

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390295

研究課題名(和文) 荷重の増減による間葉系幹細胞から骨・血管・脂肪への分化調節機構の解明とその制御

研究課題名(英文) Regulation system of differentiation from mesenchymal stem cells to bone, vascular, and fatty tissues by mechanical loading and unloading

研究代表者

酒井 昭典 (SAKAI, Akinori)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：90248576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,400,000円、(間接経費) 1,920,000円

研究成果の概要(和文)：荷重を負荷したマウスと尾部懸垂により後肢を非荷重にしたマウスを用いて実験を行った。荷重負荷により、副甲状腺ホルモン受容体を介したシグナルが、未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促進し、脂肪細胞への分化を抑制することを明らかにした。外骨膜性骨形成が亢進し、皮質骨外径が拡大するためには、このシグナルの亢進が必要であることを示した。一方、非荷重状態では、骨髄細胞におけるCD31とその受容体CD38の発現が低下し、非荷重後の再荷重によりこれらは正常荷重レベルに回復した。骨芽細胞とCD38陽性骨髄細胞の共培養実験の結果から、骨芽細胞分化には血管系因子が必要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We performed studies using exercise loading mice and unloading mice due to tail suspension. We demonstrated that the signal through PTH/PTHrP receptors promoted osteogenic differentiation and suppressed adipogenic differentiation from mesenchymal stem cells under loading condition. This signal is necessary for promotion of periosteal bone formation and enlargement of cross-sectional cortical shell. The expressions of CD31 and its receptor CD38 decreased after unloading and recovered to the normal loading levels after reloading. Co-culture experiments of osteoblasts and CD38 positive cells revealed that vascular endothelial factors are necessary for osteogenic differentiation.

研究分野：医学

科研費の分科・細目：外科・整形外科

キーワード：荷重 非荷重 骨芽細胞 血管内皮細胞 脂肪細胞 未分化間葉系幹細胞 骨髄細胞 副甲状腺ホルモン受容体

1. 研究開始当初の背景

運動のように荷重が増加すると、骨髄における骨形成は促進され、海綿骨量が増加し、脂肪組織量は減少する。一方、寝たきりや宇宙飛行のように荷重が減少すると、骨髄における骨形成は低下し、海綿骨量が減少し、脂肪組織量は増加する。

また、我々は、骨髄損傷モデルの研究から、骨芽細胞分化と血管新生や血管内皮細胞分化には密接な関連性がみられることを明らかにしてきた。

しかし、荷重の増減に伴う骨髄細胞分化の振り分けを調節する機序や各細胞間の相互作用は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

研究の目的は、荷重の増減に伴い、骨髄細胞中の未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞、脂肪細胞、血管内皮細胞への分化がどのように変化するのか、また、各細胞間に相互作用があるのか、どのようなシグナルが分化の振り分けを行っているのか、を明らかにすることである。荷重増減下での骨髄細胞の分化調節機構を解明することを目的に研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 荷重増加状態下での骨髄細胞分化の解析

マウス脛骨骨髄における間葉系幹細胞から骨芽細胞と脂肪細胞と血管内皮細胞への分化に及ぼす荷重の影響について組織学的所見と分化に関連する遺伝子発現から明らかにした。荷重の増加モデルとして、最高部に給水瓶を設置した高さ1メートルの金網製ケージ内で飼育したマウスを用いた。マウスは水を飲むために自発的にケージの昇降を繰り返す。脛骨を採取し、HE染色およびTRACP染色を行った。

(2) 荷重減少状態から荷重増加状態下へ変化したときの骨髄細胞分化の解析

マウス脛骨骨髄における間葉系幹細胞から骨芽細胞、血管内皮細胞、脂肪細胞への分化に及ぼす荷重減少の影響について組織学的所見と分化に関連する遺伝子発現から明らかにした。非荷重モデルとして、尾部を懸垂して後肢を非荷重にしたマウスを用いた。1週間非荷重にしたあと、尾部懸垂を止め再荷重した。脛骨を採取し、脛骨二次海綿骨における骨形態計測と骨髄細胞を用いた定量的RT-PCRとフローサイトメトリーを行った。

(3) 荷重増加状態下での分化の振り分けに関わるシグナルの解析

マウス四肢に荷重増加状態とし、その脛骨骨髄における間葉系幹細胞から骨芽細胞、脂肪細胞への分化の変化について組織学的所見と分化に関連する遺伝子発現から明らかにした。分化の振り分けに関するシグナルを

解析した。

(4) PTH (副甲状腺ホルモン) 受容体シグナルを介した荷重の増減と骨形成の関連性
アルデヒド脱水素酵素 2 (*aldh2*) 遺伝子欠損マウス [*aldh2*(-/-)] と正常な野生型マウス [*aldh2*(+/+)] の大腿骨と脛骨を用いて実験を行った。海綿骨と皮質骨を用いて、組織学的所見と分化に関連する遺伝子発現から評価した。

4. 研究成果

(1) 荷重増加状態下での骨髄細胞分化の解析

荷重の増加により2週後に破骨細胞面(骨吸収)が低下し、4週後に骨形成率が増加することが明らかとなった。2週後に海綿骨量と骨梁数が増加し、脂肪組織量と脂肪細胞数が減少した。運動後7日の海綿骨では皮質骨内面での骨芽細胞からオステオカルシン mRNA の発現が増加し、運動後7日の皮質骨では *wnt-1*、*frizzled 4*、*-catenin* mRNA の発現が増加した。骨髄細胞において、運動後4日に脂肪細胞早期分化遺伝子である C/EBP と C/EBP mRNA の発現が低下し、運動後7日に脂肪細胞特異的遺伝子である *aP2* と *PEPCK* mRNA の発現が低下した。骨髄細胞において、血管内皮細胞関連遺伝子である CD31 (PECAM-1) とその受容体である CD38 は増加した。荷重増加モデルマウスの研究結果から、骨・脂肪・血管それぞれの分化マーカーについて発現の時期を明らかにした。

(2) 荷重減少状態から荷重増加状態下へ変化したときの骨髄細胞分化の解析

非荷重後1週で海綿骨量は約50%に減少し、骨髄細胞では骨芽細胞への分化が障害され、脂肪細胞への分化が促進された。骨髄細胞中における *osterix* と *osteocalcin* mRNA の発現が低下し、*PPAR* mRNA の発現が亢進した。血管関連因子では、非荷重状態の骨髄細胞における CD31 (PECAM-1) とその受容体 CD38 の発現が低下し、*Tie-2* 発現が骨梁付近の骨髄腔で低下した。非荷重後の再荷重によりこれら血管関連因子発現は正常荷重レベルに回復した。これらの結果は、CD38 ノックアウトマウスが骨形成低下と骨量減少を示すという過去の報告と一致している。骨芽細胞株の MC3T3-E1 細胞に CD38 陽性骨髄細胞を添加し共培養した群では、MC3T3-E1 細胞単独群と比較してアルカリフォスファターゼ活性が増強した。CD38 陰性骨髄細胞を添加し共培養した群では増強しなかった。非荷重状態の骨髄細胞では T リンパ球のマーカーである CD3e の発現が低下していた。

(3) 荷重増加状態下での分化の振り分けに関わるシグナルの解析

荷重の増加により2週後に海綿骨量と骨梁数が増加し、脂肪組織量と脂肪細胞数が減少

した。荷重後の海綿骨では皮質骨内面での前骨芽細胞から PTH/PTHrP 受容体 (PTHR1) とオステオカルシンのタンパク発現が増加し、皮質骨では *wnt-1*, *frizzled 4*, *-catenin* mRNA の発現が増加した。

4 日間荷重負荷したマウスの脛骨から採取した骨髄細胞を培養した。アルカリフォスファターゼ陽性 CFU-f 数は、PTH (1-34) を添加するとその形成が増加し、抗 PTHR1 抗体を添加するとその形成が低下した。それとは逆に、オイルレッド O 陽性細胞数は、PTH (1-34) を添加するとその形成が低下し、PTHR1 抗体を添加するとその形成が増加した。荷重を負荷すると PTHR1 mRNA の発現は増加し、尾部懸垂により非荷重にするとその発現は低下した。これらの結果から、荷重増加により、PTH/PTHrP 受容体を介したシグナルが、骨髄細胞中の骨芽細胞分化を促進し、脂肪細胞分化を抑制することを明らかにした。

(4) PTH (副甲状腺ホルモン) 受容体シグナルを介した荷重の増減と骨形成の関連性

7 週齢の *aldh2(-/-)* と *aldh2(+/+)* それぞれに、4 週間、水を飲ませる群 (+wa) と 5% エタノールを飲ませる群 (+al) で比較した。脛骨近位二次海綿骨量は、*aldh2(-/-)+wa* 群と *aldh2(+/+)+wa* 群と *aldh2(+/+)+al* 群では差がないが、*aldh2(-/-)+al* 群だけが有意に減少していた。海綿骨梁表面における骨形成が低下していた。骨髄細胞中の骨芽細胞系細胞の *p21* 遺伝子発現が亢進し、G2 期で細胞周期が停止していた。オステオカルシンの発現が低下していた。一方、5% エタノールの負荷に関わらず、*aldh2(-/-)* の大腿骨骨幹部の骨横断面の外径は、*aldh2(+/+)* と比べて小さかった。1 週間荷重を負荷すると、*aldh2(+/+)* では大腿骨と脛骨の皮質骨における PTH/PTHrP 受容体の mRNA 発現が有意に増加し、外骨膜性骨形成が促進されるが、*aldh2(-/-)* では PTH/PTHrP 受容体の mRNA 発現が全く増加せず、外骨膜性骨形成が促進されなかった。

これらの結果から、*aldh2* 遺伝子欠損状態下で、海綿骨における骨芽細胞分化は、エタノール負荷により抑制されること、一方、皮質骨では、エタノール負荷に関わらず、荷重を増加しても PTH/PTHrP 受容体の mRNA 発現が増加せず、外骨膜性骨形成反応が生じないことが明らかとなった。

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 9 件)

Yoshioka T, Sakai A, et al. (4 人のうち 4 番目、査読有) A comparative study of the effects of daily minodronate and weekly alendronate on upper gastrointestinal symptoms, bone resorption, and back pain in postmenopausal osteoporosis patients. J

Bone Miner Metab 31:153-160, 2013

DOI: 10.1007/s00774-012-0393-x

Sakamoto K, Sakai A, et al. (13 人のうち 8 番目、査読有) Why not use your own body weight to prevent falls? A randomized, controlled trial of balance therapy to prevent falls and fractures forelderly people who can stand on one leg for ≤ 15 s. J Orthop Sci 18:110-120, 2013.

DOI: 10.1007/s00776-012-0328-3

Tsuchiya T, Sakai A, et al. (11 人のうち 2 番目、査読有) Disruption of aldehyde dehydrogenase 2 gene results in altered cortical bone structure and ibcreased cortical bone mineral density in the femoral diaphysis of mice. Bone 53:358-368, 2013

DOI: 10.1016/j.bone.2012.12.049

Utsunomiya H, Sakai A, et al. (6 人のうち 4 番目、査読有) Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from shoulder tissues involved in rotator cuff tears. Am J Sports Med 41:657-668, 2013

DOI: 10.1177/0363546512473269

酒井昭典. メカニカルストレスの骨細胞による感知と Wnt シグナル. Clin Calcium 22:1829-1835, 2012

DOI: CliCa121218291835

Shimizu Y, Sakai A, et al. (8 人のうち 2 番目、査読有) Reduced bone formation in alcohol-induced osteopenia is associated with elevated p21 expression in bone marrow cells in aldehyde dehydrogenase 2-disrupted mice. Bone 48:1075-1086, 2011

DOI: 10.1016/j.bone.2011.01.008

Sakai A, et al. (6 人のうち 1 番目、査読有) Unipedal standing exercise and hip bone mineral density in postmenopausal women: a randomized controlled trial. J Bone Miner Metab 28: 42-48, 2010

DOI: 10.1007/s00774-009-0100-8

Sakai A, et al. (6 人のうち 1 番目、査読有) Shorter unipedal standing time and lower bone mineral density in women with distal radius fractures. Osteoporos Int 21: 733-739, 2010

DOI: 10.1007/s00198-009-0992-0

Tanaka K, Sakai A, et al. (6 人のうち 3 番目、査読有) Deficiency of vitamin A delays bone healing process in association with reduced BMP2 expression after drill-hole injury in mice. Bone 47:11006-1012, 2010

DOI: 10.1016/j.bone.2010.08.016

[学会発表](計 11 件)

酒井昭典, 他:メカニカルストレスと骨髄細胞分化. 第 33 回日本骨形態計測学会, 2013 年 7 月 5 日, 浜松市 (アクトシティ浜松コンgresセンター)

山本淳也、酒井昭典、他: トモシンセシス骨梁解析による海綿骨微細構造の推定 - イヌ大腿骨および腰椎での検討-. 第 33 回日本骨形態計測学会, 2013 年 7 月 6 日, 浜松市(アクトシティ浜松コンgresセンター)

酒井昭典: 橈骨遠位端骨折の臨床からみた骨粗鬆症治療の問題点と課題. 第 15 回日本骨粗鬆症学会, 2013 年 10 月 11 日, 大阪市(大阪国際会議場)

酒井昭典、他: 骨粗鬆症患者において他のビスホスホネート製剤からミノドロロン酸月 1 回製剤へ変更後の腰椎骨密度増加に関連する背景因子の検討. 第 15 回日本骨粗鬆症学会, 2013 年 10 月 12 日, 大阪市(大阪国際会議場)

酒井昭典: 骨粗鬆症治療の新時代 - 新規テリパラド製剤週 1 回投与法と骨形成促進作用 -. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月 15 日, 京都市(国立京都国際会館)

酒井昭典、他: 卵巣摘出動物における PTH のアナボリック作用. 第 32 回日本骨形態計測学会, 2012 年 6 月 8 日, 大阪市(大阪国際会議場)

酒井昭典: 骨への力学的負荷の感知とその応答シグナル. 第 30 回日本骨代謝学会学術集会, 2012 年 7 月 20 日, 東京都(京王プラザホテル)

酒井昭典: 骨芽細胞分化と骨形成の分子制御の最新知見. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2012 年 10 月 26 日, 名古屋市(名古屋国際会議場)

酒井昭典: 骨粗鬆症の動物モデル. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2012 年 10 月 27 日, 名古屋市(名古屋国際会議場)

Sakai A, et al. Fragility fracture: Risk assessment and prevention. 第 13 回日本骨粗鬆症学会 3rd Joint Meeting of Japanese Osteoporosis Society and Korean Society of Osteoporosis Symposium, 2011 年 11 月 5 日, 神戸市(神戸国際会議場)

森寺邦晃、酒井昭典、他: 非荷重環境下での Tie-2 受容体の発現と局在の変化. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会, 2010 年 7 月 23 日, 東京都(京王プラザホテル)

〔図書〕(計 7 件)

酒井昭典、メディカルレビュー社、ファーマナビゲーター PTH 編、2013、317

酒井昭典、メディカルレビュー社、ファーマナビゲーター ビスホスホネート編、2013、249

酒井昭典、医薬ジャーナル社、ビスホスホネート エビデンスブック、2013、383

酒井昭典、メディカルレビュー社、ファーマナビゲーター 活性型ビタミン D₃ 製剤編、2012、355

酒井昭典、医薬ジャーナル社、骨粗鬆症診療ハンドブック(改訂 5 版) 2012、391

Sakai A, Nakamura T, Springer、Mechanosensing Biology、2011、219

酒井昭典、中村利孝、南江堂、整形外科専門医テキスト、2010、987

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
酒井昭典(SAKAI, Akinori)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90248576

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: