

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19390476

研究課題名（和文） 破骨細胞のトランスサイトosisによる骨代謝制御機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the regulated mechanism of bone metabolism by osteoclastic transcytosis.

研究代表者

宇田川 信之(UDAGAWA NOBUYUKI)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号 70245801

研究成果の概要：骨を壊す細胞である破骨細胞の働きが過剰になると、骨粗鬆症などの疾患が生じる。本研究では、(1) 破骨細胞からトランスサイトosis経路により L-グルタミン酸が分泌される、(2) その過程にカルシウム及びカルシウム依存性プロテインキナーゼが関与する、(3) L-グルタミン酸により骨吸収が抑制される、(4) 破骨細胞から L-グルタミン酸が分泌されないマウスでは骨吸収が亢進し、骨量が減少する、ということを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：破骨細胞、トランスサイトosis、VGLUT1、L-グルタミン酸、骨粗鬆症

## 1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は骨を消化し、発生した骨分解産物をエンドサイトosisにより細胞内へと吸収し、骨吸収面とは反対の機能的分泌領域から細胞外へ放出すると考えられている。この過程はトランスサイトosisと呼ばれ、破骨細胞の非常に重要な機能であ

ると考えられている。しかし、その詳細な分子機構は不明である。

我々は破骨細胞からのL-グルタミン酸分泌に関して以下の5点を明らかにしていた。(1) 破骨細胞の骨分解産物を含有するトランスサイトosis小胞に小胞型グルタミン酸輸送体(Vesicular glutamate transporter;

VGLUT) 1 が発現している。(2) L-グルタミン酸が、トランスサイトシス小胞内に濃縮されており、高カリウム刺激または、ATP 刺激により骨分解産物と共に細胞外へと分泌される。(3) トランスサイトシスを介した L-グルタミン酸と骨分解産物の分泌はカルシウム、cAMP 及び温度に依存的な制御された過程である。(4) 分泌された L-グルタミン酸が自身に発現している代謝型グルタミン酸受容体(mGluR8)に作用して、トランスサイトシスと骨吸収を抑制する。(5) VGLUT1 を欠損したマウス (VGLUT1 KO マウス) は骨粗鬆症様の形質を示す。

## 2. 研究の目的

研究の背景に示した (1) から (5) の結果は、トランスサイトシスにより破骨細胞から分泌されるL-グルタミン酸が、オートクライン的な負の制御因子として機能していることを示している。しかしながら、L-グルタミン酸分泌 (トランスサイトシス) のメカニズム及び骨組織におけるグルタミン酸の詳細な役割については不明である。それらを解明することは、L-グルタミン酸シグナルによる骨代謝制御を明らかにする上で解決すべき課題であると考えた。そこで、(1) 破骨細胞からのL-グルタミン酸分泌を指標としてトランスサイトシスの分子機構を明らかにすること、(2) VGLUT1 KOマウスの形質をより詳細に検討し、L-グルタミン酸シグナルの生理的な役割を明らかにすること、の2点を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 破骨細胞からの L-グルタミン酸分泌

1~2日齢 ddY マウスの頭蓋冠から骨芽細胞を調製し、6週齢 ddY マウスの骨髄細胞と活性型ビタミン D<sub>3</sub> 存在下で7日間共存培養し、多核の破骨細胞が形成された時点でトリプシン処理により骨芽細胞を除去した。6時間後、リンガー液に置換し、50 mM 塩化カリウムまたは1 mM ATP を含むリンガー

液により刺激した。阻害剤は、刺激の 30 分前から添加した。

### (2) 骨形態計測

8週齢及び16週齢のマウスに、テトラサイクリンを腹腔投与した。8週齢の場合は2日後、16週齢の場合は3日後にカルセインを腹腔投与し、その2日後に屠殺した。腰椎、大腿骨及び脛骨を採取した。計測は、伊藤骨形態計測研究所に依頼した。

### (3) マイクロ CT による骨量測定。

8週齢及び16週齢のマウスから大腿骨を採取し、遠心側の成長板から、1 mm 下を基点として、そこから1.5 mm の範囲の CT 像をコンピューターで解析し、骨組織量に対する骨量の比を算出した。

### (4) 血清骨代謝パラメーターの測定

8週齢のマウスから得た血清中に含まれる骨形成マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)の活性を測定キットにより定量した。骨吸収マーカーである TRACP5b 量については、ELISA キットにより定量した。

### (5) 炎症モデルマウス

関節に炎症を起こすモデルである、Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ トランスジェニック (Tg)マウスを購入し、VGLUT1 ヘテロ欠損マウスと掛け合わせた。VGLUT1 ヘテロ欠損でかつ TNF- $\alpha$  Tg であるマウス同士を掛け合わせ、VGLUT1 KO TNF- $\alpha$  Tg マウスを得た。炎症の程度を評価するため、四肢の腫脹部の幅を測定し、TNF- $\alpha$  Tg ではないマウスと比較した。

### (6) L-グルタミン酸不含培地を用いた骨吸収活性測定系

骨吸収活性を測定する際に用いられる培地 ( $\alpha$ -MEM) には、高濃度 (約 500  $\mu$ M) の L-グルタミン酸が含まれている。また、そこに添加するウシ血清 (FBS) にも L-グルタミン酸が約 100  $\mu$ M 含まれている。そのため、

L-グルタミン酸の骨吸収抑制効果は、L-グルタミン酸受容体の阻害剤を用いた間接的な知見であった。

骨器官培養に用いられる BGJb 培地には、L-グルタミン酸が含まれていない。この培地単独では、破骨細胞の生存を維持できず、骨吸収活性を測定できなかつた。そこで、0.5% ウシアルブミンを添加することで、破骨細胞の生存が維持され、L-グルタミン酸を含まない培地を用いて骨吸収活性を評価する系を確立できた。

#### 4. 研究成果

(1) トランスサイトosisの分子基盤の解明

トランスサイトosisによるL-グルタミン酸分泌にたいするおけるcAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)及びカルシウム依存性プロテインキナーゼ(PKC)の関与を調べた。高カリウムまたはATP刺激による破骨細胞からのL-グルタミン酸分泌は、PKC阻害剤であるカルフォスチンCにより濃度依存的に阻害され、500 nMで完全に阻害された。しかし、PKA阻害剤であるKT5720は、1 μMでもほとんど阻害効果を示さなかつた。このことから、トランスサイトosisは、カルシウム、PKC、cAMPに依存的でPKAに非依存的な経路により起こることが示唆された。

(2) VGLUT1 KOマウスの骨及び骨代謝についての解析

8 週齢及び 16 週齢の野生型及び VGLUT1 KO マウスについて骨形態計測、マイクロ CT による骨量測定を行った。8 週齢マウスについては血清骨代謝パラメーターについても測定した。8 週齢マウスでは、骨吸収パラメーターである TRACP5b と骨形成パラメーターである ALP 活性が VGLUT1 KO マウスで共に上昇していた。骨形態計測でも 8 週齢では、骨形成速度、骨吸収速度ともに VGLUT1 KO マウスで増加しており、骨代謝回転が亢進していることが明らかになった。しかし、16 週齢においては、骨吸収速度、骨形成速度

共に野生型及び VGLUT1 KO マウスで有意差が認められなかつた。骨量については、8 週齢では有意差がなく、16 週齢では、VGLUT1 KO マウスで 10~15%程度低下していた。個体数を増やした解析により、これは、有意な差であることを確認した。

(3) 炎症性モデルにおけるVGLUT1 KO マウスの骨及び骨代謝についての解析

炎症とそれに伴う骨破壊に対する VGLUT1の影響を調べた。TNF-α Tgマウスは、12週齢頃から、関節の腫脹が見られ、16 週齢では関節の変形も認められた。VGLUT1 KOでかつTNF-α Tgであるマウスでも、関節の腫脹と変形は同程度に認められ、VGLUT1の有無は、炎症による腫脹には影響を与えないことが示唆された。現在、これらのマウスの骨を解析中である。

(4) L-グルタミン酸による骨吸収抑制効果の直接的評価

L-グルタミン酸を含まない培地を用いた骨吸収活性評価系を確立した。その系を用いて、L-グルタミン酸に、骨吸収活性を40%程度抑制する作用があることを明らかにした。

#### 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 8 件) (全て査読あり)
- ① Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N et al. Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *J Cell Biol* 184:541-554, 2009
  - ② Koide M, Kinugawa S, Udagawa N et al. Diphenylhydantoin inhibits osteoclast differentiation and function through suppression of NFATc1 signaling. *J Bone Miner Res in press*, 2009
  - ③ Narita N, Kobayashi Y, Udagawa N et al. Multiwalled carbon nanotubes specifically inhibit osteoclast differentiation and function. *Nano Lett* 9:1406-1413, 2009
  - ④ Yamashita T, Kobayashi Y, Udagawa N et al. MKK6-p38 MAPK signaling

pathway enhances survival but not bone-resorbing activity of osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 365:252-257, 2008

- ⑤ Asami A, Nakamura M, Udagawa N et al. Effects of heat treatment of hydroxyapatite on osteoblast differentiation. *J Hard Tissue Biol*, 17:37-46, 2008
- ⑥ Takaku H, Miyamoto Y, Udagawa N et al. Synthesis and structure-activity relationships of 16-ene-22-thia-1 $\alpha$ , 25-dihydroxy-26,27-dimethyl-19-norvitamin D<sub>3</sub> analogs having side chains of different sizes. *Bioorg Med Chem* 16:1796-1815, 2008
- ⑦ Yamada C, Yamada Y, Udagawa N et al. The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption. *Endocrinology*, 149 : 574-579, 2008
- ⑧ Udagawa N, Sato N et al. Signal transduction of lipopolysaccharide-induced osteoclast differentiation. *Periodontology* 2000, 43:56-64, 2007

[学会発表] (計1件)

- ① Udagawa N Regulation of RANK ligand production and its signaling in osteoclast formation. 13<sup>th</sup>International Congress of Endocrinology November 9, 2008 (Rio de Janeiro)

[図書] (計1件)

- ① Takahashi N, Udagawa N et al. Principles of Bone Biology, Third Edition in press, 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宇田川 信之 (UDAGAWA NOBUYUKI)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：70245801

### (2) 研究分担者

中村 浩彰 (NAKAMURA HIROAKI)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：50227930  
溝口 利英 (MIZOGUCHI TOSHIHIDE)  
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師  
研究者番号：90329475  
二宮 禎 (NINOMIYA TADASHI)  
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師  
研究者番号：00360222

中道 裕子 (NAKAMICHI YUKO)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・助教

研究者番号：20350829

上原 俊介 (UEHARA SYUNSUKE)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90434480

### (3) 連携研究者