

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17161

研究課題名（和文）IGFBP-3による骨代謝制御機構の解明と新規骨増生法開発への応用

研究課題名（英文）New bone augmentation technique through bone metabolism regulation using IGFBP-3

研究代表者

江口 香里 (EGUCHI, Kaori)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：10779614

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、インスリン様成長因子結合蛋白-3（IGFBP-3）が骨組織においてIGF非依存的な新たな機能を有する可能性に着目し、IGFBP-3が骨代謝制御の一端を担い得るのではないかとこの着想から、IGFBP-3が間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響の解析を行った。骨芽細胞の培養系におけるIGFBP-3の添加により、骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現量の減少、ALP活性の低下、石灰化の抑制が認められた。さらに、IGFBP-3はBMP-2シグナルを抑制することで骨芽細胞の分化および成熟を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではIGFBP-3が間葉系幹細胞の骨芽細胞分化および成熟に対して抑制的な影響を及ぼすことを明らかにした。また、その抑制的作用はBMP-2シグナルを介してもたらされている可能性が示唆された。IGFBP-3による骨芽細胞分化制御は新たな知見である。IGFBP-3の機能を明らかにし、骨リモデリング機構に関わる分子の機能的意義を解明することは、人為的な骨代謝制御を可能とする新たな骨増生法の開発への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the possibility that insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) has a new IGF-independent function in bone tissue, and IGFBP-3 may play a part in the regulation of bone metabolism. The aim of this project was to analyze the effect of IGFBP-3 on the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts. The addition of IGFBP-3 in the osteoblast culture system under certain conditions has decreased the gene expression level of the osteoblast differentiation marker, lowered ALP activity, and suppressed calcification. Furthermore, it was suggested that IGFBP-3 might suppress osteoblast differentiation and maturation by inhibiting BMP-2 signaling.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：IGFBP-3 骨代謝 骨形成 BMP-2シグナル

1. 研究開始当初の背景

骨量が不足した部位に対するインプラント術の前処置としての骨増生、歯周病による骨欠損の修復、顎口腔領域の顎骨再建術など歯科領域での骨増生の必要性は高く、骨再生治療の研究と臨床応用が進められている。現在、臨床的には、細胞移植や成長因子添加により、骨形成促進について一定の成果を得ているが、増成骨の継時的減少が報告されている (Zijderveld et al. 2008)。現段階では増生骨量の維持は困難であり、増生骨の吸収抑制及び長期維持が重要な課題となっている。

骨組織の代謝は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成から成り、吸収と添加のバランスを保つことで骨量を維持していることから、増生骨の維持には骨代謝制御が重要であると考えられる。これまでに骨代謝のメカニズムについて様々な調節因子の関与が報告されているが、その詳細については不明な点が多く、移植骨の生着と骨代謝制御に関する報告はほとんどない。

インスリン様成長因子結合蛋白-3 (IGFBP-3) はこれまで、インスリン様成長因子 (IGF) の安定化や運搬を介して、骨形成促進に関与すると考えられていた。しかし近年、IGFBP が IGF 非依存的に骨形成抑制や骨吸収促進に作用する、新たな機能をもつ可能性が指摘されている (Silha et al. 2003, Yingbin et al. 2011, Li et al. 2013)。これらの知見から、IGFBP-3 は全身の骨代謝、骨量維持に影響を与え、骨形成と骨吸収の均衡を骨吸収側に傾けていると考えられるが、詳細なメカニズムについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、IGFBP-3 の IGF 非依存的な作用機序を解明し、IGFBP-3 を介した骨代謝の均衡制御の可能性を検索すること、また、この知見を応用し、増生骨の長期維持を可能にする新たな骨再生療法の基盤を構築することである。

3. 研究の方法

(1) 6~8 週齢雄性マウス (C57BL/6) 大腿骨から骨髄間質細胞を採取し、24 時間以内に細胞培養皿に接着した細胞を骨髄由来間質細胞 (BMSCs) として実験に用いた。培養液には α MEM (含 10% Fetal Bovine Serum, 1% antibiotics) を用い、培養条件は、BMP-2・IGFBP-3 非添加のコントロール群、BMP-2 添加群、IGFBP-3 添加群、および BMP-2・IGFBP-3 添加群とした。

(2) IGFBP-3 が骨芽細胞分化に及ぼす影響を明らかにするため、分化培養 2 日後における骨芽細胞分化関連遺伝子 (*Sp7*, *Alp*, *Bglap*, *Runx2*, *Spp1*) の遺伝子発現をリアルタイム PCR によって定量的に解析した。石灰化に対する影響検索のために分化培養 2 日後における ALP 活性を、また、分化培養 14 日後における石灰化をアリザリンレッド染色と吸光度により定量的に解析した。さらに、BMP-2 シグナルへの影響を検索するために Smad Binding Element (SBE) 下流にルシフェラーゼを挿入した合成遺伝子を筋芽細胞株 C2C12 細胞に遺伝子導入し、上記分化条件で培養し、ルシフェラーゼアッセイにより分化 24 時間後における SBE レポーター活性を解析した。

4. 研究成果

定量的遺伝子発現解析において、BMP-2 添加群ではコントロール群と比較し *Sp7*, *Alp*, *Bglap*, *Runx2*, *Spp1* の発現に有意な上昇を認めた。一方、BMP-2・IGFBP-3 添加群では、BMP-2 添加群と比較し *Sp7*, *Alp*, *Bglap* の発現量に有意な減少を認めた。ALP 活性解析において、BMP-2 添加群はコントロール群と比較し有意な ALP 活性の亢進を認めた。これに対し、BMP-2・IGFBP-3 添加群では IGFBP-3 による ALP 活性の抑制が認められた。アリザリンレッド染色による石灰化解析値は BMP-2 による石灰化の亢進が IGFBP-3 により抑制されることを示した (Fig.1)。

ルシフェラーゼアッセイでは、BMP-2 濃度依存的に SBE レポーター活性が有意に上昇すること、BMP-2・IGFBP-3 添加群では BMP-2 添加群と比べ SBE レポーター活性は有意に減少することが示された (Fig.2)。

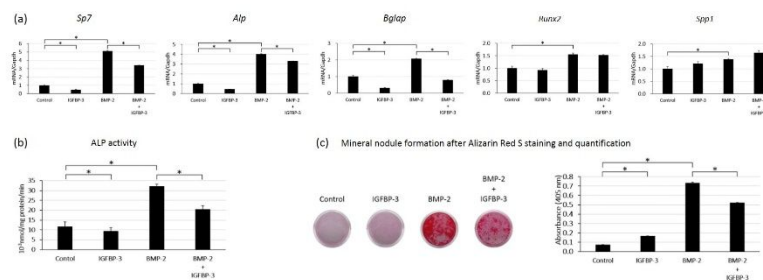


Fig.1. IGFBP-3がBMSCsの骨芽細胞分化に及ぼす影響
IGFBP-3の添加により、BMSCsの骨芽細胞関連遺伝子の発現量減少、ALP活性低下および石灰化抑制が確認された (Eguchi et al, Biochem Biophys Res Commun. 2018)。

以上の結果から、IGFBP-3が骨芽細胞の分化および成熟に対して抑制的な作用を及ぼすことが明らかとなった。また、その際、IGFBP-3はBMP-2シグナルを抑制することで骨芽細胞の分化および成熟を抑制する可能性が示唆された。

また、過去の報告から、IGFBP-3が骨吸収促進に作用するとの報告もあり (Silha et al. 2003)、破骨細胞への影響についても検討し、骨代謝制御におけるIGFBP-3の作用を明らかにする必要があることから、現在解析を進めている。

<引用文献>

1. Silha JV, Mishra S, Rosen CJ, Beamer WG, Turner RT, Powell DR, Murphy LJ. Perturbations in bone formation and resorption in insulin-like growth factor binding protein-3 transgenic mice. *J Bone Miner Res.* 2003 Nov 10; 18:1834-41
2. Z. Yingbin, L. Ling, Z. Jianfeng, et al. IGF binding protein 3 exerts its ligand-independent action by antagonizing BMP in zebrafish embryos. *J. Cell Sci.* 2011 Jun 1; 124: 1925-35
3. Li J1, Jin D, Fu S, Mei G, Zhou J, Lei L, Yu B, Wang G. Insulin-like growth factor binding protein-3 modulates osteoblast differentiation via interaction with vitamin D receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Jul 12; 436(4): 632-637.

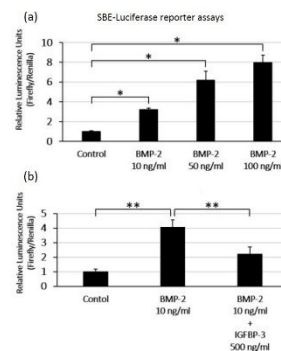


Fig.2. IGFBP-3がBMP-2シグナルに及ぼす影響
 BMP-2の添加により、BMP-2濃度依存的にSBEレポーター活性が有意に上昇することが確認された。また、BMP-2・IGFBP-3添加群ではBMP-2添加群と比べSBEレポーター活性が有意に減少することが示された (Eguchi et al, *Biochem Biophys Res Commun.* 2018)。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Eguchi Kaori, Akiba Yosuke, Akiba Nami, Nagasawa Masako, Cooper Lyndon F., Uoshima Katsumi	4. 巻 507
2. 論文標題 Insulin-like growth factor binding Protein-3 suppresses osteoblast differentiation via bone morphogenetic protein-2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 465 ~ 470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.11.065	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----