

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17578

研究課題名（和文）線維芽細胞を起点とした骨代謝制御機構の解明と骨吸収性疾患治療への応用

研究課題名（英文）Study of bone metabolic control mechanism due to fibroblasts and application to treatment of bone resorption disease.

研究代表者

伊藤 良平 (Ito, Ryohei)

弘前大学・医学研究科・講師

研究者番号：20638902

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究で、メカニカルストレス影響下において、骨芽細胞と共培養された線維芽細胞は6つのIGFBPサブタイプの発現を経時的に変化させることで、骨芽細胞の骨代謝を制御している可能性を示した。これは骨微小環境に存在する線維芽細胞がIGFBPsを介して骨代謝制御に関与している可能性を示唆する。これは線維芽細胞を主体とした骨微小環境による未知の骨代謝制御機構の存在を示唆する結果であり、新しい骨吸収性疾患治療への応用に繋がる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、線維芽細胞が作る骨微小環境が骨代謝制御に関与しており、その制御機能の重要な遺伝子がIGFBPであることをはじめて示した。

これは、骨粗鬆症をはじめとする骨吸収性疾患に対する新しい治療法に応用できる知見である。超高齢社会となり骨吸収性疾患の罹患率や影響が増大するなかで、社会的意義は大きいと考えられ、さらなる研究を進める必要がある。

研究成果の概要（英文）：This research showed the fibroblasts under effect of the mechanical stress control bone metabolism of the co-cultured osteoblasts by changing a production of IGFBPs over time. The fibroblasts constituting bone microenvironment would control bone metabolism via IGFBPs. The result indicates that unknown control mechanism by the bone microenvironment mainly composed of fibroblasts would be presented.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨芽細胞 線維芽細胞 骨代謝 骨吸収 骨形成 メカニカルストレス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨は、加わるメカニカルストレスに応じて形成・吸収を繰り返し、周囲環境に適した強度・形態へと改造される。骨代謝制御の破綻は、骨粗鬆症や歯槽骨萎縮による歯の喪失などの骨吸収性疾患へと繋がる。これらの疾患は健康寿命を短くし、超高齢社会である我が国では深刻な問題である。しかし、骨吸収性疾患の治療や骨再生療法は選択肢が少なく、効果も限定的であり、従来とは異なる新しい骨吸収性疾患治療法や骨再生療法の開発が必要である。

申請者のこれまでの先行研究の結果から、線維芽細胞が骨周囲細胞として骨微小環境を形成し、骨微小環境がメカニカルストレスなどを感知し、対応するシグナルを骨芽細胞に伝達する役割を担っており、線維芽細胞が起点となる骨代謝制御機構が存在する、という着想に至った (Ito R, et al. Biomed Res35:69-79,2014. Ito R, et al. Oral Science in Japan:3-6,2014)。

これまで着目されていなかった線維芽細胞を起点とした骨代謝制御機構の解明と骨吸収性疾患治療への応用をすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メカニカルストレス応答性骨代謝における線維芽細胞を起点とする骨代謝制御機構を解明することである。そのために、線維芽細胞と骨芽細胞を共培養し、メカニカルストレスとして伸展刺激を加え、経時的な遺伝子発現を分析した。その結果をもとに、線維芽細胞を起点とした骨代謝制御機構で重要な役割を担う遺伝子 (signature gene) を同定し、骨代謝疾患治療および骨再生医療への応用の可能性を検討した。

3. 研究の方法

骨芽細胞との非接触共培養下での、線維芽細胞への力学的刺激と解析

線維芽細胞をフィブロネクチンコーティングしたシリコンチャンバー上に播種し、トランスウェルで骨芽細胞と非接触共培養した。細胞機械的的刺激装置 (スカラテック社 NS-300 および NS-10) を用いて、非接触共培養した状態で、線維芽細胞のみに持続的一軸方向刺激を負荷した (伸展/収縮率 2~10%, 2~48h)。刺激した線維芽細胞と骨芽細胞の遺伝子発現をマイクロアレイで分析し、大きく変動していた骨代謝関連遺伝子について、リアルタイム PCR で刺激時間を変更して経時的な発現変化を解析した。

4. 研究成果

共培養伸展刺激した線維芽細胞と骨芽細胞をマイクロアレイで解析し、骨代謝に関連する遺伝子を抽出した。線維芽細胞では Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP1-6) の発現が亢進していた。共培養した骨芽細胞では BMP、RUNX2、OSX、WNT3A、IGF の骨芽細胞分化因子の発現が亢進し、RANKL や OPG は抑制された。さらに、IGFBPs は IGF に結合し、その作用を調節するとされ、マイクロアレイ解析で大きく発現変動していた (Table1)。

マイクロアレイで抽出したこれらの遺伝子の経時的発現変動解析するため、刺激時間を変更しリアルタイム PCR で解析した。骨芽細胞においては、BMP2 は刺激後 6 時間とかなり早い段階で発現亢進のピークが出現し、BMP4 と WNT3A は刺激後 12 時間と比較的早期に発現亢進のピークが出現した (Fig1)。

Table 1. Gene expression changes analyzed by microarray

Gene Symbol	Gene Title	Log2 ratio
BMP2	bone morphogenetic protein 2	1.8
BMP4	bone morphogenetic protein 4	2.6
RUNX2	runt related transcription factor 2	3.1
OSX	osterix (sp7 transcription factor)	2.2
WNT3A	wnt family member 3A	3.5
IGF1	insulin like growth factor 1	3.2
IGF2	insulin like growth factor 2	4.1
RANKL	RANK-ligand	-1.6
OPG	Osteoprotegerin	-2.7
COL1A1	collagen type I alpha 1	0.9
ALPL	alkaline phosphatase	1.6
IFGBP1	IGF binding protein 1	-2.1
IFGBP2	IGF binding protein 2	-1.2
IFGBP3	IGF binding protein 3	2.5
IFGBP4	IGF binding protein 4	2.2
IFGBP5	IGF binding protein 5	3.3
IFGBP6	IGF binding protein 6	-1.9

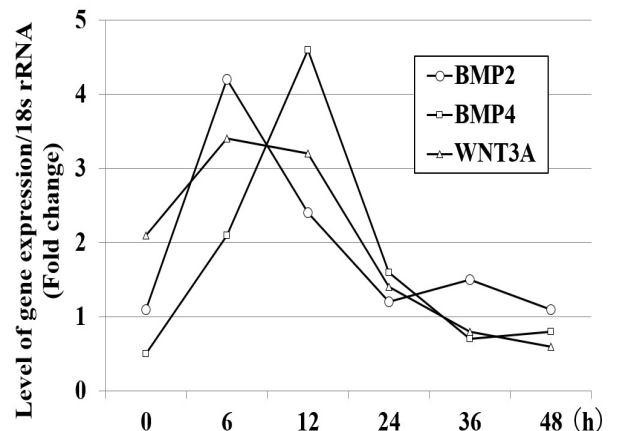


Fig 1. The gene expression level of BMP2, 4 and WNT3A.

RUNX2, オステリクス、IGF2 はいずれも刺激後 24 時間に発現亢進のピークが出現し、IGF1 はやや遅れて刺激後 36 時間でピークが出現した (Fig2)。骨基質となる 1 型コラーゲンとオステオカルシンは刺激後 48 時間に、石灰化の指標となる ALP は刺激後 36 時間にピークが出現し、骨芽細胞分化に続発して骨形成と石灰化が活性化されていくものと考えられた (Fig3)。一方で RANKL, オステオプロテグリンなどの破骨細胞関連遺伝子は刺激後 48 時間後にピークが出現した。破骨細胞関連遺伝子は骨芽細胞分化に関連する遺伝子よりかなり遅れて活性化した (Fig4)。

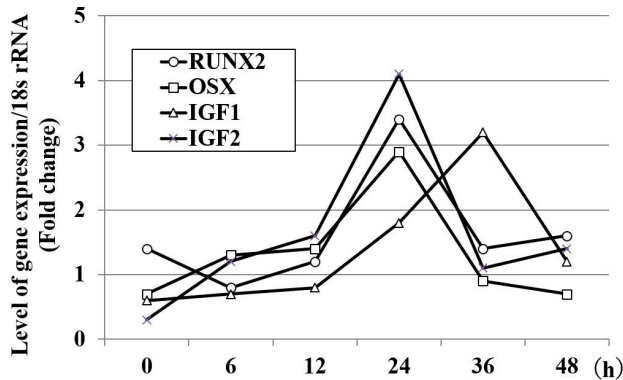


Fig 2. The gene expression level of RUNX2, OSX, and IGF1, 2.

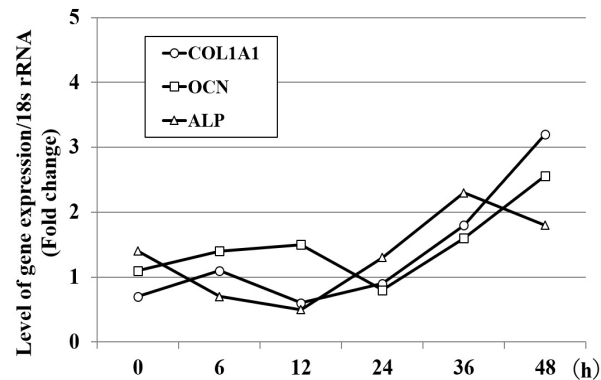


Fig 3. The gene expression level of COL1A1, OCN and ALP.

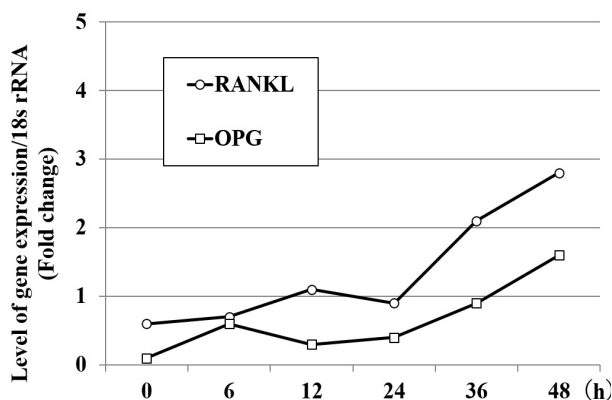


Fig 4. The gene expression level of RANKL and OPG.

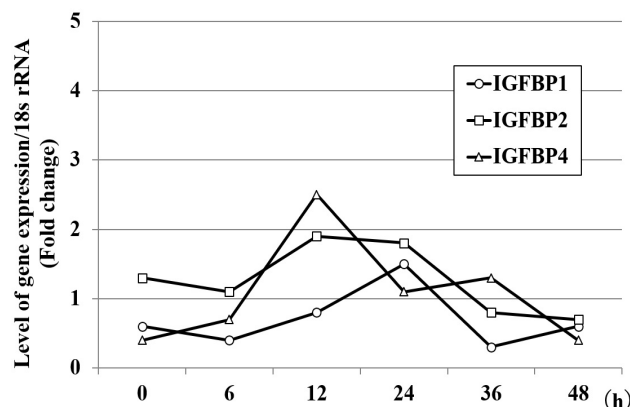


Fig 5. The gene expression level of IGFBP1, 2 and 4.

線維芽細胞においては、伸展刺激による IGFBPs の変動は、骨代謝に促進的に働く IGFBPs_{3,5} と抑制的に働く IGFBP₆ は刺激後 36 ~ 48 時間にピークが出現した。IGFBP₄ は刺激後 12 時間にピークが出現した (Fig5,6)。共培養した骨芽細胞の ALP 活性を分析したところ、ALP は一旦抑制されたのちに上昇し、その ALP の上昇と IGFBP_{3,5,6} の上昇は同期し、ALP の低下と IGFBP_{1,2,4} の上昇は同期していた。この結果から、線維芽細胞が骨周囲細胞として骨芽細胞に影響を及ぼしており、骨微小環境を形成する主な細胞が線維芽細胞であることが示唆された。さらに、IGFBPs は骨微小環境調節の中心的因子であり、さらに 6 つのサブタイプがそれぞれ異なった機能を果たし、骨代謝の促進から抑制まで制御している可能性が示された。IGFBPs はそれぞれのサブタイプごとに異なった機能を持ち、それぞれ異なるタイミングで発現が亢進し、骨代謝に関与していると考えられた。

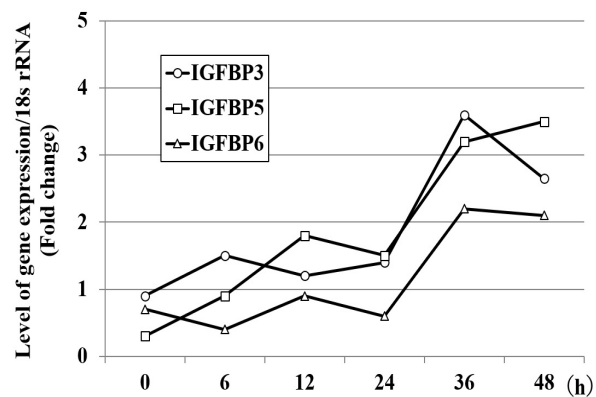


Fig 6. The gene expression level of IGFBP3, 5 and 6.

<考察>

共培養した線維芽細胞と骨芽細胞への伸展刺激により、骨芽細胞において刺激後 6 時間から 12 時間では BMP, WNT などの骨芽細胞分化過程の初期に働く遺伝子が活性化され、刺激 24 時間から 36 時間には RUNX2, OSX, IGF などの骨芽細胞分化過程の後期に働く遺伝子が活性化された。さらに刺激後 36 時間から 48 時間には、骨リモデリングの逆転期(reversal period)に関連する遺伝子である RANKL, オステオプロテグリンが活性化した。これらの変化は間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化し骨形成され、逆転期に破骨細胞が活性化され骨吸収される骨リモデリングの各過程で必要とされる因子と一致していた。

また、骨芽細胞では IGF の発現亢進も誘導された。IGF は骨芽細胞の機能を強調する一方、最終的には局所濃度が一定まで高まることにより破骨細胞分化へと誘導することが知られ、骨リモデリング過程のカップリング因子としての可能性が示唆されている。しかし IGF の局在と調節機構は不明な点が多く、IGFBPs が関与している可能性が示唆されているが詳細は解明されていない。

本研究では骨芽細胞と共培養し伸展刺激した線維芽細胞において IGFBP3, 4, 5, 6 の発現が変動していた。IGFBP3, 5 は IGF と複合体を形成し IGF の局所濃度を維持することで IGF に促進的に働くとされる。本研究では IGFBP3,5 の発現は IGF1, 2 の発現よりも少し遅れて亢進していた。これは IGF の局所濃度の維持のために発現が亢進しているのかもしれない。IGFBP4 は IGFBP5 と対照的な働きを持ち、IGF に結合しその作用を阻害することで骨芽細胞分化を抑制する。本研究では IGFBP4 は IGFBP5 よりも早期に発現が亢進していた。IGF は骨リモデリングの骨形成期(formation period)、逆転期(reversal period)、骨吸収期(resorption period)のそれぞれの代謝制御を担っている。IGFBP4 は IGF による骨形成期の早期に制御に関与し、そして IGFBP3,5 は骨形成期の後期や逆転期の制御に関わっているのかもしれない。IGFBP6 は骨芽細胞の分化に抑制的に働くとされているが、その詳細は明らかではない。骨芽細胞分化に促進的に働く IGFBP3,5 と抑制的に働く IGFBP6 の両方が活性化されることで、バランスを維持している可能性がある。IGFBPs はそれぞれのサブタイプごとに異なった機能を持ち、それぞれ異なるタイミングで発現が亢進し、骨代謝に関与していると考えられる。IGFBPs が多様性に富んだ骨代謝制御機構を有し、メカニカルストレスで誘導される骨代謝において IGFBPs は骨芽細胞の分化制御のみならず、骨形成と骨吸収のバランスを制御している可能性が示唆される。今後 IGFBPs と骨代謝制御の関連についてさらなる研究が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryohei Ito, Kosei Kubota, Ken Furudate, Hiroshi Nakagawa, Norihiko Narita, Mayu Mimura, Toshiaki Oyama, Yoshihiro Tamura, Yusuke Tanaka, Anna Satake, Haruka Fukuta, Natsumi Akiyama, Wataru Kobayashi.	4. 巻 -
2. 論文標題 Chronological Changes in Gene Expression of Osteoblast Differentiation Factor and Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins Induced by Mechanical Stress in Osteoblast-Like Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oral Science in Japan2018	6. 最初と最後の頁 5-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究協力者	小林 恒 (Kobayashi Wataru)		
研究協力者	久保田 耕世 (Kubota Kosei)		
研究協力者	松宮 朋穂 (Matumiya Tomoh)		
研究協力者	古舘 健 (Furudate Ken)		