

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870546

研究課題名(和文)末梢血由来の骨芽細胞系細胞の機能解析

研究課題名(英文)Functional Analysis of Osteoblast-Like Cells Originate from Peripheral Blood.

## 研究代表者

横田 和浩 (Yokota, Kazuhiro)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：20406440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチは全身性の慢性炎症性疾患であり、心血管疾患(CVD)を合併することが多いことが知られている。主要なCVDの危険因子は血管壁石灰化であり、以前より末梢血中の骨芽細胞系細胞の関与が推定されている。ヒト末梢血単核球を象牙質上で培養し、炎症性サイトカイン(TNF またはIL-6)で刺激すると石灰化物質の形成を認めた。この石灰化物質は主にカルシウム、リンが含まれていた。TNF またはIL-6で刺激された末梢血単核球は、骨形成マーカーを強く発現し、骨芽細胞様細胞の分化が誘導された。このことは炎症性サイトカインが骨芽細胞様細胞への分化を誘導することで血管石灰化に関与している可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis is a chronic systemic inflammatory disease with an increased risk of the developing cardiovascular diseases. A major risk factor for the cardiovascular diseases is vascular wall calcification, underlying molecular mechanisms of which remain as yet unclear. Recent studies have suggested that circulating osteoblast-lineage cells are associated with a marked induction of vascular wall calcification. Stimulation of peripheral blood mononuclear cells with TNF or IL-6 formed mineralized nodules on dentin slices. These structures were calcified matrices composed of calcium and phosphate. Expression levels of osteoblastic markers in PBMCs by stimulation with TNF or IL-6 was significantly up-regulated. Our results demonstrated that TNF can induce the differentiation of human osteoblast-like cells from peripheral-blood mononuclear cells on dentin slices.

研究分野：リウマチ学

キーワード：骨芽細胞系細胞 末梢血単核球 炎症性サイトカイン 腫瘍壊死因子 関節リウマチ 心血管疾患 動脈硬化 石灰化

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨代謝において、骨芽細胞と破骨細胞は中心的な役割を演じている。破骨細胞は末梢血中の単核球から分化されるが、骨芽細胞は骨髄内に存在し、末梢血中に存在するという概念はほとんど知られていない。

(2) 申請者らは、マウス大腿骨から採取した骨髄単球に、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) および、炎症性サイトカイン (TNF + IL-6) 刺激を添加することで骨吸収能を有する破骨細胞様細胞が誘導されることを報告した (Yokota K, et al. *Arthritis & Rheumatology*, 66(1): 121-129, 2014)。そして、ヒト末梢血単核球において、破骨細胞様細胞の分化誘導を試みるために、末梢血単核球を象牙質上で培養し、M-CSF および TNF, IL-6, RANKL (破骨細胞分化因子) をそれぞれ単独刺激したところ、予想外にも TNF および IL-6 の単独刺激によって象牙質にカルシウム、リンを含む石灰化組織が電子顕微鏡で観察された。

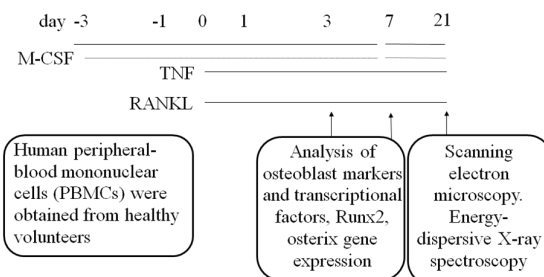
### 2. 研究の目的

(1) ヒト末梢血単核球を用いて、TNF または IL-6 刺激による骨芽細胞様細胞への分化誘導機構およびその機能を明らかにする。

(2) 末梢血中において、骨芽細胞に類似した骨芽細胞系細胞を同定し、その役割を明らかにする。末梢血中の骨芽細胞系細胞の存在が明らかになることで、動脈硬化の特徴の一つである血管壁の石灰化についての新たな制御へ発展していくことが期待される。

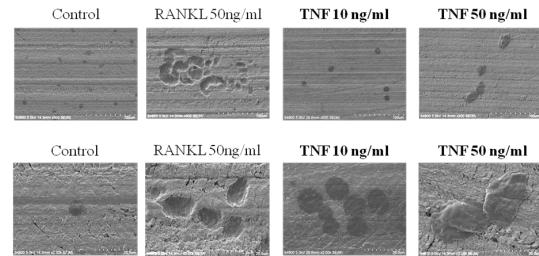
### 3. 研究の方法

(1) 末梢血は健康人より採取し、比重遠心法にて分離した単核球を象牙質上に TNF, IL-6 または RANKL で刺激・培養した。形成された石灰化構造物を電子顕微鏡で観察し、構成元素と濃度をエネルギー分散型 X 線分析 (EDX) で調べた。培養単核球細胞における ALP の活性を測定し、osteoprotegerin (OPG)、RANKL、ALP、osteocalcin、Runx2、osterix mRNA の発現量を real-time PCR 法で解析した。

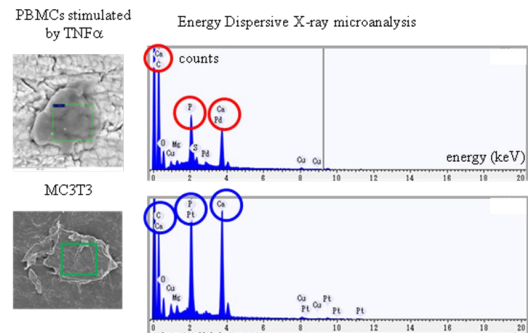


### 4. 研究成果

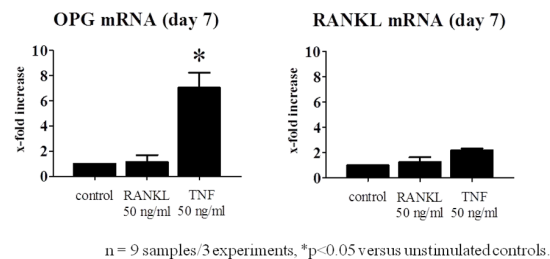
(1) 末梢血単核球を象牙質上で培養し、RANKL で刺激すると骨吸収窩を認めた (下の写真の左から二つ目)。一方、TNF で刺激すると濃度依存性に石灰化物質の形成を認めた (下の写真: 左から 3 つ目と 4 つ目)。



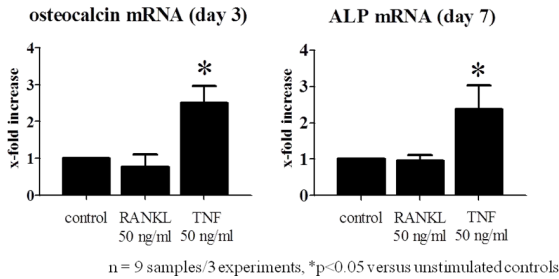
(2) 末梢血単核球を象牙質上で TNF 刺激することにより形成された石灰化物質は、EDX による解析では主にカルシウム、リンが含まれていた (下の写真: 上段)。下の写真: 下段にある MC3T3 はマウス骨芽細胞前駆細胞のセルラインの陽性コントロールである。



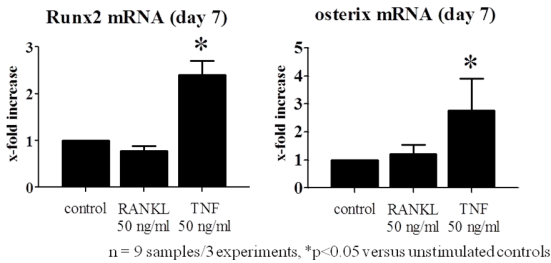
(3) 末梢血単核球を TNF 刺激することにより、破骨細胞分化抑制因子 OPG mRNA の発現量が無刺激・RANKL 刺激と比較して有意に増加していた。一方、いずれの刺激においても RANKL mRNA の発現量の増加は認められなかった。



(4) 末梢血単核球を TNF 刺激することにより、骨芽細胞の発現分子 osteocalcin, ALP mRNA の発現量が無刺激・RANKL 刺激と比較して有意に増加していた。一方、RANKL 刺激では osteocalcin, ALP mRNA の発現増加は認められなかった。



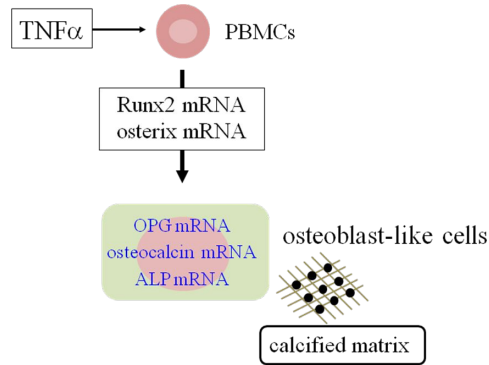
(5) 末梢血単核球を TNF 刺激することにより、骨芽細胞分化に必須の転写因子 Runx2, osterix mRNA の発現量が無刺激・RANKL 刺激と比較して有意に増加していた。RANKL 刺激では Runx2, osterix mRNA の発現増加は認められなかった。



(6) 骨芽細胞と骨芽細胞系細胞の違いについて下記の表に示す。骨芽細胞は骨形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Protein, BMP) が分化誘導因子であり、ALP mRNA を発現し、骨形成能を有することが知られている。一方、今回、我々は末梢血単核球を象牙質上で培養し、TNF 刺激することにより ALP mRNA を発現し、骨形成能を有する骨芽細胞系細胞 (osteoblast-like cells) が分化誘導できることを見出した。

	Differentiating factor	Expression of ALP and osteocalcin mRNA	Bone formation activity
osteoblast	BMP	+++	+++
osteoblast-like cells	TNF $\alpha$	+	+

(7) ヒト骨芽細胞系細胞の分化誘導機構および機能についてのシエマを示す。末梢血単核球を TNF 刺激することにより、末梢血単核球中の骨芽細胞前駆細胞での Runx2, osterix mRNA の発現が誘導される。その後、骨芽細胞様細胞に分化誘導し、OPG, ALP mRNA の発現を誘導する。そして、この骨芽細胞様細胞は石灰化物質を形成し、骨形成能を有する。このことは、末梢血中に存在する骨芽細胞様細胞が石灰化物質を形成し、血管石灰化に関与している可能性を示唆している。



(8) IL-6 刺激によるヒト末梢血単核球の骨芽細胞様細胞への分化誘導と機能解析

末梢血単核球を象牙質上で培養し、IL-6 で刺激すると石灰化構造物の形成を認め、構成元素の解析では、主にカルシウム、リンが含まれていた。IL-6 で刺激された末梢血単核球は、ALP の活性および Runx2, Osterix, WNT10B mRNA の発現量が無刺激・RANKL 刺激と比較して有意に増加していた。

以上より、末梢血単核球を象牙質上で IL-6 刺激すると、石灰化構造物を形成する骨芽細胞様細胞が分化誘導された。このことは IL-6 が血管石灰化に関与している可能性を示唆している。

## 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 3 件)

(1) Kazuhiro Yokota, Yuji Akiyama, Kojiro Sato, Yoshimi Aizaki, Yasuto Araki, Hiroshi Kajiyama, Yu Funakubo Asanuma, Toshihide Mimura; TNF $\alpha$  Induces the Calcified Nodule Formations and Increased Osteoblastic Marker Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells on Dentin Slices.

第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会,

2016年4月23日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

(2) 横田 和浩, 相崎 良美, 三村 俊英;  
TNF $\alpha$ はヒト末梢血単核球から骨芽細胞様細胞を誘導する

第2回日本骨免疫学会, 2016年7月6日, ホテルモントレー沖縄スパ&リゾート（沖縄県恩納村）

(3) 横田 和浩, 相崎 良美, 秋山 雄次,  
IL-6 刺激によるヒト末梢血単核球の骨芽細胞様細胞への分化誘導と機能解析

第44回日本臨床免疫学会総会, 2016年9月9日, 京王プラザホテル（東京都新宿区）

〔図書〕(計 0 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

横田 和浩 (YOKOTA, Kazuhiro)

埼玉医科大学・リウマチ膠原病科・講師

研究者番号: 20406440

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: