

## 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24日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591945

研究課題名（和文） 間葉系幹細胞を用いた軟骨細胞が分泌する新規骨芽細胞分化調節タンパク質の同定

研究課題名（英文） Identification of osteoblast function regulating factor secreted by human mesenchymal stem cell

研究代表者

佐々木 順造（SASAKI JUNZO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30093686

研究成果の概要（和文）：

私たちは、骨髄間葉系幹細胞を用いて、骨芽細胞分化の指標である石灰化を、調整する分子を検索した。その結果、軟骨細胞から分泌される分子というよりもむしろ、その元となる間葉系幹細胞の死細胞が石灰化に重要であることを見いだした。私たちの結果は、*in vitro* で骨芽細胞による石灰化に、間葉系幹細胞のアポトーシスとネクローシス細胞が関与し、石灰化の核形成過程に死細胞の膜が関与することを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated whether cell death is induced during the calcification process by osteoblast derived from human bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*, and whether dead cells are involved in the calcification process. Our findings showed that cell death was induced in osteogenic culture of mesenchymal stem cells *in vitro*, and suggested that caspase-independent dead cells and/or necrotic dead cells of osteoblast lineage might be involved in the mechanism of bone calcification.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：整形外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学，整形外科学

キーワード：間葉系幹細胞、骨芽細胞分化、死細胞

1. 研究開始当初の背景

骨髄の間葉系幹細胞は、加わる刺激によっ

て、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、間質細胞などの異なった機能を持つ様々な細胞に分化できる。そのため、間葉系幹細胞は、再生医学の分野でも期待されており、分化の分子機構の研究にも非常に有用である。間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化には、転写因子Runx2が関与しており、これが、骨シアロタンパク質（骨形成マーカー）の発現を調節することが解明されている。

長管骨の骨形成過程で見られる軟骨内骨化は、軟骨細胞が軟骨で骨の型を形成し、これを骨芽細胞が骨に置換することで行われる。この軟骨内骨化の組織では、軟骨細胞や肥大軟骨細胞が整列した軟骨細胞層と、骨芽細胞による骨化層が完全に分かれている。私たちは、軟骨内骨化の組織学的解析から、骨芽細胞は、肥大軟骨細胞が死滅した軟骨基質を選択的に石灰化し、軟骨細胞が存在する軟骨を石灰化してないことに、着目した。これは、軟骨細胞が、骨芽細胞の分化及び石灰化を調節している可能性を示している。

軟骨細胞が骨芽細胞への分化を促進する可能性については、軟骨細胞が骨芽細胞の分化誘導因子である骨形成タンパク質 BMP を発現することで知られており、既に研究が進んでいる。しかし、軟骨細胞が骨芽細胞の分化と機能を調節する可能性については殆ど解析されていない。

申請者らは、軟骨細胞が、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化や機能を調節する分子を分泌している可能性を考え、研究を開始した。間葉系幹細胞に骨芽細胞の分化を誘導したところ、骨芽細胞分化の指標である石灰化や骨シアロタンパク質及びオステオプロテグリンの mRNA の発現が認められた。また、同じ間葉系幹細胞から培養によって軟骨細胞を分化した。この培養上清を、解析した結果、石灰化に影響を及ぼす因子が存在すること

を明らかにした。しかし、その実態は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、骨髄間葉系幹細胞を用いて、骨芽細胞の分化の指標である石灰化を調節する因子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

以下の方法を用いて解析を行った。細胞は不死化したヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて、常法により培養した。骨芽細胞の分化培養には、デキサメサゾン、 $\beta$ グリセロリン酸を含む最小培地を用いた。石灰化の検出には、カルセイン及びアリザリンレッドS染色、原子吸光法を用いた。細胞死の誘導には、凍結融解及び光線力学的細胞障害法を用いた。カスパーゼの活性化には、特異的蛍光基質を用いた。また、活性酸素生成細胞の定量には Hydroethidine 及び ArrayScan を用いた。死細胞の検出は、Propidium Iodide や Hoechst 33258 を用いた。

## 4. 研究成果

この研究の過程で、私たちは軟骨細胞が分泌する分子というよりも、分化誘導中にできる間葉系幹細胞の死細胞に、骨芽細胞の分化の指標である石灰化を調節する作用があることを発見した。死細胞が誘導する石灰化において、死細胞の膜面分が重要である事を示した。PI染色とカルセイン染色により添加した死細胞が石灰化の中心となることを示した。さらに、その死細胞は、カスパーゼ依存的に誘導されるものとそうでないもの、おそらくネクローシス様の死細胞が混在することを示した。また、この細胞死では、オートファジー関連分子の変化が認められたものの、細胞死はオートファジー阻害剤によって抑制されず、オートファジックな細胞死ではない事が示唆された。以上の結果は、in vitro で骨芽

細胞の分化の指標である石灰化に、間葉系幹細胞のアポトーシスとネクローシス細胞が関与し、石灰化の核形成過程に死細胞の膜分子が関与することを示唆した。

#### 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 7 件) 全て査読有

①Uchida M, Oyanagi E, Kremenik MJ, Sasaki J, Yano H. Interferon-beta, but not tumor necrosis factor-alpha, production in response to poly I:C is maintained despite exhaustive exercise in mice. *J Physiol Sci.* 2012 Jan;62(1):59-62.  
doi:10.1007/s12576-011-0177-4.

②Ogino T, Kobuchi H, Munetomo K, Fujita H, Yamamoto M, Utsumi T, Inoue K, Shuin T, Sasaki J, Inoue M, Utsumi K. Serum-dependent export of protoporphyrin IX by ATP-binding cassette transporter G2 in T24 cells. *Mol Cell Biochem.* 2011 Dec;358(1-2):297-307.

③Oyanagi E, Yano H, Uchida M, Utsumi K, Sasaki J. Protective action of L-carnitine on cardiac mitochondrial function and structure against fatty acid stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Aug 19;412(1):61-7.

④Fujita H, Kurokawa K, Ogino T, Ono M, Yamamoto M, Oka T, Nakanishi T, Kobayashi N, Tanaka N, Ogawa T, Suzaki E, Utsumi K, Sasaki J. Effect of risedronate on osteoblast differentiation, expression of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand and apoptosis in mesenchymal stem cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011

Aug;109(2):78-84. doi:

10.1111/j.1742-7843.2011.00685.x.

⑤Fujita H, Shiva D, Utsumi T, Ogino T, Ogawa T, Abe K, Yasuda T, Utsumi K and Sasaki J.

$\alpha$ -Tocopheryl succinate induces rapid and reversible phosphatidylserine externalization in histiocytic lymphoma through the caspase-independent pathway *Mol Cell Biochem.* 333:137-149, 2010

[学会発表] (計 40 件)

①藤田洋史、内海耕造、佐々木順造ら。骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞分化誘導に伴う細胞死と石灰化の機構解析。第 84 回日本生化学会大会(2011.9.21-24, 京都)

②Hirofumi Fujita, Junzo Sasaki et al. Effect of  $\alpha$ -tocopherol and its derivative in TNF  $\alpha$ -induced osteoclastogenesis in vitro. The 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia) (2011. 8.31-9.4, Kagoshima)

③藤田洋史、斧美緒、佐々木順造ら。In vitro における骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に伴う石灰化には細胞死が関与する。第 29 回日本骨代謝学会 (2011.7.28-30, 大阪)

④藤田洋史、佐々木順造ら。炎症性サイトカインによる破骨細胞形成機構とそれに対するビタミン E 誘導体の影響。第 64 回日本酸化ストレス学会 (2011. 7.2-3, 北海道)

⑤Hirofumi Fujita, Junzo Sasaki et al. Dead cells promote calcification of mesenchymal stem cell-derived osteoblasts in vitro. 第 116 回日本解剖学会総会・全国

学術集会 (2011. 3. 28-30, 横浜)

⑥藤田洋史、佐々木順造ら

間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に伴う石灰化における細胞死の関与. Involvement of cell death on calcification of human mesenchymal stem cell-derived osteoblast BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会) (2010. 12. 7-10, 神戸)

⑦ Utsumi K., Fujita H, Sasaki J et al. INHIBITION OF ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER G2 INCREASED MITOCHONDRIAL LOCALIZATION OF PPIX IN ALA TREATED CELLS AND ENHANCED THEIR APOPTOTIC CELLBY PHOTODYNAMIC TREATMENT. OzBio2010 Combined Conference (2010. 9. 26-10. 1, Melbourne)

⑧斧美緒、藤田洋史、佐々木順造ら. ヒト間葉系幹細胞による炎症性破骨細胞分化の制御とビスフォスフォネートの影響. The suppression of inflammatory stimuli-induced osteoclast differentiation by human mesenchymal stem cell and the action of bisphosphonate. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 (東京、2010. 7. 21-23)

⑨藤田洋史、佐々木順造、内海耕隼ら  
5-Aminolevulinic acid 依存性 protoporphyrin IX 蓄積に於ける ABC transporter の機能と光動力学作用. 第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会 (神奈川、2010. 6. 24-25)

⑩藤田洋史、佐々木順造ら. 間葉系幹細胞に

おける骨粗鬆症治療薬リセドロネートの骨芽細胞分化と RANKL 発現への影響. 第 115 回日本解剖学会総会全国学術集会 (盛岡、2010. 3. 28-30)

⑪黒川佳津子、藤田洋史、佐々木順造ら  
骨粗鬆症治療薬リセドロネートの間葉系幹細胞に対する作用-骨芽細胞分化を中心として-第 82 回日本生化学会 (神戸、2009. 10. 21-24)

⑫藤田洋史、佐々木順造ら. アポトーシスにおける活性型カスパーゼ 3 と細胞骨格構造との結合. Active form of caspase-3 binds to actin cytoskeletal structure in apoptosis. 第 82 回日本生化学会 (神戸、2009. 10. 21-24)

⑬藤田洋史、佐々木順造ら. 5-アミノレブリン酸依存性プロトポルフィリン IX を利用した癌細胞イメージングとその蓄積機構の解析, 第 18 回バイオイメージング学術集会 (岡山、2009. 9. 3-5)

⑭藤田洋史、佐々木順造、内海耕隼ら.  $\alpha$ トコフェロールサクシネートによる細胞膜ホスファチジルセリンの細胞表面転移作用と細胞死の機構. 第 12 回 Vitamin E Update Forum (東京、2009. 8. 31)

⑮ Kozo Utsumi, Junzo Sasaki et al. Involvement of caspase-dependent and -independent cell death pathways in 5-ALA-mediated photodynamic treatment in human histiocytic lymphoma cell line U937. 21st IUBMB International Congress (Shanghai, China, 2009. 8. 2-7)

⑩藤田洋史、佐々木順造ら. PC12 細胞における 6-Hydroxydopamine 誘導性アポトーシスには細胞内鉄イオンが関与する. 第 62 回日本酸化ストレス学会学術集会 (福岡、2009. 6. 11-12)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 順造 (SASAKI JUNZO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：30093686

### (2) 研究分担者

尾崎 敏文 (OZAKI TOSHIFUMI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：40294459

藤田 洋史 (FUJITA HIROFUMI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：20423288

三木 友香理 (MIKI YUKARI)  
香川県立保健医療大学・保健医療学部・助教  
研究者番号：70397876

森本 裕樹 (MORIMOTO YUKI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：00452574  
(H21 年度～H22 年度)

### (3) 連携研究者