞へと分化する能力を有している。本研究では波長405nmのレーザーをMSCsに照射することにより、骨芽細胞への分化を促進できた。さらにそのメカニズムとして、体内時計(サーカディアンリズム)関連因子のCryptochrome 1の細胞内局在の変化を明らかにした。本研究結果であるレーザー技術による細胞の分化制御は、疾病の新しい治療方法、体内時計リズムと細胞機能の解析に新規レーザープロセスとして用いることができる。

キーワード: クリプトクロム, 体内時計, 間葉系幹細胞, 青色レーザー

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells present in adult bone marrow that replicate as undifferentiated cells and can differentiate to lineages of mesenchymal tissues. Here we show that blue laser (wave length; 405 nm) irradiation can influence the differentiation of mouse MSCs into osteoblasts by altering the intracellular localization of the circadian rhythm protein Cryptochrome 1 (mCRY1). Laser irradiation could provide a simple and effective means of controlling the fate of implanted MSCs as a therapeutic strategy. Furthermore, this model system may be useful for exploring the crosstalk between circadian rhythm and cell differentiation.

Key Words: cryptochrome, circadian rhythms, mesenchymal stem cells, blue laser

幹細胞を利用した再生医療の実現化は21世紀の臨床医学における悲願の一つである。本研究では、光技術を用いることによって既存の分子生物学的手法では達成できていない生体由来幹細胞の分化を制御し再生医療実現化へのブレークスルーとなる光技術を創成、提案している。本論文ではその中から骨髄間葉系幹細胞株を用いたレーザー照射による骨芽細胞分化促進作用について論述する。

再生医療と幹細胞移植

幹細胞は、ある細胞に変化するという“指示”を受けると特定の細胞に変身、すなわち分化する能力を持っている。また、変化を遂げる前の未分化の状態でも長期間にわたって自らを複製、再生する能力も備えている。胚からは胚性幹細胞(ES細胞)、成人からは成体幹細胞、胎児からは胚生殖細胞を採り出すことができる。幹細胞は様々な細胞へ分化する能力と高い増殖能力を持つため、失われた細胞を再生して補うという治療法(再生医療)への応用が期待されている。パーキンソン病、心筋梗塞、脊椎損傷、白血病、糖尿病、肝臓病など様々な病気の治療への応用が期待され、一部は既に臨床治験が始まっている。しかしながら、再生医療があと一歩で現実的なものとならない理由の一つとして、幹細胞をそのまま患者に移植してもほとんど効果が無いことがあげられる。治療効果が無いだけではなく、移植前に長期間培養した幹細胞が癌細胞化したという報告もある¹⁾。これらを解決するためには、移植前の幹細胞を目的の細胞となるように分化誘導を行った後、移植する必要がある。しかしながら、幹細胞の未分化性維持や分化誘導を行う方法として遺伝子組み換え技術や薬剤添加による方法が行われているが、遺伝子組み換えに用いるウィルスに起因する癌細胞化²⁾など、臨床で移植に耐え得るほど十分な成果が得られていないのが現状である。そのため、ウィルスを用いない細胞内への遺伝子導入方法が試みられているが³⁾、遺伝子組み換えや薬剤に頼らない幹細胞分化技術の開発も必要である。そこで私たちは幹細胞の中でも骨髄間葉系幹細胞に非侵襲的にレーザー照射を適用し、幹細胞分化技術の確立を試みている。間葉系幹細胞は骨髄中に存在し骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋肉細胞などに分化できる細胞を指している。たとえば、骨粗鬆症や重度の骨欠損の治療では、患者から一時的に骨髄を採取し、間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させた後に移植することで、骨欠損部のスムーズな回復を誘導することが期待できる。

生物リズム(サーカディアンリズム)と生体恒常性(ホメオスタシス)

1日を1周期とする生物リズム(サーカディアンリズム)は、生物の進化の初期に獲得された生命機能であり、単細胞生物から哺乳類・ヒトにいたるまで、現在の地球に生存する多くの生物種に普遍的に見られる生命現象である。1990年代後半には植物から哺乳類にいたるまで広範な生物で時計遺伝子が発見され、普遍的なリズム振動原理が

解明された。これらの研究により、リズム現象は遺伝子・細胞・組織・器官・個体を統合する新しい21世紀のサイエンスの中心として注目されている⁴⁾。ヒトをはじめとした哺乳類においてもさまざまな行動および生理現象におよそ24時間のリズムが存在する。すなわち、時差ぼけや不眠といった身近なものから、睡眠覚醒、体温調節、ホルモン分泌などの基礎生理現象や生体恒常性(ホメオスタシス)だけではなく、薬物代謝や薬物効果にもサーカディアンリズムがあり、時間薬理学(chronopharmacology)として医療の面からも大きな注目を集めている。

サーカディアンリズムと骨芽細胞分化

骨組織においては間葉系幹細胞由来の骨芽細胞による骨形成と単球/マクロファージ由来の破骨細胞による骨吸収が行われており、そのバランスもホメオスタシスの上に成り立っている。Kawasakiらは骨芽細胞における

Fig.1 Circadian rhythms are oscillations in the behaviour and biochemical reactions of organisms, and occur with a periodicity of approximately twenty-four hours. Circadian rhythms are thought to confer a selective advantage to organisms by enabling them to pursue levels of activity that are optimal for growth and development, and that minimize, by establishing favorable time/space niches, susceptibility to predation and competition. In mammals, the core oscillator of the master circadian clock utilizes interacting positive and negative transcription-translation feedback loops. Proteins involved in these feedback loops include two cryptochrome genes (Cry1 and Cry2), three homologs of the period genes (Per1, Per2, and Per3), and the transcriptional activator genes Clock and Bmal1 (Brain and Muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-Like protein 1). A key step in these feedback loops is the shutdown of CLOCK- and BMAL1-driven transcription by CRY proteins. BMAL1 and CLOCK are transcription factors that contain two basic helix-loop-helix domains and bind E-box elements (CACGTG) in the Per and Cry clock genes and thereby effect a positive feedback loop of circadian rhythm regulation.

Bone Morphogenetic Protein (BMP)-4の発現にサーカディアンリズムの中心的な役割を果たすE-box motifが関与していることを示している⁵⁾。また、Fuらはサーカディアンリズムに関連するタンパク質であるCryptochrome (CRY) またはPeriod (PER) をノックアウトしたマウスにおいて、骨量の増加を認めている⁶⁾。これらの報告から、骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞分化はサーカディアンリズムに依存していることがわかる。哺乳類の時計遺伝子は数種の遺伝子群からなり、安定した約24時間周期の分子リズムを作り出している (Fig.1)。この分子時計は体中ほぼすべての細胞に存在して細胞内の時計の役割を果たし、細胞分裂など種々の細胞活動の時間を規定している。本研究では、種々の時計関連因子の中からCRYに着目している。CRYは青色光を吸収し励起されるFADを補酵素(発色団)としてもっている。CRYは高等植物やショウジョウバエなどでは青色光受容体として知られているが⁷⁾、CRYの光受容によりCRY分子内で何が起きているのかという光受容過程は依然として不明のままである。これまでに知られている光受容体は、いずれも発色団の光異性化をきっかけにその構造変化がアポタンパク質に伝わり、タンパク質全体の構造変化が引き起こされることにより光受容シグナルが伝えられている。しかしCRYの場合、発色団がFADであるため光異性化は起こりえない。光により励起されたFADから何らかの基質に電子移動が起こることが考えられるが、詳細は明らかになっていない⁸⁾。

レーザー照射による幹細胞の分化制御

本研究ではCRYの補酵素・FADの吸収帯である波長405nmの青色半導体レーザーを用い、培養骨髄間葉系幹細胞株へレーザーを照射した後のCRYの細胞内分布や発現量変化について研究を行った。また、レーザー照射後のCRY細胞内動態や発現量の人為的制御による細胞分化制御について研究を行った。本研究で用いた培養骨髄間葉系幹細胞株・KUSA-A1細胞は分化誘導により骨細胞や脂肪細胞といった中胚葉系の細胞へ分化することが知られている⁹⁾。プレート底面に接着している細胞へ直接レーザーを照射するため、本実験ではプレート底面からレーザーを照射する光学系を作製した。顕微鏡備付用のステージ位置制御装置(シグマ光機株式会社製)を改良し、温度制御板を装着したステージ上に置いたマイクロプレート下部からレーザー・光照射が行うことのできる光学系を作製した。骨髄間葉系幹細胞に0, 100, 200, 300 mW/cm²で3分間、波長405nm半導体レーザー(連続波)を照射した後、培地を骨分化培地(10 nMデキサメタゾン, 2 mM β -グリセロリン酸, 50 μ g/mLアスコルビン酸および10 %FCSを含むDMEM)に交換し、培養した。Fig.2(A)にレーザーのビームプロファイルと、Fig. 2(B) 種々のエネルギーで骨髄間葉系幹細胞に照射した後の骨芽細胞への分化を確認した結果を示した。細胞へ照射したレーザーは直径500 μ mの円形であった。このレーザーを培養骨髄間葉系幹細胞へ照射した結果、そのビームプロファイルと全く同様の形状でアリザリンレッドS染色された。

Fig.2 (A) The beam profile of the blue laser (wave length; 405 nm, continuous wave). A blue laser was irradiated to MSCs were irradiated for 180 sec with various laser powers (Scale bars indicated = 200 μ m). via a fiber attached to the backside of the 96-well cell culture plate bottom. (B) Histochemical analysis of laser irradiated MSCs. Alizarin red S staining of irradiated MSCs irradiated a blue laser. Calcium phosphate deposition was evaluated by von Kossa staining. At 5 days after treatment, staining increased with that increased with laser energy in irradiated samples at the day 5. The area expressing of activated alkaline phosphatase (ALP) activity was stained. Laser irradiated samples were displayed immunopositive staining of for osteocalcin, a marker of early osteoblast differentiation was positively stained in a laser irradiated samples. Scale bars indicated = 200 (Alizarin red S, von Kossa, and ALP staining) and 100 μ m (osteocalcin immunostaining).

すなわちカルシウムの沈着が認められた。またリン酸カルシウムの染色方法であるvon Kossa染色を行なった結果についても、同様に染色された。さらにアルカリフォスファターゼおよびオステオカルシンの免疫染色においても同様の結果を得た。Fig.3には各培養ウェル中のカルシウム濃度を定量した結果を示した。その結果、照射するレーザーエネルギー依存的にカルシウム量が増加することが明らかとなった。Fig.4(A)には細胞内CRYの免疫染色を行なった結果を示した。レーザーを照射しない群においてCRY 1は細胞質に存在するものの、レーザー照射

Fig.3 The quantitative calcium content was increased after blue laser irradiation compared with that of relative to non-irradiated cells. Calcium content was increases varied withing depended on the laser energy. *, $p < 0.01$: significant difference against between the calcium contents of laser non-irradiated MSCs and controls.

Fig.4 Subcellular location of (A) mCRY1 and (B) mPER2 proteins in MSCs after laser irradiation. and observed Cells were double-labeled with by the method of double staining of nucleus with DAPI (blue, upper panel) and mCRY1 or mPER2 (red, center panel). The lower panel shows provides at the merged image (Scale bars indicated = $30\mu\text{m}$). The localization of mCRY1 and mPER2 localized to the was in the cytoplasm before prior to laser irradiation. After laser irradiation, these were translocated to the nucleus.

Fig.5 mRNA levels of *mCry1* in MSCs 24 hr after laser irradiation (100 mW/cm^2) and in non-irradiated cells MSCs. Samples were normalized to mRsp18. The mRNA levels of mCry1 was decreased after a blue laser irradiation compared relative to with that of non-irradiated cells. *, $p < 0.01$: significant difference between against the relative mRNA levels of laser non-irradiated MSCs and controls.

群はCRYが核へ移行していることが明らかとなった。同様にPER 2の免疫染色を行なった結果、CRY 1の結果と同様、レーザー照射群においてPER 2の核移行が認められた (Fig.4(B))。さらにリアルタイムPCR法により、レーザー照射後のCRY 1 mRNAの定量を行なったところ、レーザーを照射しない群と比較して有意にmRNA量の減少が認められた (Fig.5)。これらの結果から、波長405 nmのレーザー光を受容した補酵素FADを有するCRY 1が、核移行シグナルを有するPER 2と結合し、CRY・PER複合体が核内へ移行したと考えている。サーカディアンリズム (Fig.1) においては、CLOCK、BMALは転写調節領域にE-box配列をもつ遺伝子群の転写を活性化する因子である。CLOCK、BMALがヘテロダイマーを形成しPer, Cryの転写を促進している。そこから翻訳されたPER, CRYタンパク質は細胞質でヘテロダイマーを形成し核に移行する。核に移行したPER, CRYヘテロダイマーはCLOCK, BMALヘテロダイマーに結合し転写を阻害し自らの発現を抑制する。つまり、PER, CRYはE-box配列をもつ遺伝子群の転写抑制因子である。自身の転写の抑制によりPER, CRYヘテロダイマーの量が減少してくると転写抑制が解けPer, Cryの転写が再開される。このようにして遺伝子発現のネガティブフィードバック機構によってリズムが維持されている。こういった遺伝子発現のリズムが24時間周期で起こった結果として、サーカディアンリズムが形成されることが分かっている。本研究の結果では、培養マウス骨髄間葉系幹細胞株に波長405nmのレーザーを照射することで、CRY 1の細胞内局在を細胞質か

ら核へと移行させ、さらにCRY1のmRNA発現抑制を促すことができた。すなわち、外部からのレーザー照射という刺激によって、細胞のリズム発振をコントロールすることができた。リズム発振をコントロールすることができたことから、E-boxを介したさまざまな生理現象をレーザー照射によりコントロールすることができる可能性がある。マウス骨髄間葉系細胞の骨芽細胞分化におけるCRYの作用機序はいまだ未解明であるが、E-box下流に存在し体内時計による発現の制御が示唆されているBMPやエストロゲンといった骨生成に関与する種々のサイトカインと深く関与していると考えている。詳細なメカニズムは現在多くの研究者が解析中であるが、本研究ではレーザーを用いた細胞の分化制御(促進)という新規プロセスを提案することができた。特にサーカディアンリズムの中心であるE-box配列は、うつ病や癌、生活習慣病、体温、血圧、ホルモン合成や免疫機能など様々な生理現象との関連性が指摘されており、現在、世界中で熾烈な解析競争が行われている。これら生理機能をレーザー照射により制御することができれば、疾病の新しい治療方法としてだけではなく、サーカディアンリズムと細胞機能の解析にレーザーが有用なツールとなると考えている。

参考文献

- 1) D. Rubio, J. Garcia-Castro, M. C. Martín, R. de la Fuente, J. C. Cigudosa, A. C. Lloyd, and A. Bernad, Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. *Cancer Res*, 65: 3035-3039, 2005.
- 2) Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S.: Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2007 in press
- 3) Kushibiki T., Tabata Y.: A new gene delivery system based on controlled release technology. *Current Drug Delivery*, 1: 153-163, 2004.
- 4) 岡村均, 深田吉孝: 時計遺伝子の分子生物学, i-iii, 2004, シュプリンガー・フェアラーク東京
- 5) Kawasaki S., Ebara S., Nakayama K., Takaoka K.: The E-Box motif, recognized by tissue-specific nuclear factor(s), is important for BMP-4 gene expression in osteogenic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 263: 560-565, 1999.
- 6) Fu L., Patel M.S., Bradley A., Wagner, E.F., Karsenty, G.: The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell*, 122: 803-815, 2005.
- 7) Lee C., Etchegaray JP., Cagampang FR., Loudon AS., Reppert SM.: Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, 107: 855-867, 2001.
- 8) Oster H., Yasui A., van der Horst GT., Albrecht U.: Disruption of mCry2 restores circadian rhythmicity in mPer2 mutant mice. *Genes Dev*, 16: 2633-2638, 2002.
- 9) Umezawa A., Maruyama T., Segawa K., Shadduck RK, Waheed A, Hata J.: Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis *in vivo*. *J Cell Physiol*, vol 151: 197-205, 1992.

著者紹介

楠引 俊宏 (Toshihiro Kushibiki)

2000年大阪薬科大学大学院薬学研究科博士前期課程修了。2005年京都大学大学院工学研究科博士後期課程研究指導認定退学。同年 京都大学博士(工学)。2005年大阪大学21世紀COEプログラム「細胞・組織の統合制御にむけた総合拠点形成」特任研究員。2006年同特任助手。2006年大阪大学大学院工学研究科附属フロンティア研究センターグローバル若手研究者フロンティア研究拠点 特任講師(現職)。2006年(独)科学技術振興機構さがけ「光の創成・操作と展開」研究者(兼任)。平成18年度日本レーザー医学会総会賞受賞, 第31回レーザー学会奨励賞受賞。