

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18510

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の経静脈投与によるステロイド誘発大腿骨壊死の予防で働く分子機構の解明

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanism of prevention of steroid-induced osteonecrosis of the femur by intravenous administration of mesenchymal stem cells

研究代表者

島崎 都 (SHIMASAKI, Miyako)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：00440511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：1.ステロイド誘発性大腿骨壊死の主な原因は虚血性低酸素症およびミトコンドリア損傷である。骨壊死予防には骨内ミトコンドリア機能の維持が不可欠である。ミトコンドリア転写因子A(TFAM)の添加により骨細胞壊死の発生が抑制されたことから、TFAMは細胞壊死における保護効果を有し、培養骨細胞の骨壊死を予防することを明らかにした。2.間葉系幹細胞(MSC)の組織修復作用による予防および治療における有効性を示すために、ステロイド投与および低酸素ストレスに対するMSCのストレス耐性を検討した。MSCはストレス下においても、生存能およびミトコンドリア機能の維持した。さらに、酸化ストレスの抑制を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1.TFAMはミトコンドリアの機能維持、酸化傷害の抑制、ATP産生の維持において重要であることが示された。ミトコンドリア損傷の予防は、骨細胞壊死の進行を減少させる事が効果的であるため、酸化傷害の抑制、ATP産生の維持に関するTFAMは骨壊死予防における治療法に応用できる可能性が高い。2.デキサメタゾンおよび低酸素によるストレスに曝された間葉系幹細胞(BM-MSC)はミトコンドリア機能を維持し、酸化ストレスの抑制を示した。骨細胞死を引き起こすのに十分なストレスのかかる条件下でもMSCは機能は維持し、骨壊死に対し骨内移植における予防および治療戦略が有望である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：1. Ischemic hypoxia and mitochondrial damage are the main causes of steroid-induced osteonecrosis of the femur. Maintenance of mitochondrial function in osteocytes is essential for the prevention of osteonecrosis. Development of osteocyte necrosis was suppressed by mitochondrial transcription factor A (TFAM). TFAM has a protective effect on cell necrosis and prevents osteonecrosis in cultured osteocytes. 2. In order to demonstrate the efficacy of mesenchymal stem cells (MSCs) in prevention and treatment by tissue repair, we investigated the stress tolerance of MSCs against steroid administration and hypoxic stress. The stress resistance of MSCs to steroid administration and hypoxic stress was investigated. MSCs maintained mitochondrial function under stress and suppressed oxidative stress.

研究分野：再生医療

キーワード：骨髄由来間葉系幹細胞(MSC) 酸化ストレス 低酸素 抗炎症作用 分化能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、難治性自己免疫疾患に対して分子標的治療薬をはじめとする新規治療薬が加わった。しかし、一般的治療法であるステロイド、特に methylprednisolone のパルス療法は、難治性自己免疫疾患にとって治療効果が高く、なくてはならない切り札の治療である。ステロイドパルス療法は治療効果が大きい反面、副作用も大きい。なかでも大腿骨頭壊死症は最も恐ろしい副作用で、厚生労働省の指定難病になっている。患者数は 2014 年で 23,600 人にのぼる。さらに、基礎疾患である自己免疫疾患は青・壮年に発症する。副作用である大腿骨頭壊死症が発生すると、その治療は長期にわたり、患者の苦難に加え医療費ならびに労働経済学的な損失も多大である。ステロイド誘発性大腿骨頭壊死の発症機序に関して多くの研究が行われてきた。酸化ストレスによるアポトーシスや血管内皮細胞の機能障害が注目されているが、その分子機構は未だ明らかではない。近年、傷害臓器修復への幹細胞の応用が試みられている。大腿骨壊死に対しても、壊死部への BM-MSC の直接注入による修復促進が報告された(Lafforgue P, Joint Bone Spine 2010)。しかし、その骨壊死予防作用、特に BM-MSC の経静脈投与による骨壊死阻止に関する報告はない。我々は先行研究において、ステロイド誘発性大腿骨壊死ウサギモデルを用いて経静脈投与された BM-MSC が骨壊死を阻止することを初めて報告した(平成 29 年日本病理学会総会、論文投稿中)。その臨床応用に向け「**大腿骨傷害部への BM-MSC の集合(ホーミング)と傷害阻止で働く分子機構は何か?**」が緊急の研究課題となった。

2. 研究の目的

代表者は、ウサギステロイド誘発大腿骨壊死モデルを用い、骨髄由来間葉系組織幹細胞 bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BM-MSC) の経静脈投与による骨壊死阻止を報告した。その臨床応用に向け、BM-MSC の大腿骨傷害部へのホーミングと傷害阻止に関わる分子機構の解明が緊急の研究課題となった。本研究では、BM-MSC の傷害部への集合(ホーミング)と傷害阻止に関わる遺伝子群を、遺伝子プロファイリングにより選別し、*in vivo*における遺伝子・蛋白発現解析と *in vitro*における遺伝子発現修飾実験で検証する。

3. 研究の方法

ウサギステロイド誘発大腿骨壊死モデルおよび骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MSC)の全身投与によるステロイド誘発大腿骨壊死予防モデルを作製し、RNA-sequencing による BM-MSC の傷害部へのホーミングと傷害阻止に関わる遺伝子群を網羅的に解析する。RNA-sequencing・遺伝子パスウェイで得られた関連遺伝子について培養骨芽細胞を用いて *in vitro*で検証する。この解析で発現が大きく変化していた特異的遺伝子が、どのようなパスウェイに関わっているかを探し出し、予防・治療への機序解明へ繋げる。

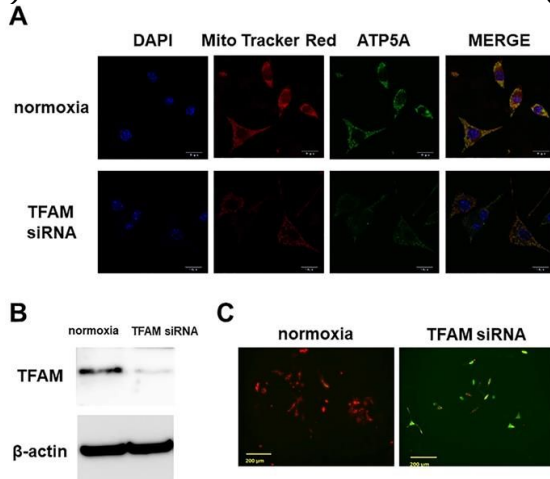
4. 研究成果

新型コロナウイルス (COVID-19)の流行により RNA-sequencing の業者への委託が困難となり、*in vitro* および *in vivo* によるタンパク発現解析を中心とした実験系に変更した。研究成果(1.)ステロイド関連の大腿骨頭壊死の主な原因は虚血性低酸素症であり、酸化ストレスの根底にある要因であると考えられている。ミトコンドリアは酸化損傷に対して脆弱であり、その機能、保存、制御に関与するミトコンドリア転写因子 A (TFAM) に着目し、低酸素環境へのグルココルチコイドの添加によって誘発される酸化損傷および大腿骨壊死において検討した。1 μ M デキサメタゾン (Dex) を添加した 1% 低酸素環境 (hypoxia) の培養骨細胞 ML0-Y4 (Dex(+)/hypoxia(+)) を用いて、酸化ストレスの指標である (8-OHdG)、および低酸素マーカーである低酸素誘導因子 (HIF-1)を検証した。次に、TFAM をノックダウンし、ミトコンドリア

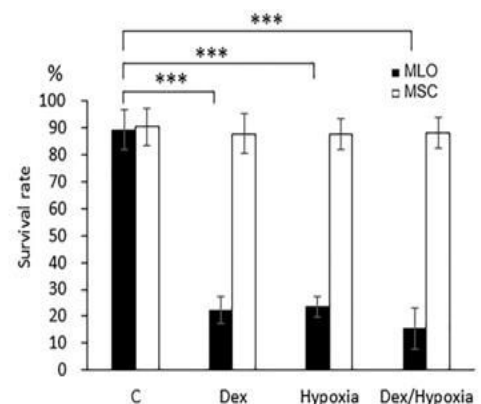
におけるアポトーシスおよびエネルギー産生(ATP5A)について検討した。TFAM を添加した MLO-Y4 に Dex を添加し、低酸素下で 24 時間培養した。死細胞と生細胞の比率を比較した。低酸素環境下でグルココルチコイドを添加した後の骨細胞では、8-OHdG、HIF-1 の発現の亢進が見られた。TFAM ノックダウンでは、酸素正常状態と比較して、ミトコンドリア機能が大幅に低下した。一方、TFAM を添加すると、Dex(+)/低酸素(+)と比較して、骨細胞壊死の発生率が有意に減少した(図 1)。TFAM はミトコンドリアの機能維持、酸化傷害の抑制、ATP 産生の維持において重要であることが示された。ミトコンドリア損傷の予防は、骨細胞壊死の進行を減少させる事が効果的であるため、酸化傷害の抑制、ATP 産生の維持に関与する TFAM は骨壊死予防における治療法に応用できる可能性が高い。

研究成果(2.) 間葉系幹細胞 (MSC) の組織修復および抗炎症作用を介したさまざまな疾患の予防および治療における有効性において、骨壊死誘発ストレスに対する幹細胞の機能について検討した。骨細胞死を誘導する因子として知られているステロイド投与および低酸素ストレスに対する MSC のストレス耐性を検討した。マウス骨細胞 (MLO-Y4) およびマウス間葉系幹細胞 (MSC) を、*in vitro*においてデキサメタゾン (Dex)、1% 酸素の低酸素、またはその両方に曝露した。ミトコンドリア膜電位、酸化ストレスマーカー (8-OHdG)、アポトーシス阻害分子であるカスパーゼ-3、-9、エネルギー合成タンパクである ATP シンターゼ (ATP5A) および 抗アポトーシスタンパク質 (XIAP) を免疫蛍光法とウェスタンブロットの両方で分析した。デキサメタゾンまたは低酸素への曝露により、MLO-Y4 はミトコンドリア膜電位、ATP5A の低下、および 8-OHdG、切断型カスパーゼ、および XIAP の上方制御を示した。これらの変化は、デキサメタゾンと低酸素による曝露によって大幅に増強された。しかし、MSC ではデキサメタゾンと低酸素の両方に曝露した場合でも、ミトコンドリア膜電位は維持されていたが、アポトーシス促進分子または抗アポトーシス分子には有意な変化は見られなかった。デキサメタゾン、低酸素症、またはその両方による曝露によって引き起こされる影響は、MSC ではまったく見られなかった。グルココルチコイド投与と低酸素環境の二重ストレスに曝された骨細胞細胞では、ミトコンドリアを介して骨細胞死が誘導された。対照的に、同じストレスに曝された MSC はミトコンドリア機能が維持され、酸化ストレスの抑制を示した(図 2)。したがって、生体内で骨細胞死を引き起こすのに十分なストレスのかかる条件下でも、間葉系幹細胞の機能は維持できると推測され、骨壊死に対し骨内移植を組み込んだ予防および治療戦略が有望である可能性があることが示唆された。

(図 1)



(図 2)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shusuke Ueda , Toru Ichiseki , Miyako Shimasaki , Hiroaki Hirata , Norio Kawahara and Yoshimichi Ueda	4. 巻 1
2. 論文標題 Glucocorticoid-Induced Osteocytic Cell Death in a Hypoxic Environment Is Associated with Necroptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio Chem	6. 最初と最後の頁 98,106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biochem1020009	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Nozomu Motono , Yoshimichi Ueda, Miyako Shimasaki, Shun Iwai, Yoshihito Iijima, Katsuo Usuda and Hidetaka Uramoto	4. 巻 14
2. 論文標題 Prognostic Impact of Sphingosine Kinase 1 in Nonsmall Cell Lung Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Pathology	6. 最初と最後の頁 1,7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2632010X20988531	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Shusuke Ueda, Miyako Shimasaki, Toru Ichiseki, Hiroaki Hirata, Norio kawahara, Yoshimichi Ueda	4. 巻 17
2. 論文標題 Mitochondrial transcription factor A added to osteocytes in a stressed environment has a cytoprotective effect	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1293-1299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijms.45335	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Miyako Shimasaki , Shusuke Ueda , Toru Ichiseki , Hiroaki Hirata , Norio Kawahara , Yoshimichi Ueda.	4. 巻 18
2. 論文標題 Resistance of bone marrow mesenchymal stem cells in a stressed environment - Comparison with osteocyte cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1375-1381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijms.52104	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Takanori Morikawa , Miyako Shimasaki, Toru Ichiseki , Shusuke Ueda, Yoshimichi Ueda, Kan Takahashi.	4. 巻 12
2. 論文標題 The Possibility of IPC to Prevent Ischemic-Reperfusion Injury in Skeletal Muscle in a Rat	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm12041501	査読の有無 有
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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 島崎 都
2. 発表標題 Taurine Inhibits Glucocorticoid-Induced Bone Mitochondrial Injury, Preventing Osteonecrosis in Rabbits and Cultured Osteocytes
3. 学会等名 110回日本病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miyako shimsaki
2. 発表標題 Analysis of osteoblast differentiation potential of mesenchymal tissue stem cells induced by cytotoxic stress
3. 学会等名 第109回日本病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島崎 都
2. 発表標題 間葉系組織幹細胞の細胞傷害性ストレスに対する in vitroでの機能解析
3. 学会等名 第108回日本病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島崎 都
2. 発表標題 ラット骨格筋における虚血プレコンディショニングの機序と月齢による影響
3. 学会等名 第111回日本病理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島崎 都
2. 発表標題 デキサメタゾン/低酸素によるストレス耐性は骨髄由来ラット間葉系幹細胞の骨芽細胞分化能を増強させる
3. 学会等名 第112回日本病理学会
4. 発表年 2023年

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関