

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791553

研究課題名(和文) 骨芽細胞の増殖・分化・脂肪毒性における骨髄脂肪組織の影響とその制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of bone marrow adipose tissue on the proliferation, differentiation, and lipotoxicity of osteoblasts

研究代表者

内橋 和芳 (Uchihashi, Kazuyoshi)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：60452835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞が骨芽細胞分化系列に与える影響を検討するために、まず骨芽細胞が骨細胞に分化可能なin vitro解析モデルを開発した。本培養系を用いて、脂肪組織と骨芽細胞の混合培養を行った結果、1) 脂肪組織は液性因子を介して、骨芽細胞の増殖、分化を抑制した。2) 骨細胞では脂肪細胞による増殖抑制は認めず、脂肪組織による分化抑制は骨芽細胞に比べて軽度だった。3) 皮下脂肪組織と内臓脂肪組織とでは、骨芽細胞・骨細胞の増殖・分化に対する影響に差は認めなかった。脂肪組織による骨芽細胞の増殖抑制、骨芽細胞・骨細胞の分化抑制は、骨組織のホメオスタシス維持や骨粗鬆症に関与している可能性があり、治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We established a novel cell culture system, which reproduced the transition process from osteoblast to osteocyte. Using this model, we examined the effect of adipose tissue on osteoblasts/osteocytes, and found that 1) adipose tissue inhibit the proliferation and differentiation of osteoblasts by soluble factors, 2) osteocytes were more insensitive to adipose tissue than osteoblasts, and 3) no different effect was observed between subcutaneous and epididymal adipose tissues. These suppressive effects may be involved in the regulatory mechanisms of bone homeostasis.

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

キーワード：骨粗鬆症 脂肪毒性 骨芽細胞 骨細胞 脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

老人性骨粗鬆症は、脆弱性骨折の原因となるため、超高齢社会では生活の質、医療経済の両面において、その効果的な予防・治療戦略が重要である。

骨と皮下・内臓脂肪組織との全身的な関連は、これまで臨床的および基礎的な研究報告があり、肥満による BMI と骨密度が相関することや、レプチンをはじめとするアディポカインが骨形成を促進することなどが報告され、皮下・内臓脂肪組織の増加は骨形成を促進することにより、骨粗鬆症を抑制すると考えられている (Osteoporosis Int 19: 595-606, 2008)。一方、骨内では骨芽細胞と骨髄脂肪組織が隣接して存在しており、骨髄脂肪組織の骨芽細胞に対する局所的なパラクリン作用が骨髄ホメオスタシスの維持、骨粗鬆症の発症・病態に関与していると予想されるが、骨髄脂肪組織の役割については未だ解明されていない (J Cell Biochem 98:251-266, 2006)。近年、脂肪組織の増加を基盤とする肥満やメタボリック症候群では肝、膵、筋などへの異所性脂肪沈着に伴う脂肪毒性がその病態の 1 つとして注目されている (Annu Rev Med 53: 319-323, 2002)。骨髄内でも同様に骨髄脂肪組織が、脂肪毒性を介して骨芽細胞の生存・増殖・分化に影響を与え、骨粗鬆症の発症・病態に関与していることが推測されるが、その詳細は不明である。

従来、脂肪組織を長期間培養することは、その浮遊性のために困難であった。我々は、皮下、内臓、骨髄脂肪組織のコラーゲンゲル器官培養系を確立し、脂肪組織の長期維持、アディポカインや脂肪酸産生、間葉系幹細胞の再生現象を見出した。(図 2, Sonoda, Uchihashi et al. Endocrinology 149: 4794-4798, 2008; Uchihashi et al. Pathol Int 60: 259-267, 2010)。さらに、我々は脂肪組織-心筋細胞解析モデルを確立し、脂肪組織が心筋細胞の脂肪滴沈着を促進し脂肪毒性を誘導することを解明した (Anan, Uchihashi et al. Endocrinology 152: 1599-1605, 2011)。以上により、骨髄脂肪組織が骨芽細胞に与える直接的な影響を解析することが初めて可能となった。

骨芽細胞は間葉系幹細胞を起源とし、成熟型に分化し骨基質を産生した後に骨細胞、bone lining cell あるいはアポトーシスに至る。この骨芽細胞から骨細胞への分化を解析可能な細胞培養系は確立されていない。脂肪細胞が骨芽細胞および骨細胞に与える影響を検討するツールとしてとして骨芽細胞 - 骨細胞分化系列解析モデルの開発を行った。

2. 研究の目的

以上の背景から骨髄脂肪組織は骨芽細胞 - 骨細胞分化系列に脂肪毒性を誘導することが予想されるが、その詳細は不明である。さらに、脂肪組織誘導性の脂肪毒性が骨粗鬆症の発症・病態に関与していることが推測され

るが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究の目的は、1) 骨芽細胞 - 骨細胞分化系列モデルを確立すること。ならびに、2) 骨芽細胞・骨細胞の生存・増殖・分化における脂肪組織の役割とその制御機構を解明することである。

3. 研究の方法

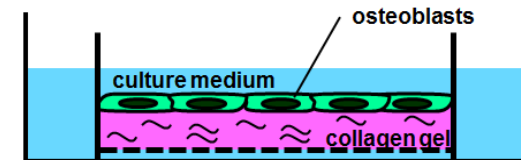
[1] 骨芽細胞 - 骨細胞分化系列モデルの開発

材料は、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 および生後 2 - 3 日のマウスから単離した初代培養骨芽細胞を用いた。

培養方法は、図 1 のように、内皿に type I collagen gel 層を作成し、その表面に骨芽細胞 40 万個を播種した。培養液には 10% 牛胎仔血清とともに骨芽細胞分化誘導因子として β -glycerophosphate と ascorbic acid を添加した。

HE 染色による形態学的解析、von Kossa 染色によるミネラル化の評価、透過型電顕による超微細構造の解析、Bromodeoxyuridine (BrdU) の 10 時間ラベリングによる増殖能の評価、TUNEL 法によるアポトーシスの評価、real-time RT-PCR および免疫組織化学による骨芽細胞・骨細胞分化マーカーの検討を行った。

【図 1】



[2] 骨芽細胞・骨細胞の生存・増殖・分化における脂肪組織の役割

材料は、骨芽細胞株 MC3T3-E1、および 5 週齢マウスの皮下、精巣周囲脂肪組織を用いた。培養方法は、まず上記の方法で内皿のゲル上に骨芽細胞を播種し 1 週および 3 週間の単独培養の期間を行う。それぞれを骨芽細胞モデル、骨細胞モデルとした。その後、脂肪組織片を包埋した外皿に、内皿を入れ 3 日間混合培養を行った (図 2)。内皿の底面はニトロセルロース膜できており、液性因子は通過可能である。HE 染色による形態学的解析、Bromodeoxyuridine (BrdU) の 10 時間ラベリングによる増殖能の評価、single strand DNA の免疫染色によるアポトーシスの評価、real-time RT-PCR および免疫組織化学による骨芽細胞・骨細胞分化マーカーの検討を行った。

【図 2】

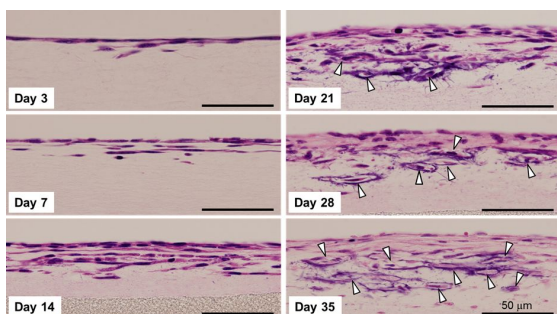


4. 研究成果

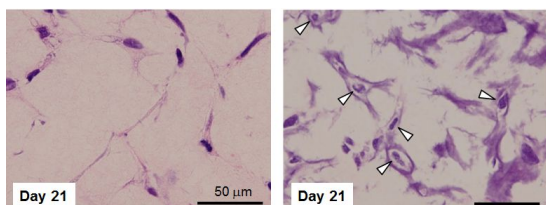
[1]骨芽細胞 - 骨細胞分化系列モデルの開発

MC3T3-E1 は、培養 3 日目以降、増殖しながらゲル内に遊走した。細胞数は、14、21 日目をピークに増加した。21 日目以降では、骨芽細胞の細胞質周囲にミネラル化がおり、骨小腔様構造を形成した。35 日目では、骨芽細胞の核にアポトーシスが見られた (図 3)。HE 染色の水平断では、骨芽細胞の細胞質が伸展し、隣接の細胞に接触していた。ミネラル化部分では、細胞周囲に骨小腔様構造、細胞間に骨細管様構造が見られた (図 4)。

【図 3】



【図 4】



初代培養骨芽細胞でも MC3T3-E1 と同様に細胞増殖、遊走がおり、より早期の 7 日目から細胞周囲のミネラル化が見られ、骨小腔および骨細管様構造が形成された。これらは、von kossa 染色にて明瞭な石灰化が証明された。

以下 MC3T3-E1 骨芽細胞での結果を示す。BrdU 陽性細胞はおもにゲルの表層付近に見られ、2 週目で最大となり、その後減少した。TUNEL 陽性細胞は、7 日までは表層、14 日目以降はゲル内で観察され、21、28 日目でピークとなった。

透過型電顕では、21 日目において細胞質に沿ってコラーゲン線維がみられた。強拡大では、明瞭な collagen bundle の合成、豊富な rough ER がみられた。35 日目では、細胞内小器官の減少、骨細胞様の細胞質突起が見られた。real time RT-PCR における骨芽細胞・骨細胞分化マーカーの検討では、コラーゲンゲル培養において、ALP (前期の骨芽細胞マーカー) は 21 日目で最大となり、オステオカルシン (成熟骨芽細胞マーカー)、PHEX、DMP1、SOST (骨細胞マーカー) は、35 日目まで徐々に発現が増加した。ゲルを用いない単層培養と比較すると、21 日、35 日では、いずれのマーカーも発現が有意に増加していた。免疫組織化学での分化マーカーの検討では、

オステオカルシンの発現は、7 日、21 日ともゲル内に遊走した細胞に発現を認めた。DMP-1 は 21 日目以降にミネラル化の細胞質側に発現が見られた。SOST は 21 日目で弱陽性となり、35 日目では、少数の細胞に強い発現を認めた。

[2] 骨芽細胞・骨細胞の生存・増殖・分化における脂肪組織の役割

骨芽細胞モデルでは、単独培養と比較して、脂肪組織との混合培養により細胞数の減少、遊走能の低下が見られた。細胞周囲のミネラル化も減少した。一方、骨細胞モデルにおいては、単独培養と同等の細胞数、遊走、ミネラル化が見られた。単位面積あたりの骨芽細胞数は、骨芽細胞モデルでは単独培養と比較して、皮下・精巣周囲脂肪組織との混合培養条件下では有意に減少していた。骨細胞モデルでは有意差はなかった。

BrdU ラベリングによる増殖能の評価では、骨芽細胞モデルにおいて、脂肪組織との混合培養では、単独培養と比較して、陽性細胞数の有意な減少が見られ、増殖能の低下が示された。骨細胞モデルにおいては、培養条件による差は認めなかった。

single strand DNA の免疫染色によるアポトーシスの評価では、骨芽細胞・骨細胞モデルのいずれにおいても有意差は認めなかった。免疫組織化学による分化マーカーの検討：オステオカルシンは、主に表層付近の細胞に発現しており、骨芽細胞モデル、骨細胞モデルの両方において、脂肪組織との混合培養で発現が低下した。骨細胞マーカーである DMP-1、SOST は、骨芽細胞モデルにおいて、脂肪組織との混合培養で発現が低下した。骨細胞モデルでは有意差は認めなかった。

real-time RT-PCR による mRNA の発現では、ALP、オステオカルシン、PHEX、DMP-1、SOST の全てにおいて、混合培養で低下傾向が見られた。

本研究では、以下のことが示された。

1) マウス骨芽細胞と皮下 / 内臓成熟脂肪組織との混合培養において、皮下 / 内臓脂肪組織は液性因子を介して、骨芽細胞の増殖、分化を抑制した。2) 骨細胞モデルでは増殖に変化はなく、骨細胞分化に対する脂肪組織の影響は骨芽細胞モデルに比べて軽度だった。3) 皮下脂肪組織と内臓脂肪組織とでは、骨芽細胞・骨細胞の増殖・分化に対する影響に差は認めなかった。

以上より、脂肪組織による骨芽細胞の増殖抑制、骨芽細胞 / 骨細胞の分化抑制は、骨組織のホメオスタシス維持や骨粗鬆症の発症、進行に関与している可能性があり、今後、骨芽細胞分化抑制に関与する仲介因子を同定し、骨粗鬆症に対する新規治療法の開発につなげたい。

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)
本研究により、以下の関連論文がサポートされ、出版された。

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Aoki S, Udo K, Morimoto H, Ikeda S, Takezawa T, Uchihashi K, Nishijima-Matsunobu A, Noguchi M, Sugihara H, Toda S. Adipose tissue behavior is distinctly regulated by neighboring cells and fluid flow stress: a possible role of adipose tissue in peritoneal fibrosis. *J Artif Organs.* ;16(3):322-31, 2013. doi: 10.1007/s10047-013-0702-8 査読あり

2. Nishijima-Matsunobu A, Aoki S, Uchihashi K, Fujimoto K, Toda S. Three-dimensional culture model for analyzing crosstalk between adipose tissue and hepatocytes. *Cell Tissue Res.* 2013 Jun; 352 (3): 611-621, 2013. doi: 10.1007/s00441-013-1588-8 査読あり

3. Uchihashi K, Aoki S, Matsunobu A, Toda S. Osteoblast migration into type I collagen gel and differentiation to osteocyte-like cells within a self-produced mineralized matrix: a novel system for analyzing differentiation from osteoblast to osteocyte. *Bone.* 52(1): 102-110, 2013. doi: 10.1016/j.bone.2012.09.001 査読あり

〔学会発表〕(計 20 件)

1. Uchihashi K, Aoki S, Matsunobu A, Yamamoto M, Toda S. Osteoblasts migrate into collagen gel and differentiate to osteocyte-like cells: a novel system for analyzing osteoblastic terminal differentiation 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research. 2013, 5, 28-6, 1. Kobe, Japan. Supplement to IBMS BoneKEy: S48

2. 内橋 和芳, 青木 茂久, 松延 亜紀, 山本 美保子, 薬師寺 舞, 山崎 文朗, 米満 伸久, 戸田 修二. 骨芽細胞の 3 次元コラーゲン培養における増殖、分化、アポトーシスの検討 2012.04. 東京. 日本病理学会会誌 101 巻 1 号 Page269

3. 内橋 和芳, 松延 亜紀, 山本 美保子, 薬師寺 舞, 青木 茂久, 小池 英介, 米満 伸久, 戸田 修二. 骨芽細胞-骨細胞分化系列解析モデルの確立. 日本内分泌病理学会 2012.10. 仙台. 日本内分泌学会雑誌, 88 巻 2 号 Page902

4. 松延 亜紀, 薬師寺 舞, 山本 美保子, 内橋 和芳, 青木 茂久, 米満 伸久, 戸田 修二. 脂肪組織-肝細胞相互作用解析モデルの確立. 日本内分泌病理学会 2012.10. 仙台. 日本内分泌学会雑誌, 88 巻 2 号 Page902

5. 内橋 和芳, 青木 茂久, 西島 亜紀, 山本 美保子, 薬師寺 舞, 米満 伸久, 戸田 修二. 脂肪組織が骨芽細胞-骨細胞分化系列に与える影響 2014.04. 広島. 日本病理学会会誌 103 巻 1 号 Page271

〔図書〕(計 1 件)

1. 内橋和芳. 中山書店. 診断病理プラクティス 骨・軟部腫瘍 2013. p411 (腱鞘巨細胞腫, びまん型巨細胞腫. 第 4 章 p253-259)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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

内橋 和芳 (KAZUYOSHI UCHIHASHI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号: 60452835

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: