

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20586

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞における細胞外カルシウムによる骨形成の検討

研究課題名(英文) A study of extracellular calcium induced bone formation in adipose-derived stem cells

研究代表者

矢内 理沙(系永理沙)(Yanai, Risa)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：60755271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪幹細胞(ASCs)は新たな再建方法として注目されている。ASCsの骨形成分化の促進には、骨形成因子(BMP-2)が有用であると提唱されているが、リコンビナントBMP-2(rBMP-2)は生産性、コスト面からその臨床応用は限定的である。このため私たちはより安全で安価な骨再生方法を検討した。細胞外Caイオン濃度を上昇させるとヒトASCsの石灰化が促進され、rBMP-2存在下での反応と同様に骨関連蛋白の発現が増強することが確認できた。このことから生体外において、Caイオンの投与がヒトASCsの骨形成分化を誘導するためのBMP-2の代替法または補助法であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎顔面骨は複雑かつ緻密に構成されており、その欠損の再建には高度で繊細な技術を必要とする。現在主流となっている治療法は金属プレートあるいは自家骨を用いた再建である。金属プレートは易感染性で露出してしまう可能性があり、自家骨は安定性に優れるが、造形的観点や採取部位に骨欠損を生じさせることが大きな欠点となる。脂肪幹細胞は感染に強く侵襲の少ない再建方法の有力な候補であるが、臨床応用は限定的であった。今回、高い細胞外Caイオン濃度で培養することにより、脂肪幹細胞の骨形成分化を促進することが示された。このことにより脂肪幹細胞による骨再建の臨床応用への新たな可能性を探ることができた。

研究成果の概要(英文)：Adipose stem cells (ASCs) are attracting attention as a new reconstruction method. Bone morphogenetic protein (BMP-2) has been proposed to be useful for promoting osteogenic differentiation of ASCs, but recombinant BMP-2 (rBMP-2) has limited clinical application in terms of productivity and cost. For this reason, we have considered safer and cheaper bone regeneration methods. It was confirmed that increasing extracellular Ca ion concentration promotes calcification of human ASCs and enhances bone-related protein expression, similar to the reaction in the presence of rBMP-2. From this, it was suggested that Ca ion administration is an alternative method or an adjunct method to BMP-2 for inducing osteogenic differentiation of human ASCs in vitro.

研究分野：脂肪幹細胞

キーワード：脂肪幹細胞 BMP-2 Ca 骨再生

## 1. 研究開始当初の背景

ASCs は成体幹細胞の一つで、骨髄由来幹細胞と同様の多分化能があると報告されている。骨髄由来幹細胞と比較すると、ASCs は採取部位が皮下脂肪であるため、局所麻酔で簡単にしかも大量に入手でき、骨髄に比べはるかに多くの幹細胞が含まれている。このため自家移植の面では ASCs は臨床応用に最も適した幹細胞と思われる。

	脂肪由来幹細胞	骨髄由来幹細胞
採取部位	皮下脂肪	骨髄ストローマ分画
採取方法	局所麻酔下での脂肪吸引	全身麻酔下
取得量	大量に可能	限られる
幹細胞の含有量	骨髄幹細胞の100~1000倍	非常に少ない
加齢による変化	ほとんど変化なし	加齢とともに減少

骨誘導因子 BMP : BMP (Bone Morphogenetic Protein) は 1965 年 Urist によって骨基質中に存在し、異所性の骨形成を誘導するサイトカインとして発見された(1)。現在、20 種類の BMP の cDNA がクローニングされている。BMP が受容体に結合すると細胞内情報伝達分子を介して、標的遺伝子の発現を調節し骨形成を誘導する(図 1)(2)。

現在、歯科や整形外科領域で BMP-2 の臨床応用を目指した研究がおこなわれているが、十分な骨を誘導するためには大量の BMP が必要であること、さらに大量の BMP-2 の投与が炎症・疼痛を惹起するという理由から期待通りの効果は得られていない。

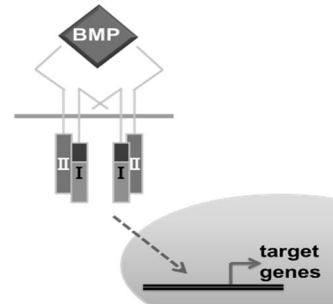


図 1 BMP のシグナル伝達

## 【References】

(1) Urist MR *Science* 1965, 150:893;

(2) Katagiri T *et al.* The bone morphogenetic proteins. *The TGF-β family*. New York: Cold Spring Harbor Monograph; 2008, 121;

## 2. 研究の目的

顎顔面骨は複雑かつ緻密に構成されており、その欠損の再建には審美的な要素のみならず、機能的な要素も要求される。そのため顎顔面骨の再建は高度で繊細な技術を必要とし、多面的要素を含む非常に大きな課題である。現在主流となっている治療法は金属プレートあるいは自家骨を用いた再建である。金属プレートは易感染性で露出してしまう可能性があり、自家骨は安定性に優れるが、造形的な観点や採取部位に骨欠損を生じさせることが大きな欠点となる。そのため感染に強く侵襲の少ない再建方法の確立が急務である。その有力な候補として、脂肪由来間葉系幹細胞 (ASCs) が挙げられる。ASCs の骨形成分化の促進には、骨形成因子 (BMP-2) が有用であると提唱されているが、リコンビナント BMP-2 (rBMP-2) は生産性、コスト面から臨床応用は限定的である。さらに、生体由来のため抗原性の問題もある。私たちは以前の研究で、線維芽細胞への  $Ca^{2+}$  刺激により BMP-2 が産生されることを示した。その結果を踏まえ、本研究では、ヒト ASCs (hASCs) における細胞外  $Ca^{2+}$  の影響を検討することにより、BMP-2 によらない細胞外  $Ca^{2+}$  のみを利用する hASCs の骨再生の可能性を探り、臨床応用へ展開していくことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### Ca<sup>2+</sup> 誘導性 BMP-2 産生の科学的証明

- 1) hASCs における細胞外  $Ca^{2+}$  刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇のメカニズムを探る
- 2) 細胞内  $Ca^{2+}$  上昇による BMP-2 産生までの細胞内シグナル伝達に関する因子を検索する
- 3) 産生された BMP-2 と炎症メディエーターとの関係を探る

### 1) 細胞外 $Ca^{2+}$ 刺激による細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度上昇のメカニズムを探る

細胞外の  $Ca^{2+}$  濃度を感知するシステムは、どの細胞にも備わっているわけではなく hASCs に備わっているとすれば、非常に貴重な報告となる。候補としては、Calcium sensing receptor (CaSR)、TRP channel (特に TRPC channel)、G-protein coupled receptor 6A (GPCR6A) などが挙げられるが、定量的 real-time PCR、ウエスタンブロット法や各種選択的阻害剤を用いて  $Ca^{2+}$  イメージングや細胞培養を施行し同定する。

2) 細胞内  $Ca^{2+}$  上昇による BMP-2 産生までの細胞内シグナル伝達に関する因子を検索する  
 細胞外  $Ca^{2+}$  刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇に誘導させる BMP-2 産生までの細胞内シグナル伝達には、NFAT 経路、PKC、カルシウム感受性 Rho キナーゼ等の関与が考えられ、定量的 real-time PCR、ウエスタンブロット法や各種選択的阻害剤を用いて生理学的・分子生物学的に検討する。

また、 $Ca^{2+}$  以外のイオン ( $Mg^{2+}$ ,  $Na^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$  等) の相互作用、相乗作用を検討する。

### 3) 産生された BMP-2 と炎症メディエーターとの関係を探る

BMP-2 の投与は炎症を引き起こすが、この炎症により骨形成を誘導することが知られている。このため hASCs の骨形成において、培養中の培養液の各種炎症メディエーター (プロスタグランジン、ロイコトリエン、インターロイキン、TNF- $\alpha$  等) を ELISA 等を用いて検索し、骨形成に有効な炎症メディエーターを明らかにする。さらに培地に添加することで細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇により産生された BMP-2 との相互作用、相乗作用を検討する。また  $Ca^{2+}$  刺激を加えず炎症メディエーター単独の刺激でも hASCs の骨形成に影響を与えるか検索する。

## 4. 研究成果

### 1) 石灰化における rhBMP-2 の影響

私たちは hASCs の骨形成分化における BMP-2 の影響について検討を行っている。BMP-2 の効果の評価するために hASCs を BMP-2 添加骨分化誘導培地で一定期間培養した後、Alizarin red S 染色を行った。図 2 には染色後の culture dish の写真 (A) とその染色強度を数値化したもの (B) を示す。その結果、染色強度は経時的に高まり hASCs 中のカルシウム沈着は rhBMP-2 を添加することで有意に増強されることが示された。

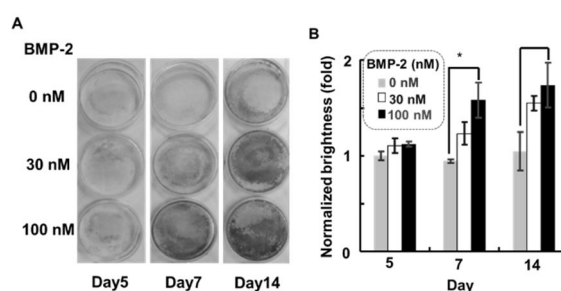


図 2 Alizarin red S 染色

### 2) 骨関連蛋白への rhBMP-2 の影響

alkaline phosphatase (ALP)、osteonectin (ON)、bone sialo-protein (BSP)、Osteocalcin (OC) は骨分化のマーカーとされており、hASCs に BMP-2 の刺激を加えることでこれらの蛋白の発現が有意に増強することが定量的 real-time RT-PCR により示された (図 3)。このことから BMP-2 は hASCs の骨形成を促進することが確認された。

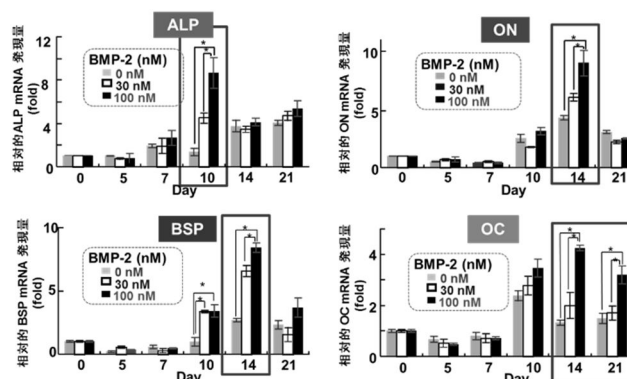


図 3 骨分化マーカーの発現

### 3) 細胞外 $Ca^{2+}$ の影響

私たちは hASCs に対する細胞外  $Ca^{2+}$  刺激の影響について検討を行った。細胞外  $Ca^{2+}$  濃度と細胞内  $Ca^{2+}$  の関係を明らかにするために  $Ca^{2+}$  イメージング法を用いた。細胞内  $Ca^{2+}$  は fluo-4/AM を hASCs 中にロードし測定した。細胞外  $Ca^{2+}$  濃度が 1 mM および 10 mM のときの hASCs の顕微鏡写真を示す (図 4) その結果細胞外  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させると細胞内  $Ca^{2+}$  が一過性および持続性の増加を示した。

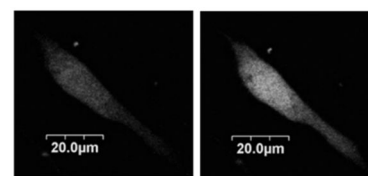


図 4 細胞外  $Ca^{2+}$  の影響

また、Runx2、Osteocalcin mRNA 発現に対する細胞外  $Ca^{2+}$  刺激の影響を real-time PCR を用いて調べた。Runx2 mRNA 発現は 3 日目で一時的に増加し、5.0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  で有意な増強を示した (図 5 A)。Osteocalcin mRNA の発現は 10 日目から増加し、14、21 日目には、5.0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  で有意な増強を示した (図 5 B)。

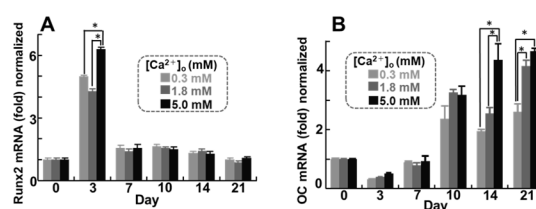


図 5 骨関連蛋白に対する細胞外  $Ca^{2+}$  の影響

#### 4) 細胞外 Ca<sup>2+</sup>による BMP-2 の産生と CaSR の影響

免疫化学染色およびウエスタンブロット法により hASCs 上に CaSR が発現していることを確認した。CaSR の活性化が BMP-2 の生産に影響するかを ELISA を用いて調べた。1 μM R568 と 100 nM nifedipine を CaSR のアゴニストとして使用、1 μM NPS2143 をアンタゴニストとして使用し、24 時間後の培地に含まれる BMP-2 タンパク量を測定した (図 6)。BMP-2 タンパクレベルは、CaSR アゴニストの存在下で有意に上昇し、アンタゴニストの存在下で大幅に減少した。さらに、5.0 mM 細胞外 Ca<sup>2+</sup>濃度で活性化された BMP-2 タンパク質のレベルは、CaSR アゴニストの存在下で見られたレベルと同程度だった。

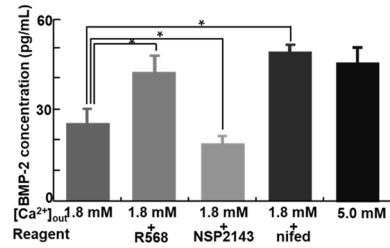


図6 細胞外Ca<sup>2+</sup>によるBMP-2の産生とCaSRの影響

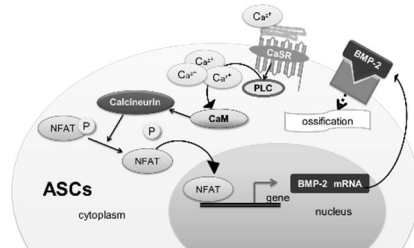
#### 5) BMP-2 産生の細胞内シグナル伝達機構

5.0 mM 細胞外 Ca<sup>2+</sup> 濃度の培地に各試薬 ( U-73122 : PLC inhibitor, W-7 : calmodulin antagonist, 11R-VIVIT : NFAT inhibitor ) を加え、BMP-2 mRNA 発現を real-time PCR で BMP-2 タンパクの発現を ELISA で調べた。その結果各阻害薬 BMP-2 発現の抑制が確認された。また、Calcineurin 発現は、5.0 mM 細胞外 Ca<sup>2+</sup> 濃度の培地で培養すると増加するが、PLC inhibitor : U-73122 存在下ではほとんど変化がみられなかった。さらに、hASCs を細胞質分画と核分画に分離し、NFAT2 の核内移行を Western blotting を用いて検討した。Ca<sup>2+</sup>刺激により細胞質内リン酸化 NFAT 2 の発現量の減少と核内 NFAT 2 の発現量の増加を認めた。

細胞内シグナル伝達には Ca / CaM / NFAT 経路関与していることが示された。

#### 結論

細胞外カルシウムの増加は、autocrine および/または paracrine によって作用し、hASCs の骨形成分化を誘導する可能性がある。これは、in vitro においてカルシウムの投与が hASCs の骨形成分化を誘導するための BMP-2 の代替法または補助法であることを示唆している。



#### 【References】

Risa Y *et al.* Extracellular calcium stimulates osteogenic differentiation in human adipose-derived stem cells by enhancing BMP-2 expression: cell calcium, 2019, 102058

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yanai Risa, Tetsuo Fumi, Ito Shinichi, Itsumi Momoe, Yoshizumi Junko, Maki Tomoko, Mori Yoshihide, Kubota Yasutaka, Kajioka Shunichi	4. 巻 83
2. 論文標題 Extracellular calcium stimulates osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by enhancing bone morphogenetic protein-2 expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102058 ~ 102058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.102058">https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.102058</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢内理沙、窪田泰孝、矢内雄太、森悦秀
2. 発表標題 脂肪幹細胞における細胞外カルシウムによる骨形成の検討
3. 学会等名 第64回 口腔外科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----