

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 3 月 9 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890127
 研究課題名（和文） 骨再生に向けた脂肪組織由来幹細胞の効率的な骨芽細胞分化誘導法の開発
 研究課題名（英文） Development of efficient osteoblast differentiation method in adipose tissue-derived stromal cells for bone regeneration

研究代表者 久田 邦博(HISADA KUNIHRO)
 大阪大学・歯学部附属病院・医員
 研究者番号：50452454

研究成果の概要：

未分化間葉系細胞株C3H10T1/2において、RAは骨芽細胞分化マーカーであるであるタイプIコラーゲン、オステオカルシン、BSPには作用しない可能性があるが、初期骨芽細胞分化マーカーであるALPをBMPシグナルと協調的に促進させることにより、骨芽細胞分化を促進することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,330,000	339,000	2,669,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯科インプラント学

キーワード：歯科インプラント 骨芽細胞 分化

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織より採取した幹細胞 (ADSC) 骨再生への組織工学的アプローチが様々な手法で行われている。しかし現在のところ、その手法が完全に確立されているとは言い難い。ADSC を骨芽細胞へと分化誘導する因子のひとつの候補として考えられるのがレチノイン酸 (RA) である。RA は、ビタミン A の生理活性を担う誘導体であり、細胞の分化を制御する因子としての報告が多くなされている。分化過程における RA の分子作用メカニズムは未だに不明であるが、RA が前脂肪細胞株の脂肪細胞分化を抑制し、骨芽細胞分化を誘導することが報告されている。さらに RA は骨芽細胞分化で主要な役割を演じる BMP シグナルと協調的に骨芽細胞分化を誘導することも報告されている。以上のことより、RA は脂肪細胞分化を抑制し、骨芽細胞分化において主要な役割を演じる BMP シグナルと共に骨芽細胞分化を誘導する因子であり、ADSC の骨芽細胞分化に有用である可能性が高い。

2. 研究の目的

骨再生へのアプローチの目的のためには、採取した ADSC をより効率的に骨芽細胞へ誘導させることが求められる。脂肪細胞分化を抑制し、骨芽細胞分化を促進する因子である RA は骨芽細胞へ効率的に分化を誘導させるために有効な可能性が非常に高い。RA を有効かつ安全に作用させる為に、骨芽細胞への分化については、分化マーカーへの影響を BMP シグナルへの関与を中心に、また脂肪細胞分化においても、脂肪細胞分化マーカーへの影響を解明し、RA の分子作用メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

未分化間系細胞株 C3H10T1/2 を用い、RA による脂肪細胞分化誘導の抑制作用および骨芽細胞促進作用について検討を行う。

(1) ALP 染色法を用いて RA による骨芽細胞分化作用の検討および BMP シグナルとの骨芽細胞分化への影響の検討を行う。

(2) oil red O 染色を用いて脂肪細胞分化において主要な役割を行う PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP δ に対する RA の脂肪抑制作用について検討を行う。

(3) real-time PCR 法を用いて骨芽細胞分化

マーカーである ALP、タイプ I コラーゲン、オステオカルシン、BSP に対する RA の遺伝子レベルでの転写活性への作用の検討をおこなう。また同時に BMP シグナルを作用させることにより、シグナルの協調作用の検討を行う。

4. 研究成果

C3H10T1/2 細胞は BMP2 存在下で ALP 陽性の骨芽細胞様細胞および オイルレッド O 陽性の脂肪細胞に分化誘導されることが報告されている。BMP2 存在下で、C3H10T1/2 細胞に RA を添加すると、骨芽細胞分化はさらに促進された。一方、BMP2 によって誘導される脂肪細胞分化は RA 添加により強く抑制された。(図 1) さらに BMP シグナルと RA シグナルの協調作用の分子メカニズムを明らかにする目的で、real-time PCR 法を用いて骨芽細胞分化マーカーである ALP、タイプ I コラーゲン、オステオカルシン、BSP に対する RA の遺伝子レベルでの転写活性への作用の検討を行った。

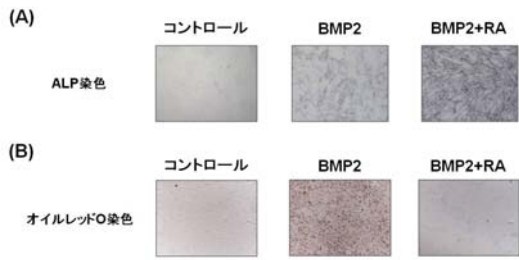
その結果、RA はタイプ I コラーゲン (図 5)、オステオカルシン (図 6)、BSP の発現には影響をおよぼさなかった。しかし ALP の遺伝子レベルでの発現を促進し、さらに BMP2 と同時に作用させることにより、さらに発現を促進した。(図 4)

骨芽細胞分化において RA は ALP を強く促進する作用を有すること、さらに BMP シグナルと協調し、さらにその促進効果を強くすることが示唆された。

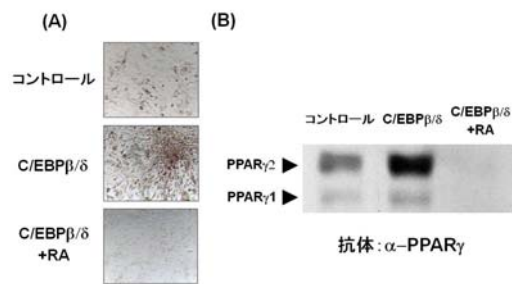
脂肪細胞分化において RA は C/EBP β および C/EBP δ の過剰発現により誘導される PPAR γ 発現および脂肪細胞の形成を抑制し (図 2)、PPAR γ の過剰発現による脂肪細胞の分化誘導をも強く阻害した (図 3)。

以上の結果より RA は C/EBP β および C/EBP δ の作用を抑制することにより脂肪細胞分化を抑制し、さらに PPAR γ の発現と作用を抑制することにより、脂肪細胞への分化を抑制していることが示唆された。また、骨芽細胞分化においては、骨芽細胞分化マーカーである ALP を促進する因子でありその効果は BMP シグナルと協調させることにより、効果的に骨芽細胞分化を誘導する可能性が示唆された。

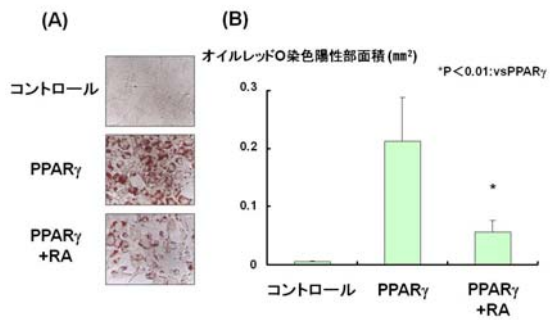
このことは脂肪組織由来幹細胞での効果的な骨芽細胞分化誘導において、RA が使用できる可能性を有すると考えられる。



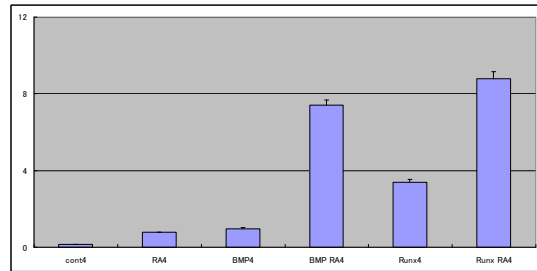
(図 1)



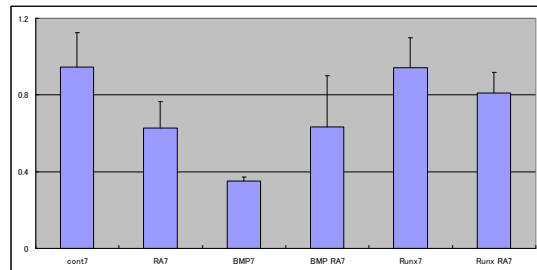
(図 2)



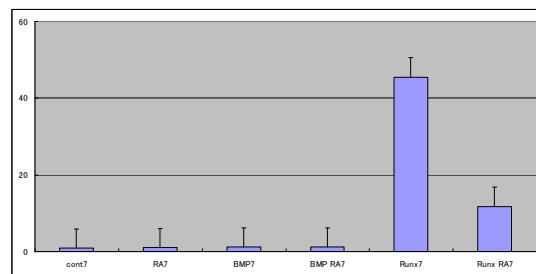
(図 3)



(図 4)



(図 5)



(図 6)

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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久田 邦博 (HISADA KUNIHIRO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50452454

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者