

研究者：杉本明日菜（所属：徳島大学大学院 医歯薬学研究部 小児歯科学分野）

研究題目：PIEZO1 シグナルを応用した間葉系幹細胞の分化誘導法の開発

目的：

間葉系幹細胞は機械的刺激によってもたらされる細胞外圧負荷環境により骨芽細胞系細胞へ分化が促進される。このことは歯が切削圧や咬合圧の負荷などに代表される機械的刺激により、新たな象牙質を形成することからも明らかであり、そうした象牙質形成には歯髄中に含まれる間葉系幹細胞が関与すると考えられている。細胞への侵害刺激を受容するピエゾ型機械受容イオンチャンネル（PIEZO1）は歯髄および骨髄中の間葉系幹細胞に強く発現し、細胞外圧負荷環境における間葉系幹細胞の骨芽細胞系細胞への分化に関与しているが、その詳細な細胞内シグナル機構については不明な点が多い。

PIEZO1 は N 末および C 末が細胞内に存在する 32 回膜貫通型のタンパク質であり、その C 末側には、R-Ras 結合ドメインと呼ばれるアミノ酸構造を持つ（図 1）。Ras タンパク質は低分子 GTP 結合タンパク質で、細胞の転写や細胞増殖などの様々なイベントに関与するとされており、細胞内の様々なシグナル伝達経路に関連している。そうした Ras が関与するシグナル伝達経路の 1 つに MAP キナーゼ経路がある。

そこで本研究では、PIEZO1 を介する間葉系幹細胞の骨芽細胞系細胞への分化における細胞内シグナル機構を解明することを目的に、間葉系幹細胞における細胞外圧負荷および PIEZO1 の活性化による MAP キナーゼ経路と Ras タンパク質との関連について解析を行った。

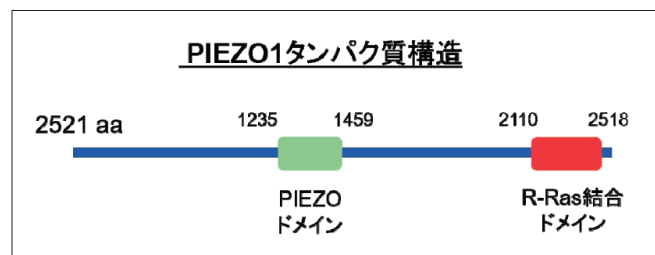


図 1 PIEZO1 タンパク質構造

対象および方法：

### 1. 細胞外圧負荷および PIEZO1 の活性化による細胞内シグナル活性の解析

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞に、静水圧負荷刺激を行い、MAP キナーゼ経路の 1 つである ERK1/2 のリン酸化についてウェスタンブロット法を用いて解析を行った。さらに PIEZO1 を活性化剤にて活性化させ、同様に ERK1/2 のリン酸化についてウェスタンブロット法を用いて解析を行った。

### 2. Ras タンパク質阻害による細胞内シグナル活性

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞に Ras タンパク質阻害剤を作用させ、PIEZO1 活性化による ERK1/2 のリン酸化に対する Ras タンパク質の影響をウェスタンブロット法にて解析した。

### 3. Ras タンパク質阻害による骨分化に関与する遺伝子発現への影響についての解析

ヒト間葉系間葉系幹細胞に Ras タンパク質阻害剤を作用させ、静水圧負荷環境下または PIEZO1 活性化剤を添加した状態で 24 時間培養を行い、骨分化に関与する遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。

#### 結果および考察：

##### 結果 1

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞に静水圧負荷刺激を行ったところ、ERK1/2 のリン酸化を認めた。さらに PIEZO1 を活性化させると静水圧負荷刺激を行った時と同様に ERK1/2 のリン酸化を認めた (図 2)。このことより静水圧負荷刺激や PIEZO1 の活性化により ERK1/2 がリン酸化することが示唆された。

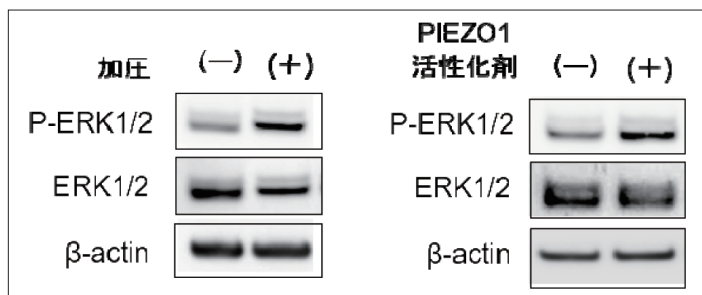


図 2 静水圧負荷および PIEZO1 活性化による ERK1/2 のリン酸化

##### 結果 2

間葉系幹細胞に Ras タンパク質阻害剤を作用させ、Ras タンパク質を阻害すると、PIEZO1 活性化により活性化された ERK1/2 のリン酸化が抑制された (図 3)。このことより、PIEZO1 活性化による ERK1/2 のリン酸化に、PIEZO1C 末側の R-Ras 結合ドメインが関与する可能性が示唆された。

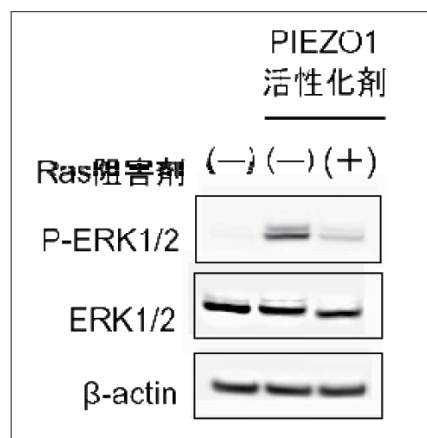


図 3 Ras タンパク質阻害による ERK1/2 のリン酸化への影響

##### 結果 3

静水圧負荷刺激または PIEZO1 の活性化を行うことで、骨分化に重要な遺伝子である *BMP2* の遺伝子発現が上昇した。しかし、Ras タンパク質阻害剤により、Ras タンパク質を阻害することで、これらの *BMP2* の発現が抑制された。このことより PIEZO1 活性による間葉系幹細胞の骨芽細胞系細胞への分化促進に Ras タンパク質が関与していることが示唆された。

PIEZO1 は静水圧負荷刺激による間葉系幹細胞の骨芽細胞系細胞の分化誘導に関与することが知られている。今回の結果より、PIEZO1 の C 末側に存在する R-Ras 結合ドメインを介して ERK1/2 シグナル経路が活性化することで、静水圧負荷刺激による間葉系幹細胞の骨芽細胞系細胞分化誘導が促進されていることが示唆された。今後は p38 や JNK など他の MAPK ファミリーについても検討する予定である。さらに、R-Ras 結合領域を欠損させた DNA プラスミドを用いた過剰発現モデルを用いての解析も行う予定である。PIEZO1 シグナル応答を解明することで、新規の間葉系幹細胞の分化誘導法の開発を目指す。

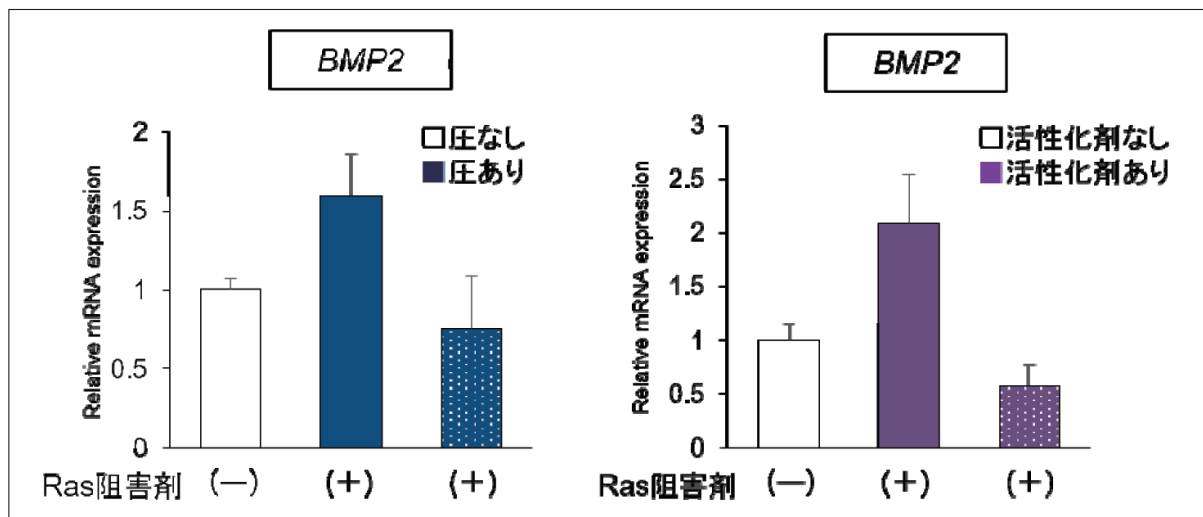


図4 Ras タンパク質阻害による BMP2 の遺伝子発現への影響

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

日本小児歯科学会で発表予定