

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：83903

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22118007

研究課題名（和文）造血細胞から破骨細胞への分化転換のメカニズム

研究課題名（英文）Mechanisms of the transition from hematopoietic cells to bone-resorbing osteoclasts

研究代表者

池田 恭治（Ikeda, Kyoji）

独立行政法人国立長寿医療研究センター・運動器疾患研究部・部長

研究者番号：00222878

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 81,400,000円

研究成果の概要（和文）：骨の破壊は、引き続き骨の再生に必須の生理過程であり、造血細胞から分化して新たに形成される多核の破骨細胞が行う。一方で、病的な数や質の破骨細胞は、閉経後骨粗鬆症や関節リウマチの原因となる。本研究では、造血細胞から、骨を破壊し骨代謝サイクル開始のシグナルを送るという特殊な機能を担う破骨細胞へと分化する過程で起こるさまざまな代謝適応や細胞周期動態とその転写ネットワークを明らかにした。また、破骨細胞に分化する過程で分泌される因子を遺伝子発現解析と生化学的手法で同定し、骨の破壊から次の再生過程への転換のメカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Bone destruction precedes subsequent bone formation and is performed by multi-nuclear osteoclasts that differentiate from hematopoietic cells in the bone marrow. Excessive osteoclastic activity underlies osteoporosis and joint destruction associated with RA. In this study we have clarified metabolic adaptations and cell-cycle dynamics that take place during the transition from hematopoietic cells to bone-resorbing osteoclasts, and the transcriptional network involved. Further, we have identified by gene expression profiling and biochemical techniques secretory products that are released at distinct stages of osteoclastogenesis and send coupling signals to the subsequent bone formation by osteoblasts.

研究分野：代謝学

キーワード：破骨細胞 分化 骨リモデリング

1. 研究開始当初の背景

骨髄での造血は骨の代謝と密接な関係がある。造血系の細胞から分化した破骨細胞が、骨を吸収することに特化した機能を獲得することによって骨の代謝を営むとともに、造血の場を確保する上でも必須の役割を担っている。

骨の代謝は、破骨細胞が骨を吸収したあと、骨芽細胞がほぼ同量の新しい骨を付加するというサイクルを繰り返す。破骨細胞が形成されるには、造血系の前駆細胞が骨芽細胞あるいはストロマ細胞と接触することが重要であることが 1980 年代に共存培養の系で明らかになり、これらの支持細胞が分泌あるいは細胞膜上に提示する M-CSF と RANKL が、破骨細胞形成に必須のサイトカインであることが 1990 年代に解明された。破骨細胞による骨吸収は、正常の骨代謝に必須である一方、機能の過剰は骨粗鬆症や関節リウマチの骨破壊などの中核となる病理像である。

破骨細胞による骨吸収は、骨代謝開始のシグナルであり、古い骨を質の良い新しい骨に置換するという重要な生理機能をもつ。研究代表者らは、RANKL の存在下で単核の前破骨細胞に分化し、さらに細胞融合によって多核の成熟破骨細胞になる過程での遺伝子発現変化をマイクロアレイによって解析し、破骨細胞の分化における内的要因 (Nature Medicine 2009) を、さらには骨内部からの細胞外刺激について明らかにしてきた (Cell Metabolism 2007)。単核の状態では骨吸収活性は弱く最終的な機能発現には細胞融合による多核化が重要であるが、その際細胞周期停止が必要条件で融合に先行するのか、周期進行のまま融合するのか、また破骨細胞分化に伴う代謝適応も重要な課題であるが未解決である。また成熟した破骨細胞は早期にアポトーシスにより死滅し、寿命はたかだか 1 週間と考えられているが、破骨細胞によって吸収された穴には、骨芽細胞が動員されて骨形成が誘導されるが、骨吸収から骨形成への転換のメカニズムについても、破骨細胞からの分泌因子 ("clastokine") という視点からはあまりアプローチされていない。

2. 研究の目的

本研究では、骨髄のマクロファージから破骨細胞への分化転換に伴う転写ネットワークとエピジェネティック制御を解析することで、造血の場形成の細胞・分子メカニズムを解明することを企図する。造血系から派生した単核細胞が、石灰化骨基質を吸収するという特性をもった多核の破骨細胞としての運命を獲得するメカニズムの解明は、造血や骨代謝という個々の研究分野を超えて、骨粗鬆症・関節リウマチ・癌の骨転移など破骨細胞の活性化が病理の中核をなす病態や、造血の場に異常をきたす病態の理解にもつながる可能性がある。

3. 研究の方法

研究代表者らは、M-CSF 依存的に増殖する

骨髄マクロファージが、TNF ファミリーのサイトカイン RANKL の存在下で単核の前破骨細胞になり、さらに細胞融合によって多核の成熟破骨細胞になる過程での経時的な遺伝子発現変化について共同研究者のマイクロアレイ解析により詳細なデータベースを獲得した。エネルギー代謝や細胞周期に関わる遺伝子群に着目して分化の時系列に沿った発現動態を定量化し、それらの発現制御の背景にある転写ネットワークや染色体修飾を明らかにするとともに、分化形質の獲得に必要な代謝適応に関わる遺伝子群の機能をレトロウイルスあるいはレンチウイルスによる機能低下実験によって検証した。細胞周期の reporter として共同研究者らが開発した Fucci 蛍光を骨髄細胞で発現するトランスジェニックマウスを理研より導入し、骨髄マクロファージを単離して M-CSF の存在下の時系列で FACS 解析を行うとともに、M-CSF/RANKL 刺激により破骨細胞へ分化誘導したときの細胞周期と分化との関連についてリアルタイムで動画撮影・解析した。また、破骨細胞分化の過程で産生・分泌されるタンパク性因子を生化学的手法および発現プロファイリングの結果をもとに探索と同定を試み、それら因子の機能を、とくに骨芽細胞系列への連携という視点から解析した。

4. 研究成果

Fucci reporter を用いた細胞周期動態の解析では、分化前半の 48 時間に S 期の波に引き続いて、G1 停止、さらに細胞融合をきっかけとしてほぼ同時に G0 と思われる濃い赤色の核が観察された。DNA 合成を hydroxyurea (HU) あるいは aphidicolin で阻害すると、破骨細胞分化も顕著に抑制されたが、同じく HU 処理をした細胞を高密度で播種すると破骨細胞形成が回復したことから、DNA 合成そのものではなく一定の細胞密度の確保が多核の破骨細胞形成に重要であると結論づけた (論文投稿中)。実際、スタートでの骨髄マクロファージの数や、分化半ばの 48 時間での前破骨細胞の数を増減させると、RANKL に対する内在性の遺伝子プログラムの発現は同じであるにもかかわらず、形成される破骨細胞の数とタイミングが、細胞数に応じて異なることが明らかになった。すなわち、細胞融合して多核の破骨細胞になる直前の細胞の数が決定的要因であるという知見は、分化途上で細胞数に影響を与える介入については (薬物であれ遺伝学的であれ)、最終分化を左右してしまうゆえ結果の解釈には注意を払う必要があることを示唆しており、破骨細胞分化に関する研究全般に対して波及効果があると考えられる。

破骨細胞の分化・機能と栄養素・細胞内代謝との関連を調べた結果、グルコースが分化には影響ないものの骨吸収機能の獲得に重要であること、グルコース取り込み輸送体である Glut1 の発現が分化の後期で上昇すること、PFK や LDH を含む解糖系酵素の遺伝子発

現も分化とともに上昇し、VEGF の発現上昇も含めてこれらの転写促進には Hif1 α が関わっていること、Hif1 α をノックダウンすると解糖系酵素や VEGF の発現とともに骨吸収機能が著明に抑制されることが明らかになった。また、分化初期からグルタミンの輸送体である Slc1a5 とグルタミン分解酵素の発現が上昇し、これらを薬理的あるいは遺伝学的に抑制すると破骨細胞分化が抑制された。グルタミン関連の遺伝子発現には c-Myc が重要であり、c-Myc 機能を阻害すると細胞分化が著明に抑制された。さらに mTOR を薬理的に阻害、あるいは flox マウス由来の骨髄細胞に adeno-Cre を感染させて遺伝学的に欠失させたところ分化も機能も著明に抑制された。以上から、Hif1 α と c-Myc によるグルコースおよびグルタミン輸送体や細胞内代謝酵素の転写制御と mTORC1 複合体/AMPK を介する代謝適応が破骨細胞の分化および機能発現に重要であると結論した (J Bone Miner Res 2013)。

破骨細胞の分化に必須のサイトカイン RANKL の産生源について、研究代表者らが作製した flox マウスを、骨芽細胞系列での deleter cre マウス、T 細胞での deleter cre マウスと交配することにより、細胞型特異的なノックアウトマウスを作出し、生理状況下でも、エストロゲン欠乏やリウマチなどの炎症時の骨吸収にも骨芽細胞系列由来の RANKL の寄与が大きいこと、また生理状況下では T 細胞由来の RANKL も骨恒常性の維持に寄与していることを明らかにした (J Bone Miner Res 2014)。

破骨細胞の分化は骨吸収に必須であるばかりでなく、破骨細胞自身がさまざまな因子 ("clastokines") を分泌あるいは細胞膜上に提示することによって、骨芽細胞系列、造血細胞、血管系など骨髄のさまざまな細胞にシグナルを送ることによって、骨吸収から骨形成へのカップリングに働き、骨リモデリング、骨髄環境の維持というきわめて重要な生理機能を担っていると考えられる。破骨細胞分化の過程における遺伝子発現プロファイリングにより、破骨細胞が最終分化しかつ骨吸収を営んでいる最中にのみ発現誘導されて細胞外に分泌される Cthrc1 を同定した (JCI 2013)。Cthrc1 の flox マウスの作製と破骨細胞特異的な遺伝子欠損モデルの in vivo での解析から、Cthrc1 が破骨細胞から骨芽細胞系列へのカップリングに働き、その作用がなくなると骨吸収後の骨形成不全により、骨の自己再生過程が遅延することが明らかになった。さらに Cthrc1 の作用機構解明をめざして、骨髄ストローマや骨芽細胞系列の標的細胞膜上に Cthrc1 と結合するタンパクを生化学的に同定し、Cthrc1 による骨芽細胞分化促進における機能と β -catenin 依存のおよび非依存的な細胞内シグナル伝達経路を明らかにした (論文作成中)。

同じく破骨細胞分化での遺伝子発現解析

により、分化初期には PDGF-A、分化後半には PDGF-B 遺伝子が発現誘導され、初期には PDGF-AA タンパクが、中期には AB アイソフォームが、後半には PDGF-BB が分泌されることを見出した (BBRC 2015)。PDGF-AA は、間葉系幹細胞に発現する PDGFR- α を介して、骨芽細胞分化に直接つながり、PDGF-BB は血管壁細胞に発現する PDGFR- β を介して、血管増生を介して骨形成を間接的に誘導するという仮説を提唱した。また、破骨細胞の培養液を大量に採取し、骨芽細胞の分化を促進する生物活性を生化学的に追跡し、補体成分の C3a を同定した (JBMR 2014)。C3 遺伝子の発現は破骨細胞分化とともに誘導され、細胞外で生成された C3a は骨芽細胞系列が発現する C3a 受容体を介して、これも破骨細胞から骨芽細胞への連携に機能していることをつきとめた。

以上、骨髄の造血細胞から破骨細胞への分化転換過程に起こる代謝適応を明らかにし、癌細胞での Warburg 効果との類似性をはじめ提唱するとともに、分化に伴う解糖系とグルタミン分解系の亢進、これに関わる HIF1 α と c-Myc による転写ネットワークを明らかにした。HIF1 α については他のグループから閉経後骨粗鬆症の病態で報告され (PNAS 2013)、c-Myc についても続報で確認されている (Nat Commun 2014)。

研究代表者は以前、骨細胞を ablation するモデルマウスを開発し骨細胞の生理機能をはじめ in vivo で実証した (Cell Metabolism 2007)。本研究ではこの成果をさらに発展させ、骨細胞におけるメカノ受容に果たすインテグリン αv の生理機能、骨細胞の鈣質コルチコイド受容体がグルココルチコイドの骨への副作用に果たす病態生理的意義を明らかにした。また、共同研究者である公募班の片山らは、骨細胞 ablation マウスを利用して、骨にレジデントの骨細胞と造血との密接な関係 (Cell Stem Cell 2013)、さらに、骨組織を超えて遠隔臓器とのクロストークを明らかにした (Cell Metab 2013)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

Rahman MM, Matsuoka K, Takeshita S, Ikeda K: Secretion of PDGF isoforms during osteoclastogenesis and its modulation by anti-osteoclast drugs. **Biochem Biophys Res Commun** 462: 159-164, 2015 (10.1016/j.bbrc.2015.04.115) 査読あり

Takeshita S, Fumoto T, Naoe Y, Ikeda K: Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL. **J Biol Chem** 289: 16699-16710, 2014 (DOI: 10.1074/jbc.M114.547919) 査読あり

Fumoto T, Takeshita S, Ito M, Ikeda K: Physiological functions of osteoblast lineage and T cell-derived RANKL in bone homeostasis. **J Bone Miner Res** 29: 830-842, 2014 (DOI:10.1002/jbmr.2096) 査読

あり

Fumoto T, Ishii K, Ito M, Berger S, Schutz G, Ikeda K: Mineralocorticoid receptor function in bone metabolism and its role in glucocorticoid-induced osteopenia. **Biochem Biophys Res Commun** 457: 407-412, 2014 (DOI:10.1016/j.bbrc.2014.03.149)査読あり

Kaneko K, Ito M, Naoe Y, Lacy-Hulbert A, Ikeda K: Integrin αv in the mechanical response of osteoblast lineage cells. **Biochem Biophys Res Commun** 447: 352-357, 2014 (DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.04.006)査読あり

Matsuoka K, Park K, Ito M, Ikeda K, Takeshita S: Osteoclast-derived complement component 3a stimulates osteoblast differentiation. **J Bone Miner Res** 29: 1522-1530, 2014 (DOI: 10.1002/jbmr.2187) 査読あり

Fumoto T, Ito M, Ikeda K: Lanthanum carbonate stimulates bone formation in a rat model of renal insufficiency with low bone turnover. **J Bone Miner Metab** 32: 484-493, 2014 (DOI: 10.1007/s00774-013-0521-2) 査読あり

Ikeda K, Takeshita S: Factors and mechanisms involved in the coupling from bone resorption to formation: how osteoclasts talk to osteoblasts. **J Bone Miner Metab** 21: 163-167, 2014 (DOI: 10.11005/jbm.2014.21.3.163) 査読あり

Takeshita S, Fumoto T, Matsuoka K, Park K, Aburatani H, Kato S, Ito M, Ikeda K: Osteoclast-secreted Cthrc1 in the coupling of bone resorption to formation. **J Clin Invest** 123: 3914-3924, 2013 (DOI:10.1172/JCI69493) 査読あり

Indo Y, Takeshita S, Ishii K, Hoshii T, Aburatani H, Hirao A, Ikeda K: Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function. **J Bone Miner Res** 28: 2392-2399, 2013 (DOI: 10.1002/jbmr.1976) 査読あり

Sato M, Asada N, Kawano Y, Minagawa K, Kawano H, Wakahashi K, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Katayama Y: Bone-buried osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism. **Cell Metab** 18:749-758, 2013 (DOI:10.1016/j.cmet.2013.09.014) 査読あり

Asada N, Katayama Y, Sato M, Minagawa K, Wakahashi K, Kawano H, Kawano Y, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Tanimoto M: Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. **Cell Stem Cell** 12: 737-747, 2013 (DOI:10.1016/j.stem.2013.05.001) 査読あり

Kaneko K, Ito M, Fumoto T, Fukuhara R, Ishida J, Fukamizu A, Ikeda K: Physiological function of the angiotensin AT1a receptor in bone remodeling. **J Bone Miner Res** 26:

2959-2966, 2011(DOI: 10.1002/jbmr.501) 査読あり

Yajima A, Inaba M, Tominaga Y, Nishizawa Y, Ikeda K, Ito A: Increased osteocyte death and mineralization inside bone after parathyroidectomy in patients with secondary hyperparathyroidism. **J Bone Miner Res** 25: 2374-2381, 2010(DOI: 10.1002/jbmr.1976) 査読あり

Akieda-Asai S, Zaima N, Ikegami K, Kahyo T, Yao I, Hatanaka T, Iemura S-i, Sugiyama R, Yokozeki T, Eishi Y, Koike M, Ikeda K, Chiba T, Yamaza H, Shimokawa I, Song Si-Y, Matsuno A, Mizutani A, Sawabe M, Chao MV, Tanaka M, Kanaho Y, Natsume T, Sugimura H, Date Y, McBurney MW, Guarente L, Setou M: SIRT1 Regulates Thyroid-Stimulating Hormone Release by Enhancing PIP5K γ Activity through Deacetylation of Specific Lysine Residues in Mammals. **PLoS ONE** 5(7): e11755 (doi:10.1371/journal.pone.0011755) 査読あり

[学会発表](計15件)

Ikeda K: How osteoclasts talk to osteoblasts. Second Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting 5月31日 Soel, Korea 2014

Takeshita S: Osteoclast-secreted Coupling Factors. 第11回 Bone Biology Forum 8月23日 三島 2014

Ikeda K: PTHrP to bone cell biology. AEB Metabolism Symposium 4月4日 Yale University, USA 2014

Ikeda K: What it takes to be an osteoclast. Daegu Univ Seminar 5月29日 Daegu, Korea 2014

Matsuoka K, Ikeda K, Takeshita S: Osteoclast-derived coupling factor Cthrc1 stimulates osteoblast differentiation through Rac1/PKC δ /ERK. The 36th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 9月15日 Houston, Texas 2014

池田 恭治: 骨リモデリングの制御機構 第57回日本リウマチ学会学術集会シンポジウム“骨代謝 分子生物学から臨床まで” 4月19日 京都 2013

Kaneko K, Ito M, Lacy-Hulbert A, Ikeda K: Integrin αv and mechano signal transduction in osteoblast lineage cells. 第86回日本生化学会大会 横浜 9月11日 2013

Matsuoka K, Ito M, Ikeda K, Takeshita S: Osteoclast-secreted complement component 3a stimulates osteoblast differentiation. The 35th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 10月6日 Baltimore, Maryland 2013

Kaneko K, Ito M, Lacy-Hulbert A, Ikeda K: Integrin αv in the mechanical response of

osteoblast lineage cells. The 35th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 10月6日 Baltimore, Maryland 2013

Fumoto T, Takehita S, Ito M, Ikeda K: Osteoblastic and T Cell-derived RANKL in Bone Remodeling and Modeling. The 35th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 10月5日 Baltimore, Maryland 2013

Indo Y, Takehita S, Aburatani H, Ikeda K: Metabolic Adaptation during Osteoclastogenesis. The 35th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 10月6日 Baltimore, Maryland 2013

池田 恭治: Signaling between osteoclasts and osteoblasts 4th International Conference on Osteoimmunology. 6月20日 Corfu, Greece 2012

池田 恭治: 骨の代謝と老化 第54回日本老年医学会学術集会 若手企画シンポジウム“筋骨格系の老化とその制御について” 6月29日 東京 2012

池田 恭治: リモデリングと骨質 シンポジウム“骨質” 第30回日本骨代謝学会学術集会 7月19日 東京 2012

松岡和彦, 池田 恭治, 竹下 淳: 破骨細胞が分泌する骨芽細胞分化促進因子の精製 第85回日本生化学会大会 12月16日 福岡 2012

〔図書〕(計11件)

池田 恭治: 骨リモデリングの制御機構 日本臨床増刊号“最新関節リウマチ学” 27: 112-115, 2014

竹下 淳: 骨吸収から骨形成へのカップリング 実験医学増刊号“骨代謝制御 そのメカニズムと最新治療” 32: 126-132, 2014

池田 恭治: 内科学 第10版、12. 内分泌系の疾患、12-5 副甲状腺・カルシトニン・ビタミンD、朝倉書店、p1626-1644, 2013

池田 恭治: 骨粗鬆症の発症メカニズム 日本臨床 増刊号“最新の骨粗鬆症学” 71: 17-20, 2013

池田 恭治: 骨の代謝と老化 日本老年医学会雑誌 50: 211-212, 2013

池田 恭治: PTH 関連蛋白、内分泌・糖尿病・代謝内科 特別増刊号「内分泌ホルモンのすべて」36: 478-482, 2013

池田 恭治: 骨細胞ネットワークの機能 THE BONE 特集“骨細胞：骨を制御する司令塔” 27: 39-42, 2013

竹下 淳: 骨リモデリングのメカニズム、アンチエイジングシリーズ 3 骨研究最前線 p45-52、NTS 10月14日、東京 2013

池田 恭治: 骨粗しょう症、アンチエイジングシリーズ 3 骨研究最前線 p69-72、NTS 10月14日、東京 2013

池田 恭治: 骨代謝制御における骨細胞の

役割 アンチ・エイジング医学 特集“骨粗鬆症とアンチエイジング” 8: 26-28, 2012

池田 恭治: 破骨細胞分化のメカニズム、“運動器疾患の予防と治療” p127-132, 長寿科学振興財団 2011

〔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
<http://www.ncgg.go.jp/department/bjd/bjd/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者
池田 恭治 (Ikeda Kyoji)
国立長寿医療研究センター
運動器疾患研究部 部長
研究者番号：00222878

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
竹下 淳 (Takehita Sunao)
国立長寿医療研究センター
運動器疾患研究部 室長
研究者番号：50263009