

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19890243  
 研究課題名（和文） 破骨細胞前駆細胞のトランスマイグレーションに細胞接着分子が及ぼす影響  
 研究課題名（英文） Influences of adhesion molecules on transmigration of Osteoclast precursor  
 研究代表者  
 堂前 英資 (DOMAE EISUKE)  
 大阪歯科大学・歯学部・助教  
 研究者番号：50454559

## 研究成果の概要：

破骨細胞に分化することが知られている細胞株 RAW264 を用いて破骨細胞分化因子である sRANKL を添加することによって細胞の接着・運動に関わることが知られている細胞内シグナル伝達分子の検討を行った。その結果、sRANKL 刺激により Focal adhesion kinase (FAK) がリン酸化されることが明らかとなった。さらに RAW264 にフィブロネクチンによる細胞接着刺激を加えると、FAK の 397 番目のチロシンがリン酸化され、さらに共刺激として sRANKL を加えると FAK の 861 番目のチロシンがリン酸化されることが明らかとなった。FAK のロスオブファンクションの影響を検討するために BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression システムによる FAK のサイレンシングを行った。FAK のサイレンシングでは破骨細胞分化の抑制はみられなかった。以上の結果から sRANKL 刺激により破骨細胞分化とは別に細胞接着および運動に関わる分子が活性化されることが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,660,000	402,000	3,062,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：細胞接着分子、破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在、破骨細胞研究は血球系の前駆細胞からの破骨細胞への分化と、分化した破骨細胞が骨表面で行う骨吸収、という 2 つの側面を中心に行われている。この成

果として、ビスホスホネートなどの破骨細胞の骨吸収を抑制する薬剤の進歩や、Denosumab のような破骨細胞分化に必須のサイトカインである RANKL の作用を阻害する抗体の開発などが挙げられる。

今後も破骨細胞の分化と骨吸収の研究は、代謝性骨疾患や炎症性骨疾患の新規治療薬の開発に寄与するものと思われる。

2006年に **Transmigration : a new property of mature multinucleated osteoclasts.** と題した論文が発表された。この中で、Saltelらは、破骨細胞の分化と骨吸収に加えて、**Transmigration** を成熟破骨細胞の新たな機能として提示し、*in vitro* の実験系で成熟した多核破骨細胞がコンフルエントに達した骨芽細胞層を **Transmigrate** することを示した。Saltelらも認めているように、一般的理解では多核破骨細胞が骨表面に移動するのではなく、単核の前駆細胞が骨表面で多核の破骨細胞に分化すると考えられるため、多核破骨細胞の **Transmigration** は病的な状態で破骨細胞が骨表面から離れた部位に移動する際に重要であると考えられる。

*in vitro* での骨芽細胞と骨髄由来細胞との共培養では効率的に破骨細胞が形成される。この培養皿を観察すると、破骨細胞の上に骨芽細胞の層が存在する。この細胞の培養皿に対する位置関係はどの時点で形成されるのだろうか。Saltelらは多核破骨細胞が骨芽細胞層を **Transmigrate** することが可能であることを示したが、細胞融合前の単核破骨細胞、あるいは破骨細胞へのコミットメントする前の細胞が **Transmigrate** するかどうかは検討されていない。

近年、骨芽細胞は造血幹細胞の維持、あるいはB細胞の分化に必須のニッチを形成する、ということが明らかとなった。このような血球系細胞と骨芽細胞との相互作用は、骨芽細胞を単にサイトカイン産生細胞としてではなく、血球系細胞の機能維持に必要な微小環境を形成する細胞として捉えるものである。

このような背景をふまえて、私は、骨面に接着した破骨細胞の周囲を破骨細胞に特異的な微小環境として捉え、破骨細胞前駆細胞は分化に先立って、骨芽細胞層を **Transmigration** する必要があるのかを検証し、また **Transmigration** に関与する分子の同定を行うべく研究計画を立案した。

## 2. 研究の目的

白血球が血管内皮細胞層を通り抜ける際にはケモカイン、接着タンパク、インテグリンなどが重要である。破骨細胞（前駆細胞）が骨芽細胞層を **Transmigrate** する際にも接着分子の活性化やそれに伴う細胞骨格の変化、また基質分解酵素の活性化などが重要であると考えられる。すでに私たちのグループでは破骨細胞分化の際に活性化される接着に関わる分子を同定している。このような分子をさらに検討し、その中から **Transmigration** に必須の **Key molecule** を同定する。

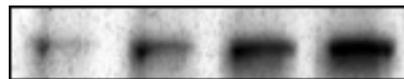
## 3. 研究の方法

**Transmigration** に影響を与える候補分子を検討する。細胞は糖鎖に対するレセプターやICAMなどの接着タンパク、接着分子であるインテグリンや、破骨細胞前駆細胞を遊走させるケモカインも発現している。一方、破骨細胞前駆細胞もこれらと相互作用する分子を発現しており、**SDF-1** 刺激は遊走活性だけではなく **MMP** の活性化にも関与する。上記のように骨芽細胞と破骨細胞の相互作用において重要である接着タンパク、接着分子、ケモカインなどによる接着実験や架橋刺激実験、添加実験を行う。これらの刺激によって遺伝子発現が亢進する分子、あるいは活性化細胞内シグナル伝達分子を **RT-PCR**、ウエスタンブロット、**FACS** などで検討する。さらに、細胞接着、遊走、基質分解に重要である分子の阻害剤を添加することによる細胞活性の変化を、接着実験、遊走実験、基質

分解実験、ウエスタンブロットで検討する。

#### 4. 研究成果

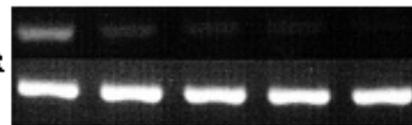
骨芽細胞と骨髄由来細胞との共培養では効率的に破骨細胞が形成される。この培養皿を観察すると、破骨細胞の上に骨芽細胞の層が存在する。骨表面は骨芽細胞によって覆われているため、破骨細胞が骨を吸収するためには骨芽細胞を押しよけるかあるいはトランスマイグレートすることが必要になると考えられる。近年、骨芽細胞は造血幹細胞の維持、あるいはB細胞の分化に必須のニッチを形成することが明らかとなった。本研究では、骨面に接着した破骨細胞の周囲を破骨細胞に特異的な微小環境として捉え、破骨細胞前駆細胞は分化に先立って、骨芽細胞層をトランスマイグレートするのかが明らかにし、関与する分子の同定を試みた。まず破骨細胞に分化することが知られている細胞株 RAW264 を用いて破骨細胞分化因子である sRANKL を添加することによって細胞の接着・運動に関わることが知られている細胞内シグナル伝達分子の検討を行った。その結果、sRANKL 刺激により Focal adhesion kinase(FAK)がリン酸化されることが明らかとなった。さらに RAW264 にフィブロネクチンによる細胞接着刺激を加えると、FAK の 397 番目のチロシンがリン酸化され、さらに共刺激として sRANKL を加えると FAK の 861 番目のチロシンがリン酸化されることが明らかとなった。FAK のロスオブファンクションの影響を検討するために BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression システムによる FAK のサイレンシングを行った。FAK のサイレンシングでは破骨細胞分化の抑制はみられなかった。以上の結果から sRANKL 刺激により破骨細胞分化とは別に細胞接着および運動に関わる分子が活性化されることが明らかとなった。



RANKL	-	+	-	+
FN 刺激	-	-	+	+

FAK は RANKL 刺激と接着刺激により 861 番目のチロシンがリン酸化された

RT-PCR



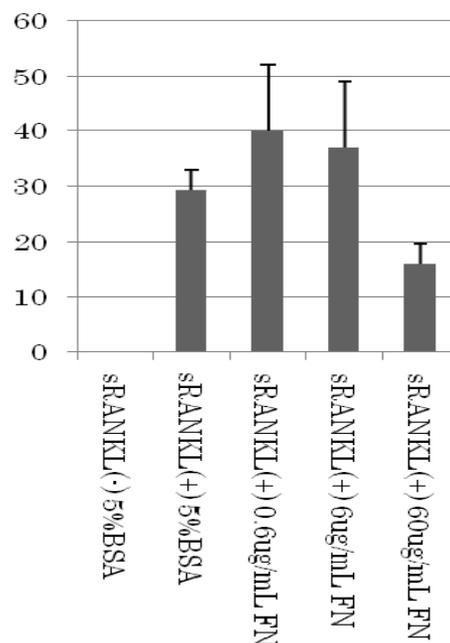
Western Blotting



mock clone 1 clone 2 clone 3 clone 4

RAW264 細胞に対する Lentiviral miR RNAi Expression System による遺伝子ノックダウン

FAK 遺伝子ノックダウンを行い、stable clone を樹立した (clone 1~4)。RT-PCR および Western blotting により mRNA およびタンパク質レベルでの発現の抑制を確認した



## 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)

[学会発表] (計 2件)

1. Domae Eisuke, Methyl- $\beta$ -cyclodextrin suppresses osteoclastogenesis by modulating the MAPKs signaling pathways, The 4th Sino-Japanese Conference on Stomatology, 2008年9月29日, Xi'an CHINA

2. Domae Eisuke, Effect of Lysenin on the differentiation of osteoclasts, The 11<sup>th</sup> International Academy of Periodontology Congress, 2007年9月13日, Berne SWISS

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堂前 英資 (DOMAE EISUKE)  
大阪歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 50454559

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし