

森 圭介 論文内容の要旨

主 論 文

Potential of osteoclastogenesis by adipogenic conversion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells

骨髄由来間葉系幹細胞の脂肪分化過程における破骨細胞分化誘導メカニズム

森 圭介、鈴木 啓司、穂積 晃、後藤 久貴、富田 雅人、小関 弘展、
山下 俊一、尾崎 誠

(Biomedical Research, Vol. 35 (2) ,153-159, 2014)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻

(主任指導教員：山下俊一教授)

緒 言

近年、高齢者の増加とともに骨粗鬆症に伴う骨折が増加しており、骨粗鬆症の病態解明は脆弱性骨折を予防することにおいて重要な課題である。骨粗鬆症の病態として、加齢に伴い骨髄内の脂肪組織が増加することが明らかになっているが、増加した骨髄脂肪細胞の機能的側面は未だに解明されていない。先行研究で、骨髄成熟脂肪細胞が破骨細胞分化の必須因子である receptor activator of nuclear- κ B ligand (RANKL) を発現し、破骨細胞分化を促進させることが確認された。本研究では、ヒト由来 bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSC) から骨髄脂肪細胞に分化していく過程で、どの様にして破骨細胞分化促進能を獲得するのかを明らかにすることを目的とした。

対象と方法

BMSC に adipose differentiation medium を添加し骨髄脂肪細胞に分化させた。分化誘導開始から 0、1、3、7、14 日目の細胞において、5 μ M BODIPY493/503 を培地中に添加後、脂肪滴の生成を蛍光顕微鏡で観察することで BMSC の骨髄脂肪細胞への分化を評価した。脂肪分化誘導を行った 0、1、3、7、14 日目の細胞から蛋白を抽出し、ウエスタンブロット法で、成熟脂肪マーカーである adiponectin、fatty-acid binding proteins (FABP4)、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 及び RANKL の蛋白の発現を比較検討した。

BMSC より分化した骨髄脂肪細胞の破骨細胞分化促進能を評価するため、破骨前駆細胞を 24 穴の osteo assay well plates に播種し、BMSC から骨髄脂肪細胞に 14 日間分化誘導を行った細胞と共培養した。培養液は、33 ng/ml の macrophage colony-stimulating factor と 0~24.8 ng/ml の RANKL を含んだ osteoclast differentiation medium を用いて 7 日間共培養を行った。well plates 上で von Kossa 染色を行い、各 well をデジタルカメラで撮影しイメージソフトを用いて von Kossa 染色陰性の骨吸収窩を定量化した。

結果

BMSC から骨髄脂肪細胞に分化誘導を行った 3 日目より脂肪滴の出現を認め、14 日目で BODIPY 染色において約 70%の陽性率を確認した。ウエスタンブロット法による解析では、成熟した脂肪細胞に分化するよりも前の段階である分化誘導 3 日目より RANKL 蛋白発現の増加を認め、成熟脂肪細胞マーカーである adiponectin, FABP4, PPAR γ 蛋白質の発現は 7 日目より増加を認めた。

破骨前駆細胞と骨髄脂肪細胞との共培養において、骨髄脂肪細胞単独では骨吸収窩の出現を認めなかったが、単独では破骨吸収窩を誘導しない濃度の RANKL の補助的添加 (最低で 8.3ng/ml) により、骨髄脂肪細胞との共培養で骨吸収の顕著な増加を認めた。一方、BMSC との共培養では、高濃度の RANKL (24.8ng/ml) でもごくわずかに骨吸収が認められる程度であった。

考察

BMSC は骨芽細胞や骨髄脂肪細胞など様々な多分化能を有していることが知られている。骨芽細胞が骨リモデリングに重要な役割を果たしている一方で、骨髄脂肪細胞の機能的側面は未だ明らかになっていない。近年、加齢に伴う骨髄内の脂肪蓄積と骨粗鬆症との関連性が示唆されていることも踏まえ、本研究では BMSC が骨髄脂肪細胞に分化していく過程での破骨細胞分化に対する役割について解析を行った。

その結果、BMSC から骨髄脂肪細胞への分化を開始した細胞は、分化初期の段階から RANKL を発現し破骨細胞分化を促進させることが明らかになった。興味深いことに骨髄脂肪細胞から産生される RANKL は、単独では十分な破骨細胞分化促進能を示さなかったことから、骨髄内では BMSC から同様に分化する骨芽細胞による RANKL の産生を補助する役割を持つのではないかと推察される。

また、骨髄脂肪細胞自体の RANKL 発現量は、健常人では影響のないレベルかもしれないが、高齢者では BMSC から骨芽細胞への分化は抑制され、骨髄脂肪細胞への分化誘導が促進されることが明らかになっている。高齢者では、増加した骨髄脂肪細胞から分泌される RANKL は、破骨細胞分化をより誘導することを通じて骨吸収を促進し、加齢性の骨粗鬆症の進行に寄与しているのではないかと考えられる。