

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09506

研究課題名(和文)破骨細胞出現の場を制御する骨芽細胞膜表面分子：新しい骨改造調節機構に基づく骨再生

研究課題名(英文)Osteoblast-specific cell-surface antigen regulating recruitment of osteoclasts:
Bone regeneration based on the new concept concerning the regulation of bone remodeling

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：石灰化制御を含む骨改造制御に関与する新規骨芽細胞特異的膜表面分子(A7抗原)を見出し解析した。質量分析により候補分子・インスリン受容体様分子(IRLM)を同定した。ウェスタンブロッティング及びPCR解析により、IRLMは初代骨芽細胞が発現する膜表面蛋白質であることがわかった。IRLM抗体とA7抗体を用いてIP/IB法によりA7抗原がIRLMであることを強く示唆する所見を得た。IRLMは特定の培養環境に対するセンサーの機能を有することが報告されているため、初代骨芽細胞を特定環境で処理したところ、石灰化が有意に亢進した。骨組織においても本分子が環境センサーとして機能する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規骨芽細胞特異的膜表面分子が骨改造において制御的な役割を果たしており、特定の環境因子のセンサーとして機能する可能性を見出した。本研究から導き出される骨改造制御に関する新しい概念に基づいて、新しい治療法を開発することが可能となる。超高齢化社会に入り骨疾患が増加する一方にある我国において、本研究は社会的意義が極めて深い研究である。

研究成果の概要(英文)：We have found and analyzed a novel osteoblast-specific cell surface molecule (A7 antigen) involving regulation of bone remodeling and calcification. By use of MASS spectroscopic analysis, we have identified insulin receptor-like molecule (IRLM) as one candidate for A7 antigen. We have obtained lines of evidence showing IRLM is actually expressed on cell surface of primary osteoblasts. We have also obtained strong evidence demonstrating that A7 antigen is highly associated with IRLM itself by use of IP/IB analysis. IRLM is reported as the sensor for a specified culture environment. When primary osteoblasts were treated with the specified culture environment, calcification was significantly stimulated. It was suggested that A7 antigen/IRLM acts as a sensor for the specific environment in bone tissues.

研究分野：骨代謝

キーワード：破骨細胞 骨芽細胞 石灰化 骨改造制御 血管 環境センサー

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞により古い骨が吸収されると、骨芽細胞が骨基質成分を分泌し吸収窩を埋めていく。この過程が骨組織の複数の箇所でも繰り返されることにより、骨の新陳代謝である「骨改造」が行われる。骨改造開始点に破骨細胞が出現し骨吸収を始めることにより骨改造が始まると考えられるが、骨改造の明確な「開始点」の実態については不明の点が多い。RANKLにより破骨細胞が形成されることは良く分かっているが、RANKLが発現される部位に必ずしも破骨細胞が出現するとは限らない。生体内で骨改造の主役である破骨細胞が出現する正確な部位については未だに不明の点が多い。また骨芽細胞により骨基質が分泌された後、石灰化が開始されるが、石灰化を制御する仕組みについても不明の点が多い。

ところで近年、血管内皮細胞にサブポピュレーションが存在することが明らかにされた。長管骨の骨幹端には、骨形成細胞に分化する「オステオプロジェニター」の分化を誘導する能力を有する血管内皮細胞から構成されるH型血管が走っており、骨幹部では造血幹細胞の維持をもつぱら行うL型血管が走っていることが知られている。破骨細胞分化や機能も血管によって制御されることが知られているが、血管内皮サブポピュレーションとの関係は分かっていない。

2. 研究の目的

骨形成細胞である骨芽細胞膜表面上に特異的に発現されると推定される「骨改造制御膜表面分子」を検索し、プロテオミクス等により分子の解析・同定を行うことを目的とした。また、炎症性骨破壊における破骨細胞形成制御に血管内皮サブポピュレーションが関与する可能性についても検証することを目的とした。

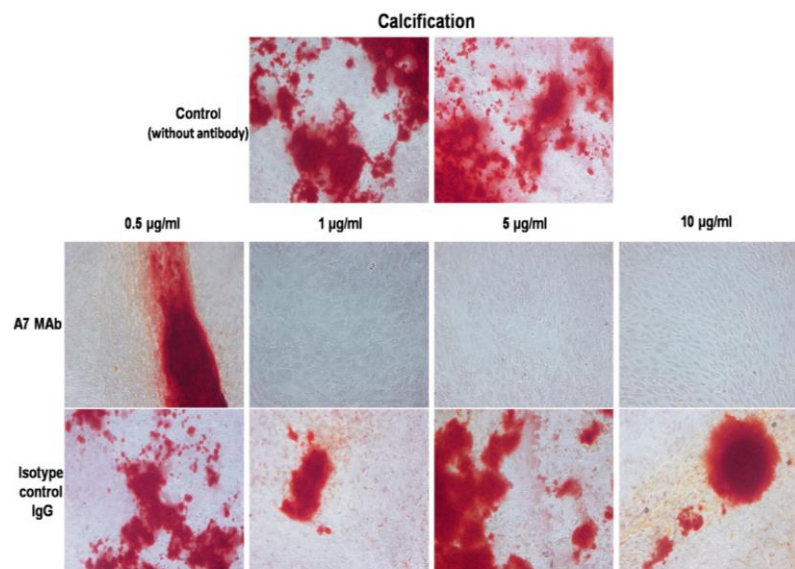
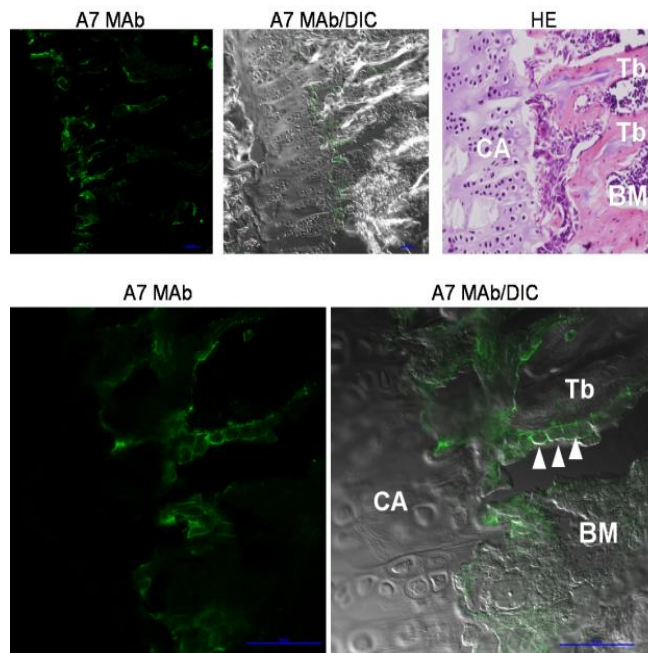
3. 研究の方法

抗原として未固定のラット骨肉腫細胞株 ROS17/2.8 細胞クローンを Balb/c マウスの腹腔内に投与した。免疫を繰り返し、最終免疫の3日後に脾臓を摘出した。脾細胞を調製し、マウス骨髄腫細胞 P3U1 細胞とポリエチレングリコール法を用いて細胞融合後、通法により HAT 選択培地で培養し、多数のハイブリドーマを得た。抗原細胞特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択し、限外希釈法によるクローニングを2回実施することにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得た。ラット骨髄細胞を用いた破骨細胞分化系への反応性(染色性及び分化制御能)も検討した。抗原細胞及び初代骨芽細胞の膜表面に特異的に反応し、且つ破骨細胞分化を制御するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。ラット骨肉腫細胞株 ROS17/2.8 細胞クローン及び新生仔ラット頭蓋冠由来初代骨芽細胞の細胞膜表面蛋白質をビオチン化後、或いは細胞をそのまま、RIPA バッファーにて可溶化した。A7Mab 結合 Dynabeads Protein G を用いて免疫沈降を行った。ビオチン化膜表面蛋白質については SDS-PAGE 後、メンブレンに転写し、ストレプトアビジン-HRP を用いて膜表面抗原を検出した。Whole cell lysate については、免疫沈降物をトリフルオロ酢酸 (TFA) により溶出し SDS-PAGE 後、質量分析用の銀染色を施し、検出されたバンドについて質量分析を行った。質量分析によって同定された候補分子の発現を rtPCR 法 および免疫沈降・ウェスタンブロッティング (IP/IB) 法により確認した。

更に初代骨芽細胞について、特定の培養環境の石灰化への影響について検討した。A7 抗原の組織学的発現パターンを共焦点レーザー顕微鏡等を用いて解析した。アジュバント関節炎ラット及び正常ラットの距腿関節を含む組織の凍結切片を作成し、病理組織学的検定に用いた。破骨細胞マーカーとしてカタプシン K、H 型血管内皮細胞のマーカーとしてエンドムチンを用い、それぞれ特異的抗体により検出した。

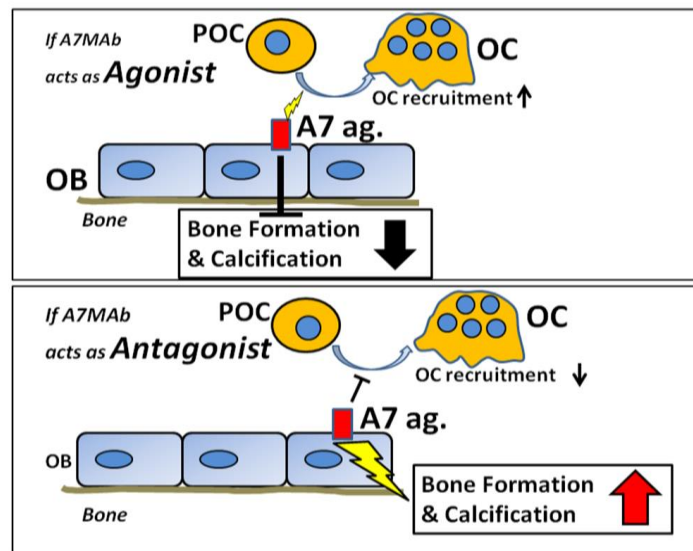
4. 研究成果

- (1) 骨改造制御に関与すると考えられる新規骨芽細胞特異的膜表面分子 (A7 抗原) を見出し報告した (Badawy T. et al. Laboratory Investigation 2019) (右図)。A7 抗原を特異的モノクローナル抗体 (A7 Mab) で刺激すると破骨細胞形成が穏和に促進された。A7 抗原の発現は骨芽細胞に非常に特異的であり、骨芽細胞の一部のポピュレーションと骨基質に埋没したばかりの骨芽細胞 (骨細胞) が発現していた。A7 Mab を用いた架橋実験 (クロスリンクング実験) を行ったところ、初代骨芽細胞の石灰化が A7 Mab の添加により強力に抑制されることが分かった (下図)。



- (2) 質量分析により推定された候補分子としてインスリン受容体様分子 (IRLM) を同定した。ウェスタンブロッティング法および rtPCR 解析により、IRLM は初代骨芽細胞が発現する膜表面蛋白質であることを確認した。IRLM 抗体と A7 Mab を用いて IP/IB 法により解析したところ、A7 抗原が IRLM であることを強く示唆する所見を得た。

- (3) IRLM は特定の培養環境に対するセンサーの機能を有することが報告されているため、初代骨芽細胞をその培養環境で処理したところ、石灰化が有意に亢進した。骨組織においても本分子が環境因子センサーとして機能する可能性が示唆された。なお、骨肉腫細胞が短いタイプの IRLM を主として発現することを示唆する所見も得られ、短いタイプの IRLM の発現が骨肉腫の病態と関連性がある可能性が示唆された。本研究により骨芽細胞が特異的に発現する IRLM が石灰化を制御する可能性が強く示唆された。
- (4) 組織学的解析により A7 抗原陽性骨芽細胞と破骨細胞が近接して存在する傾向と、破骨細胞がエンドムチン陽性血管内皮細胞で構成される H 型血管と密接して存在することがわかった。破骨細胞形成が A7 抗原陽性骨芽細胞ポピュレーションと H 型血管による制御を受けているものと考えられた。
- (5) 本研究より骨改造に於いて A7 抗原を発現する骨芽細胞が制御的な役割を果たしていることと、特定の血管により骨改造が制御されている可能性が強く示唆された。骨改造の新規制御法を開発する為の基礎的且つユニークな知見が本研究により得られた (下図)。



- (6) 本研究により、環境センサーを介した骨改造制御に関する新しい概念が構築されることとなり、この概念に基づいた新規骨代謝制御法が誕生することとなる。骨疾患を有する患者の数が増加の一途をたどっている超高齢化社会の我国において、本研究は非常に有益な研究であると思われる。このように本研究は社会的にも極めて意義深い研究であると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kamohara A, Hirata H, Xu X, Shiraki M, Yamada S, Zhang JQ, Kukita T, Toyonaga K, Hara H, Urano Y, Yamashita Y, Miyamoto H, Kukita A.	4. 巻 32
2. 論文標題 IgG immune complexes with Staphylococcus aureus protein A enhance osteoclast differentiation and bone resorption by stimulating Fc receptors and TLR2.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. Immunol.	6. 最初と最後の頁 89-104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxz063.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shiraki M, Xu X, Iovanna JL, Kukita T, Hirata H, Kamohara A, Kubota Y, Miyamoto H, Mawatari M, Kukita A	4. 巻 33
2. 論文標題 Deficiency of stress-associated gene Nupr1 increases bone volume by attenuating differentiation of osteoclasts and enhancing differentiation of osteoblasts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 8836-8852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.i096/fj. 201802322RR.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanaka Y, Sonoda S, Yamaza H, Murata S, Nishida K, Kyumoto-Nakamura Y, Uehara N, Nonaka K, Kukita T, Yamaza T, Tanaka Y	4. 巻 45
2. 論文標題 Acetylsalicylic Acid Treatment and Suppressive Regulation of AKT Accelerate Odontogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Endod.	6. 最初と最後の頁 591-598
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.joen.2019.01.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Badawy T, Kyumoto-Nakamura Y, Uehara N, Zhang J, Sonoda S, Hiura H, Yamaza T, Kukita A, Kukita T	4. 巻 99
2. 論文標題 Osteoblast lineage-specific cell-surface antigen (A7) regulates osteoclast recruitment and calcification during bone remodeling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lab. Invest.	6. 最初と最後の頁 866-884
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-018-0179-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Xu X, Hirata H, Shiraki M, Kamohara A, Nishioka K, Miyamoto H, Kukita T, Kukita A.	4. 巻 33
2. 論文標題 Prostate transmembrane protein androgen induced 1 is induced by activation of osteoclasts and regulates bone resorption.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 4365-4375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201801573R. Epub 2018 Dec 17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shiratori T, Kyumoto-Nakamura Y, Kukita A, Uehara N, Zhang J, Koda K, Kamiya M, Badawy T, Tomoda E, Xu X, Yamaza T, Urano Y, Koyano K, Kukita T.	4. 巻 200
2. 論文標題 IL-1 Induces Pathologically Activated Osteoclasts Bearing Extremely High Levels of Resorbing Activity: A Possible Pathological Subpopulation of Osteoclasts, Accompanied by Suppressed Expression of Kindlin-3 and Talin-1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Immunol.	6. 最初と最後の頁 218-228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1602035. Epub 2017 Nov 15.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamaza H, Sonoda S, Nonaka K, Kukita T, Yamaza T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Pamidronate decreases bilirubin-impaired cell death and improves dentinogenic dysfunction of stem cells from human deciduous teeth.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Res.Ther.	6. 最初と最後の頁 303-314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-018-1042-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Funakubo N, Xu X, Kukita T, Nakamura S, Miyamoto H, Kukita A.	4. 巻 233
2. 論文標題 Pmpa1 induced by RANKL-p38 MAPK pathway has a novel role in osteoclastogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Cell. Physiol.	6. 最初と最後の頁 3105-3118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.26147. Epub 2017 Sep 20.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tamer Badawy, Yukari Kyumoto-Nakamura, Norihisa Uehara, Akiko Kukita, Toshio Kukita
2. 発表標題 Osteoblast-specific cell surface antigen regulating osteoclastogenesis and calcification. A possible unique modulator of bone remodeling
3. 学会等名 American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Badawy Tamer, 久本由香里、上原範久、張旌旗、山座孝義、久木田明子、久木田敏夫
2. 発表標題 Osteoblast Lineage-Specific Cell Surface Antigen Regulation Osteoclastogenesis and Calcification. A Possible New Player in Bone Remodeling
3. 学会等名 第60回 歯科基礎医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tamer Badawy, 久本由香里、上原範久、久木田明子、久木田敏夫
2. 発表標題 Novel Osteoblast-Lineage Specific Cell-Surface Antigen Possibly Regulating Osteoclastogenesis and Calcification 破骨細胞形成と石灰化を制御する可能性を有する新規骨芽細胞膜表面抗原
3. 学会等名 第36回 日本骨代謝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久本由香里、上原範久、久木田明子、久木田敏夫
2. 発表標題 破骨細胞分化制御における Galectin-9/Tim-3 シグナルの関与
3. 学会等名 第36回 日本骨代謝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦原麻菜、徐祥赫、白木誠、平田寛人、久木田敏夫、久木田明子
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌のプロテインAとIgG複合体による骨破壊促進機構
3. 学会等名 第36回 日本骨代謝学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久木田 明子 (Kukita Akiko) (30153266)	佐賀大学・医学部・准教授 (17201)	
研究分担者	久本 由香里 (Kyumoto Yukari) (40729026)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------