

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 11日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791387

研究課題名（和文）

骨髄脂肪組織－骨芽細胞相互作用と脂肪組織由来間葉系幹細胞の増殖・分化機構の解明

研究課題名（英文）

Interactions between MSC-containing bone marrow adipose tissue and osteoblasts

研究代表者

内橋 和芳 (UCHIHASHI KAZUYOSHI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：60452835

研究成果の概要（和文）：

骨髄内で隣接して存在する間葉系幹細胞を含む脂肪組織と骨芽細胞との液性因子を介した相互作用を検討した。骨髄脂肪組織の単独培養では、組織片周囲に紡錘形の間質細胞が新生し、その2.8%にCD44/CD105共陽性の間葉系幹細胞様細胞が含まれていた。骨芽細胞との混合培養により、間質細胞の新生は抑制され、レプチン分泌、脂肪細胞特異的遺伝子の発現が抑制された。一方、骨芽細胞の増殖・分化も抑制された。

研究成果の概要（英文）：

Bone marrow stromal cells including a small number of lipid-laden preadipocytes and CD44+/CD105+ mesenchymal stem cell (MSC)-like cells, developed from bone marrow adipose tissue (BMAT) in the organ culture of BMAT. We also examined BMAT-osteoblast interactions and found that osteoblasts inhibited the development of BMSCs and reduced leptin production, while BMAT inhibited the growth and differentiation of osteoblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

1) 骨内の骨髄組織は、骨組織（骨梁）、脂肪組織、造血組織から成り、これらの組織の相互作用は、骨髄恒常性の維持に必須である。さらに、老人性骨粗鬆症においては、骨量の減少と脂肪組織の増加が加齢と共に進行するので、脂肪組織と骨梁表面に局在する骨芽細胞との相互作用は、骨髄恒常性の維持や骨粗鬆症の病態に深く関与していると考えら

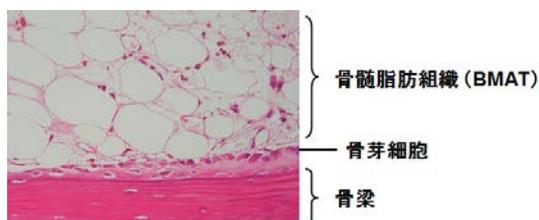
れる。しかし、骨芽細胞と骨髄脂肪組織の相互作用は不明であり、国内外での報告はない。2) 脂肪組織内には骨芽細胞、筋肉細胞、脂肪細胞等に分化する間葉系幹細胞が存在することが解明された (Zuk PA, et al. Mol. Biol. Cell 13: 4279-4295, 2002)。我々は、皮下及び内蔵脂肪組織の3次元コラーゲンゲル培養法を開発し、脂肪組織の長期培養系を確立し、脂肪組織から、CD44, CD105, c-kit 陽性の間葉

系幹細胞が再生することを見出した (Sonoda E, et al. *Endocrinology* 149: 4794-4798, 2008)。老人性骨粗鬆症では、骨髄脂肪組織由来間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化促進と骨芽細胞への分化抑制が基本病態の1つと推測される (Gimble JM et al. *J Cell Biochem.* 98:251-66, 2006)。しかし、骨芽細胞-骨髄脂肪組織相互作用が、骨髄脂肪組織由来間葉系幹細胞の増殖・分化に与える影響は不明であり、国内外での報告はない。

2. 研究の目的

骨内には、骨梁表面の骨芽細胞と骨髄脂肪組織により形成された微小環境が存在する (図1)。また、脂肪組織は間葉系幹細胞の供給臓器である。老人性骨粗鬆症においては、加齢と共に骨量の減少と脂肪組織の増加 (脂肪髄化) が進行する。しかし、骨芽細胞と骨髄脂肪組織の相互作用は不明である。以上の背景に基づいて、骨芽細胞と骨髄脂肪組織の細胞間相互作用とその相互作用下における脂肪組織由来間葉系幹細胞の増殖・分化機構を解明する本研究を着想した。本研究では、上記の課題を、骨芽細胞と骨髄脂肪組織の混合培養系を用いて解明する。本研究により、骨髄恒常性の維持機構や老人性骨粗鬆症の基本病態の解明が期待される。

[図1]



3. 研究の方法

1. 材料: 骨髄脂肪組織 (Bone marrow adipose tissue: BMAT) は、人工関節置換術の材料から得られたヒト骨髄脂肪組織 (学内倫理委員会の許可済み症例のみ) を用いた。骨芽細胞はマウス頭蓋冠由来 MC3T3-E1 細胞を用いた。

2. 培養システム:

(A) 骨髄脂肪組織単独培養

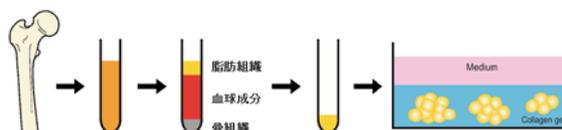
採取した骨髄脂肪組織を静置、遠心し、可及的に骨組織、血球成分を除去した後、約 0.5 mm 径に細切した骨髄脂肪組織片 (0.2 ml) を包埋したコラーゲングル (1 ml) を 12 ウェルプレートに入れた。これに培養液 (Ham F-12 + 10% 新生子牛血清 + 50 µg/ml ゲンタマイシン) を入れて、1、3 週間培養した (図2)。この系に、脂肪細胞分化誘導因子や脂肪分解因子 (Dexamethasone 10mM, Insulin 20 mU/ml, TNF-α 2 nM, LPS 10 mg/ml) を添加した。

(B) 骨髄脂肪組織-骨芽細胞混合培養系

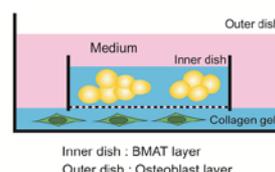
骨髄脂肪組織を上記と同様の方法で、底面がニトロセルロース膜からなる培養皿 (内皿:

直径 30 mm、ミリポア社製) に入れて、脂肪組織層を作った。また、外皿 (直径 10 cm) に 300 万個の骨芽細胞をコラーゲングルに包埋し、重合後に脂肪組織片入りの内皿を置き、1、3 週間培養した。(図3)。コントロール群として、骨芽細胞のみサンプルも作成した。

[図2]



[図3]



3. 骨芽細胞が脂肪組織片に与える影響の解析:

1) 培養サンプルのホルマリン固定・パラフィン切片からヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色標本を作製し、脂肪組織の形態を解析した。脂肪細胞の増殖を 24 時間ウリジン (BrdU) の摂取率で検討した。さらに、脂肪細胞の機能を検討するために、アディポサイトカインである leptin、adiponectin の培養液中への産生を、ELISA キットで測定した。

2) 骨芽細胞が、骨髄脂肪組織由来の間葉系幹細胞の再生・増殖、分化に及ぼす影響を検討した。すなわち、間葉系幹細胞のマーカーである CD44, CD105 などの免疫組織化学を用いて、脂肪組織からの間葉系幹細胞の再生を検討した。さらに、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を、アルカリフォスファターゼ、I 型コラーゲン、osteocalcin の発現で、脂肪細胞への分化を、オイル・レッド-O 染色による脂肪滴の同定と PPARγ (脂肪細胞への分化転写因子)、leptin、adiponectin の発現で免疫組織化学、RT-PCR を用いて、比較検討した。

4. 脂肪組織が骨芽細胞に与える影響の解析:

1) 骨芽細胞の形態・増殖は、上記 3. と同様の方法で解析した。

2) 骨芽細胞の機能分化を、アルカリフォスファターゼ、I 型コラーゲン、osteocalcin の免疫組織化学、RT-PCR で、比較検討した。

3) 骨芽細胞の脂肪細胞への分化を、オイル・レッド-O 染色による脂肪滴の同定と PPARγ、leptin、adiponectin の免疫組織化学、Western blot、PCR で比較検討した。また、

脂肪組織による骨芽細胞の他の間葉系細胞への分化転換が誘導されるか否かを検討した。

4. 研究成果

培養開始時のヒト骨髓脂肪組織では、単房性の成熟脂肪細胞が見られ、その細胞間に造血細胞を認めた。組織片の周囲には細胞成分は認めなかった。BMAT の中心部では、3 週まで成熟脂肪細胞および造血細胞が保持され、造血細胞は培養の経過とともに減少した。また3 週目では脂肪細胞の細胞膜が一部で消失し、いわゆる fat cyst が出現した (図 4)。

一方、BMAT の辺縁部では、その周囲に紡錘形の Bone marrow stromal cell (BMSC) が出現し、5 強拡大視野当たり 70 個認めた (図 5)。この BMSC のうち、CD105/CD44 が共に陽性を示す間葉系幹細胞が 2.8%、脂肪滴を有する前脂肪細胞が 0.75% 含まれていた。

BMAT 内に含まれる CD45 陽性の白血球に BrdU の取り込みが見られた (図 6)。一方成熟脂肪細胞の核には陽性所見は認めなかった。CD45 陽性細胞には、B リンパ球、T リンパ球、マクロファージがそれぞれ、23.4%、33.3%、36.2% 含まれていた。

BMAT 辺縁部では、脂肪滴を有しない BMSC の約 3% に BrdU の取り込みが見られた。脂肪滴を有する前脂肪細胞に BrdU の取り込みは認めなかった。

次に脂肪細胞分化誘導因子を添加した。デキサメサゾンの投与により、BMSC に占める前脂肪細胞の割合が 32% に増加した (図 7)。インスリンでは増加は認めなかった。全体の BMSC の数に変化はなかった。

各種因子の投与におけるアディポカイン分泌と脂肪細胞特異的遺伝子発現を検討したところ、adiponectin の分泌はすべての条件で 0.8ng/ml 以下と極めて低値であった。レプチン分泌は、デキサメサゾンとインスリンで増加した。Real time RT-PCR による mRNA 発現の評価では、デキサメサゾンの投与で PPAR γ 、adiponectin、leptin 全ての遺伝子発現が上昇し、インスリンでは PPAR γ 、leptin の発現が増した。TNF α は PPAR γ の発現増加、adiponectin、leptin の発現低下を示した。LPS は PPAR γ 発現増加、leptin 発現低下を示した (図 8)。

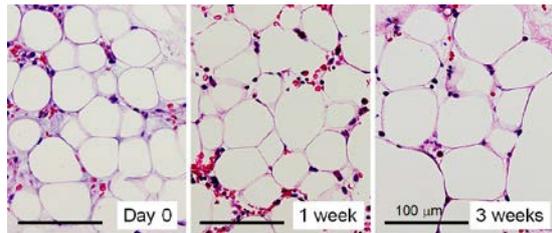
BMAT 単独培養では、脂肪組織片周囲に BMSC が出現するのに対し、骨芽細胞との混合培養では BMAT 周囲における BMSC の新生が有意に抑制された。adiponectin 分泌は単独培養同様低値で、有意差を認めなかった。レプチンは骨芽細胞との混合培養で有意に低下した。

骨芽細胞の増殖は、BMAT と混合培養することにより BrdU の取り込みが有意差をもって減少した。ALP、type I collagen、オステオカ

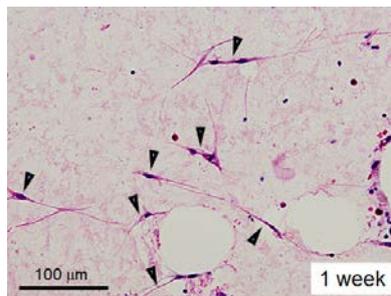
ルシンなどの骨芽細胞分化マーカーはいずれも著明に低下した。特に後期の分化マーカーであるオステオカルシンは測定下限以下であった。また、骨芽細胞から筋細胞や軟骨細胞など他の間葉系細胞への分化転換は認められなかった。

今回の実験では、骨髓内で隣接して存在する成熟脂肪細胞に富んだ脂肪組織と骨芽細胞との液性因子を介した直接的な相互作用を検討した。その結果互いの増殖、分化を抑制していることが示唆された。

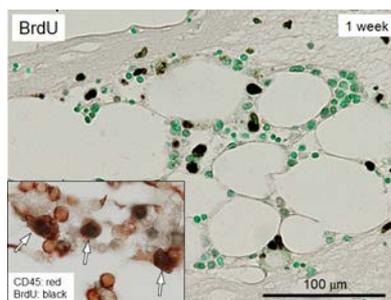
[図 4]



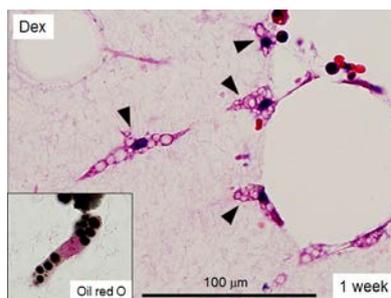
[図 5]



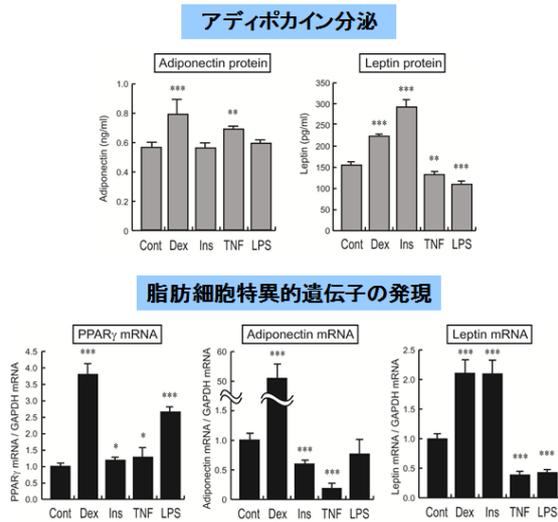
[図 6]



[図 7]



[図8]



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)

本研究により、以下の関連論文がサポートされ、出版された。

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Toda S, Aoki S, Uchihashi K, Matsunobu A, Yamamoto M, Ootani A, Yamasaki F, Koike E, Sugihara H. Culture model for studying thyroid biology and disorders. ISRN Endocrinology Volume 2011, Article ID 275782, 9 pages 査読有り
2. Anan M, Uchihashi K, Aoki S, Matsunobu A, Ootani A, Node K, Toda S. A promising culture model for analyzing the interaction between adipose tissue and cardiomyocytes. Endocrinology 152: 1599-1605, 2011 査読有り
3. Nomoto-Kojima N, Aoki S, Uchihashi K, Matsunobu A, Koike E, Ootani A, Yonemitsu N, Fujimoto K, Toda S. Interaction between adipose tissue stromal cells and gastric cancer cells in vitro. Cell Tissue Res 344: 287-298, 2011 査読有り
4. 戸田修二、松延亜紀、内橋和芳、山本美保子、薬師寺舞、山崎文朗、小池英介、青木茂久、杉原 甫。脂肪組織と脂肪細胞の基礎形態学。臨床検査 55:533-538, 2011 査読有り
5. Aoki S, Makino J, Nagashima A, Takezawa T, Nomoto N, Uchihashi K, Matsunobu A, Sanai T, Sugihara H, Toda S. FLUID FLOW STRESS AFFECTS PERITONEAL CELL KINETICS: POSSIBLE PATHOGENESIS OF PERITONEAL FIBROSIS. Perit Dial Int. 2011 Apr 30. [Epub ahead of print] 査読有り
6. Uchihashi K, Aoki S, Shigematsu M,

Kamochi N, Sonoda E, Soejima H, Fukudome K, Sugihara H, Hotokebuchi T, Toda S. Organotypic culture of human bone marrow adipose tissue. Pathol Int. 60(4):259-67, 2010 査読有り

7. 戸田修二、青木茂久、内橋和芳、(他6名、3番目)。メタボリック症候群における脂肪組織の病理形態と病態解析培養モデル。病理と臨床 28:959-965, 2010 査読有り

8. Udo K, Aoki S, Uchihashi K, Kawasaki M, Matsunobu A, Tokuda Y, Ootani A, Toda S, Uozumi J. Adipose tissue explants and MDCK cells reciprocally regulate their morphogenesis in coculture. Kidney Int 78:60-68, 2010 査読有り

9. Yee CH, Aoki S, Uchihashi K, Matsunobu A, Yamasaki F, Misago N, Piao M, Tetsuji U, Yonemitsu N, Sugihara H, Toda S. The air liquid-interface, a skin microenvironment, promotes growth of melanoma cells, but not their apoptosis and invasion, through activation of mitogen-activated protein kinase. Acta Histochem Cytochem 43:1-7, 2010 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

1. Nomoto N, Yonemitsu N, Aoki S, Uchihashi K, Matsunobu A, Toda S, Fujimoto K. Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Promote the Invasive Growth of Gastric Adenocarcinoma Cells, Which Accelerate the Myofibroblastic Differentiation of the Stromal Cells in Order to Develop a Cancer-Associated Cell Type. DDW. 2010, 5, 10. Gastroenterology Vol. 138, Issue 5, Supplement 1, Pages S734-735
2. Uchihashi K, Aoki S, Matsunobu A, Koike E, Yonemitsu N, Funatsumaru S, Sugihara H, Toda S. A new organotypic culture of adipose tissue fragments maintains viable mature adipocytes for a long term, together with development of immature adipocytes and mesenchymal stem cell-like cells. The 14 th International Congress of Endocrinology. 2010, 3, 21-26. Kyoto, Endocrine Journal 28: 102-102, 2010

[図書] (計 1 件)

1. 内橋和芳、馬渡正明。金芳堂。特発性大腿骨頭壊死症。2010. p268 (ステロイド性骨粗鬆症における脂肪組織の役割. p131-135)

[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

内橋 和芳 (UCHIHASHI KAZUYOSHI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：60452835

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし