

平成23年 5月18日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890149

研究課題名（和文）BMPアンタゴニストの制御による歯槽骨増成促進方法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel method of promoting alveolar bone formation by controlling the expression of BMP antagonist.

研究代表者

藤澤 拓生 (FUJISAWA TAKUO)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：20325096

研究成果の概要（和文）：

本研究はBMPによる骨形成過程で発現するBMPアンタゴニストを同定し、その機能を抑制することにより骨形成を促進させる方法を開発するものである。本研究においてBMPのアンタゴニストの一つであるSOSTの遺伝子発現を抑制することによりヒト骨髄由来間質細胞の骨芽細胞への分化が有意に促進されることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to identify the BMP antagonists which expressed during osteogenic differentiation induced by BMP-2 and develop a novel method for promoting alveolar bone formation by controlling the expression of those antagonists. In this study, I demonstrate knockdown of SOST by RNA interference in vitro resulted in a significant increase in the expression of the osteogenic marker alkaline phosphatase and the deposition of extracellular mineral, in response to osteogenic stimulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：骨髄由来間質細胞, BMP, BMPアンタゴニスト, siRNA

1. 研究開始当初の背景

骨形成タンパク質 (BMP) は骨形成を強力に誘導するタンパク質であり、骨増生のゴールドスタンダードとされてきた自家骨移植や自

家骨膜移植などにとって代わる有望な骨組織再生治療法として期待されてきているが、ヒトにおいてBMPによる骨形成を誘導するためには大量のタンパクが必要であり、非常に高

コストとなるためrhBMPを単独で臨床応用する際の大きなハードルになっており未だ広く一般的に臨床応用されているとは言い難い。

申請者らの予備実験の結果から、ヒト骨髄由来間葉系間質細胞 (BMSC) においては未分化な状態ではBMPに対する何らかの抑制因子が強く働いており、骨芽細胞への分化を抑制している可能性が示唆されている。一方、近年、BMPアンタゴニストであるNogginやChordinの遺伝子発現を抑制することによってBMPを投与することなく間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化や骨芽細胞の石灰化が促進されることが示されている。これらの知見はBMPアンタゴニストの発現を抑制することによって骨形成過程におけるBMPの作用を増強できる可能性を示している。すなわち、これらBMPアンタゴニストの作用を制御することによって相対的にBMPの活性を上昇させることはBMPを臨床応用するうえで非常に有効な手法であると考えられる。しかしながら、これらのアンタゴニストのヒトBMSCにおける発現の有無あるいはその作用についてはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究はヒトBMSCが骨芽細胞へ分化する過程において発現しているBMPアンタゴニストを同定し、このタンパクの活性を抑制することによって骨髄間葉系細胞の骨芽細胞への分化が促進され、結果として骨形成能生が促進されるという仮説のもとにその有用性を検討するものである。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨髄由来間質細胞 (hBMSC) の細胞分化に対するBMP-2の影響ならびに炎症性サイトカインであるTNF- α で同時刺激した際の影響をSmadシグナルのリン酸化、アルカリホスファターゼ (ALPase) 活性および骨芽細胞分

化マーカーの遺伝子発現を指標に検討した。

(2) BMPアンタゴニストの同定

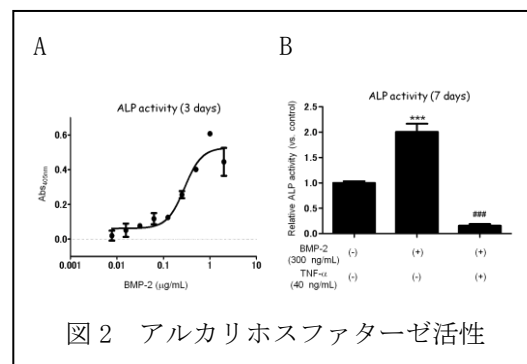
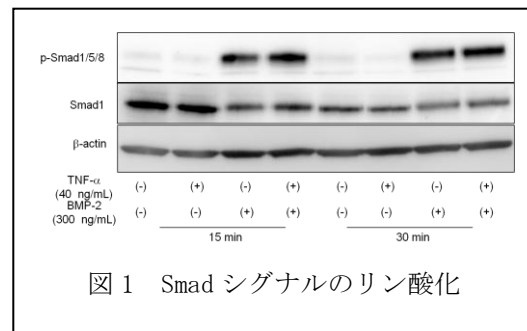
hBMSCをBMP-2で刺激した際のBMPアンタゴニストの遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRで検討した。

(3) BMPアンタゴニストの阻害実験

BMPアンタゴニストの一つであるSOSTの遺伝子発現をsiRNAで特異的に阻害し、骨芽細胞分化に対する影響をALPase活性とアリザリンレッド染色を指標に検討した。

4. 研究成果

(1) hBMSCをBMP-2で刺激すると、Smadタンパクのリン酸化が亢進した (図1)。また、ALPase活性も濃度依存的に上昇した (図2A)。一方、TNF- α で同時刺激するとSmadのリン酸化は影響を受けなかったがALPase活性は有意に抑制された (図2B)。BMP-2刺激により促進されたhBMSCの石灰化能もTNF- α 刺激により抑制された (図3)。



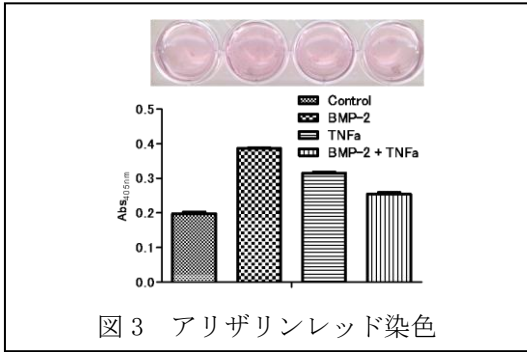


図3 アリザリンレッド染色

さらにはBMP-2添加により誘導された骨芽細胞分化もTNF- α により有意に抑制された(図4).

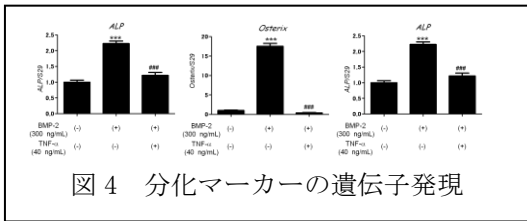


図4 分化マーカーの遺伝子発現

(2)BMP-2刺激によりChoedin like-2, SOST, NogginなどのBMPアンタゴニストの遺伝子発現が亢進した. さらにBMPシグナルの抑制因子であるSmad6, Smad7の遺伝子発現も亢進した(図5). 一方, 炎症性サイトカインであるTNF- α との同時刺激によってNogginやSmadの遺伝子発現は著しく抑制された.

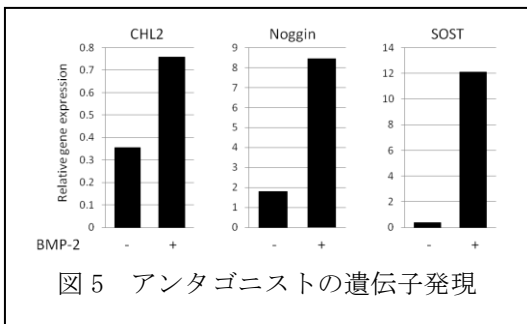


図5 アンタゴニストの遺伝子発現

(3)SOSTの発現をsiRNAで抑制した状態でhBMSCの骨芽細胞分化誘導を行うとアルカリホスファターゼ活性の上昇(図6)やアリザリンレッドによる染色性の亢進(図7)が認められた. すなわちhBMSCにおいてSOSTの発現を抑制することによりBMP-2による骨芽細胞分化が促進されることが明らかとなった.

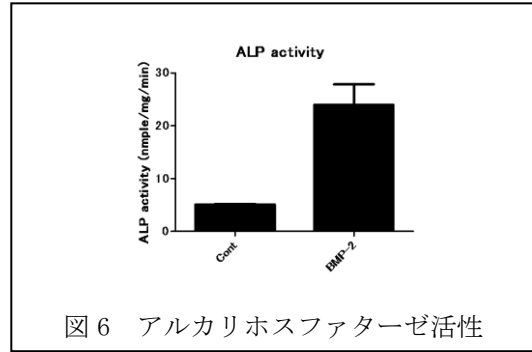


図6 アルカリホスファターゼ活性

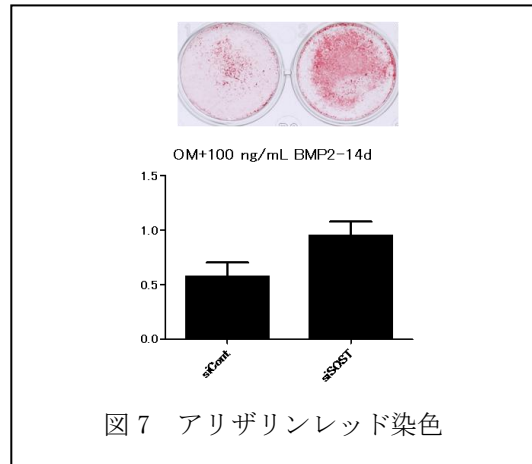


図7 アリザリンレッド染色

以上よりBMP-2はhBMSCにも直接作用し, 骨芽細胞分化シグナルを亢進させることが明らかとなった. 一方で, 骨芽細胞分化を抑制するシグナルの増強も認められたことから, hBMSCにおいてはBMP-2刺激による骨芽細胞分化は負のフィードバック機構により抑制されている可能性が示唆された. そして, SOSTなどのBMPアンタゴニストの発現を抑制することにより骨芽細胞誘導が促進できることが明らかとなった. さらに, 炎症性サイトカインであるTNF- α はBMPアンタゴニストの遺伝子発現を抑制するもののBMP-2による骨芽細胞分化も有意に抑制することが明らかとなった.

今後はBMP-2による生体内での骨形成を促すためには, 骨形成を必要とする局所での炎症状態をコントロールする因子の一つであるTNF- α のシグナルを制御することも有効な手段の一つであることが示唆された.

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)

[学会発表] (計1件)

①Fujisawa T, Suppression of BMP-2-induced osteogenic differentiation of hBMSCs by TNF-alpha., 88th General Session & Exhibition of the IADR, 2010.7.15, Balcerona

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤澤 拓生 (FUJISAWA TAKUO)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：20325096