

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19390474
 研究課題名（和文） 骨芽細胞の免疫調節機能に及ぼす細胞分化とメカニカルストレスの影響
 研究課題名（英文） Effects of cell differentiation and mechanical stress on immuno-regulatory functions of osteoblasts
 研究代表者 松口 徹也（MATSUGUCHI TETSUYA）
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：10303629

研究成果の概要：高齢化社会を迎えて社会問題化しつつある骨粗鬆症、骨関節症、歯周病等の疾患の新たな治療・予防法開発のために、骨代謝の中心的細胞である骨芽細胞が注目されている。本研究では、いくつかの鍵分子（免疫性分泌因子、細胞内酵素など）を中心とした解析から、骨芽細胞が持つ①免疫調節能、②細胞分化、および③メカニカルストレス応答性の三つの機能が有機的に連関することを示し、新しい観点から骨芽細胞の機能解析を進めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2008 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨芽細胞、細胞分化、シグナル伝達、遺伝子発現、メカニカルストレス、ケモカイン、JNK、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

1) 骨芽細胞分化：間葉系幹細胞に由来する分化骨芽細胞は、骨マトリックスの形成能と、RANKL を介した破骨細胞の成熟誘導によって、骨代謝の中心的役割を果たす。骨芽細胞の分化には RUNX2、osterix (OSX)、NFATc1、ATF4 などの転写因子、BMP シグナル、Wnt/ β -catenin

シグナルなどが重要な働きをすることが明らかになったが、それ以外の一般的シグナル伝達機構の詳細な役割については不明な点が多かった。

2) 骨芽細胞とメカニカルストレス：メカニカルストレスが骨代謝に関係することは、運動負荷による骨粗鬆症予防、低出力超音波刺激による骨折治療機転の促進、

歯科矯正などの臨床応用でも証明されており、メカニカルストレスが骨芽細胞の細胞増殖や分化に影響すると考えられていた。しかし、骨芽細胞におけるメカニカルストレスの感知機構、細胞内シグナル伝達機構などの詳細は不明であった。

3) 骨芽細胞の持つ免疫調節能：骨芽細胞は病原体分子パターン認識レセプター (PRP: pattern recognition receptor) の代表である TLRs (Toll-like receptors) や、MHC クラス II 分子、T 細胞に対する共刺激分子である CD40、細胞内 PRP である Nod1/2、白血球走化作用をもつケモカインなどを発現することが明らかとなり、免疫反応における骨芽細胞の役割が注目され始めていた。

2. 研究の目的

骨芽細胞は、骨マトリックス産生と破骨細胞の機能制御によって、骨代謝の中心的役割を果たすことが知られている。現在、高齢化社会を迎えて社会問題化しつつある骨粗鬆症、骨関節症、歯周病等の疾患の新たな治療・予防法開発のために、新しい観点からの骨芽細胞機能の解明が求められている。最近、骨代謝と免疫の密接な関連が注目されてきた。本研究では我々の研究成果を含めた最新の知見に基づき、骨芽細胞の①免疫調節機能を中心に、②細胞分化および③メカニカルストレス応答性を含めた3点の解析を進め、特にそれら相互の関連性を明らかにするという新たな観点から、骨芽細胞機能のより良い解明を目指した (図1)。

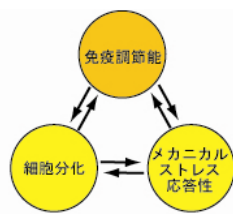


図1

3. 研究の方法

1) 骨芽細胞分化に関わる免疫系シグナル伝達分子の解明

①骨芽細胞分化過程におけるシグナル伝達分子発現量の解析

マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 およびマウス頭頂骨由来初代培養骨芽細胞をアスコルビン酸 + β グリセロフォスフェート (VitC + β GP) 存在下で培養すると数週で細胞外マトリックスの石灰化を伴う成熟型骨芽細胞に分化する。分化過程における細胞内シグナル伝達分子の発現量変化をウェスタンブロット法にて解析した。我々が以前マクロファージから単離した MAP kinase phosphatase isolated form macrophages (MKP-M) は MAP キナーゼ

の中で c-Jun N-terminal kinase (JNK) を極めて特異的に脱リン酸化 (不活性化) するユニークなフォスファターゼであり、マクロファージの機能調節 (サイトカイン産生量など) に特に重要な働きを示す (Matsuguchi et al. Mol. Cell. Biol. 2001)。

抗MKP-M抗体を用いたウェスタンブロット法にて、細胞内のMKP-Mタンパク量が骨芽細胞分化に伴って著明に減少することを発見した (図2)。



図2

②骨芽細胞分化過程における JNK 活性の役割の検討

JNK 特異的フォスファターゼであるMKP-Mの発現量変化がJNK活性に及ぼす影響を検討するために、骨芽細胞分化過程におけるJNKの蛋白量、リン酸化レベル (キナーゼ活性を反映) の経時的变化を解析した。

次に JNK の特異的酵素阻害剤投与により、JNK 活性の強弱が骨芽細胞分化に与える影響について解析を行った。

③MC3T3-E1 細胞株へのテトラサイクリンによる誘導性発現システム (Tet-On システム) の導入

Tet-On システムにより、MC3T3-E1 細胞にMKP-M、およびJNKの発現を誘導し、それぞれの発現誘導が骨芽細胞分化に与える影響を検討することで、骨芽細胞分化におけるJNK活性の機能的役割を検討した。

④MKP-M ノックアウトマウスの作製

MKP-M 遺伝子ノックアウトのためのターゲットプラスミドを作成した (図3)。

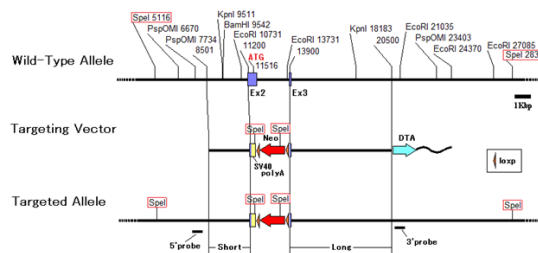


図3 マウス MKP-M 遺伝子ターゲッティング

このターゲッティングプラスミドを C57BL/6 マウス ES 細胞に導入し、homologous recombination を確認した ES 細胞株を使って MKP-M^{-/-}マウスの産出を試みた。MKP-M^{-/-}の遺伝子型はサザンブロット法にて確認した。さらに MKP-M^{-/-}マウス同士の交配によって MKP-M^{-/-}マウスの作成を試みた。

2) 骨芽細胞におけるメカニカルストレス応答の網羅的解析

①骨芽細胞におけるメカニカルストレス応答遺伝子発現の gene chip による解析

分化させた MC3T3-E1 細胞 (メカニカルストレスに高反応性) にメカニカルストレス (LIPUS: 低出力超音波) を加え (図 4)、gene chip によって遺伝子発現パターンの変化を網羅的に解析した。

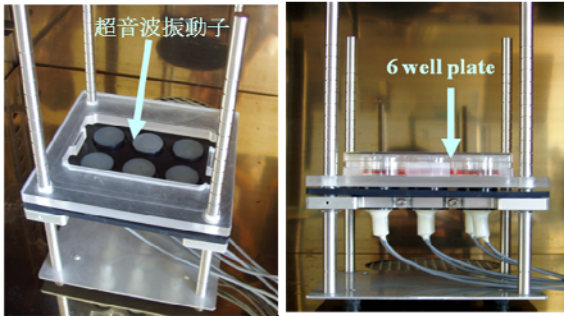


図 4 低出力超音波発生装置

Gene chip にて有意な発現変化の見られた遺伝子については、RT-PCR 法、ノーザンブロッティング法を別途に行ってその発現パターンを確認した。特にケモカイン、サイトカイン、細胞内シグナル伝達分子などの発現変化に注目し、骨芽細胞の免疫機能とメカニカルストレスの関連について考察を進めた。

②骨芽細胞メカニカルストレスレセプターとその下流シグナル

培養骨芽細胞を用いた実験系で、発現プラスミド導入、RNAi によるノックダウン、シグナル阻害剤添加などの方法で解析を進め、骨芽細胞におけるメカニカルストレスレセプターの同定およびその下流シグナル伝達機構についての検討を進めた。

4. 研究成果

1) 骨芽細胞分化と JNK

①骨芽細胞分化には JNK 活性が必須の働きをしている。

MC3T3-E1、マウス初代培養骨芽細胞の両細胞系において、特異的 JNK 阻害剤 (SP600125) の投与は骨芽細胞の分化 (細胞外マトリックスの石灰化によって判断) を著しく抑制した (図 5)。

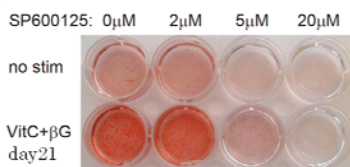


図 5 JNK 阻害による骨芽細胞分化抑制 (VitC+βG: アスコルビン酸+βグリセロフォスフェート)

また Tet-On システムにより MC3T3-E1 細胞に MKP-M の発現を強制誘導したところ、同様に骨芽細胞分化の抑制が認められた。

次に Tet-On システムによる JNK の各 isoform (JNK1a1、2a1、2a2) の発現誘導が分化に与える影響を解析したところ、JNK2a2 (p54JNK2) の強発現が特異的に骨芽細胞分化を促進したが、他の isoforms の発現誘導では分化促進効果が認められなかった。

一方、ウェスタンブロッティングによる解析により、MC3T3-E1 の細胞分化に伴って、JNK2a2 のタンパク発現量が増加し、MKP-M のタンパク量はやや減少した。これらの所見より、骨芽細胞の分化に、JNK 活性が isoform 特異的に重要な役割を果たす可能性が強く示唆された。

②JNK 活性は転写因子 ATF4 の発現誘導を介して、骨芽細胞分化後期に重要な役割を果たす。

SP600125 処理が骨芽細胞分化マーカーの発現に与える影響を解析したところ、分化初期～中期のマーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性やオステオポンチン (OPN) mRNA 発現の抑制は認められなかったが、分化後期のマーカーであるオステオカルシン (OCN) や骨シアロタンパク質 (BSP) の mRNA 発現は著明に抑制された。 (図 6)

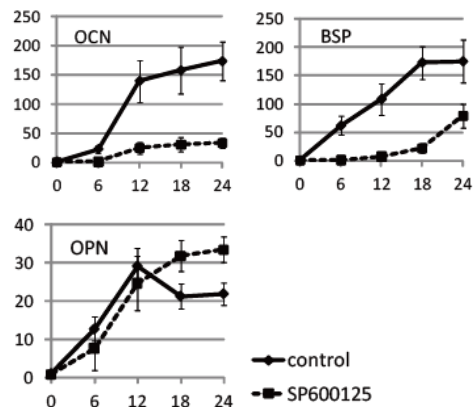


図 6 マウス初代培養骨芽細胞の分化日数 (横軸) に伴う骨分化マーカー遺伝子の相対的 mRNA 発現量 (縦軸) の推移

次に、骨芽細胞分化に重要な役割を果たすことが知られる転写因子の発現に対する JNK 活性抑制の影響を調べたところ、RUNX2、OSX に対する影響は認められなかったが、ATF4 の発現が著明に抑制された (図 7)。ATF4 は骨芽細胞分化後期に特異的に働く転写因子であることが知られており、これらの所見より、JNK 活性、特に JNK2a2 活性が、転写因子 Atf4 の発現量調節を介し

て骨芽細胞分化後期に特に重要な役割を果たすことが強く示唆された。

以上の研究成果は、骨代謝研究のリーディングジャーナルである *Journal of Bone and Mineral Research* 誌に掲載された。

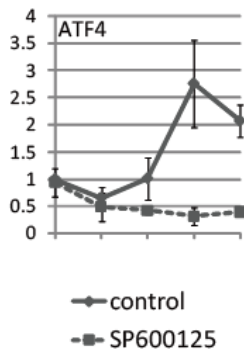


図7 マウス初代培養骨芽細胞の分化日数(横軸)に伴う *atf4* 遺伝子の相対的 mRNA 発現量(縦軸)の推移

③MKP-M ノックアウトマウスの作製

マウス MKP-M 遺伝子ノックアウトのためのターゲットプラスミド(図1)を C57BL/6 マウス由来 ES 細胞に導入し、サザンブロッティングにて homologous recombination を確認した6つの ES 細胞クローンを Balb/c マウス胚盤胞に注入し、2系統のキメラマウスを作成した。これらのキメラマウスを C57BL/6 マウスと交配させ、生まれた F1 黒色マウス14匹中7匹(♂2, ♀5)は PCR genotyping 陽性で、MKP-M ヘテロ KO マウスと判断した(図8)。今後このマウスのかけ合わせからホモ KO マウスを産出し、その表現形を解析していく。



図8 MKP-M KO F1 マウス

2) 骨芽細胞におけるメカニカルストレス応答の網羅的解析

① Gene chip による網羅的解析

MC3T3-E1 細胞株に対してメカニカルストレスとして低出力超音波(LIPUS)処理を行い、Gene chip によって、メカニカルストレス反応性に発現が上昇する遺伝子を同定した。解析した45105遺伝子のうち、2倍以上の有意義な発現亢進を認めた遺伝子が226

個認められた。そのうちには、数種類のケモカインや、後述する AMP-activated kinase (AMPK)が含まれ、その他にも骨分化に関わる幾つかの遺伝子(Msx-2など)の発現も有意に上昇していた。

②骨芽細胞からのメカニカルストレス反応性のケモカイン産生

骨では常時盛んな新陳代謝が行われており、骨組織中には各分化段階の骨芽細胞および骨細胞が共存する。骨芽細胞のメカニカルストレス応答性とその分化段階の関係を検討した。アスコルビン酸によって3週間分化させた骨芽細胞では、より未分化の骨芽細胞に比べて、低出力超音波刺激による RANKL、ケモカイン(MCP-1、MIP-1β)の発現誘導が著しく増強していた。なお、この応答性はさらに分化の進んだ骨細胞においては減弱した(図9)。

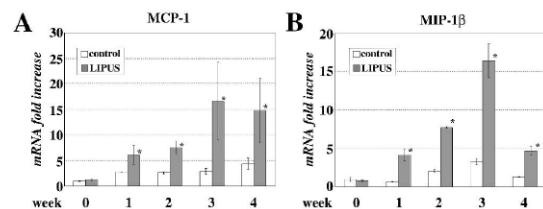


図9 各分化段階におけるLIPUS処理によるケモカイン遺伝子発現量の比較

興味深いことに、心筋細胞のメカニカルストレス受容体として同定されたアンジオテンシンIIタイプ1レセプター(AT1)が骨芽細胞でも発現されており、その各分化段階での発現量変化とAT1の特異的阻害剤(candesartan)を用いた実験の所見は、AT1が骨芽細胞のメカニカルストレス受容体の少なくとも一つとして重要な機能を持っていることを強く示唆していた(図10)。

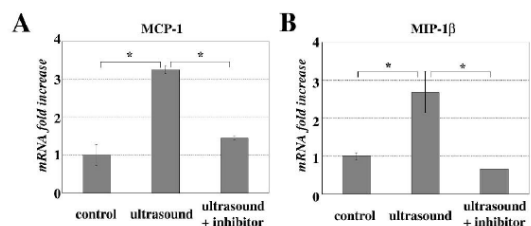


図10 分化骨芽細胞におけるメカニカルストレス誘導性ケモカイン遺伝子発現はAT1を介する。

3) AMP-activated kinase (AMPK)が骨芽細胞に及ぼす影響

前述の様に、メカニカルストレス反応性遺伝子の一つとして AMP-activated kinase (AMPK)を同定した。興味あることに、AMPKの活性化剤投与によって骨芽細胞分化は著

明に抑制された (図 1 1)。

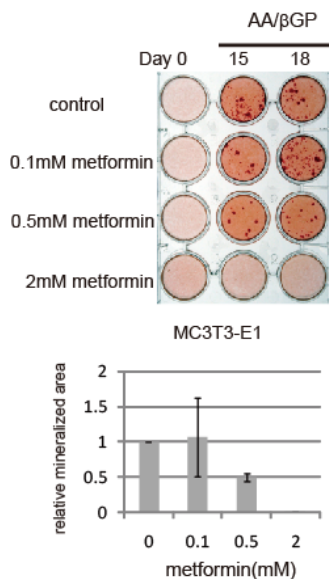


図 1 1 AMPK 活性化剤 metformin は骨芽細胞分化を強力に抑制した。(上図はアリザリン染色像。下図は染色された石灰化結節を相対的に数値化したもの。)

AMPK の活性化によって骨芽細胞分化はその初期から抑制がかかり、OPN 遺伝子発現、ALP 活性なども著明に抑制された。

転写因子の mRNA レベルの解析より、この分化抑制は、骨芽細胞分化のマスターレギュレーターとされる RUNX2 の転写抑制によるものであることが分かった。

4) 歯科臨床とメカニカルストレス

① ヒト periodontal ligament cell (PDL 細胞) における IL-8 産生機構

ヒト PDL 細胞は矯正力に反応してケモカインである IL-8 を産生する。PDL 細胞における IL-8 産生には構成的な IL-1 β 産生が必須であることを示し、歯科矯正臨床との関連について考察した。(Maeda, Matsuguchi et al. J. Dental Res. 86, 629-634, 2007.)

② 矯正的歯牙移動に及ぼす歯周炎の影響

マウスモデルを用いて、実験的歯周炎の存在が、矯正的歯牙移動に抑制的に働くことを示した。(Okamoto, Matsuguchi et al. Eur J Oral Sci. 117, 238-247, 2009.)

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 10 件)

1. 松口徹也 骨芽細胞分化と JNK シグナル (ミニレビュー) 生化学, in press. 査

読無.

2. Matsuguchi T, Chiba N, Bandow K, Kakimoto K, Masuda A, Ohnishi T. JNK activity is essential for Atf4 expression and late-stage osteoblast differentiation. J Bone Miner. Res. 24, 398-410, 2009. 査読有.
3. Okamoto A, Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Chiba N, Maeda A, Fukunaga T, Miyawaki S, Matsuguchi T. Reduction of orthodontic tooth movement by experimentally induced periodontal inflammation in mice. Eur J Oral Sci. 117, 238-247, 2009. 査読有.
4. Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Machigashira M, Matsuyama T, Matsuguchi T. Oxidative stress causes alveolar bone loss in metabolic syndrome model mice with type 2 diabetes. J Periodont. Res. 44, 43-51, 2009. 査読有.
5. Yaomura T, Tsuboi N, Urahama Y, Hobo A, Sugimoto K, Miyoshi J, Matsuguchi T, Reiji K, Matsuo S, Yuzawa Y. Serine/threonine kinase, Cot/Tpl2, regulates renal cell apoptosis in ischaemia/reperfusion injury. Nephrology (Carlton). 13, 397-404, 2008. 査読有.
6. Chiba N, Masuda A, Yoshikai Y, Matsuguchi T. Ceramide inhibits LPS-induced Production of IL-5, IL-10, and IL-13 from Mast Cells. J Cell Physiol. 213, 126-136, 2007. 査読有.
7. Maeda A, Soejima K, Bandow K, Kuroe K, Kakimoto K, Miyawaki S, Okamoto A, Matsuguchi T. Force-induced IL-8 from periodontal ligament cells requires IL-1 . . . J. Dental Res. 86, 629-634, 2007. 査読有.
8. Matsuzaki T, Takagi A, Ikemura H, Matsuguchi T, Yokokura T. Intestinal microflora: probiotics and autoimmunity. J Nutr. 2007 Mar;137(3 Suppl 2):798S-802S. Review. 査読有.
9. Masuda A, Hashimoto K, Yokoi T, Doi T, Kodama T, Kume H, Ohno K, Matsuguchi T. Essential role of GATA transcriptional factors in the activation of mast cells.

J Immunol. 178, 360-368, 2007. 査読有.

10. Bandow K, Nishikawa Y, Ohnishi T, Kakimoto K, Soejima K, Iwabuchi S, Kuroe K, Matsuguchi T. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) induces RANKL, MCP-1, and MIP-1beta expression in osteoblasts through the angiotensin II type 1 receptor. J Cell Physiol. 211, 392-398, 2007. 査読有.

[学会発表] (計 12 件)

1. 大西智和, 坂東健二郎, 柿元協子, 千葉紀香, 松口徹也. 高グルコース培養が骨芽細胞のメカニカルストレス反応性に及ぼす影響. 第 12 回超音波骨折治療研究会. 2009 年 1 月、東京.
2. 坂東健二郎, 柿元協子, 大西智和, 千葉紀香, 松口徹也. 軟骨細胞の分化における AMP-activated protein kinase (AMPK) の機能的役割. 第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会. 2008 年 12 月、神戸.
3. 千葉紀香, 松口徹也. LPS によるマスト細胞活性化における Cot/Tpl2 の役割. 第 38 回 日本免疫学会. 2008 年 12 月、京都.
4. 葛西貴之, 坂東健二郎, 鈴木啓, 千葉紀香, 柿元協子, 大西智和, 川本真一郎, 長岡英一, 松口徹也. Roles of AMPK in Osteogenic Differentiation. 第 56 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR). 2008 年 11 月、名古屋.
5. 大西智和, 柿元協子, 坂東健二郎, 松口徹也. 実験的歯周炎における歯槽骨吸収の Cot/Tpl2 による制御. 第 26 回日本骨代謝学会学術集会. 2008 年 10 月、大阪.
6. 岡本敦子, 大西智和, 福永智広, 前田綾, 宮脇正一, 松口徹也. 歯周炎モデルマウスにおける矯正歯の移動度の減弱. 第 67 回日本矯正歯科学会大会. 2008 年 9 月、千葉.
7. 坂東健二郎, 大西智和, 柿元協子, 千葉紀香, 松口徹也. マウス骨芽細胞における TRPC 発現に対する LIPUS の影響. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会. 2007 年 12 月、横浜.
8. 松口徹也, 千葉紀香, 坂東健二郎, 柿元協子, 大西智和. 骨芽細胞分化における JNK シグナルの役割. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回 日本生化学会大会合同大会. 2007 年 12 月、横浜.
9. 柿元協子, 千葉紀香, 坂東健二郎, 大西智和, 松口徹也. IL-23 および IL-27 の発現に対する Tpl2/Cot シグナルの影響. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会. 2007 年 12 月、横浜.
10. 大西智和, 坂東健二郎, 柿元協子, 松口徹也. メタボリックインドローームを持つ 2 型糖尿病モデルマウスの歯槽骨吸収に酸化的ストレスが及ぼす影響. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回 日本生化学会大会合同大会. 2007 年 12 月、横浜.
11. 葛西貴行, 坂東健二郎, 松口徹也, 長岡英一. 骨芽細胞の分化およびメカニカルストレス応答性における飢餓センサーキナーゼ (AMPK) の機能的役割. 第 55 回 JADR 総会. 2007 年 11 月、横浜.
12. 前田綾, 副島和久, 坂東健二郎, 岡本敦子, 黒江和斗, 宮脇正一, 松口徹也. 機械的刺激による歯根膜細胞の IL-8 産生に IL-1β は必要である. 第 49 回 日本矯正歯科学会. 2007 年 9 月、大阪.

[その他]

一部の研究成果について、第 9 回 (2007) および第 10 回 (2008) 鹿児島骨代謝研究会で発表した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松口 徹也 (MATSUGUCHI TETSUYA)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：10303629

(2) 研究分担者

大西 智和 (Ohnishi Tomokazu)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：30244247

柿元 協子 (KAKOMOTO KYOKO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：40274849

坂東 健二郎 (Bandow Kenjiro)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：50347093