

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592708

研究課題名(和文) 下顎骨骨化点の初期石灰化における神経性調節機構の解明

研究課題名(英文) The neurogenic regulation for the initial bone formation in mandibular bone.

研究代表者

小林 繁 (KOAYASHI, SHIGERU)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10118078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：骨の形成に対する神経の関与を確かめるために、iPS細胞から骨芽細胞になる過程における神経ペプチドの受容体の発現変化について調べた。マウスiPS細胞から骨を形成する骨芽細胞までの間をiPS期、胚様体期、骨芽細胞期に分けて遺伝子発現を調べた結果、未分化なiPS期と骨芽細胞期の初期にはCGRPおよびβ2アドレナリン受容体が、骨芽細胞の分化後期にはNK-1受容体が特異的に発現していることが明らかとなった。これらの結果より骨芽細胞の分化段階依存的に神経ペプチドが影響していることが示された。

研究成果の概要(英文)：To confirm the involvement of nerves for bone formation were examined for altered expression of the receptor of neuropeptides in the process to become osteoblasts from iPS cells. During three stage of cell differentiation; iPS, embryonic body, and osteoblast, the cells in iPS stage and early osteoblastic stage, the beta 2 adrenergic receptors and CGRP receptor were specifically expressed, and the NK-1 receptor is expressed specifically in the late differentiation of osteoblasts. These results suggest that neuropeptides affect the differentiation of osteoblast as the differentiation stage-dependent manner.

研究分野：形態系基礎歯科学

科研費の分科・細目：基盤研究(C)

キーワード：iPS細胞 神経 神経ペプチド 細胞分化 間葉系幹細胞 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

下顎骨はヒトの場合胎生6週の頃、下歯槽神経がオトガイ枝と切歯枝に分かれる部位で間葉系細胞の集積と骨化が起こることによって生じることはすでに分かっているが、なぜその神経の分岐部で骨化が生じるかは不明である。組織形成や再生において血管の新生が重要であることは分かっているが、我々は血管に加え神経性の調節、つまり神経ペプチドの作用が重要であることに着目した。

近年、我々をはじめいくつかのグループによって、神経ペプチドが骨芽細胞、破骨細胞の細胞上のレセプターを介して、直接的に骨に作用することが明らかとなった。さらに、我々は研究を進め、三叉神経節由来の神経ペプチドが顎骨の骨代謝に影響していることを見いだした。

但し、我々が明らかにした神経ペプチドと骨代謝との関連は adult rat におけるもので、骨の初期発生にどのような神経ペプチドがどのように関わっているかはほとんど分かっていない。また、神経ペプチドに関してはどの細胞にそれらのレセプターが存在するかも重要である。我々が主として対象にしてきた知覚神経ペプチドである substance P のレセプターである neurokinin-1 receptor (NK1-R) は骨芽細胞の分化の後期に発現するので、骨芽細胞の分化段階では他の神経ペプチドのレセプターが発現しているものと考えられた。骨芽細胞には他に、グルタミン酸、CGRP、PACAP、VIP、NPY、ATP など多数の神経ペプチドのレセプターが発現していることが報告されているが、骨芽細胞の分化過程でどの神経ペプチドがどのように作用するかはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

骨と神経の関わりを調べるにあたって、どのような神経ペプチドが未分化細胞から骨芽細胞に分化する段階で関わっているのかを直接的に調べるのは難しいが、細胞側にどのような神経ペプチドの受容体が発現するかを調べる事によって間接的に神経の骨芽細胞分化に対する関与を推測することができる。

下顎骨に限らず、骨芽細胞の初期分化、つまり間葉系幹細胞から osteoprogenitor cell 骨芽細胞前駆細胞に分化する過程においてどのような神経ペプチドのレセプターが発現しどの神経ペプチドが骨芽細胞分化に関

わっているかほとんどわかっていない。

従って本研究ではマウス iPS 細胞を分化させて骨芽細胞を形成させる系を使って骨芽細胞の分化段階ごとに細胞を採取し、神経ペプチド受容体の発現を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

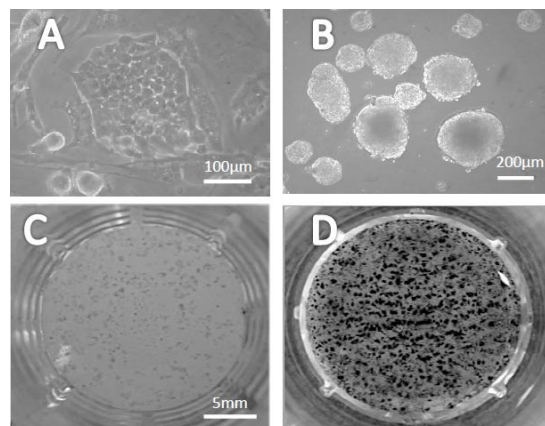
マウス歯根膜線維芽細胞由来のマウス iPS 細胞を SNLP76.7-4 フィーダー細胞上にまきコロニーを形成させたのちにトリプシンでフィーダー細胞を除き、非接着性培養皿上で培養し胚様体を形成させた。1 X 10⁻⁶ M レチノイン酸で処理し間葉系細胞が多くなるようにした。その後、胚様体を接着性培地に移し、アスコルビン酸、デキサメタゾン、グリセロリン酸を含む骨芽細胞分化培地で培養し骨を形成させた。これらの過程を iPS 期、胚様体 (EB) 3 日目、EB 5 日目、骨芽細胞分化 (OB) 1 週目、OB 2 週目、OB 3 週目、OB 4 週目にお細胞を回収し遺伝子発現を RT-PCR 法ならびに teal-time PCR 法にて調べた。

強い遺伝子発現が見られた CGRP 受容体とアドレナリン受容体については抗体を用いて蛍光免疫染色を行ってその骨芽細胞分化過程での発現を確認した。

4. 研究成果

1) マウス iPS 細胞の骨芽細胞分化

フィーダー細胞上でコロニーを形成した iPS 細胞は非接着性培養皿に移すことによって胚様体を形成した(図 1, A, B)。さらに胚様体を接着培地に移して骨芽細胞分化培地で培養すると von Kossa 染色で黒染する骨結節の形成が確認できた(図 1, D)。なお、骨



芽細胞分化培地ではなく通常の培養液で培養した場合は骨結節は形成されなかった(図 1, C)。

図 1. iPS 細胞から骨芽細胞への分化

さらに、iPS 細胞から骨芽細胞までの分化段階を RT-PCR で調べた結果それぞれの分化段階に特異的な遺伝子の発現が確認された (図 2)。

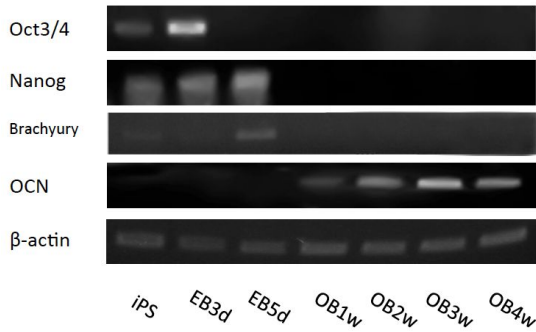


図 2 . 分化マーカーの遺伝子発現の確認

2) RT-PCR による受容体発現の解析

どの神経ペプチド受容体がどの分化段階で発現しているのかを調べるために RT-PCR 法を用いて調べた。その結果、 $\alpha 2$ アドレナリン、および CGRP 受容体は未分化な iPS 期から発現していること、NK-1 受容体は骨芽細胞分化期から、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体は骨芽細胞分化後期に発現することが明らかとなった (図 3)。

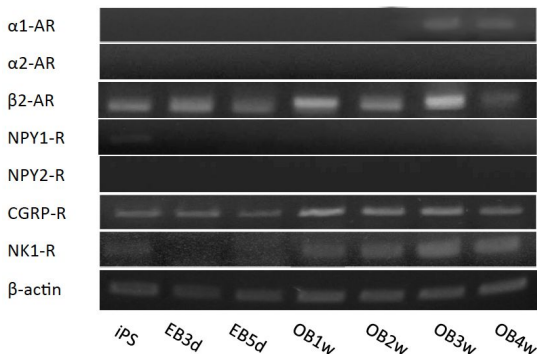
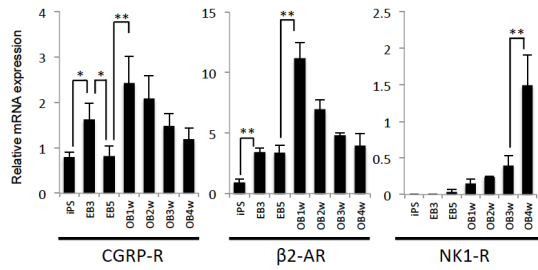


図 3 . 神経ペプチド受容体の発現

3) Real-time PCR による定量的遺伝子発現解析

iPS 細胞から骨芽細胞への分化段階で強い発現が認められた CGRP、 $\alpha 2$ アドレナリン、および NK1 受容体についてその定量的遺伝子発現変化を real-time PCR で調べた。その結果、RT-PCR で見られたように未分化な iPS 期と胚様体期ですでに CGRP および $\alpha 2$ アドレナリン受容体の発現が認められたが、NK1 受容体は骨芽細胞分化期になって経時的に発現の上昇が認められた (図 4)。また CGRP および $\alpha 2$ アドレナリンは骨芽細胞分化初期に強い発現が認められたが、骨芽細胞に分化するにつれて発現が減少した。



4. 神経ペプチド受容体の定量的発現変化

4) 免疫蛍光染色

CGRP 受容体と $\alpha 2$ アドレナリン受容体についてはそれぞれの特異抗体を用いてその局在を調べた。CGRP 受容体と $\alpha 2$ アドレナリン受容体は図 5, 6 に示すように骨形成を行う骨芽細胞のコロニーの部位に強い免疫陽性反応が認められた。また、骨芽細胞ころの一の周辺部の細胞にはいずれも免疫陽性反応は認められなかった。

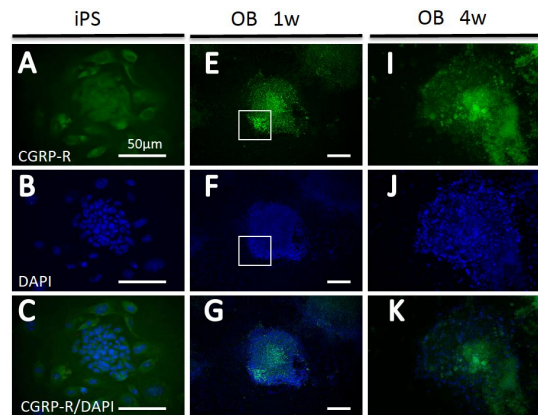


図 5. CGRP 受容体の免疫蛍光像

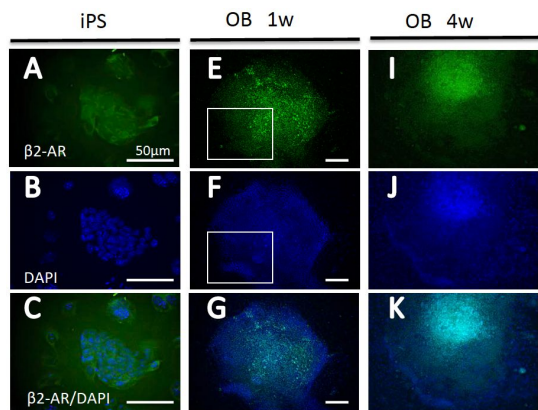


図 6. $\alpha 2$ アドレナリン受容体の免疫蛍光像

以上の結果を模式的に表すと CGRP、 $\beta 2$ -AR、および NK1 受容体の発現は以下のようになった(図7)。

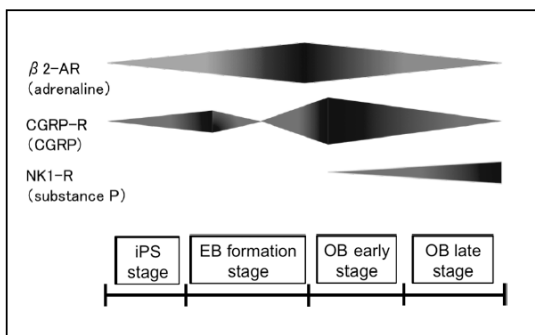


図7. iPS細胞から骨芽細胞へ分化する

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0件)

[学会発表](計5件)

1. 長尾怜美、後藤哲哉、中川綾子、小林 繁、牧 憲司：マウス iPS 細胞の骨芽細胞分化におけるレチノイン酸の影響について。第72回九州歯科学会、北九州市、2012.
2. 小早川美輝、牧角有華、小林 繁、後藤哲哉：Hemokinin 1 は substance P の骨形成促進作用を抑制する。第54回歯科基礎医学会総会、郡山(9月)、2012.
3. 長尾怜美、後藤哲哉、江草 宏、矢谷博文、小林 繁、牧 憲司：マウス iPS 細胞の骨芽細胞分化過程における神経ペプチドレセプターの発現について。第55回歯科基礎医学会総会、岡山(9月)、2013.
4. 長尾怜美、後藤哲哉、小林 繁：マウス iPS 細胞の骨芽細胞分化における交感神経・知覚神経の関与について。日本解剖学会第69回九州支部学術集会、鹿児島(11月)、2013.
5. 後藤哲哉：マウス iPS 細胞から骨芽細胞への分化過程における神経ペプチドレセプターの発現について。第50回日本口腔組織培養学会、東京(10月)、2013

[図書](計 件)

[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
 小林 繁 (KOBAYASHI SHIGERU)
 九州歯科大学・歯学科・教授
 研究者番号：10118078
- (2)研究分担者
 後藤哲哉 (GOTO TETSUYA)
 九州歯科大学・歯学科・准教授
 研究者番号：70253458
- (3)研究分担者
 片岡真司 (KATAOKA SHINNJI)
 九州歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：80364149