

令和元年5月29日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16168

研究課題名(和文) 副甲状腺ホルモンによる破骨細胞・骨芽細胞カップリングの変化及びメカニズムの解明

研究課題名(英文) Change and Mechanism of Osteoclast/Osteoblast Coupling by Parathyroid Hormone

研究代表者

永田 友貴 (Nagata, Yuki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：20779483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：副甲状腺ホルモン(PTH)は骨代謝を亢進する。PTHによる破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子EphrinB2/EphB4変化および機序を検討した。PTH投与マウス骨組織で破骨細胞EphrinB2及び骨芽細胞EphB4は増加した。破骨細胞/骨芽細胞共培養で破骨細胞形成及びEphrinB2はPTHで増加し、抗RANKL抗体で抑制された。骨芽細胞へのEphrinB2-Fc・PTH添加は骨芽細胞分化・ミネラル化を増加した。以上より、PTHは骨芽細胞RANKL発現を上昇させ、破骨細胞EphrinB2を増加する。また、EphrinB2はPTHと協調して骨芽細胞分化や石灰化を促進させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PTH 間歇的投与は骨芽細胞による骨形成を促進し、骨密度・骨質を増加させる唯一の骨形成促進薬であり、それ以外の骨粗鬆症治療薬は、破骨細胞による骨吸収を抑制し、骨密度を増加させる骨吸収阻害薬が主流である。本研究により、PTHによって、骨組織における破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子EphrinB2/EphB4の骨代謝回転における役割と、RANKLを介したの発現調節機構の存在が証明された。この機構が明らかになったことで、骨形成を促進させる新たな骨粗鬆症の治療法につながる可能性があり、本研究はトランスレーショナルリサーチとして、非常に重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Parathyroid hormone (PTH) facilitates bone turnover. We studied the mechanisms responsible for the changes of EphrinB2/EphB4, which is bidirectional osteoclast (OCL)/osteoblast (OB) coupling factor. In mice treated with PTH, EphrinB2 on OCL and EphB4 on OB were increased in bone, compared to control mice. Mice treated with RANKL also increased EphrinB2, whereas mice treated with anti-RANKL antibody attenuated EphrinB2 in bone, compared to control mice. PTH did not change EphrinB2 on OCL; however, OCL/OB co-culture with PTH showed OCL formation and EphrinB2 were increased, whereas these effects were reversed by anti-mouse RANKL antibody. On the other hand, OB treated with EphrinB2-Fc increased RANKL and PTH had an additive effect, as well as ALP and Alizarin Red staining was increased. These results indicate that PTH augments EphrinB2 derived from OCL via increased RANKL in OB. In addition, EphrinB2 on OCL promotes OB differentiation and mineralization coordinately with PTH.

研究分野：代謝内分泌

キーワード：副甲状腺ホルモン 破骨細胞 骨芽細胞 カップリング因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

副甲状腺ホルモン(PTH)は骨芽・骨細胞の副甲状腺ホルモン受容体を介して作用し、骨芽細胞分化や骨形成を促進する。活性化された骨芽・骨細胞は破骨細胞前駆細胞に発現する受容体の Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B (RANK)と結合する RANK Ligand (RANKL)発現が増加し、破骨細胞形成および骨吸収を促進する。骨リモデリングは破骨細胞による骨吸収の後に、骨芽細胞によって新たな骨が再度形成される機構であり、破骨細胞/骨芽細胞カップリングが平衡状態を保持することで成立している。近年様々な破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子が報告されており、破骨細胞/骨芽細胞それぞれに存在する細胞表面の分子の ephrin および Eph 受容体は、シグナル伝達を双方向性に行う主なカップリング因子の一つである。破骨細胞に発現する ephrinB2 と骨芽細胞に発現する受容体である EphB4 は細胞同士が接触することでシグナルを相互に伝達していることが報告されている(Zhao C et al. Cell Metab 2006)。破骨細胞において ephrinB2 を介して伝達されるシグナルは、NFATc1 発現を抑制することで、破骨細胞形成および骨吸収を抑制する。一方、骨芽細胞において EphB4 を介して伝達される ERK シグナルは、骨芽細胞分化および骨形成を促進する。これらの ephrinB2/EphB4 の双方向性シグナルによって、破骨細胞/骨芽細胞は骨リモデリングを調節していることが示されている。副甲状腺に発生した腺腫や過形成から PTH が過剰に分泌される病態である副甲状腺機能亢進症では、この骨リモデリングの均衡が崩れており、骨吸収優位の高回転型骨粗鬆症を示すことは以前より良く知られているが、現在のところ、副甲状腺機能亢進症における骨組織でのカップリング因子の変化やその機序に関しては明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、持続的 PTH 過剰状態によって、破骨細胞/骨芽細胞の ephrinB2/EphB4 カップリング発現が変化し、その変化した ephrinB2/EphB4 により、骨吸収・骨形成がどのように調節されるかを検討とした。さらにその機序を検討し、PTH による破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子の変化を介して、副甲状腺機能亢進症に伴う骨粗鬆症のメカニズムの一旦を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

動物実験において、副甲状腺機能亢進症モデルとして 6 週齢 C57BL6J マウスに PTH1-34 を充填した浸透圧ポンプを皮下に埋没し、25 µg/kg/day の割合にて 2 週間の持続投与を行った。また、骨吸収促進モデルとして、6 週齢 C57BL6J マウスに RANKL 0.5 mg/kg を 24 時間あけて 2 回腹腔内投与し、24 時間後に検体を採取した。骨吸収抑制モデルとして、抗 RANKL 抗体 5 mg/kg を腹腔内投与し、2 週間後に検体を採取した。

骨芽細胞の初代培養として、C57BL6J マウスから採取した大腿骨を 20% ウシ胎仔血清(FBS) 添加 -Minimum Essential Medium (-MEM) に 100 U/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した培地中で培養し、遊走した細胞を使用した。単核球の初代培養から破骨細胞様細胞を誘導するために、6~10 週齢の C57BL6N 雌マウス的大腿骨から骨髓を採取し、比重遠心法により単球分画を得た。分離した単球にマクロファージコロニー刺激因子 (Macrophage Stimulating Factor; M-CSF) 20 ng/mL を添加し 3 日間培養した後、破骨細胞分化誘導因子である RANKL 50 ng/mL を添加して 4 日間培養し、破骨細胞様細胞を誘導した。破骨細胞/骨芽細胞共培養では、上記にて誘導した破骨細胞様細胞をセルスクレイパーにて剥離し、 $2\sim 3 \times 10^4$ /mL で播種した。翌日に骨芽細胞をトリプシンによって剥離後に 1×10^5 /mL で播種し、実験に使用した。上記の培養系を用い、PTH および OPG、抗 RANKL 抗体による添加実験はそれぞれ 48 時間行い、PBS 洗浄後に RIPA 溶解液にてタンパク抽出を行った。

4. 研究成果

(1) PTH 持続投与によるカルシウム代謝への効果

PTH 持続投与群では、vehicle 投与群と比較して、有意な血清カルシウム値の上昇およびリン値の低下を認めた。このことは原発性に過剰な PTH が分泌される原発性副甲状腺機能亢進症症例での血液生化学検査における特徴と一致する。また、血清クレアチニン値は PTH 持続投与群で軽度ではあるが有意に上昇を認め、高カルシウム血症に伴う脱水もしくは腎機能障害が示唆された(図 1)。

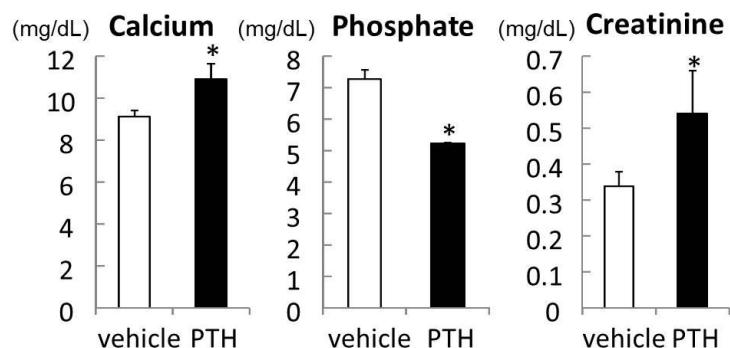


図1. PTH持続投与による血清カルシウム、リン、クレアチニンへの影響

(2) PTH による骨組織における ephrinB2/EphB4 変化

PTH 持続投与マウス骨組織・抽出液では、vehicle 投与群と比較して、Cathepsin K や ALP 発現増加も認められ、PTH により破骨細胞および骨芽細胞が活性化され骨代謝回転が亢進していることが示された。上記検体では PTH 投与群において、破骨細胞 ephrinB2 及び骨芽細胞 EphB4 発現は増加した(図2)。また、in vitro では破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞への分化に伴い EphrinB2 発現は増加した。このことから破骨細胞の分化が促進するに伴って ephrinB2 発現が増加することが示唆された。

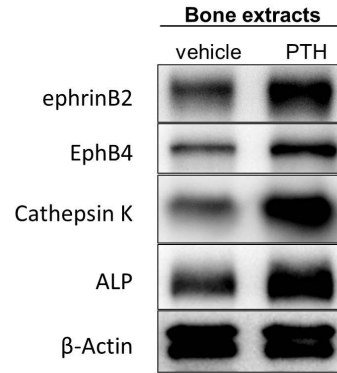


図2. PTH持続投与マウス骨抽出液における ephrinB2/EphB4発現量の変化

(3) 破骨細胞/骨芽細胞 ephrinB2/EphB4 発現が PTH によって変化する機序

破骨細胞単独培養において、PTH 添加しても破骨細胞の分化や EphrinB2 発現に変化なかったが、破骨細胞/骨芽細胞共培養においては PTH 添加により破骨細胞形成及び EphrinB2 発現は増加し、osteoprotegerin (OPG) 添加でそれらは抑制された(図3)。WT マウスへの RANKL 投与によって、骨組織 TRAP 陽性細胞数の増加およびそれらの細胞での ephrinB2 発現は増加を認めた(図4)。反対に抗 RANKL 抗体を投与した WT マウス骨形態計測で Oc.S/BS, N.Oc/BS, ES/BS は有意に低下し、同マウス骨抽出液の ephrinB2 発現も有意に低下した。このことから、PTH は破骨細胞に直接作用するのではなく、骨芽細胞における RANKL 発現を増加させることで破骨細胞の形成や成熟を促進し、ephrinB2 発現が増加することが明らかとなった。

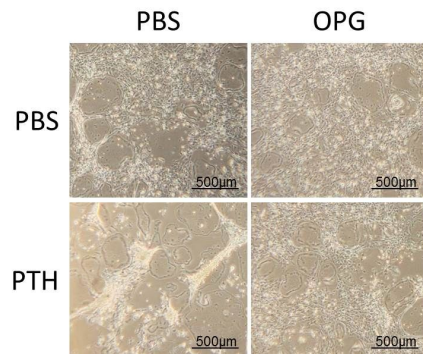


図3. 破骨細胞/骨芽細胞共培養における PTH および OPG の効果

(4) 骨芽細胞分化およびミネラル化と ephrinB2/EphB4 シグナルの検討

PTH 添加し培養した骨芽細胞の培養上清で破骨細胞形成は増加し、EphB4-Fc 添加で低下した。骨芽細胞への EphrinB2-Fc 添加で ALP 及びアリザリンレッド染色は増加し、PTH 同時添加で更に増加した。このことから、破骨細胞で増加した ephrinB2 は PTH と共に骨芽細胞分化やミネラル化に寄与することが示唆された。

(5) まとめ

PTH によって骨代謝回転が亢進すると同時に、破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子である ephrinB2/EphB4 発現は増加することが示された。その機序として、PTH によって骨芽細胞の RANKL 発現が上昇することで、破骨細胞の形成や成熟が促進し、ephrinB2 発現が増加すると考えられた。増加した破骨細胞の ephrinB2 は PTH と協調して骨芽細胞分化や石灰化を促進させることが明らかとなった。一方、EphB4 の発現増加の機序に関しては、はっきり示すことはできなかった。骨バジェット病では、異常に活性化した破骨細胞から過剰に分泌される IGF1 や IL-6 によって、骨芽細胞 EphB4 発現が増加することが示されており(Teramachi J, et al. J Clin Invest 2017)、原発性副甲状腺機能亢進症においてもこの機構を介して EphB4 は調整されている可能性はあると考えられる。

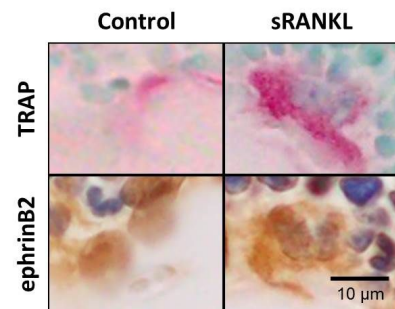


図4. RANKL投与マウスにおける TRAP陽性細胞での ephrinB2発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) 永田 友貴、宮岡 大知、林 礼行、今西 康雄、稲葉 雅章. 副甲状腺ホルモンによる破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子 EphrinB2/EphB4 変化の検討. 第9回大阪副甲状腺ホルモン研究会、2019年1月5日、大阪市立大学(大阪府)
- 2) 永田 友貴、今西 康雄、宮岡 大知、林 礼行、山田 真介、都井 律和、絵本 正憲、稲葉 雅章. 副甲状腺ホルモンによる破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子の変化、第 35

回 Kobe Parathyroid & Bone Forum、2018年11月8日、ANAクラウンプラザホテル神戸（兵庫県）

- 3) 永田 友貴、今西 康雄、前田 朋美、宮岡 大知、林 礼行、絵本 正憲、稲葉 雅章．原発性副甲状腺機能亢進症モデルにおいて、副甲状腺ホルモンは破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子 EphrinB2/EphB4 を増加させる．第 38 回日本骨形態計測学会、2018 年 6 月 23 日、大阪国際交流センター（大阪府）
- 4) 永田 友貴、今西 康雄、宮岡 大知、林 礼行、都井 律和、山田 真介、絵本 正憲、稲葉 雅章．副甲状腺ホルモンによる破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子の変化．第 38 回日本骨形態計測学会 スポンサーセミナー 1、2018 年 6 月 22 日、大阪国際交流センター（大阪府）
- 5) 永田 友貴、今西 康雄、前田 朋美、宮岡 大知、林 礼行、絵本 正憲、稲葉 雅章．原発性副甲状腺機能亢進症モデルにおいて副甲状腺ホルモンは破骨細胞/骨芽細胞カップリング因子 EphrinB2/EphB4 を増加させる．第 19 回日本骨粗鬆症学会、2017 年 10 月 20 日、大阪国際会議場（大阪府）
- 6) Yuki Nagata, Yasuo Imanishi, Tomomi Maeda, Daichi Miyaoka, Noriyuki Hayashi, Masaaki Inaba. Parathyroid Hormone Increases EphrinB2/EphB4 of Osteoclast/Osteoblast Coupling Factor in Primary Hyperparathyroidism Model. ASBMR 2017 Annual Meeting, 2017 年 9 月 9 日, Denver (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。