

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791042
 研究課題名（和文）
 間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に対するビスフォスフォネートの影響に関する研究
 研究課題名（英文）
 Effect of bisphosphonate on osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells
 研究代表者
 藤田 洋史（FUJITA HIROFUMI）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：20423288

研究成果の概要（和文）：

本研究課題にて、私たちは、ビスフォスフォネートの一種リセドロネートが間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を抑制し、間葉系幹細胞由来骨芽細胞の RANKL の間接的な関与がないことを示唆する知見を得た。さらに私たちは、メバロン酸経路阻害をバイパスするグラニルゲラニオールがリセドロネートによるアポトーシスを強く抑制することを示した。以上の結果は、リセドロネートの抗骨粗鬆作用は RANKL の発現抑制を介していないことを示し、また、間葉系幹細胞へのアポトーシス誘導能を持つことを初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Our results indicated that bisphosphonate suppressed osteoblast differentiation and suggested that the anti-bone resorptive effect of bisphosphonate is not involved in RANKL expression of MSCs-derived osteoblast. We also found that GGOH strongly suppressed the bisphosphonate-induced apoptosis in MSCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：ビスフォスフォネート、骨粗鬆症、骨芽細胞、間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

骨髄の間葉系幹細胞は、加わる刺激によって、骨芽細胞、脂肪細胞、間質細胞などの異なった機能を持つ様々な細胞に分化できる。

そのため、間葉系幹細胞は、再生医学の分野でも期待されており、分化の分子機構の研究にも非常に有用である。間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化には、転写因子 Runx2 が関与し

ており、これが、骨代謝回転調節タンパク質オステオカルシン (OC, 骨芽細胞分化マーカー) の発現を調節することが解明されている。

骨粗鬆症に対して、最も有効な薬剤として、世界的に認められているのがビスフォスフォネート (BP) である (国際誌に 13000 報以上掲載)。BP は、骨密度低下を抑制するだけでなく、骨密度を有意に増加することが、臨床レベルで明らかである。BP が、骨芽細胞を増殖もしくは活性化し、造骨作用を促進した可能性がある。

BP は、骨芽細胞の増殖を促進することがすでに報告されていることから、申請者は BP が間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進している可能性を考えた。これまでに報告されている BP の薬理作用は、破骨細胞の機能障害やアポトーシス誘導による骨吸収抑制である。近年、破骨細胞の形成、分化、生存や骨吸収活性は、骨芽細胞より産生される Macrophage- Colony Stimulating Factor (M-CSF) や骨芽細胞表面に発現している膜結合性サイトカイン Receptor activator of NF κ B ligand (RANKL) と破骨細胞表面にあるその受容体 RANK に調節されており、骨代謝において骨芽細胞が破骨細胞を調節していることが明らかとなった。これらは BP が骨芽細胞の分化とそれに伴う RANKL の発現を抑制することで骨吸収を抑制している可能性を示している。その一方で BP の骨芽細胞に対する作用の解明は未だ不十分で、骨芽細胞の分化に対する影響についてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、窒素含有ビスフォスフォネートの一種であるリセドロネート (RIS) を用いて間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化及び RANKL に対する影響の解明を目的とした。また、RIS は、破骨細胞だけでなく、癌細胞

をはじめとする様々な細胞のアポトーシスを誘導するため、RIS の間葉系幹細胞のアポトーシス誘導に対する影響についても調べた。

3. 研究の方法

細胞培養

ラット胸腺由来の間葉系幹細胞 ST1B II b とヒト骨髄由来の hMSC#12 を用いた。これらの細胞は、10% ウシ胎児血清、100 μ g/ml ストレプトマイシン、100 U/ml ペニシリンを含む D-MEM 培地中で、5% CO₂、37°C に設定したインキュベーター内で培養した。培養には 24 well plate には 0.5 \times 10⁵ cells/ml で 0.5 ml/well ずつ、3.5 cm dish には 1.5 \times 10⁵ cell/ml で 1.5 mL ずつ播種し、24 時間プレインキュベート後に各処理を行い解析に用いた。分化刺激には、10% ウシ胎児血清、100 mg/ml ストレプトマイシン、100 U/ml ペニシリン、10 mM β -グリセロリン酸、50 μ g/ml アスコルビン酸、10 nM デキサメタゾンを添加した alpha-MEM 培地を用いた。

アリザリンレッド染色法

細胞を PBS で洗浄した後、100 % エタノールを加え氷上で 1 h 固定し、95 %、90 %、80 %、70 % エタノール、ミリ Q 水の順番で 5 min ずつ振とうした。その後、アリザリンレッド染色液で 10 min 振とうし、染色液をミリ Q 水、95 % エタノール、100 % エタノールで wash し、100 % エタノールを加え、顕微鏡下で観察した。PBS でディッシュを 15 min 洗浄し、10 % セチルピリジニウムクロライドで抽出した。マイクロプレートリーダー (570 nm) で吸光度を測定し、検量線を用いて濃度を測定した。

RNA 抽出法

培地を除去した後 PBS を加えて細胞を培養

ディッシュから剥離し、1.5 ml チューブに回収した。これを1500×g、5分間、4°Cで遠心し、アスピレーターで上清を除いたペレットにTRIzol (Invitrogen) 1 mlを加え、超音波で破碎した。室温で5分間インキュベートした後、クロロホルム 200 μlを加え、15秒間振った。室温で3分間インキュベートした後、12,000×g、15分間、4°Cで遠心した。新しい1.5 ml チューブに上層である水層を移し、100%イソプロピルアルコールを500 μl加えて4回ほど転倒混和し、室温で10分間インキュベートした後、12,000×g、10分間、4°Cで遠心した。この上清をデカンテーションで除去したペレットに80% EtOH DEPCwater 1 mlを加え、12,000×g、10分間、4°Cで遠心した。上清を除去し残ったペレットを10分間空気乾燥させた後DEPCwater 50 μlで溶解した。

RT-PCR

SuperScript First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen)を用いて、抽出し濃度を調整したRNA 8 μlにオリゴdTプライマー12[~]18 1 μl、dNTP 1 μlを加えて混合した。65°C、5分間インキュベートした後、氷上で1分間以上放置した。このRNA混合液に、9 μlの反応液(10×RT1 Buffer 2 ml、25 mM MgCl 2 4 μl、0.1 M DTT 2 μl、RNase OUT 1 μl)を加え、42°C、2分間インキュベートした。それにSuper Script II RT 1 μlを加えて42°C、50分間インキュベートし、さらに70°C、15分間インキュベートして反応を停止させた後、氷上でRNase H 1 μl加え、37°C、20分間インキュベートした。

これにより精製されたcDNAをPlatinum Blue PCR Super Mix (Invitrogen)を用いてPCRを行った。プライマーはhBSP (AATGAAAACGAAGAAAGCGAAG), hALP

(ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC), hCo1 (GGACACAATGGATTGCAAGG), h36B4 (TGCCAGTGTCTGTCTGCAGA)を使用した。PCR反応はホットスタートで行い、95°C, 30秒 → 52°C, 1分 → 72°C, 1分を35サイクル行った。

電気泳動法

1.5%アガロースゲル(アガロース、1×TAE、0.01% Ethidium Bromide)を作成し、ゲル穴にPCR産物を10 μl加え、100Vで23分間泳動した。

タンパク定量

スタンダードとして、それぞれ試験管に0.4 mg/ml BSA, 0.8 mg/ml BSAを20 μlずつ加え、反応液(Bio-Rad Protein Assay) 5 mlをH₂Oで25 mlにメスアップした溶液を1 mlずつ加えた。また、サンプルは3 μlずつ加え、色調を見ながら濃度がスタンダードの範囲内になるように希釈した反応液を加え、5 min反応させた。96 wellプレートにブランク(Bio-Rad Protein Assayの希釈液)、スタンダード、サンプルをそれぞれ200 μlずつ加え、マイクロプレートリーダー(590 nm)で吸光度を測定し、検量線を用いてタンパク濃度を測定した。

ウエスタンブロット法

細胞を処理後、培地を除去した後PBSを加えスクレーパーで細胞を培養ディッシュから剥離し、1.5 ml チューブに回収した。これを1500×g、5分間、4°Cで遠心し、アスピレーターで上清を除いたペレットに、Protease inhibitorをRIPA Buffer 1mlに加えた溶液を40 μlずつ加え、10秒間の超音波を3回繰り返して破碎した。これを氷中で30分間放置した後、21,000×gで10分間、4°C

で遠心し、上清を回収しタンパク定量を行った。同じタンパク量になるように RIPA Buffer 溶液で調整し、同量の Sample Buffer を加えた後、タッピングして遠沈し、100°C で 5 分間ボイルし、これをサンプルとした。

12.5 % の分離ゲル (30 % アクリルアミド 4.2 ml、分離ゲル Buffer 2.5 ml、H₂O 3.3 ml、25 % APS 40 μ l、TEMED 7 μ l を混合) を作成し、その上から濃縮ゲル (30 % アクリルアミド 0.75 ml、濃縮ゲル Buffer 1.25 ml、H₂O 3 ml、25 % APS 20 μ l、TEMED 7 μ l を混合) を作成した。タンパク量が 10 ~ 50 μ g/well になるように加え、ゲル 1 枚あたり 30 mA で 60 分間泳動し、続いて 2 mA/cm² で 90 分間ブロッキングを行った。その後、メンブレンをスキムミルク中で 45 分間振とうし、続いて TBS-T 中に移して 5 分間の振とうを 3 回繰り返した。1 次抗体に抗 RANKL 抗体と抗 Actin 抗体を用いて、4°C、オーバーナイトで反応させ、TBS-T で 5 分間の振とうを 3 回行った。その後、2 次抗体に anti-mouse IgG を用いて、37°C、90 分間インキュベートし、TBS-T で 5 分間の振とうを 3 回行った。RANKL は ECL Plus Western Blotting Detection System、Actin は ECL Western Blotting Detection System で 5 分間反応させ検出した。

クロマチン凝集測定法

細胞を暗所、室温にて 15 分間、1 μ M Hoechst33342 で染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。同じ領域で全細胞とクロマチン凝集細胞をカウントし、クロマチン凝集細胞の割合を百分率で求めた。

4. 研究成果

骨芽細胞分化刺激による間葉系幹細胞の骨石灰化能および骨芽細胞分化マーカーの発

現

はじめに、間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化するか明らかにするために、間葉系幹細胞に分化誘導刺激を行った。分化の指標として骨石灰化能をアリザリン染色によって検出した。その結果、ラット胸腺由来の間葉系幹細胞である ST1B II b とヒト骨髄由来の間葉系幹細胞である hMSC#12 のどちらも分化刺激によって時間依存的にアリザリン染色で検出された石灰化を誘導した。ST1B II b に対して hMSC#12 は、石灰化小塊の形成が早期から観察された。同じく骨芽細胞へ分化の指標として RT-PCR 法により分化マーカーの発現を調べた。その結果、ST1B II b では骨芽細胞分化マーカーである BSP は、分化誘導後 7 日目から発現が観察され、その後 14 日目まで時間依存的に発現した。一方、Col-1 と ALP は分化誘導初日から発現が観察され、その後も発現に変化は見られなかった。また、OC は分化誘導後 14 日間の観察で発現は見られなかった。hMSC#12 では、OC が分化誘導後 3 日目から発現し、その後 7 日目まで発現した。

骨芽細胞分化刺激した間葉系幹細胞の石灰化及び骨芽細胞分化マーカー発現に対するリセドロネートの影響

次に、間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化することが分かったため、骨芽細胞分化に対する RIS の影響について調べた。その結果、RIS は濃度依存的に石灰化を抑制した。ST1B II b では、1 μ M RIS で約 50 % 石灰化が抑制され、10 μ M では約 100 % 石灰化が抑制された。hMSC#12 では、3 μ M RIS で約 80% 石灰化が抑制され、10 μ M では約 90% 石灰化が抑制された。同じく分化の指標として分化マーカーの発現を調べた。その結果、ST1B II b では RIS を添加した濃度の上昇にしたがって BSP の発現が抑制され、10 μ M RIS では約

100 % BSP の発現が抑制された。ALP も同様に発現が抑制されたが濃度依存性は見られなかった。Col-1 の発現に対しては RIS の影響は見られなかった。hMSC#12 でも RIS の添加濃度の上昇にしたがって OC の発現が抑制され、10 μ M RIS ではおよそ 50 % の OC の発現が抑制された。

骨芽細胞分化刺激した *ST1BIIb* の石灰化能に対するリセドロネートとゲラニルゲラニオールの影響

RIS は、破骨細胞ではファルネシルピロリン酸シンターゼを抑制することにより、ゲラニルゲラニルピロリン酸の合成阻害を介して細胞内情報伝達系を阻害することで、破骨細胞の機能障害やアポトーシス誘導し、骨吸収機能を抑制することがわかった。そこで、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化抑制に対してもファルネシルピロリン酸シンターゼの阻害が関与しているか、メバロン酸経路をバイパスする GGOH を用いて調べた。3 μ M, 10 μ M GGOH 存在下で *ST1BIIb* に 1 μ M RIS を添加し 14 日間分化誘導を行い、アリザリン染色によつての石灰化の変化を調べた。*ST1BIIb* の分化誘導時に RIS 処理したものに比べて、GGOH 処理はほぼ影響しなかった。

骨芽細胞分化刺激した hMSC の RANKL 発現に対するリセドロネートの影響

破骨細胞の分化や活性化に骨芽細胞表面に発現する RANKL が関与していることから、骨芽細胞分化刺激による RANKL 発現に RIS が影響するかどうかを hMSC#12 において調べた。hMSC#12 を 10 nM 1, 25(OH)₂D₃ を含む分化誘導培地で 0 μ M, 1 μ M, 10 μ M RIS 存在下で 3 日間分化誘導をし、ウエスタンブロット法によつて RANKL の発現を調べた。その結果、分化刺激時間に依存して RANKL 発現は増加し

たが、RIS 処理による RANKL の発現には影響がなかった。

間葉系幹細胞のアポトーシス誘導に対するリセドロネートの影響

癌細胞や破骨細胞に対して 100 μ M RIS はアポトーシスを誘導するので、RIS が間葉系幹細胞のアポトーシスを誘導するかどうかを核の凝集を指標に調べた。まず、間葉系幹細胞の核の凝集を誘導する RIS の濃度を調べた。播種後 24h インキュベートした hMSC#12 に 0~1000 μ M RIS を加えて 48h 培養後観察した。100 μ M RIS ではアポトーシスは誘導されなかったが、300 μ M RIS では 30% 程度の核の凝集を誘導し、1000 μ M RIS では、50% 以上の細胞の核の凝集を誘導した。次に播種後 24h インキュベートした hMSC#12 に 300 μ M RIS を加え、核の凝集を誘導する時間変化を観察した。間葉系幹細胞の核の凝集は、RIS 処理後 30 時間以降で時間依存的に誘導された。

リセドロネートによる間葉系幹細胞のアポトーシス誘導に対するイソプレノイド合成基質及びカスパーゼインヒビターの影響

RIS による間葉系幹細胞のアポトーシス誘導について、ゲラニルゲラニルピロリン酸とファルネシルピロリン酸の膜透過型アナログである GGOH や farnesol (FOH) とカスパーゼインヒビターである Z-VAD の影響を調べた。播種後 24h インキュベートした hMSC#12 に、それぞれ 10 μ M GGOH, 20 μ M FOH, 100 μ M Z-VAD を添加し 1h プレインキュベートした後、300 μ M RIS を加えて 48h 培養後観察した。GGOH の併用は、RIS によるアポトーシス誘導を約 30 % 阻害し、Z-VAD は約 50 % 程度阻害した。

以上の結果は、リセドロネートの抗骨粗鬆

作用はRANKLの発現抑制を介していないことを示し、また、間葉系幹細胞ヘカスパーゼ依存性でFPP合成酵素阻害が関連したアポトーシス誘導能を持つことを初めて明らかにした。この知見は、骨粗鬆症治療薬RISの作用機序の一部の解明に貢献した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. Fujita H, et al. α -Tocopheryl succinate induces rapid and reversible phosphatidylserine externalization in histiocytic lymphoma through the caspase-independent pathway. *Mol Cell Biochem.* 333:137-149, 2010. 査読あり
2. Amo T, Fujita H et al. Mechanism of cell death by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action and its enhancement by ferrochelatase inhibitors in human histiocytic lymphoma cell line U937. *Cell Biochem Funct.* 27(8):503-15, 2009 査読あり
3. H Fujita, et al. Alpha-lipoic acid suppresses 6-hydroxydopamine-induced ROS generation and apoptosis through the stimulation of glutathione synthesis but not by the expression of heme oxygenase-1. *Brain research.* 1206, 1-12 2008. 査読あり

[学会発表] (計21件)

1. 藤田洋史ら。間葉系幹細胞における骨粗鬆症治療薬リセドロネートの骨芽細胞分化とRANKL発現への影響。第115回日本解剖学会総会全国学術集会 (盛岡、2010. 3. 28-30)

2. 黒川佳津子, 藤田洋史ら。骨粗鬆症治療薬リセドロネートの間葉系幹細胞に対する作用-骨芽細胞分化を中心として-。第82回日本生化学会(神戸、2009. 10. 21-24)
3. 黒川佳津子, 藤田洋史ら。間葉系幹細胞の骨芽細胞分化とそれに対するリセドロネートの作用。第50回日本生化学会中国・四国支部例会 (鳥取、2009. 5. 15-16)
4. 黒川佳津子, 藤田洋史ら。Effect of nitrogen containing bisphosphonate on osteoblast differentiation of rat mesenchymal stem cell. *BMB2008*(第81回日本生化学会大会) (神戸、2008. 12. 9-12)
5. 藤田洋史, 黒川佳津子ら。間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に対するリセドロネートの影響。第5回ビスフォスフォネートUpdate (大阪、2008. 10. 29)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 洋史 (FUJITA HIROFUMI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20423288

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

黒川 佳津子 (KUROKAWA KADUKO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生
研究者番号なし