

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791376

研究課題名（和文） RANKL および M-CSF 欠損マウスを用いた破骨細胞ニッチの解明

研究課題名（英文） Identification of osteoclast niche using RANKL-deficient and M-CSF-deficient mice.

研究代表者

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

研究成果の概要：

細胞周期が停止した破骨細胞前駆細胞(pOCP; post-mitotic osteoclast precursors)は、破骨細胞ニッチを形成する。pOCPの存在部位(すなわち破骨細胞ニッチ)を同定するため、pOCPをGFP標識できるトランスジェニック(Tg)マウスを開発するため、DNAコンストラクトを作製した。また本研究によりM-CSF受容体の新しいリガンドIL-34が、破骨細胞ニッチからの破骨細胞供給に関与することを示唆するデータを得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

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：M-CSF, RANKL, 破骨細胞ニッチ, IL-34, 活性型ビタミンD<sub>3</sub>

## 1. 研究開始当初の背景

破骨細胞への分化は、骨芽細胞により厳密に調節されている。骨芽細胞は破骨細胞分化に必要なM-CSF(マクロファージコロニー刺激因子)とRANKL(receptor activator of NF-κB ligand)を発現し、単球/マクロファージ系列の細胞から破骨細胞の形成を誘導する。破骨細胞は細胞周

期が停止した細胞である。申請者らのグループは、前駆細胞から破骨細胞に分化する過程で、細胞周期の進行と停止が連続して起こることを見出した。そしてこの細胞周期の停止した破骨細胞前駆細胞をpOCP(post-mitotic osteoclast precursors, 増殖後-前駆細胞)と命名した(第23回日本骨代謝学会、演題番号O-079、2005年)。

次いで、RANKL 欠損マウスとM-CSF 欠損 (M-CSF<sup>op/op</sup>マウス)に、それぞれRANKLおよびM-CSFを投与した時の破骨細胞形成過程を解析した。この時RANKLおよびM-CSF刺激は、細胞周期の進行を経ずに前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導することを見出した(2006 年度米国骨代謝学会 演題番号F259)。さらに我々はM-CSF<sup>op/op</sup>マウスにおいて、活性型ビタミンD<sub>3</sub>アナログ(2MD)などの骨吸収促進因子投与すると、4 日間で破骨細胞が誘導されることを見出した(2007年 日本骨代謝学会プログラム抄録集 p.228)。近年、細胞周期が停止した造血幹細胞は、骨髄に接する骨芽細胞によって支持され、骨芽細胞が造血ニッチを提供することが報告された(Nature 425:778, 2003)。そこで我々は、骨芽細胞は造血幹細胞のみならず、細胞周期が停止した破骨細胞前駆細胞(pOCP)を支持し、破骨細胞ニッチを提供しているという仮説をたてた。本研究は、これまでの破骨細胞分化に関する研究を基盤に、破骨細胞ニッチを明らかにすることを目的としている。

## 2. 研究の目的

- (1) pOCPは、RANKLもしくはM-CSFのいずれか一方が存在すれば形成されるのか？それともRANKLとM-CSFの双方がなくてもpOCPは形成されるのか？これを明らかにするためにRANKLとM-CSFの二重欠損マウス(RANKL<sup>-/-</sup>M-CSF<sup>op/op</sup>)を作製し、RANKL投与後の破骨細胞形成過程を解析する。
- (2) pOCPの形成過程かそれとも、pOCP以降の破骨細胞形成過程のどちらにITAMシグナルが関与しているか？pOCPの形成を指標に、RANKLおよびM-CSFシグナルとITAMシグナルの関係を明らかにする。

- (3) pOCPの生成部位や定着部位(=破骨細胞ニッチ)および存在時間を明らかにする。すなわち、RANK, M-CSF受容体二重陽性で、かつ細胞分裂をしないもしくは遅い細胞だけを標識できるトランスジェニックマウスを開発し、解析する。

## 3. 研究の方法

最近、M-CSF 受容体の第二のリガンドとしてIL-34 が発見された(Science 320:807-11, 2008)。そこで、RANKL<sup>-/-</sup>M-CSF<sup>op/op</sup>マウスの解析を行う前に、IL-34 の破骨細胞形成に対する役割をin vitro およびin vivo 双方で解明する必要性が生じた。そこで、以下の実験を行った。

- (1) マウス骨髄造血系細胞を用いて、M-CSFとIL-34のマクロファージ誘導活性を比較した。
- (2) 骨髄Mφ培養系にRANKLとともに、M-CSFあるいはIL-34を添加し、OC形成を解析した。
- (3) 1,25D<sub>3</sub>の標的組織におけるIL-34の発現を解析した。
- (4) IL-34の発現組織である脾臓におけるTRAP陽性細胞の出現について検討した。
- (5) M-CSF<sup>op/op</sup>マウスにおいて、脾摘を行った後2MDを投与し、骨組織におけるOC形成を解析した。
- (6) 当初の計画通り、pOCPをGFP標識するトランスジェニック(Tg)マウスを開発するため、DNAコンストラクトを作製した。

## 4. 研究成果

- (1) M-CSFとIL-34のマクロファージ誘導活性は、同等であった。
- (2) IL-34の骨髄Mφ培養系におけるOC誘導活性は、M-CSFと同等であった。
- (3) M-CSF<sup>op/op</sup>マウスおよび野生型マウスの双

方において、IL-34 は脾臓での発現が高く、2MD 投与 24 時間後に更なる発現上昇が認められた。骨における IL-34 の発現レベルは低く、2MD による発現上昇は認められなかった。

- (4) M-CSF<sup>op/op</sup> マウスにおいて、骨における OC 形成に先行して 2MD 投与 48 時間後に、脾臓にて TRAP 陽性単核細胞数の増加が認められた。96 時間後には TRAP 陽性単核細胞数は、control レベルまでに低下し、骨において OC 形成を認めた。この結果より、脾臓で生成された TRAP 陽性単核細胞は、OC 前駆細胞である可能性が示された。
- (5) 脾摘した M-CSF<sup>op/op</sup> マウスにおいて、2MD 投与による骨における OC 形成を認めなかった。

以上の結果より M-CSF<sup>op/op</sup> マウスにおいて、脾臓は 1,25D<sub>3</sub> による OC 形成に必須の組織であることが明らかとなった。また、IL-34 は 1,25D<sub>3</sub> の新たな標的遺伝子である可能性が示された。

- (6) RANK<sup>+</sup>でかつ細胞分裂をしないもしくは遅い細胞だけを GFP 標識するための DNA コンストラクトを作製した。

#### 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 5 件)

- ① Uchiyama M, Nakamichi Y, Nakamura M, Kinugawa S, Yamada H, Udagawa N, Miyazawa H.; Dental pulp and periodontal ligament cells support osteoclast differentiation. **J Dent Res**: 2009, *in press* (査読有)

- ② Tomimori Y, Mori K, Koide M, Nakamichi Y, Ninomiya T, Udagawa N, Yasuda H. ; Evaluation of Pharmaceuticals With a Novel Fifty-Hour Animal Model of Bone Loss. **J Bone Miner Res**: 2009, *in press* (査読有)
- ③ Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Yamashita T, Hosoya A, Ninomiya T, Nakamura H, Yamamoto Y, Kinugawa S, Nakamura M, Nakamichi Y, Kobayashi Y, Nagasawa S, Oda K, Tanaka H, Tagaya M, Penninger JM, Ito M, Takahashi N.; Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. **J Cell Biol**:184:541-54, 2009 (査読有)
- ④ Takahashi M, Mizoguchi T, Uehara S, Nakamichi Y, Yang S, Naramoto H, Yamashita T, Kobayashi Y, Furusawa K, Udagawa N, Uematsu T, Takahashi N.; Docetaxel inhibits bone resorption through suppression of osteoclast formation and function in different manners. **J Bone Miner Metab**: 27:24-35, 2009 (査読有)
- ⑤ Yukata K, Matsui Y, Shukunami C, Takimoto A, Goto T, Nishizaki Y, Nakamichi Y, Kubo T, Sano T, Kato S, Hiraki Y, Yasui N.; Altered fracture callus formation in chondromodulin-I deficient mice. **Bone** 43:1047-56, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 中道裕子; An M-CSF-independent mechanism for osteoclastogenesis, 第 5 回 Bone Biology Forum, 静岡, 2008 年 8 月
- ② Nakamichi Y, Udagawa N, Yasuda H, Nakamura M, Kobayashi Y, Takahashi N : M-CSF independent mechanisms for

osteoclastogenesis : (J Bone Miner Res **22**,  
Suppl 1; S380, 2007) 29<sup>th</sup> American  
Society for Bone and Mineral Research  
(ASBMR) Annual Meeting, モントリオ  
ール September, 2007

- ③ **中道裕子**, 宇田川信之, 林眞一, 保田尚  
孝, 中村美どり, 小林泰浩, 高橋直之:  
M-CSF非存在下における破骨細胞形成  
メカニズムの解析:(第25回日本骨代謝  
学会プログラム抄録集:p.228) 日本骨  
代謝学会(第25回)大阪 2007年7月
- ④ 溝口利英, 武藤昭紀, 細矢明宏, **中  
道裕子**, 山下照仁, 小林泰浩, 宇田  
川信之, 伊藤充雄, 高橋直之 (In vivo  
において細胞周期の停止した破骨細  
胞前駆細胞(pOCP)は5-FU感受性  
である:第25回日本骨代謝学会プロ  
グラム抄録集:p.275) 日本骨代謝学  
会(第25回)大阪 2007年7月

[その他]

ホームページ等

[http://www.mdu.ac.jp/laboratory/research\\_contents/index.html](http://www.mdu.ac.jp/laboratory/research_contents/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

**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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: