

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390492

研究課題名（和文） 骨髄間葉系幹細胞を用いた骨破壊制御：
組織幹細胞特異的表面マーカーの開発とその応用研究課題名（英文） Regulation of bone destruction by bone marrow mesenchymal stem cells:
Development and application of the cell-surface marker specific to
tissue stem cells

研究代表者

久木田 敏夫（KUKITA TOSHIO）

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：70150464

研究成果の概要（和文）：

間葉系幹細胞(MSC)についてその表面マーカーを開発し、MSCを純化し、関節炎動物の炎症性骨破壊を制御することを最終的な目的とした。マウスMSCの分離が不安定であったことから、安定に得られるラットの間葉系幹細胞について、表面マーカーの開発とラット関節炎モデル(アジュバント関節炎)の制御を中心に行なった。bFGF依存的な増殖を指標として調製されたラットMSCは骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化する能力を有しており、表面マーカーもCD90+、CD29+、CD31-、CD45-であり幹細胞であることを確認した。MSCは破骨細胞分化抑制性サイトカインであるOPGとIL10を発現することが分かった。MSCは破骨細胞分化を顕著に抑制した。MSCはケモカイン受容体であるCCR1とCCR3及びCXCR4を発現しており、炎症性骨破壊部位で高発現するケモカインMIP-1とSDF-1に対して走化性を有することが分かった。アジュバント関節炎ラットにMSCを投与したところ炎症性骨破壊が顕著に抑制された。MSCが炎症部位へ選択的に移動し、破骨細胞分化を制御する可能性が、本研究により示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this research is to develop the cell-surface marker of mesenchymal stem cells (MSCs) and to regulate inflammatory bone destruction of animals bearing arthritis. As the isolation of mouse MSCs had problem in its purity and reproducibility in purification, we have focused on isolating and applying rat MSCs on the development of cell surface markers for MSC and regulation of inflammatory bone destruction on adjuvant-induced arthritis in rats. Isolated rat MSCs in the presence of basic FGF differentiated into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes and expressed surface phenotypes of CD90+, CD29+, CD31-, CD45-. MSCs significantly inhibited osteoclastogenesis. MSCs expressed OPG and IL10, cytokines suppressing osteoclastogenesis, and chemokine receptors CCR1, CCR3 and CXCR4. MSCs had migratory activity against MIP-1 α and SDF-1 α , chemokines expressed in the area of inflammatory bone destruction. MSCs injected to rats with adjuvant-induced arthritis markedly suppressed inflammatory bone destruction. It was suggested that administrated MSCs migrate to the site of inflammatory bone destruction and suppress osteoclastogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	0	0	0

2013年度	0	0	0
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学
 科研費の分科・細目：歯学
 キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）

1. 研究開始当初の背景

硬い骨組織に守られた骨髄には造血幹細胞が存在しており特有の微小環境(ニッチ)のもとで、時事刻々と造血が営まれている。造血幹細胞は骨表面の主として骨芽細胞から成る「内骨膜ニッチ」と骨髄内に存在する血管の内皮細胞と周囲細胞より構成される「血管周囲ニッチ」に存在する。骨折した骨を固定しておくとも自然に治癒することは昔から知られており、この骨髄に「間葉系幹細胞(MSC)」が存在することが証明され、骨折治癒過程で血腫形成に引き続く軟骨様カルスの形成、そして断裂部位の骨形成による完全治癒は、MSCから分化誘導された軟骨細胞と骨芽細胞によるものであることが分かってきた。MSCは軟骨細胞や骨芽細胞の他に、脂肪細胞や結合組織ストローマ細胞等にも分化する。このMSCは分化転換により、神経細胞や内皮細胞などの外胚葉系細胞、また、腸上皮のような内胚葉系細胞にも分化するという報告もある。組織再生を目的として、MSCを生体内に投与する研究がなされてきたが、比較的最近になって、MSCが強力な免疫抑制能を有することが見出された。MSCには炎症性の組織破壊を伴う部位に選択的に浸潤するという不思議な性質を持つことが知られており、炎症部位に浸潤したMSCが過剰な免疫反応を局所的に沈静化するとともに、その部位の組織再建を促す可能性を示唆する所見が集積されつつあった。

2. 研究の目的

本研究では骨髄間葉系幹細胞(MSC)の膜表面マーカー等を利用して骨髄から免疫学的にMSCを純化し、炎症性骨破壊を伴う関節

炎マウスに投与し、骨破壊制御を行なうことを目的とした。炎症性骨破壊の場に於けるMSCの挙動と破骨細胞及びその前駆細胞の挙動を分子形態学的に解析し、その骨破壊制御機構を解明する。MSCのホーミング機構についても解析を行ない、MSCによる効果的な炎症性骨破壊制御を実現することを本研究の究極の目的とした。

3. 研究の方法

具体的には次のような方法論を用いた。1) 骨髄MSCの血液学的・免疫学的純化。2) 骨髄MSC特異的モノクローナル抗体の作成とその抗体が認識する抗原分子特定。3) 純化したMSCを用いた炎症性骨破壊制御。関節炎マウスに投与し炎症部位へのMSCの移動と破骨細胞及びその前駆細胞との相互的空間的存在状態を経時的に解析する。MSCのケモカインに対する走化性についての検討。

4. 研究成果

ラット骨髄間葉系幹細胞の分離

骨髄細胞よりbasic FGFを用いてMSCを分離、培養した。この細胞をFACSを用いて細胞膜表面マーカーの発現を解析した。その結果、CD90は95.9%、CD29は79.8%、CD45は0.3%、CD31は0.4%が陽性であった。また、用いた細胞に特異的な抗体を用いて蛍光顕微鏡を用いて解析したところ、FACSによる解析結果とほぼ同様の染色結果が得られた。これらの結果、ラット骨髄細胞より分離・培養した細胞がMSCに特徴的な細胞表面マーカーの発現パターンを示すことが分かった。

Basic FGF 存在下で分離・培養したMSC 様細胞は、多分化能を有する

ラット骨髄細胞からbasic FGF を用いて分離・培養した細胞をそれぞれの条件下で分化を誘導した。骨芽細胞誘導の結果ウェル内に凝集物が形成され、Alizarin red S 染色の結果、カルシウムの沈着が認められた。脂肪細胞誘導の結果、培養初期は紡錘形であった細胞は丸みを帯びる形を呈するようになり、Oil red O 染色の結果、細胞質内に顆粒状の脂肪滴が観察された。軟骨細胞誘導の結果、トルイジンブルー染色により軟骨細胞が観察された。これらの結果から、ラット骨髄細胞より分離・培養した細胞が多分化能を示すことが分かった。

ラットMSC特異的モノクローナル抗体の作成

ラットMSCを抗原とし新規モノクローナル抗体の作成をおこなった。約1,500個のハイブリドーマをスクリーニングした結果、MSC特異的な抗体産生するクローンを2個見出した。MSCマーカーとしての開発を継続して進めている。

AA ラットにおける炎症及び、腫脹はMSC の投与により抑制される

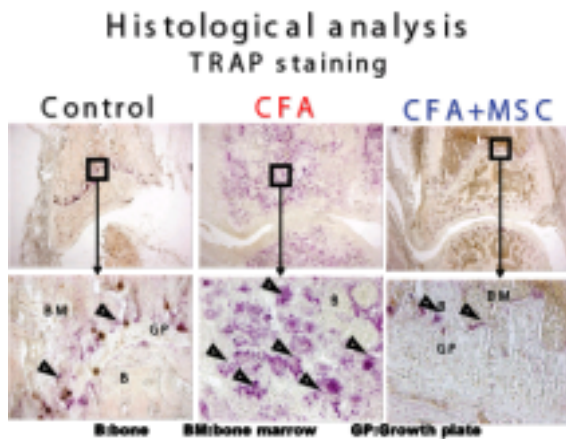
CFA 及びMSC を投与後7日から28日に渡って、体重、関節炎スコア、下肢腫脹幅、下肢腫脹厚さを計測した。その結果、体重減少の有意な抑制は認められなかったものの、関節炎スコア、下肢腫脹幅、下肢腫脹厚さは有意に抑制された。

AA ラットにおける骨破壊はMSC の投与により抑制される

CFA およびMSC 投与から28日目にラットを屠殺、還流固定後に下肢を切離した。下肢を軟エックス線で解析したところ、CFA 投与群では明らかな骨破壊が脛骨遠位端に認められるのに対し、MSC 投与群では骨破壊が抑制されていた。マイクロCT を用いて距腿関節の三次元再構成を行い、MSC 投与群で骨破壊が抑制されていることを確認した。骨破壊の抑制が観察された。脛骨遠位端の骨髓腔内の海綿骨の骨量を解析した結果、骨破壊が有意に抑制されていることが分かった。

MSC は距腿関節において炎症性細胞の浸潤、破骨細胞形成を抑制する

距腿関節及びその周囲を含む領域のパラフィン切片を作成し、H/E およびTRAP 染色(下図)にて解析した。H/E 染色において、CFA 投与群(CFA)は炎症性細胞の浸潤、滑膜組織の増殖、関節腔の変形、癒着などが観察されたのに対し、MSC 投与群(CFA+MSC)においては、これらの所見が抑制されていることがわかった。CFA 投与群で骨面に沿って多数観察される破骨細胞の数も少なかった。TRAP 染色で破骨細胞の局在を確認したところ、CFA 投与群において脛骨遠位端および距骨の広範囲に破骨細胞が観察されたのに対し、MSC 投与群においては、破骨細胞の局在は成長板周囲に局限しており、この分布はMineral Oil 投与群(Control)の破骨細胞の分布に非常に類似していた。



AA ラットの距腿関節においてMIP-1 およびSDF-1 の発現はMSC 投与により影響されない

CFA 投与群、CFA+MSC 投与群のラットの距腿関節からRNA を抽出した後、半定量的 RT-PCR によってMIP-1 およびSDF-1 の発現を解析した。その結果、CFA 投与群、CFA+MSC 投与群どちらにおいても同程度のMIP-1 およびSDF-1 のmRNA の発現を確認した。MSC は*in vitro* において破骨細胞形成を抑制するAA ラットにおいMSC は破骨細胞形成を阻害し、骨破壊を抑制したため、*in vitro* でのMSC の破骨細胞分化に対する影響を解析した。全骨髄細胞と種々の数のMSC を共培養することによりMSC の破骨細胞形成に対する影響を調べた。共培養には全骨髄細胞を用いた破骨細胞形成系にMSC を直接添加した「直接的共培養系」と全骨髄細胞破骨細胞形成系に上方からTranswell membrane を挿入・設置し、membrane の上面にMSC を加え、骨髄細胞とMSC の直接的な接触を阻害した状態で共培養する「間接的共培養」を行った。その結果、直接的共培養においてはMSC の数が100 から、間接的培養においては1000 から破骨細胞形成抑制効果を認められた。

MSC は破骨細胞形成抑制性サイトカインを発現する

破骨細胞抑制性サイトカインの発現を解析したところ、Interferon- γ の発現は認められなかったが、TGF- β 、OPG、IL-10のmRNA の発現が認められた。MSC がこれらの因子を介して破骨細胞分化抑制作用を呈することが示唆された。MSC が発現するケモカインレセプターの発現を解析したところ、MCP-1 のレセプターであるCCR2の発現は認められなかったがCCR1、CCR3、及びCXCR4 の発現が確認された。

MSC は細胞膜表面に発現するケモカインレセプターを介してそれらのケモカインに対して有意に走化性を示す

得られたケモカインレセプターの発現プロファイルをもとに*in vitro* におけるMSC のケモカインに対する走化性を解析した。10h の培養の後、小孔を通り抜けmembrane の下面に移動した細胞の数をカウントした。その結果、SDF-1 (CXCR4リガンド)では、1ng/ml、MIP1- α (CCR1リガンド)では10ng/ml及び100ng/ml で有意にMSC の走化性が認められた。MCP1(CCR2リガンド)に関してはどの濃度に対しても有意な走化性は認められなかった。

本研究より、ラットMSCによる炎症性骨破壊制御において炎症性骨破壊の場で高発現するケモカイン(MIP-1、SDF-1)にMSCが誘引され、骨破壊の場で抑制性サイトカインを分泌することにより、骨破壊を抑制する可能性が強く示唆された。MSCによる骨破壊制御の分子機構の一端が明らかとなった。本研究期間内にMSC特異的マーカーの開発は完了できなかったが、現在、開発を継続しているところであり、本研究で得られた成果を基盤として、

優れたMSC純化法が確立され、炎症性骨破壊のMSCによる効果的な制御が可能になり、臨床への応用も可能になるものと思われる。

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4件)

The Transcription Factor FBI-1/OCZF/LRF Is Expressed in Osteoclasts and Regulates RANKL-Induced Osteoclast Formation In Vitro and In Vivo. Kukita A., Kukita T., Nagata K., Teramachi J., Li Y-J., Yoshida H., Miyamoto H., Gay S., Pessler E., Shobuike T. *Arth Rheumatism* 63(9):2744-2754, 2011

Adenosine abolishes MTX-induced suppression of osteoclastogenesis and inflammatory bone destruction in adjuvant-induced arthritis. Teramachi J., Kukita A., Li Y-J., Ushijima Y., Ohkuma Y., Wada N., Watanabe T., Nakamura S., Kukita T. *Lab. Invest.* 91:719-731, 2011.

Phosphatidylserine-containing liposomes inhibit the differentiation of osteoclasts and trabecular bone loss. Wu Z., Ma H.M., Kukita T., Nakanishi Y., Nakanishi H. *J.Immunol.* 184(6)3191-3201, 2010.

A possible suppressive role of galectin-3 in up-regulated osteoclastogenesis accompanying adjuvant-induced arthritis in rats. Li Y-J., Kukita A., Teramachi J., Nagata K., Wu Z., Akamine A., Kukita T. *Lab. Invest.* 89:26-37, 2009.

[学会発表](計10件)

高野登志夫、李銀姫、久木田明子、山座孝義、高橋明、鮎川保則、古谷野潔、久木田敏夫 間葉系幹細胞による炎症性骨破壊制御 第53回歯科基礎医学会、2011年9月(岐阜)

高橋良、久木田明子、李銀姫、鮎川保則、古谷野潔、久木田敏夫 膜ナノチューブによる前破骨細胞融合制御 第53回歯科基礎医学会、2011年9月(岐阜)

牧野友祐、山座孝義、山座治義、馬蘭、益田啓太郎、園田総一郎、城戸瑞穂、野中和明、寺田善博、久木田敏夫 ヒト過剰歯由来幹細胞の免疫細胞療法効果について 第53回歯科基礎医学会、2011年9月(岐阜)

山座孝義、牧野友祐、山座治義、馬蘭、園田総一郎、益田啓太郎、野中和明、寺田善博、久木田敏夫 乳歯凍結保存法がヒト乳歯由来幹細胞の免疫調節能に与える影響について 第53回歯科基礎医学会、2011年9月(岐阜)

Toshio Takano, Yin-ji Li, Akiko Kukita, Takayoshi Yamaza, Yasunori Ayukawa, Kiyoshi Koyano, Toshio Kukita. Mesenchyme stem cells markedly suppressed inflammatory bone destruction in rats with adjuvant-induced arthritis. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Annual Meeting, 2011年9月(SanDiego, USA)

Akira Takahashi, Akiko Kukita, Yin-ji Li, Hisayuki Nomiyama, Yasunori Ayukawa, Kiyoshi Koyano, Toshio Kukita. Involvement and regulatory role of membrane nanotubes in fusion of osteoclast precursors: A possible migration and penetration of DC-STAMP protein into osteoclast precursors through intercellular bridges. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Annual Meeting 2011 9月(SanDiego, USA)

李銀姫、久木田明子、屈鵬飛、高野登志夫、實松敬介、二ノ宮祐三、久木田敏夫 Nordihydroguaiaretic Acid は破骨細胞分化とラットアジュバント関節炎における骨破壊を抑制する。第29回日本骨代謝学会、2011年7月(大阪)

高野登志夫、李銀姫、久木田明子、山座孝義、鮎川保典、小谷野潔、久木田敏夫 間葉系幹細胞による骨破壊制御：アジュバント関節炎ラットを用いた解析。第29回日本骨代謝学会、2011年7月(大阪)

李銀姫、久木田明子、久木田敏夫 Nordihydroguaiaretic acid は破骨細胞の形成と骨吸収を抑制する。第27回日本骨代謝学会、2009年7月(大阪)

李銀姫、久木田明子、久木田敏夫
Nordihydroguaiaretic acid による破骨細胞
分化と機能の制御。第 51 回 歯科基礎医学
会、2009 年 9 月 (新潟)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

久木田 敏夫 (Kukita Toshio)

研究者番号：7 0 1 5 0 4 6 4

(2) 研究分担者

久木田 明子 (Kukita Akiko)

研究者番号：3 0 1 5 3 2 6 6

(3) 連携研究者

()

研究者番号：