

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20431

研究課題名(和文) 骨髄細胞の機能を介した局所の破骨細胞分化制御機構の探索

研究課題名(英文) An investigation of local osteoclastogenesis through function of bone marrow cells

研究代表者

長澤 麻沙子 (Nagasawa, Masako)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40612239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：血中にある骨髄由来細胞が局所の破骨細胞の分化や誘導の制御に間接的に関わっているという仮説に基づき、各種条件で培養したBMSCsの培養上清が破骨細胞に与える影響、BMSCsが産生する既知の破骨細胞分化関連因子の発現、およびその因子を最も発現する細胞種の同定を試みた。その結果、異なる性状を持つ各種表面でBMSCsを一定期間培養し、この培養上清をBMM培養液に加えたところ、それぞれ異なる破骨細胞の分化が見られた。また、各種表面上で培養したBMSCsの遺伝子発現をqPCR法によって解析したところ、破骨細胞の分化に影響を与える因子をBMSCs中の何らかの細胞が産生することが示された。

研究成果の概要(英文)：Based on the hypothesis that bone marrow derived cells in blood are indirectly involved in the control of local osteoclast differentiation and induction, we investigated the influence of supernatant of cultured BMSCs under various conditions on osteoclastogenesis, the expression of known osteoclast differentiation related factors expressed by BMSCs and we tried to identify the cell type that most expresses those factors. As a result, BMSCs cultured for a certain period on various surfaces had different properties on BMM differentiation to osteoclast. In addition, analysis of gene expression of BMSCs cultured on various surfaces by qPCR method confirmed that some cells in BMSCs produce factors that affect osteoclast differentiation.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：破骨細胞 骨髄細胞

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞の前駆細胞は単球・マクロファージに由来し、骨の微小環境において外部から種々の刺激を受けることにより破骨細胞に分化する。破骨細胞分化を誘導するシグナルは様々であり、M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) や OPG(osteoprotegerin)/RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)/RANK(receptor activator of NF- κ B) システムに関する報告は数多くなされている。またこれらの因子が骨芽細胞からも産生されることも知られている。一方、骨芽細胞の局所での分化制御にも同様に多くの因子が関係していることが分かっている。骨芽細胞と破骨細胞は両者とも骨代謝制御に密接に関わっており、両者の動態を理解することが重要である。しかし、骨代謝制御に重要な役割を果たす局所での骨芽細胞・破骨細胞の分化、および破骨細胞の遠隔部位からの誘導(ホーミング)メカニズムの詳細は十分に分かっていない。近年骨代謝制御メカニズムの一端として、免疫系細胞の関与が注目されており、血中の幹細胞の存在も確認されている。さらに、破骨細胞分化の刺激因子は骨芽細胞のみならず、間葉系幹細胞、間質細胞、繊維芽細胞(細網細胞)、上皮細胞、脂肪細胞、マクロファージ、平滑筋細胞さらにはT細胞、B細胞、単球から分泌されることが分かっている。これらすべての細胞は骨髄、血中に含まれており、その中でも骨髄間質細胞は主に、繊維芽細胞(細網細胞)、間葉系細胞、マクロファージ、内皮細胞、骨芽細胞、脂肪細胞などから成り立っている。以上の背景から、局所の破骨細胞分化制御には、血中や骨髄に存在する細胞が関与している可能性が高いと考えるに至った。実際に間葉系幹細胞に関する骨代謝の研究は数多くなされており、例えば、Human Mesenchymal Stem Cells はOPGを恒常的に産出することにより、破骨細胞形成を阻害しているという報告があ

る。

興味深いことに、ヒト骨芽細胞様細胞株 MG63 はRANKL のデコイレセプターであるOPGを産生するが、プラスチックディッシュで培養する場合に比較して、チタンプレート上で培養する場合にはOPGの産生量が多くなる。つまり、破骨細胞の分化に影響するケモカインを産生する細胞が置かれている環境の変化や刺激により、間接的に破骨細胞の分化が制御され得ることを示している。生体内における破骨細胞の機能は、破骨細胞以外が産生する因子によって制御されており、それらの細胞に対する刺激が間接的に局所での破骨細胞の分化・誘導制御を行っている可能性が高いということである。創傷治癒に大きな役割を果たす間葉系幹細胞の数は、骨髄に存在する接着性細胞の中でも約10万個に1個と言われている。例えばインプラント埋入時にも、その周囲の血中に骨髄由来の細胞が存在している可能性は高く、それらの細胞を介した破骨細胞分化誘導メカニズムが存在する可能性は高い。インプラント表面周囲の骨形成に関する研究は多いが、埋入後の初期の反応として血中にある骨髄由来細胞の関与については研究されていない。

2. 研究の目的

本研究は、血中にある骨髄由来細胞が局所の破骨細胞の分化や誘導の制御に間接的に関わっているという仮説に基づき、以下の内容を明らかにすることを目的とする。

(1) Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs) の培養上清が破骨細胞の増殖・分化に与える影響

各種培養条件でBMSCsを培養し、その培養上清が破骨細胞に与える影響を検索する。

(2) 破骨細胞分化に影響を及ぼすBMSC産生因子の同定

各種培養条件で、BMSCsが産生する既知の破骨細胞分化関連因子(M-CSF, RANKL, OPG, TNF-)の発現を検索し、破骨細胞の分化に最も

影響を及ぼす因子を同定する。

(3) 上記(2)の因子を最も発現する細胞種の同定

BMSCs に含まれる細胞のうち、どの細胞が破骨細胞分化に大きく影響を及ぼしているかを検索・同定する。BMSCs は線維芽細胞(細網細胞)、マクロファージ、間葉系幹細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、内皮細胞などから構成されていると言われている。

3. 研究の方法

【Bone Marrow Stromal Cells(BMSCs)を介した破骨細胞の分化制御の検索】

(1) BMSCs の培養と培養上清の回収

6 週齢ウィスター系ラットの大腿骨、腓骨より骨髓細胞を採取し、24 時間培養する。

非接着細胞を取り除き、PBS で数回洗浄したのち、再度培養液を加え、接着細胞を一定期間培養する。これをBMSCs(骨髓間質細胞)とする。

継代 1 ~ 2 目のBMSCs を再度、プラスチックディッシュに播種し、一定期間培養し、その培養上清を回収する。培養上清回収の24 時間前に培養液を交換する。培養上清は使用までの間 -20 で保存しておく。

(2) Bone Marrow-derived Macrophage (BMM) の培養

6 週齢ウィスター系ラットの大腿骨、腓骨より骨髓細胞を採取し、24 時間培養する。

非接着細胞を回収し、これをBMM(骨髓由来マクロファージ)とする。

3 にて回収した培養上清と通常培地を一定の割合で混合し、soluble-RANKL, M-CSF を加えてBMM を一定期間培養する。

増殖・分化した破骨細胞の評価を行う。具体的にはTRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase)染色により3 核以上の巨細胞数を計測する。また、ピットアッセイにより破骨細胞の機能を評価する。

【BMSCs における破骨細胞分化制御因子遺伝子発現の検索】

(1) qPCR 法による遺伝子発現の検索

骨芽細胞や間質細胞が産生するM-CSF と RANKL, RANK のデコイレセプターであるOPG が破骨細胞の分化, 生存, 機能発現に必要な因子であることに加え、炎症性骨破壊において特に重要な役割を持つTNF- α はRANKL の発現上昇とOPG 産生の低下, そして直接的に破骨細胞分化を促すことにより骨破壊を亢進させると考えられている。そこでBMSCs におけるこれら蛋白の遺伝子発現をreal-time PCR 法によって検索する。まずはM-CSF, RANKL, OPG, TNF- α の4 因子に着目し、BMSCs が産生し、間接的に破骨細胞の分化に影響を与える因子を同定するための解析を行う。

(2) 蛋白レベルでの発現確認

以上の結果、破骨細胞分化に対する影響が見出された遺伝子については、BMSCs をプラスチックプレート上で培養した際の培養上清中の該当蛋白をELISA 法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)やウエスタンブロット法によって検索する。

【BMSCs における破骨細胞分化制御機能発現細胞の選別】

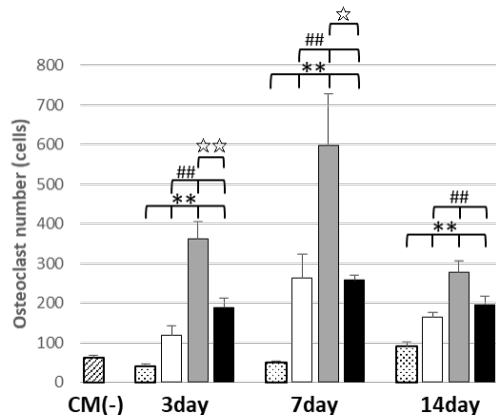
骨髓細胞より分離培養したBMSCs に含まれる細胞のうち、どの細胞が破骨細胞分化に大きく影響を及ぼしているかを検索する。BMSCs は線維芽細胞(細網細胞)、マクロファージ、間葉系幹細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、内皮細胞などから構成されていると言われている。ところが、骨芽細胞や間葉系幹細胞に関する研究報告は多いものの、それ以外の細胞に関する報告は少ない。あらゆる細胞を対象から排除せず、上記で同定された破骨細胞の分化に影響を与える蛋白を最も発現する個々の細胞を同定する。

4. 研究成果

【Bone Marrow Stromal Cells(BMSCs)を介した破骨細胞の分化制御の検索】

異なる性状を持つ各種表面でBMSCs を一定期間培養し、この培養上清をBMM 培養液に加

えたところ、それぞれ異なる破骨細胞の分化が見られた(図1)。

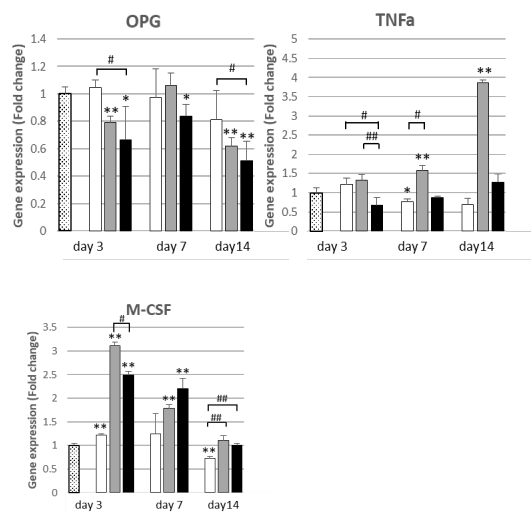


(図1)

このことは、骨髄の細胞が例えばインプラントの表面に接することによって産生する因子が、周囲の破骨細胞の分化に影響を与え、その後の骨形成に影響する可能性があることを示している。つまり、生体材料の埋植によって起こる骨形成は、骨髄由来細胞によって影響を受けている可能性が有るといえることである。

【BMSCs における破骨細胞分化制御因子遺伝子発現の検索】

各種表面上で培養した BMSCs が産生する M-CSF, RANKL, OPG, TNF- の4因子の遺伝子発現を qPCR 法によって解析したところ、図2に示す結果が得られた。このことは、破骨細胞の分化に影響を与える因子を BMSCs 中の何らかの細胞が産生し、かつ接触する表面によってその発現が変化することを示している。



(図2)

【BMSCs における破骨細胞分化制御機能発現細胞の選別】

本研究期間中に BMSCs に含まれる細胞のうち、破骨細胞分化制御機能に関わる因子を最も発現している細胞を特定することはでき

なかった。今後の継続的な研究によって、これを解明することに努めたい。

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 1件)

Nagasawa M, Cooper LF, Ogino Y, Mendonca D, Liang R, Yang S, Mendonca G, Uoshima K: Topography Influences Adherent Cell Regulation of Osteoclastogenesis. J Dent Res 95(3):319-26, 2016

〔学会発表〕(計 4件)

Nagasawa M, Cooper LF, Uoshima K: Topography Influences Adherent Cell Regulation of Osteoclastogenesis. The University Indonesia – Niigata University collaborative symposium, Lombok, January 9, 2016

Nagasawa M, Uoshima K, Mizushima K, Suliman M, Akiba N, Cooper LF: Bone marrow cells are mediating osteoclast differentiation around dental implant in vivo. The 31st Annual Meeting of the Academy of Osseointegration, San Diego, California February 18, 2016.

Nagasawa M, Uoshima K, Suliman M, Mizushima K, Cooper LF: Bone marrow cells are mediating osteoclast differentiation around dental implant in vivo. The International Collaborative Symposium 2017 (Niigata University, Japan – Prince of Songkla University, Thailand, February 11, 2017.

長澤麻沙子:インプラント表面性状と周囲に存在する細胞との埋入初期における相互作用. 第8回日本口腔インプラント学会関東甲信越支部学術シンポジウム, 東京, 2017年8月6日

〔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

長澤 麻沙子 (NAGASAWA Masako)
新潟大学大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：40612239