

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15677

研究課題名(和文)病的に活性化された破骨細胞のみを標的とする新規骨破壊制御法の開発：活性化の新概念

研究課題名(英文)Development of novel methods to regulate only pathologically activated osteoclasts: A novel Concept for the Osteoclast Activation

研究代表者

久木田 敏夫 (KUKITA, TOSHIO)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：70150464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：病的に高度な骨破壊能を獲得した破骨細胞が特異的に発現する膜表面分子を検索することを目的とした。IL-1 存在下で形成される破骨細胞に極めて高度の酸分泌能及び骨吸収能を認めたので、この破骨細胞を病的活性化破骨細胞(PAOC)と仮定した。正常破骨細胞の最終分化に必須でありインテグリン 鎖を活性化する分子の顕著な発現抑制がPAOCで認められた。更にPAOCの膜表面分子発現解析により、正常破骨細胞では認められない膜表面分子が検出された。「病的活性化破骨細胞のみを標的とする制御法」を開発する為の基盤的知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to search and find membrane molecules specific to the pathologically activated osteoclasts (PAOC), which acquired the highest bone destruction activity. As osteoclasts formed in the presence of IL-1 showed extremely high proton-secretion and bone resorbing activity, we have regarded these osteoclasts as PAOC. Data showed a marked suppression in the expression of molecules regulating terminal differentiation of normal osteoclasts and activation of integrin 3. By use of the analysis of the cell surface proteins, we have detected the cell surface molecule specifically expressed in PAOC. Through this study, we could establish the experimental basis for the development of novel therapy targeting only PAOC.

研究分野：口腔解剖学

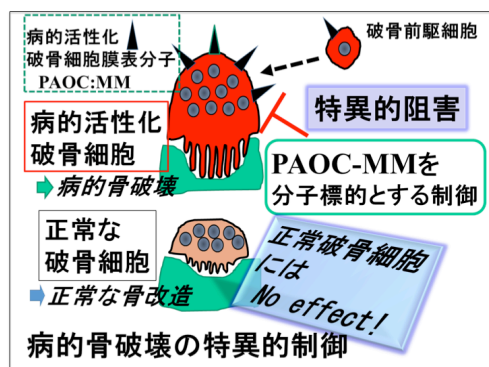
キーワード：破骨細胞 病的活性化 病的骨破壊 膜表面分子 プロテオミクス 酸感受性蛍光プローブ

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は造血幹細胞に由来するマクロファージ系の前駆細胞どうしの特異的な融合により形成される大型の多核細胞である。RANKL 等の破骨細胞分化因子により形成された破骨細胞は骨微小環境下、骨吸収に必須の構造体である刷子縁を形成し最終分化を遂げる。この過程は「活性化」とも呼ばれ、インテグリンの活性化等が重要な役割を演ずる。関節リウマチや歯周病等では激しい骨破壊が起こるが、これらの病態では破骨細胞が異常に活性化されている（「病的活性化」と呼ぶ）。炎症性の骨破壊を起こす破骨細胞は種々の炎症性サイトカインに暴露されており、細胞表面レセプター等の発現パターンが正常のものとは異なるものと推定されるが、病的に活性化された破骨細胞の膜表面分子については不明な点が多い。申請者らは活発に骨吸収を営む破骨細胞が高発現する膜表面分子を免疫学的手法で見出している (Takahashi et al. *J.Cell.Biochem.*, 2013, Matsubara et al. *PLOS ONE* 2013, Kukita et al. *Calcif.Tissue.Int.* 1998, *J.Immunol.*1994)。更に、本分子に関連した膜表面分子に対する数種類のモノクローナル抗体を得ている。近年、破骨細胞分化因子 RANKL を標的とする生物学的製剤が開発され、非常に有効な薬として実用化されたが、RANKL は免疫系でも重要な役割を演ずることから、副作用が懸念される。以上のような経緯から、正常な骨改造には全く影響を与えず、病的骨破壊のみを制御する方法論の開発に関する本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、病的に活性化された破骨細胞のみが特異的に発現する膜表面分子「病的活性化破骨細胞膜表面分子 Pathologically Activated Osteoclast Membrane Molecule: PAOC-MM」を網羅的に検索する。病的骨破壊部位における PAOC-MM 発現細胞を同定するとともに、末梢血中を循環する前駆細胞を検出する。最終目的として PAOC-MM を分子標的とする骨破壊制御法を確立する (左下図)。本



研究により、正常な骨改造を温存しつつ病的骨破壊のみを制御する新しい骨吸収制御法が誕生する。

3. 研究の方法

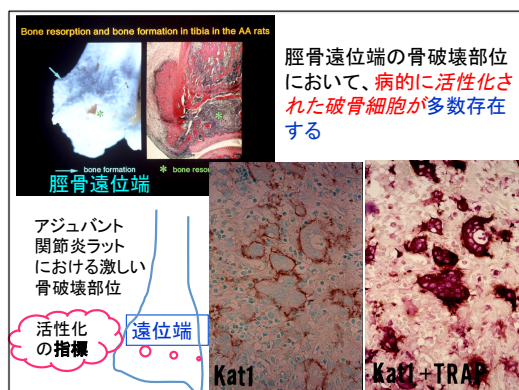
最初に破骨細胞が病的活性化を起す条件、即ち PAOC を形成する条件を検討した。具体的には種々の炎症性サイトカインを (単独あるいは様々な組み合わせで) マウス骨髄マクロファージを用いた破骨細胞形成系に添加する。形成された破骨細胞を剥離し象牙質片上に播種し、酸感受性蛍光プローブ RhPM (東京大学・薬・薬品代謝化学/医・生体情報 浦野泰照教授よりご供与) を用いてプロトン産生を検出するとともに形成された吸収窩の総面積を測定した。PAOC 形成条件を定め、ウエスタンブロット法を用いて細胞接着や破骨細胞の最終分化に関連する分子について発現解析を行なった。更に PAOC と正常破骨細胞の膜表面蛋白質をビオチン標識し、膜表面分子の発現パターンを比較した。既に得ている、破骨細胞特異的のモノクローナル抗体についても PAOC との反応性を検討した。

4. 研究成果

破骨細胞分化系に各種炎症性サイトカインを単独及び種々の組み合わせで添加し、最も高い骨吸収能を有する破骨細胞を形成する条件を詳細に検討した。その結果、IL-1 $\beta$  の存在下で形成された破骨細胞が顕著に高い骨吸収活性を有することがわかった。更に、pH 依存性蛍光プローブを用いた破骨細胞活性化のイメージング解析を行ったところ、IL-1 $\beta$  存在下に形成された破骨細胞は無刺激の破骨細胞に比べ明らかに多量のプロトン (H<sup>+</sup>) を象牙質片に向けて放出することがわかった。

IL-1 $\beta$  存在下で形成された破骨細胞を PAOC と想定し、以下の実験を行なった。正常な破骨細胞の最終分化段階である Ruffled Border 形成過程、即ち最終分化（「活性化」とも呼ぶ）においてインテグリン  $\beta_3$  の活性化が必須である。この段階に正常破骨細胞と PAOC で差があるかを検討した。インテグリン  $\beta_3$  の活性化に必須の細胞内制御分子である Kindlin-3 と Talin について蛋白質の発現を比較したところ、正常破骨細胞に比較して PAOC ではこれらの分子の著しい発現抑制が認められた。PAOC では正常破骨細胞とは異なる活性化機構が働いていることが強く示唆された。更に、細胞表面分子の発現パターンを比較したところ、PAOC のみが発現する膜表面分子を検出することができた。このような相違点が検出されたことから、PAOC は正常な破骨細胞とは異なるポピュレーションを形成している可能性が示唆された (論文リバイス中)。プロテオミクス等の技術を用いた PAOC-MM の同定・解析とともに、PAOC 特有の骨吸収機構が存在する可能性についても検討する必要がある。

一方、既に得ている抗破骨細胞モノクローナル抗体について、炎症性骨破壊の場における破骨細胞との反応性について検討した。その結果、骨表面で骨破壊を行なっている破骨細胞のみならず、骨面から少し離れた骨髄中に多数巣状に存在する病的破骨細胞の細胞膜が特異的に染色され(下図)、このモノクローナル抗体によって認識される膜表面抗原が病的な破骨細胞で高発現していることを強く示唆する所見を得た。PAOC-MMと関連性の深い分子である可能性がある。



本研究により病的に活性化された破骨細胞が特異的に発現する膜表面分子が存在することが示された。PAOC-MMを分子標的とする新規制御法が開発されれば、「正常な骨改造を温存しつつ、病的骨破壊のみを鎮静化する革新的骨破壊制御法」が創生されることとなる。このような新規制御法開発の為の重要な知見が本研究で得られた。

##### 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)

[雑誌論文] (計7件)

- 1) Osteoblast-derived Laminin-332 is a novel negativeregulator of osteoclastogenesis in bone microenvironments  
Uehara N, Kukita A, Kyumoto-Nakamura Y, Yamaza T, Yasuda H, Kukita T.  
*Lab.Invest.* (in press)  
<http://www.nature.com/labinvest/index.html>
- 2) Generation mechanism of RANKL+ effector memory B cells: relevance to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Ota Y, Niuro H, Ota S, Ueki N, Tsuzuki H, Nakayama T, Mishima K, Higashioka K, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Mitoma H, Akahoshi M, Arinobu Y, Kukita A, Yamada H, Tsukamoto H, Akashi K.  
*Arthritis Research & Therapy* 18:67, 2016  
Open Access.  
doi: 10.1186/s13075-016-0957-6.

- 3) Extremely high expression of antisense RNA for Wilms' Tumor 1 in active osteoclasts: Suppression of Wilms' Tumor 1 protein expression during osteoclastogenesis. Li YJ, Kukita A, Kyumoto-Nakamura Y, Kukita T.  
*Am.J.Pathol.* 186(9):2317-2325, 2016  
doi: 10.1016/j.ajpath.2016.05.005
  - 4) Interferon-gamma improves impaired dentinogenic and immunosuppressive functions of irreversible pulpitis-derived human dental pulp stem cells. Sonoda S, Yamaza H, Ma L, Tanaka Y, Tomoda E, Aijima R, Nonaka K, Kukita T, Shi S, Nishimura F, Yamaza T.  
*Sci Rep.* 6:19286, 2016  
doi: 10.1038/srep19286.
  - 5) 炎症性骨破壊の免疫学的制御:病的骨破壊のみを制御する「安全かつ強力な次世代型骨代謝制御法」の開発をめざして. 特集I 骨免疫学と臨床応用. 久木田敏夫, 久木田明子 臨床免疫科・アレルギー科 科学評論社 64:113-120, 2015
  - 6) Membrane Nanotube Formation in Osteoclastogenesis. Kukita T, Takahashi A, Zhang J-Q, Kukita A. In "Membrane Nanotube formation in Osteoclastogenesis" *Methods in Molecular Biology*, Ed.Pfannkuche K. Springer N.Y. USA1313:193-202, 2015  
doi: 10.1007/978-1-4939-2703-6\_14.
  - 7) Inhibition of RANKL-dependent cellular fusion in pre-osteoclasts by amiloride and a NHE-10-specific monoclonal antibody. Mine Y, Shuto T, Nikawa H, Kawqai T, Ohara M, Kawahara K, Ohta K, Kukita T, Terada Y, Makihara S.  
*Cell Biol. Int.* 39:696-709, 2015  
doi: 10.1002/cbin.10447.
- [学会発表] (計18件)
- 1) 上原範久、久木田明子、久本由香里、保田尚孝、久木田敏夫 ラミニン-332の骨芽細胞での発現と破骨細胞分化制御。第122回 日本解剖学会 2017年3月28-30日 長崎大学(長崎)
  - 2) 李銀姫、久木田明子、久本由香里、久木田敏夫 活発に機能する破骨細胞におけるWilms' Tumor-1(WT1)アンチセンスRNAの高発現と破骨細胞分化制御。第72回 日本解剖学会九州支部学術集会 2016年10月29日 長崎大学(長崎)
  - 3) 白鳥卓磨、久木田明子、上原範久、久本由香里、張旌旗、山座孝義、古谷野潔、久木田敏夫 病的に活性化された破骨細胞:形成条件の検討と蛍光プローブを用いた骨吸収イメージング。第58回歯科基礎

- 医学会 2016年8月24-26日 札幌コンベンションセンター (札幌)
- 4) 張旌旗、高橋良、白鳥卓磨、久木田明子、山座孝義、久木田敏夫 破骨細胞形成過程における細胞融合とサイトキネシスの形態学的解析. 第58回歯科基礎医学会 2016年8月24-26日 札幌コンベンションセンター (札幌)
  - 5) 久本由香里、上原範久、久木田明子、山座孝義、久木田敏夫 Galectin-9による破骨細胞分化抑制因子 MafB の発現制御 第58回歯科基礎医学会. 2016年8月24-26日 札幌コンベンションセンター (札幌)
  - 6) 山座孝義、山座治義、園田聡一郎、友田恵利佳、田中陽介、上原範久、久本由香里、野中和明、久木田敏夫 口唇口蓋裂患児由来乳歯幹細胞の解析 第58回歯科基礎医学会 2016年8月24-26日 札幌コンベンションセンター (札幌)
  - 7) 田中陽介、山座孝義、友田恵利佳、園田聡一郎、上原範久、久本由香里、久木田敏夫 根尖乳歯組織由来幹細胞の象牙質形成に対するアスピリンの影響. 第58回歯科基礎医学会 2016年8月24-26日 札幌コンベンションセンター (札幌)
  - 8) 友田恵利佳、山座孝義、山座治義、田中陽介、園田聡一郎、野中和明、久木田敏夫 ヒト乳歯幹細胞におけるビリルビン酸添加による細胞生存への影響. 第58回歯科基礎医学会 2016年8月24-26日 札幌コンベンションセンター (札幌)
  - 9) 園田聡一郎、山座孝義、友田恵利佳、田中陽介、久木田敏夫 一酸化窒素によるラット歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化促進. 第58回歯科基礎医学会 2016年8月24-26日 札幌コンベンションセンター (札幌)
  - 10) 白鳥卓麻、上原範久、久本由香里、久木田明子、徐祥赫、古谷野潔、久木田敏夫 病的骨破壊の特異的制御を目指して：炎症性サイトカイン刺激下で形成される破骨細胞は病的に活性化された破骨細胞か？ 第34回日本骨代謝学会 第3回アジア太平洋骨代謝会議 2016年7月20-23日 大阪国際会議場 (大阪)
  - 11) 上原範久、久本由香里、久木田明子、久木田敏夫 マウス骨転移性乳癌細胞由来エクソソームは破骨細胞分化を促進する. 第34回日本骨代謝学会 第3回アジア太平洋骨代謝会議 2016年7月20-23日 大阪国際会議場 (大阪)
  - 12) 久本由香里、上原範久、久木田明子、久木田敏夫 Galectin-9による破骨細胞分化抑制と転写因子 MafB の発現制御メカニズムの解明. 第34回日本骨代謝学会 第3回アジア太平洋骨代謝会議 2016年7月20-23日 大阪国際会議場 (大阪)
  - 13) 徐祥赫、蒲原麻菜、菖蒲池健夫、久木田敏夫、久木田明子 zBTB タンパク質

- LRF/OCZF の破骨細胞分化における機能と骨吸収中の破骨細胞における発現の解析. 第34回日本骨代謝学会 第3回アジア太平洋骨代謝会議 2016年7月20-23日 大阪国際会議場 (大阪)
- 14) 久木田明子、徐祥赫、菖蒲池健夫、武智香織、古賀貴子、白木誠、蒲原麻菜、久木田敏夫、高柳広 POZ-ZF 転写制御遺伝子 LRF/OCZF の破骨細胞の分化と機能における役割. 第38回日本分子生物学会 第88回日本生化学会 合同大会 12月1-4日 神戸国際会議場 (神戸)
  - 15) 久本由香里、上原範久、久木田明子、久木田敏夫 Galectin-9による破骨細胞形成抑制機構：MafB 制御系関与の可能性. 第57回歯科基礎医学会 2015年9月11-13日 朱鷺メッセ (新潟)
  - 16) 上原範久、久木田明子、久本由香里、保田尚孝、久木田敏夫 ラミニン-332による RANK 発現調節とマクロファージ-破骨細胞分化転換の制御. 第33回日本骨代謝学会 7月23-25日 京王プラザホテル (東京)
  - 17) 久本由香里、上原範久、久木田明子、久木田敏夫 Galectin-9による破骨細胞分化制御メカニズムの解明：NFATc1 の発現を抑制する転写因子 MafB 及び IRF-8 の関与. 第33回日本骨代謝学会 7月23-25日 京王プラザホテル (東京)
  - 18) 徐祥赫、舟久保立、白木誠、久木田敏夫、久木田明子 Nedd4 ユビキチンリガーゼ結合蛋白質 Pmepa1 の破骨細胞の分化と機能における新たな役割. 第33回日本骨代謝学会 7月23-25日 京王プラザホテル (東京)

[図書] (計1件)

- 1) Involvement of deoxyadenosine and adenosine deaminase in the Methotrexate-induced suppression of inflammatory bone destruction. Qu P-F, Kukita A, Li Y-J, Moriyama K, Lei L and Kukita T. *In: "Adenosine Receptors: Pharmacology, Functions and Therapeutic Aspects"* Ed. Kasandra Warrick, NOVA hardcover edited collection (by Selected Invited only). NOVA Science Publisher, N.Y. USA. Chapter V , 143-164, 2015

[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 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

久木田 敏夫 (KUKITA TOSHIO)  
九州大学・歯学研究院・教授  
研究者番号：70150464

### (2) 研究分担者

久木田 明子 (KUKITA AKIKO)  
佐賀大学・医学部・准教授  
研究者番号：30153266

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )