九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

脂肪幹細胞における細胞外カルシウムによる骨形成の検討

矢内，理沙

https://hdl.handle.net/2324/1500616

出版情報：九州大学，2014，博士（歯学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

（様式３）

氏　　名　：　矢内　理沙

論 文 名　：　脂肪幹細胞における細胞外カルシウムによる骨形成の検討

区　　分　：甲

論　文　内　容　の　要　旨

脂肪由来間葉系幹細胞（ASCs）は、骨髄由来のものと比較して採取方法が簡便で、かつ組織中に含まれる幹細胞の量がはるかに多いため、臨床応用に最も適した幹細胞の一つと考えられる。骨形成因子（BMP-2）は骨のモデリング/リモデリングに深く関わることが報告されており、ASCs の骨形成分化を促進させる因子としても有力な候補と言われている。その一方で、破骨細胞形成を活性化するという報告もあり、このことからヒト由来 ASCs (hASCs) の骨形成分化に対して BMP-2 を作用させることについては、未だ統一した見解は得られていない。外因性 BMP-2 は腰椎椎間板変性症や脛骨骨折などの治療に使用することが試みられているが、リコンビナント BMP-2 (rBMP-2) は大量生産が困難で、また生産コストが高価であることから臨床応用は限定的である。私たちは以前の研究で、線維芽細胞は Ca^{2+}刺激により BMP-2 が産生されることを示した。そこで本研究では、hASCs における 1）リコンビナント ヒト BMP-2 (rhBMP-2) の影響、および 2）細胞外 Ca^{2+} の影響を検討することにより、hASCs を用いた骨再生の可能性について検討を行った。

hASCs は腹部採皮術を受けた患者から得た余剰皮下脂肪組織を酵素処理して分離した。rhBMP-2 の影響は骨分化誘導培地を rhBMP-2 無添加群、30 nM 添加群、100 nM 添加群として比較検討した。　hASCs の骨形成分化の評価は Alizarin red S 染色、von Kossa 染色、alkaline phosphatase (ALP) 発現、骨形成関連蛋白 mRNA と蛋白の発現をリアルタイム PCR 法、Western blotting 法で行った。その結果、hASCs は rhBMP-2 (≤ 100 nM) により濃度依存的に骨形成を促進した。次に hASCs に対する細胞外 Ca^{2+} 刺激の影響について検討を行った。細胞外 Ca^{2+} 濃度を 0.3 mM、1.8 mM、5.0 mM とし alkaline phosphatase (ALP)活性、BMP-2 mRNA および蛋白の発現を比較分析した。その結果、ALP 活性、BMP-2 発現ともに Ca^{2+} (≤ 5.0 mM) で濃度依存的に増大した。さらに、細胞外 Ca^{2+} 刺激は BMP レセプター2 (BMPR2) の発現も増強することが示された。次いで細胞外 Ca^{2+} 誘発性 BMP-2 および BMPR2 発現のメカニズムについて検討を行った。細胞外 Ca^{2+} 濃度を上昇させると細胞内 Ca^{2+} が一過性および持続性の増加を示した。増加した細胞内 Ca^{2+} は細胞質中のリン酸化 NFAT2 を脱リン酸化させ核内へと移行させた。また NFAT の脱リン酸化促進に関与する calmodulin に対する阻害剤（W-7）を作用させると細胞外 Ca^{2+} 刺激を加えても BMP-2 発現は増加しなかった。

以上の結果により、hASCs では細胞外 Ca^{2+}刺激によって calmodulin / NFAT の経路を介して

自ら BMP-2 および BMPR2 の産生を促進させ、骨芽細胞への分化を誘導することが示唆された。