

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：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791384

研究課題名（和文） 間葉系幹細胞の破骨細胞分化調節に対するビスホスフォネートの影響に関する研究

研究課題名（英文） The effect of human mesenchymal stem cell and risedronate on TNF-alpha-induced osteoclast differentiation

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、TNF α 刺激による破骨細胞形成に対するヒト骨髄間葉系幹細胞(hMSC)の抑制機構を解明することを目的とした。また、これに対する骨粗鬆症治療薬ビスホスフォネートの影響についても解析した。私たちの結果は、hMSCは破骨細胞形成を抑制することを示し、ビスホスフォネートは、このhMSCの作用を阻害することを示した。以上より、炎症時においてビスホスフォネートが、hMSCに対して通常の骨粗鬆症治療効果とは異なる作用を持つ可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the effect of human bone marrow mesenchymal stem cell (hMSC) and bisphosphonate on inflammatory cytokine-induced osteoclast differentiation. Our findings showed that osteoclast differentiation by TNF-alpha was suppressed by hMSC and the suppression was inhibited by bisphosphonate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

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：破骨細胞、間葉系幹細胞、ビスホスフォネート

1. 研究開始当初の背景

骨髄間質細胞の一つである骨髄間葉系幹

細胞は、分化刺激の違いにより、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞など異なった機能を持つ

細胞に分化でき、再生研究分野で期待されている。一方、この細胞は、破骨細胞の分化を促進する Receptor activator of NF κ B ligand (RANKL)の分泌と、分化を抑制する Osteoprotegerin (OPG)の分泌を介して、破骨細胞の分化を調節する。そのため、間葉系幹細胞は、破骨細胞の分化調節の分子機構の研究に、非常に有用である。

ビスフォスフォネート(BP)は、骨粗鬆症に対して最も有効な薬剤として、世界的に認められている。BP は、骨粗鬆症の原因である破骨細胞による骨吸収を抑制するだけでなく、骨髄腫における骨吸収も抑制することが明らかとなった。しかし、近年、高用量のBP で治療する骨髄腫患者を中心に、抜歯後に顎骨が壊死する副作用の報告が急増しており、国際的に問題視されている (BP 関連性顎骨壊死)。BP 関連性顎骨壊死は、数年前から報告された副作用であり、その原因や機構の大半は不明であるが、現在、抜歯の際の口腔内細菌感染が原因であるという証拠が蓄積しつつある。この際、骨吸収による顎骨骨密度の低下を伴うことが示されている(Ian RR, Bone, 2009)。しかし、骨吸収を抑制する薬剤であるBP が、顎骨の骨吸収を促進することは、矛盾している。

感染時に産生される炎症性サイトカインTNF α は、造血幹細胞由来マクロファージを直接破骨細胞へ分化させる(Azuma Y ら, JB C, 2000)。また、骨髄中で間葉系幹細胞は、造血幹細胞を未分化の状態に維持し、この細胞の血中投与は、重篤な敗血症モデルの炎症を抑制する(Nemeth K ら, Nat Med, 2009)。このように間葉系幹細胞は、免疫細胞の活性化を強く抑制する機能を持っている。そこで私たちは、BP の直接的な作用点が、間葉系幹細胞であれば上述の矛盾が、解決できると考えた。すなわち、骨粗鬆症の改善において

は、BP が、間葉系幹細胞の破骨細胞分化調節機能を阻害することで骨吸収を妨げ、一方BP 関連性顎骨壊死においては、BP が、間葉系幹細胞の免疫抑制能を低下させ、細菌感染による過剰な炎症が抑制できない為、炎症誘導性破骨細胞による骨吸収が誘導されているという可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、TNF α 刺激によるマクロファージ培養細胞の破骨細胞形成に対するヒト骨髄間葉系幹細胞(hMSC)の抑制機構を解明することを目的とした。また、これに対する骨粗鬆症治療薬ビスホスフォネートの影響についても解析した。

3. 研究の方法

細胞培養は、破骨細胞前駆細胞の培養細胞であるRAW264Dを用い、常法により培養した。破骨細胞の分化誘導はRANKL存在下TNF- α により4日間の間で誘導した。TRAP活性陽性細胞の検出は、Naphtol AS-MS phosphateを基質にFast red violet LB saltを用いて反応し、顕微鏡観察にて行った。PCRによる分化マーカー遺伝子の定量は、RNA精製後、逆転写し、特異的プライマーを用いて行った。ウエスタンブロットは、破骨細胞マーカータンパク質であるCathepsinKの特異的抗体を用いて行った。アクチンリングの検出はF-actinに結合するphalloidin-TRITCと蛍光顕微鏡を用いて行った。

4. 研究成果

RAW264D細胞は、RANKL及びTNF α の濃度に依存して、破骨細胞へ分化することをTRAP染色により確認した。このRANKL-TNF α による破骨細胞分化を、hMSCは細胞濃度に依存して抑制した。hMSCによる破骨細胞の分化制御

を調べる為に、オステオプロテゲリンや TGF β の発現を調べた結果、TNF α 処理によりこれらの遺伝子発現は一過的に誘導された。これらの結果は、炎症性破骨細胞分化に対して、hMSC が OPG などの発現を介して、調節していることを示唆した。また、ビスホスフォネートの一種の risedronate は TNF α -RANKL による破骨細胞分化を顕著に抑制した。しかし、破骨細胞形成の初期のシグナルである NF- κ B の細胞質から核への移行や、細胞質 I κ B の減少は、hMSC により抑制されなかった。また、後続するシグナルイベントである NFATc1 の核の移行に対して hMSC は抑制作用を示さなかった。これらの結果は、NF- κ B や NFATc1 シグナルよりも下流を hMSC が抑制していることを示唆する。私たちの結果は、in vitro で hMSC は破骨細胞形成を抑制することを示し、ビスホスフォネートは、この hMSC の作用を阻害することを示した。以上より、炎症時においてビスホスフォネートが、hMSC に対して通常の骨粗鬆症治療効果とは異なる作用を持つ可能性を示す。

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 5 件) 全て査読有

①Ogino 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.

②Fujita 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 receptor

activator of NF- κ 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.

③Fujita H, Shiva D, Utsumi T, Ogino T, Ogawa T, Abe K, Yasuda T, Utsumi K and Sasaki J. α -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 36 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 α -tocopherol and its derivative in TNF α -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、内海耕慥ら

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者