

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10005

研究課題名（和文）細胞内エネルギー代謝調節による顎骨骨髄間葉系幹細胞の分化制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of differentiation control of jaw bone marrow mesenchymal stem cells by regulating intracellular energy metabolism

研究代表者

石井 正和（ISHII, Masakazu）

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：00456683

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：間葉系幹細胞（MSC）は生体内の様々な組織に存在し、骨、軟骨、脂肪などの組織に分化することができる。異なる組織中に存在するMSCは、発生学的起源の違いにより異なる特性を示すことが報告されている。顎骨骨髄中に存在するMSC（MBMSC）は、脂肪細胞にほとんど分化しないことが明らかとなっているが、MBMSCの脂肪分化抑制メカニズムは十分に解明されていない。本研究によって、脂肪分化誘導によるNOX4由来のROS産生増加の抑制がMBMSCの脂肪分化能の低下を引き起こす可能性があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、脂肪分化誘導によるNOX4由来のROS産生増加の抑制がMBMSCの脂肪分化能の低下を引き起こす可能性があることが明らかになり、MBMSCの組織特異的な特性を解明するための重要な手がかりとなった。従って、本研究は学術的・社会的意義の高いものである。

研究成果の概要（英文）：Mesenchymal stem cells (MSCs) are present in various tissues within the body and have the ability to differentiate into tissues such as bone, cartilage, and fat. It has been reported that MSCs present in different tissues exhibit distinct characteristics due to differences in their developmental origins. MSCs found in the maxillary/mandibular bone marrow (MBMSCs) have been shown to hardly differentiate into adipocytes, but the mechanism of adipogenic differentiation suppression in MBMSCs has not been fully elucidated. This study revealed that the suppression of ROS production derived from NOX4 during adipogenic induction might lead to a decrease in the adipogenic differentiation potential of MBMSCs.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：間葉系幹細胞 脂肪分化 活性酸素種

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSC) は様々な組織に存在し、骨、軟骨、脂肪などの中胚葉由来組織に分化することができます。発生学的起源の違いにより、MSC は異なる組織で異なる特性を示します。私たちは以前、上顎骨/下顎骨髄に MSC が存在し、これらの細胞 (MBMSC と呼ばれる) が脂肪細胞にほとんど分化しないことを報告しました。

MSC の脂肪分化は、未分化 MSC が脂肪細胞系統 (前駆脂肪細胞) に分化し、その後前駆脂肪細胞が成熟脂肪細胞に分化するという複雑なプロセスによって制御されています。C/EBP β 、C/EBP δ 、Ebf-1 は、未分化 MSC から前脂肪細胞への分化における重要な転写因子である。これらの転写因子は、PPAR γ および C/EBP α の発現を調節し、脂肪分化を開始する。PPAR γ および C/EBP α は、さまざまな脂肪細胞代謝因子の発現を促進することにより、未熟脂肪細胞から成熟脂肪細胞へのプロセスに関与する重要な転写因子である。しかし、MBMSC の脂肪分化能が抑制されるメカニズムは十分に解明されていない。

細胞の生命活動を維持するためにはエネルギーが必要となる。そのエネルギーを産生するためには、必要量の栄養を取り込み代謝する必要がある。細胞機能を維持するために必要なエネルギー量は細胞によって異なり、細胞分化や形質転換等の細胞機能が大きく変化する際には、包括的なエネルギー代謝機能の転換が起こるといわれている。しかし、MBMSC における脂肪分化制御におけるエネルギー代謝の関与は不明である。

ミトコンドリア機能の活性化は、幹細胞分化の調節に重要である。脂肪分化の誘導により、ミトコンドリアのエネルギー産生が解糖から酸化的リン酸化に移行し、ミトコンドリア機能が活性化される。脂肪形成の誘導により、ミトコンドリアの膜電位と生合成が増加し、これらはミトコンドリア活性の重要な指標である。さらに、ミトコンドリア機能の活性化により ATP 産生が誘導され、その結果、ATP 産生の副産物である活性酸素種 (ROS) が大量に生成される。細胞内 ROS が過剰になると細胞の損傷や機能不全を引き起こすが、基礎 ROS レベルを低く抑えることは、細胞機能の維持に必要かつ有益である。さらに、ROS は脂肪形成の調節に役割を果たしており、Nox4 のノックダウンにより、MSC における ROS 産生と脂肪分化が抑制される。さらに、外因性 H₂O₂ 処理は、3T3-L1 前脂肪細胞における C/EBP β および PPAR γ 発現を増加させることで脂肪分化を促進する。しかし、MBMSC の脂肪分化におけるミトコンドリア機能と ROS の役割は不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、MBMSC の分化制御メカニズムを細胞内エネルギー代謝変化の面から解析をおこない、脂肪分化制御機構におけるエネルギー代謝変化の役割を評価する。また、MBMSC の脂肪分化能力が低いのは、脂肪形成中でのミトコンドリア機能と ROS 産生の抑制による可能性があるという仮説を立て、MBMSC と IBMSC の脂肪分化中のミトコンドリア機能活性化と ROS 産生の違いを評価し、MBMSC の脂肪形成制御の根底にあるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MBMSC の採取および細胞培養

MBMSC の採取は、鹿児島大学病院臨床研究倫理委員会の承認を得て (承認番号: 170263 疫 課題名: 「ヒト口腔組織由来骨原性細胞の分離、同定と骨再生療法の開発」)、インプラント手術の際に患者の同意のもとで骨髓液を採取した。IBMSC は Lonza 社より購入したものを使用した。MBMSC および IBMSC は 10% ウシ胎児血清含有の α -MEM 培地を用いて培養をおこなった。

(2) MBMSC および IBMSC の分化能比較

MBMSC および IBMSC に対して、脂肪分化誘導をおこない、脂質の蓄積を Oil-Red O 染色によって評価した。

(3) 脂肪分化制御因子発現の評価

脂肪分化制御因子として、初期分化転写因子 (C/EBP β , C/EBP δ)、後期分化転写因子 (PPAR γ , C/EBP α) 発現を定量的リアルタイム PCR によって評価した。

(4) 乳酸産生量評価

MBMSC および IBMSC において、脂肪分化誘導に伴う乳酸産生量の変化を評価した。

(5) ミトコンドリア機能評価

脂肪分化誘導に伴うミトコンドリア機能活性化の評価を、ミトコンドリア膜電位の定量、ミトコンドリア DNA 数の測定、ミトコンドリア生合成関連遺伝子発現によって評価した。

(6) 細胞内活性酸素種 (ROS) 測定

脂肪分化誘導に伴う細胞内 ROS 産生の変化を ROS assay kit を用いて評価した。

(7) NOX4 過剰発現による MBMSC の脂肪分化に与える影響の評価

NOX4 遺伝子を過剰発現した MBMSC に脂肪分化誘導をおこない、脂肪分化制御遺伝子発現と脂質蓄積に与える影響を Oil-Red O 染色によって評価した。

(8) 細胞内 ROS 産生誘導による脂肪分化に与える影響の評価

ROS 産生誘導剤のメナジオン添加によって MBMSC の ROS 産生を増加させた際の脂肪分化に与え

る影響を評価した。

4. 研究成果

(1) MBMSC と IBMSC の脂肪分化能比較

IBMSC と MBMSC を 5 株ずつ用いて脂肪分化能の評価をおこなった。MBMSC は IBMSC に比べて有意に脂質蓄積が低いことが明らかとなった (図 1)。

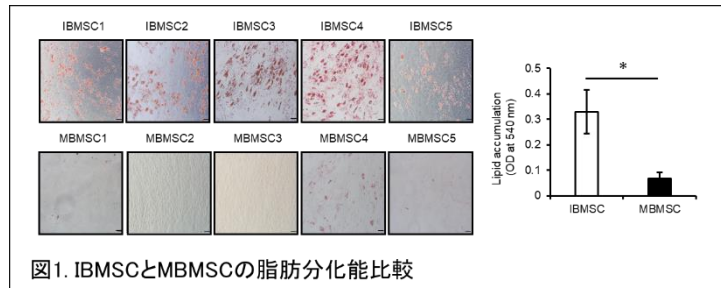


図1. IBMSCとMBMSCの脂肪分化能比較

(2) 脂肪分化制御因子発現比較

MBMSC は脂肪分化が負に制御されていることから、どのような分子メカニズムによって調節されているかを明らかにするために、脂肪分化に重要な転写因子発現を評価した。

IBMSC は脂肪分化誘導により、C/EBP β および C/EBP δ 、Ebf-1 の有意な発現上昇が誘導されるが、MBMSC では有意な変化がない (図 2A)。さらに、PPAR γ 、C/EBP α も同様に、MBMSC では有意な発現上昇は認めなかった (図 2A)。PPAR γ および C/EBP α は C/EBP β および C/EBP δ によって発現や転写活性が調節されることが報告されているため、MBMSC における脂肪分化の負の制御機構において、分化早期転写因子発現の抑制が重要なファクターである可能性が示唆される。

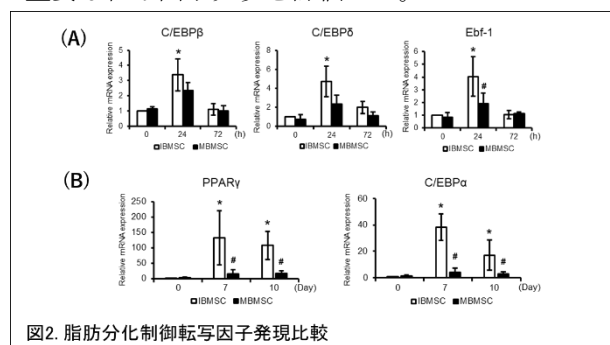


図2. 脂肪分化制御転写因子発現比較

(3) 脂肪分化に伴う乳酸産生比較

MBMSC における低脂肪分化能におけるエネルギー代謝変化の影響を評価するために、脂肪分化誘導に伴う乳酸産生量の比較をおこなったが、IBMSC と MBMSC において有意な乳酸産生量に変化を認めなかった。

(4) MBMSC の脂肪分化抑制におけるミトコンドリア機能活性化の影響

上記項目 (2) によって、MBMSC においては脂肪分化早期転写因子の抑制が脂肪制御に関与している可能性が示されたため、次にどのようなメカニズムによって C/EBP β および C/EBP δ 発現が制御されているか探索した。近年、脂肪分化の制御においてミトコンドリア機能の活性化が重要な役割をすることが報告されている。そこで、脂肪分化によるミトコンドリア機能の変化を評価した。MBMSC および IBMSC は脂肪分化誘導によって、ミトコンドリア膜電位が増加するが、両細胞間で有意な差はみられなかった。また、ミトコンドリア DNA のコピー数およびミトコンドリア生合成関連遺伝子である PGC-1 α と TFAM 発現においても MBMSC と IBMSC 間で有意な差はなかった。これらの結果から、MBMSC の脂肪分化抑制においてミトコンドリア機能の活性化は直接的には関与しないことが見出された。

(4) MBMSC の脂肪分化抑制における活性酸素種 (ROS) の影響

過剰な ROS は細胞機能障害を引き起こすが、低濃度の ROS は細胞機能の維持にとって重要であることが明らかとなっている。また、近年の研究により ROS が脂肪分化の誘導に重要であることが報告されている。そこで、MBMSC の脂肪分化制御機構における ROS の役割について評価した。

IBMSC において、脂肪分化誘導に伴う細胞内 ROS 産生は分化誘導により増加するが、MBMSC では増加しなかった (図 3A)。また、ROS 産生酵素である NOX4 は MBMSC において IBMSC に比べて有意に低かった (図 3B)。このことから、ROS が MBMSC の脂肪分化の制御に何らかの影響を及ぼしている可能性が見出された。

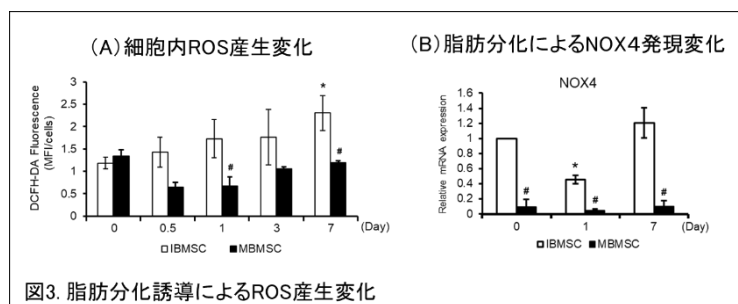


図3. 脂肪分化誘導によるROS産生変化

(5) NOX4 遺伝子過剰発現による MBMSC の脂肪分化に与える影響

次に、NOX4 由来 ROS の MBMSC 脂肪形成への関与をさらに評価するために、NOX4 遺伝子を MBMSC で過剰発現させた。NOX4 の過剰発現は MBMSC における ROS 産生を有意に増加させることが確認された (図 4A)。次に、NOX4 過剰発現 MBMSC の脂肪形成能を評価した。まず、脂肪形成転写因子の発現レベルの変化を調べた。NOX4 過剰発現細胞における C/EBP β 、C/EBP δ 、および Ebf-1 の発現は、ネガティブコントロールプラスミドを導入した細胞の発現よりも高く、NOX4 過剰発現細胞の C/EBP δ はコントロール細胞よりも有意に高かった (図 4B)。対照的に、NOX4 過剰発現細胞では PPAR γ および C/EBP α の発現に有意な増加は見られなかった (図 4C)。NOX4 過剰発現した MBMSC を脂肪形成誘導にかけ脂肪滴形成を評価した。NOX4 過剰発現細胞は、コントロールプラスミドを導入した細胞と比較して脂肪滴形成に有意差はなかった (図 4D)。これらの結果は、NOX4 過剰発現によって誘導された ROS が脂肪分化の初期段階にのみ影響する可能性があることを示している。

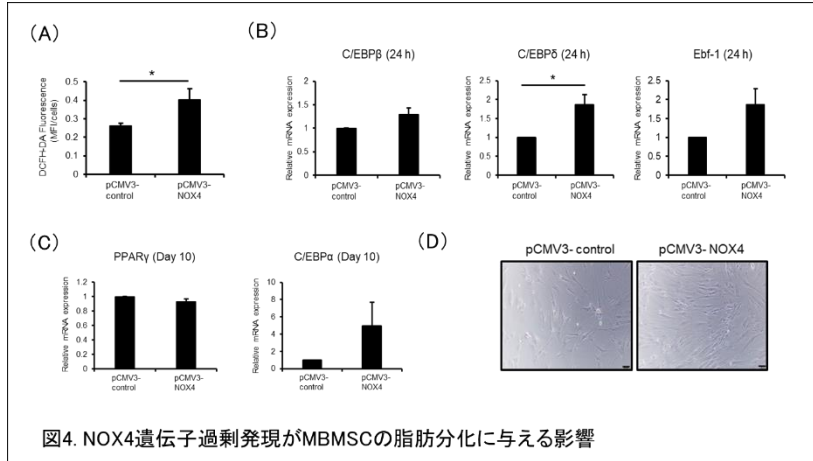


図4. NOX4遺伝子過剰発現がMBMSCの脂肪分化に与える影響

(6) メナジオン誘導性の細胞内 ROS 産生増加が MBMSC の脂肪分化に与える影響

次に MBMSC において細胞内 ROS 産生を増加させた際の脂肪分化に与える影響を評価した。細胞内 ROS 産生の誘導には合成ビタミン K であるメナジオンを用いた。MBMSC にメナジオンを添加することによって有意に細胞内 ROS 産生が増加し、C/EBP β および C/EBP δ 発現が増加した (図 5A)。しかし、メナジオン処理によって、脂肪分化後期転写因子の PPAR γ 、C/EBP α 発現には影響せず (図 5A)、脂肪滴の形成量には有意な増加は認めなかった (図 5B)。これらの結果は、MBMSC の脂肪分化において ROS は分化初期段階に部分的に関与している可能性を示している。この研究成果は MBMSC の組織特異的な性質を解明するための新たな手がかりとなる可能性を示している。

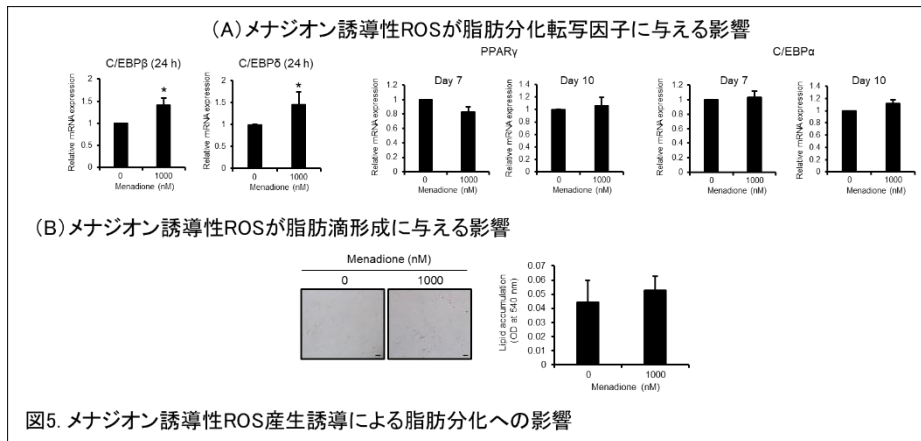


図5. メナジオン誘導性ROS産生誘導による脂肪分化への影響

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Ikeda N, Ishii M, Miyata H, Nishi Y, Suehiro F, Komabashiri N, Sakurai T, Nishimura M. Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Regulation of Adipogenic Differentiation of Human Maxillary/Mandibular Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Mol Bio Rep*. 2023;50:5733-5745. doi: 10.1007/s11033-023-08528-9.
- ② Miyata H, Ishii M, Suehiro F, Komabashiri N, Ikeda N, Sakurai T, Nishimura M. Elucidation of adipogenic differentiation regulatory mechanism in human maxillary/mandibular bone marrow-derived stem cells. *Arch Oral Biol*. 2023;146:105608. doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105608.
- ③ Nishi Y, Seto K, Murakami M, Harada K, Ishii M, Kamashita Y, Kawamoto S, Hamano

T, Yoshimura T, Kurono T, Nakamura Y, Nishimura M. Effects of denture cleaning regimens on the quantity of Candida on dentures: A cross-sectional survey on nursing home residents. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19:15805.
doi: 10.3390/ijerph192315805.

- ④ Ishii M, Miyata H, Ikeda N, Tagawa T, Nishimura M. Piper retrofractum extract and its component piperine promote lymphangiogenesis via an AKT- and ERK-dependent mechanism. *J Food Biochem*. 2022; 46:e14233.
doi: 10.1111/jfbc.14233.
- ⑤ Ishii M, Ikeda N, Miyata H, Takahashi M, Nishimura M. Purple Sweet Potato Leaf Extracts Suppress Adipogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Food Biochem*. 2022; 46:e14057.
doi: 10.1111/jfbc.14057.
- ⑥ Suehiro F, Komabashiri N, Masuzaki T, Ishii M, Yanagisawa T, Nishimura M. Efficacy of bone grafting materials in preserving the alveolar ridge in a canine model. *Dent Mater J*. 2021; 41:302-308.
doi: 10.4012/dmj.2021-173.
- ⑦ Komabashiri N, Suehiro F, Ishii M, Nishimura M. Efficacy of chitinase-3-like protein 1 as an in vivo bone formation predictable marker of maxillary/mandibular bone marrow stromal cells. *Regen Ther*. 2021; 18:38-50.
doi: 10.1016/j.reth.2021.03.004.

〔学会発表〕（計4件）

- ① 宮田春香、石井正和、大浦悠梨香、櫻井智章、末廣史雄、西村正宏、顎骨骨髓由来間葉系幹細胞における脂肪分化制御機構の解明、第23回日本再生医療学会学術大会、2024
- ② 末廣史雄、駒走尚大、石井正和、益崎与泰、田中謙光、松本哲彦、戸澤聖也、山田悠平、西村正宏、顎骨骨髓間葉系幹細胞採取条件の検討、第22回日本再生医療学会総会、2023
- ③ 駒走尚大、末廣史雄、石井正和、西村正宏、顎骨骨髓由来間質細胞の骨形成能判定のためのマーカー探索、第21回日本再生医療学会総会、2022
- ④ 宮田春香、石井正和、末廣史雄、駒走尚大、西村正宏、顎骨骨髓由来間葉系幹細胞における脂肪分化制御機構の解明、第21回日本再生医療学会総会、2022

〔図書〕（計0件）

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/prostho2/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：西村 正宏

ローマ字氏名：NISHIMURA, Masahiro

所属研究機関名：鹿児島大学 部局名：医歯学域歯学系

職名：教授

研究者番号（8桁）：00294570

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishii M, Ikeda N, Miyata H, Takahashi M, Nishimura M.	4. 巻 46
2. 論文標題 Purple Sweet Potato Leaf Extracts Suppress Adipogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Food Biochem.	6. 最初と最後の頁 e14057
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jfbc.14057.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishii M, Miyata H, Ikeda N, Tagawa T, Nishimura M.	4. 巻 46
2. 論文標題 Piper retrofractum extract and its component piperine promote lymphangiogenesis via an AKT- and ERK-dependent mechanism.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Food Biochem.	6. 最初と最後の頁 e14233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jfbc.14233.	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 -
1. 著者名 Nishi Y, Seto K, Murakami M, Harada K, Ishii M, Kamashita Y, Kawamoto S, Hamano T, Yoshimura T, Kurono T, Nakamura Y, Nishimura M.	4. 巻 19
2. 論文標題 Effects of denture cleaning regimens on the quantity of Candida on dentures: A cross-sectional survey on nursing home residents.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Environ Res Public Health.	6. 最初と最後の頁 15805
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijerph192315805.	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 -
1. 著者名 Miyata H, Ishii M, Suehiro F, Komabashiri N, Ikeda N, Sakurai T, Nishimura M.	4. 巻 146
2. 論文標題 Elucidation of adipogenic differentiation regulatory mechanism in human maxillary/mandibular bone marrow-derived stem cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol.	6. 最初と最後の頁 105608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2022.105608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komabashiri N, Suehiro F, Ishii M, Nishimura M.	4. 巻 18
2. 論文標題 Efficacy of chitinase-3-like protein 1 as an in vivo bone formation predictable marker of maxillary/mandibular bone marrow stromal cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regeneration Therapy.	6. 最初と最後の頁 38-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2021.03.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suehiro F, Komabashiri N, Masuzaki T, Ishii M, Yanagisawa T, Nishimura M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Efficacy of bone grafting materials in preserving the alveolar ridge in a canine model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal.	6. 最初と最後の頁 302-308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2021-173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishii M, Ikeda N, Miyata H, Takahashi M, Nishimura M.	4. 巻 46
2. 論文標題 Purple Sweet Potato Leaf Extracts Suppress Adipogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Food Biochemistry.	6. 最初と最後の頁 e14057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jfbc.14057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 末廣史雄, 駒走尚大, 石井正和, 益崎与泰, 田中謙光, 松本哲彦, 戸澤聖也, 山田悠平, 西村正宏
2. 発表標題 顎骨骨髓間葉系幹細胞採取条件の検討
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 駒走 尚大, 末廣 史雄, 石井 和正, 西村 正宏
2. 発表標題 顎骨骨髓由来間質細胞の骨形成能判定のためのマーカー探索
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮田春香, 石井正和, 末廣史雄, 駒走尚大, 西村正宏
2. 発表標題 顎骨骨髓由来間葉系幹細胞における 脂肪分化制御機構の解明
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮田春香, 石井正和, 大浦悠梨香, 櫻井智章, 末廣史雄, 西村正宏
2. 発表標題 細胞における 脂肪分化制御機構の解明
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会学術大会
4. 発表年 2024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
研究 分担者	西村 正宏 (NISHIMURA Masahiro) (00294570)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------