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６－２）

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
論文調査委員	主　査　　九州大学　　教授　　平田　雅人 副　査　　九州大学　　教授　　久木田　敏夫 副　査　　九州大学　　教授　　樋口　勝規

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)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多いため、臨床応用に適していると考えられる。ASC を骨形成への分化に向かわせる因子として、骨のリモデリングに関わることが知られている骨形成因子（BMP-2）は有力な候補と考えられる。しかし、BMP-2 は破骨細胞形成を促すという報告もあり、ヒト由来 ASC（hASC）に対して BMP-2 を使用することに躊躇する向きもある。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。我々は以前の研究で、Ca^{2+} 刺激により線維芽細胞で BMP-2 が産生されることを示した。これらの先行結果を踏まえて、本研究では hASC におけるリコンビナントヒト BMP-2（rhBMP-2）の影響、および細胞外 Ca^{2+} の影響を検討して、hASC を用いた骨再生の可能性ついて探った。

hASC 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に rhBMP-2 を種々の濃度で加えて比較検討した。hASC の骨形成分化の評価は Alizarin red S 染色、von Kossa 染色、アルカリホスファターゼ(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、Western blotting 法などを駆使して行った。その結果、hASC は rhBMP-2（≤ 100 nM）により濃度依存的に骨形成を促進するように分化した。次に hASC に対する細胞外 Ca^{2+} 刺激の影響について検討した。細胞外 Ca^{2+} 濃度を 0.3 mM、1.8 mM、5.0 mM とし ALP 活性、BMP-2 mRNA および蛋白の発現を比較分析した。ALP 活性、BMP-2 発現ともに Ca^{2+}（≤ 5.0 mM）の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）の発現も増やすことが示された。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した。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、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 calmodulin 阻害剤、W-7 を作用させると Ca^{2+} 刺激を加えても BMP-2 発現は増加しなかった。

以上の結果は、hASC では細胞外 Ca^{2+} 刺激によって calmodulin／NFAT 経路を介して BMP-2 および BMPR2 の産生が亢進し、骨芽細胞への分化が誘導されることを示したもので、博士（歯学）の学位授与に値する。