

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592263

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞が分泌する新規破骨細胞分化調節分子の同定

研究課題名(英文) Search for novel osteoclast regulatory factors produced by bone marrow mesenchymal stem cells

研究代表者

藤田 洋史(Fujita, Hirofumi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：20423288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチや骨髄炎に伴う骨破壊は、運動機能障害に発展することが少なくなく患者のQOLを著しく損なう。骨髄間葉系幹細胞は強力な炎症抑制作用を持つことがこれまでに明らかとなっている。本課題は、炎症性骨破壊における破骨細胞の分化と活性化を制御する分子を、ヒト骨髄間葉系幹細胞(hMSC)の分泌分子から探索することを目的とした。私たちの結果は、hMSCの培養上清に破骨細胞の分化を抑制するタンパク質があることを示した。また、タンパク質分離精製システムとハイスループットスクリーニングを組み合わせ破骨細胞分化を制御する候補分子を質量分析により複数同定することができた。

研究成果の概要(英文)：We searched for the novel osteoclast regulatory factor produced by human bone marrow mesenchymal stem cell(hMSC) on inflammatory cytokine-induced osteoclast differentiation. Our findings showed that osteoclast differentiation by TNF-alpha was suppressed by conditioned medium of hMSC and we identified some candidate molecules of osteoclast regulatory factor using high-throughput screening and mass spectrometry.

研究分野：骨代謝学、細胞組織学

キーワード：破骨細胞 骨髄間葉系幹細胞 炎症性サイトカイン ハイスループットスクリーニング 質量分析

1. 研究開始当初の背景

炎症性疾患の関節リウマチや骨粗鬆症治療薬ビスフォスフォネートの副作用である顎骨壊死では、炎症性の骨破壊が引き起こされ、患者の QOL は著しく低下する。近年、これらの病態は、破骨細胞による過剰な骨吸収が原因であることが明らかとなってきた。骨疾患の治療において、破骨細胞の分化・活性化を調節することは、最も重要な課題の一つである。そのため破骨細胞分化を調節する機構の解明が求められている。

破骨細胞は、造血幹細胞由来の単球・マクロファージ系細胞が融合、分化して形成される巨大な多核細胞である。破骨細胞は、主にリン酸カルシウム結晶や細胞外マトリクスタンパク質で構成される骨基質を、酸やカテプシン K などのプロテアーゼの分泌を介して分解する。この破骨細胞の分化を誘導するサイトカインとして、Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)や炎症性サイトカインである TNF や IL-1 が同定されている。また、RANKL による分化を抑制する分子として Osteoprotegerin (OPG)が同定されている。

骨髄間葉系幹細胞は、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などへ分化する多分化能を持つ。近年、骨髄間葉系幹細胞は、骨髄造血幹細胞を未分化な状態で維持・増殖させる微小環境(幹細胞ニッチ)の構成メンバーとして働くことが明らかとなった。すなわち造血幹細胞の分化を制御する細胞であることが解明され、注目を集めている。

血中に投与された間葉系幹細胞は、マクロファージに作用して重篤な敗血症モデルマウスの炎症と多臓器不全を、抑制する(Nemeth K et. al, Nat Med, 2009)。このことは、間葉系幹細胞は、マクロファージの活性化を強く抑制する機能を持つことを示す。また、炎症性骨破壊の原因分子である TNF は、骨髄マクロファージ細胞を RANKL 非依存的に破骨細胞へ分化させる(Kobayashi K ら, J Exp Med, 2000)。以上の研究背景より、申請者らは、骨髄間葉系幹細胞は、マクロファージ細胞の不要な活性化を抑制する役割を持ち、これと同様に、炎症性サイトカインによる骨髄マクロファージの破骨細胞分化も、骨髄間葉系幹細胞が強く抑制する、という仮説を立てた。これに関して、破骨細胞形成に対する間葉系幹細胞による抑制は、OPG だけでは説明できない事が報告された(Ohshita K ら, Arthritis Rheum. 2011)。このように、炎症による破骨細胞形成を抑制する分子の同定は、未だ十分でない。

2. 研究の目的

本研究の第一のゴールは、骨髄間葉系幹細胞の培地上清に含まれる分子をクロマトグラフィーにより精製し、破骨細胞分化抑制作用を示す分子を、細胞イメージ解析装置で検索し、LC-MS/MS にて同定することである。

3. 研究の方法

単離したヒト骨髄間葉系幹細胞の培養上清を回収し、各種カラムクロマトグラフィーを組み合わせ、分離する。そして、分離した精製分画を、TNF による破骨細胞分化系に加えて、分化を抑制する分画を検索する。検索は、ArrayScan High Content Screening system と NFATc1 の免疫細胞化学を用いて、ハイスループットスクリーニングを行う。活性分画を電気泳動にて更に分離後、質量分析機で解析する。

4. 研究成果

私たちは、炎症性サイトカイン TNF により破骨細胞形成を効率よく誘導できる実験系を確立した。この破骨細胞は強い骨吸収活性を持つ事を Pit formation assay にて確認した。さらに、ヒト骨髄間葉系幹細胞株 hMCS12 細胞が、破骨細胞形成を抑制する結果を確かめた。この抑制効果は骨髄マクロファージと hMSC12 の細胞比が 100:1 以下でも認められた。さらに hMSC12 の培養上清を硫酸分画にて分離し、Q カラムにて分離を行った。この分離分画をハイスループットスクリーニングシステム ArrayScan にて、分析して、複数の活性化区分を得た。さらに SDS-PAGE と質量分析にて破骨細胞分化抑制候補分子を同定した。

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. Ogino T, Kobuchi H, Fujita H, Matsukawa A, Utsumi K. Erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 erythroleukemic cells by monochloramine. Free Radic Res. 2014;48(3):292-302. doi: 10.3109/10715762.2013.865840. 査読有

2. Yamashita T, Ono K, Ohuchi H, Yumoto A, Gotoh H, Tomonari S, Sakai K, Fujita H, Imamoto Y, Noji S, Nakamura K, Shichida Y. Evolution of mammalian Opn5 as a specialized UV-absorbing pigment by a single amino acid mutation. J Biol Chem. 2014;289(7):3991-4000. 査読有

3. Fujita H, Yamamoto M, Ogino T, Kobuchi H, Ohmoto N, Aoyama E, Oka T, Nakanishi T, Inoue K, Sasaki J. Necrotic and apoptotic cells serve as nuclei for calcification on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. Cell Biochem Funct. 2014;32(1):77-86. doi: 10.1002/cbf.29 査読有

3. Inoue K, Fukuhara H, Kurabayashi A, Furihata M, Tsuda M, Nagakawa K, Fujita H, Utsumi K and Shuin T. Photodynamic Therapy involves Anti-Angiogenic Mechanism and is Enhanced by

Ferrochelatase Inhibitor in Urothelial Carcinoma. *Cancer Sci.* 2013; 104(6):765-772. 査読有

4. Yamamoto M, Fujita H, Katase N, Inoue K, Nagatsuka H, Utsumi K, Sasaki J, Ohuchi H. Improvement of the efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic treatment in human oral squamous cell carcinoma HSC-4. *Acta Med Okayama.* 2013;67(3):153-64. 査読有

5. Fukuhara H, Inoue K, Kurabayashi A, Furihata M, Fujita H, Utsumi K, Sasaki J, Shuin T. The inhibition of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action for prostate cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013;10(4):399-409. doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.03.003. 査読有

6. Kobuchi H, Moriya K, Ogino T, Fujita H, Inoue K, Shuin T, Yasuda T, Utsumi K, Utsumi T. Mitochondrial Localization of ABC Transporter ABCG2 and Its Function in 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Protoporphyrin IX Accumulation. *PLoS One.* 2012;7(11):e50082. doi: 10.1371/journal.pone.0050082. 査読有

7. Wang DH, Ootsuki Y, Fujita H, Miyazaki M, Yie Q, Tsutsui K, Sano K, Masuoka N, Ogino K. Resveratrol inhibited hydroquinone-induced cytotoxicity in mouse primary hepatocytes. *Int J Environ Res Public Health.* 2012;9(9):3354-64. doi:10.3390/ijerph9093354 査読有

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 藤田 洋史、越智正彦、青山絵理子、荻野哲也、近藤洋一、大内淑代. Effect of glutathione on TNF α -induced osteoclast differentiation in murine bone marrow-derived macrophages. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会(2015.3.21-23. 神戸)

2. 藤田 洋史、荻野哲也、青山絵理子、大内淑代. TNF α による破骨細胞分化に対する抗酸化物質グルタチオンの影響 (ポスター&トーク) 第 87 回日本生化学会大会(2014.10.15-18. 京都)

3. 藤田 洋史、荻野哲也、青山絵理子、大内淑代. In vitro においてグルタチオンは TNF α による破骨細胞分化を促進する. 第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会(2014.9.4-5. 京都)

4. 藤田 洋史、荻野哲也、青山絵理子、大内淑代. In vitro における TNF α による破骨細胞形成促進とグルタチオンの効果. 第 32 回日本骨代謝学会学術集会(2014.7.24-26. 大阪)

5. 藤田 洋史、荻野哲也、佐々木順造、大内

淑代 TNF α による破骨細胞形成と活性酸素生成に対する骨髄間葉系幹細胞の作用 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会(2014.3.27-29. 栃木)

6. Tetsuya Ogino, Hirotsugu Kobuchi, Hirofumi Fujita Oxidative stress and cell differentiation: monochloramine affects differentiation of K562 erythroleukemia cell line. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (2014.3.22-26, Kyoto)

7. Hirofumi Fujita, Tetsuya Ogino, Kobuchi Hirotsugu, Hideyo Ohuchi. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on TNF-alpha-induced osteoclast formation and ROS generation in bone marrow macrophages. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (2014.3.22-26, Kyoto)

8. Takashi Oka, Hirofumi Fujita, Lamia Abd Al-Kader, Ichiro Murakami, Atae Utsunomiya and Tadashi Yoshino Sensitive detection and apoptotic cell death induction of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) cells with photodynamic actions. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses HTLV 2013. (2013.6.26-30, Montreal, Quebec, Canada)

9. 藤田洋史、大本苗起子、荻野哲也、佐々木順造、内海耕慥、大内淑代 骨芽細胞分化培養に伴う石灰化と活性酸素の関与 第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会(2012.6.7-8, 徳島)

10. 藤田洋史、大内淑代、佐々木順造 骨芽細胞分化培養に伴う石灰化におけるネクロース細胞と活性酸素の関与 第 30 回日本骨代謝学会(2012.7.19-21, 東京)

11. Takashi Oka, Hirofumi Fujita, Lamia Abd Al-Kader, Hiaki Sato, Ichiro Murakami, Atae Utsunomiya and Tadashi Yoshino Apoptotic cell death induced by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic actions in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) cells The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association(2012.9.19-21, Sapporo)

12. 藤田洋史、大本苗起子、荻野哲也、久木田敏夫、佐々木順造、大内淑代. TNF α による破骨細胞形成に対する脂溶性抗酸化物質の効果 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会(2013.3.28-30, 香川)

13. 藤田洋史、大本苗起子、永川恵介、小淵浩嗣、荻野哲也、大内淑代、佐々木順造、内海耕慥. 骨髄間葉系幹細胞の osteogenic culture による細胞死仲介性石灰化と活性酸素の関与. 第 85 回日本生化学会大会(2012.12.14-16, 福岡)

他

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称 : METHOD USING
ABNORMALLY-ACTIVATED-CELL DETECTION TO
TEST FOR MALIGNANT TUMORS AND
ABNORMALLY-ACTIVATED-CELL
APHERESIS-THERAPY APPARATUS. 発明者 : OKA,
Takashi, FUJITA, Hirofumi, YOSHINO,
Tadashi. 権利者 : NATIONAL UNIVERSITY
CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY. 種類 : 特
許. 番号 : 2014JP066480. 出願年月日 : 2014年
6月20日. 国内外の別 : 外国

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

大本 苗起子 (OHMOTO NAOKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・非
常勤研究員

研究者番号 : 70598565

(H24)

小淵 浩嗣 (KOBUCHI HIROTSUGU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講
師

研究者番号 : 10304297

(H25-26)

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :