

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10176

研究課題名(和文) 骨カップリング因子として働く骨基質中のTGF-βの研究

研究課題名(英文) The study of bone matrix-derived TGF-beta that acts as a bone coupling factor

研究代表者

唐木田 丈夫 (Karakida, Takeo)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：40367305

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)：骨基質中に潜在型で蓄えられ骨吸収によって放出・活性化されるTGF-βは、骨吸収と骨形成のバランスをとるカップリング因子としての働きが期待される。我々は細胞培養系を用いて、放出されたTGF-βが破骨細胞分化と骨吸収を促進することを示した。一方でTGF-βを添加した破骨細胞の培養上清は骨芽細胞分化を促進し、骨細胞のカップリング因子の産生に影響することが示された。この結果から、TGF-βは破骨細胞を介して間接的にカップリング機構に作用することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

古いカップリング機構の概念は、骨芽細胞と破骨細胞がそれぞれのカップリング因子によって互いの活動量を調節し合うものであった。本研究では骨基質のTGF-βが破骨細胞に作用し、続いて骨芽細胞、骨細胞に影響するという複雑なカップリング機構の存在を示唆している。我々は骨カップリング機構の理解が骨粗鬆症や歯周病などの骨疾患に対する治療法開発の一助になると考える。

研究成果の概要(英文)：TGF-β, which is stored in the latent form in the bone matrix and is released activated by bone resorption, is expected to act as coupling factor that balances bone resorption and bone formation. Using cell culture systems, we showed that released TGF-β promoted osteoclast differentiation and bone resorption. On the other hand, conditioned medium of osteoclasts cultured with TGF-β was shown to promote osteoblastic differentiation and affect the production of osteocyte coupling factors. These results suggest that TGF-β acts on the coupling mechanism via osteoclasts.

研究分野：分子生物学

キーワード：TGF-β カップリング 破骨細胞 骨吸収 骨細胞 骨芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内の骨組織では破骨細胞が古い骨基質を溶解(骨吸収)し、その跡に骨芽細胞が新しい骨基質を作る(骨形成)リモデリングが行われており、両者のバランスを保つカップリング機構によって骨量は一定に維持されている。それを担うカップリング因子として破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞から産生される生理活性物質が多く報告されているが、我々は骨基質中に存在する生理活性物質、特に破骨細胞分化促進作用の報告がある TGF- β [1]に注目した。骨基質中には大量の TGF- β が不活性な潜在型(LTGF- β)で蓄えられており、骨吸収とともに骨基質外に放出され、同時に破骨細胞から分泌される酸によって活性化される。骨吸収の増加と共に放出される量が増加する TGF- β はカップリング因子としての働きが期待されるが、その報告は少なく骨髄間葉系細胞の遊走能を促進することで骨吸収部位に未成熟骨芽細胞を集めて骨形成を促進する効果が報告されるに留まる[2]。我々は骨基質から放出・活性化された TGF- β を最初にそして高濃度に浴びるのは骨吸収を行っている破骨細胞自身と考え、その反応と骨代謝に及ぼす影響を検討する。

2. 研究の目的

骨吸収によって放出・活性化された骨基質内 TGF- β が破骨細胞に及ぼす影響とそれによって生じる周辺の骨芽細胞と骨細胞への影響を検討し、骨のカップリング機構にどのような貢献をしているか考察する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞系で検討する骨基質内 TGF- β の破骨細胞に及ぼす影響

骨基質中の潜在型 TGF- β (LTGF- β)が骨吸収によって活性化し、破骨細胞の分化や機能にどのような影響を与えるか細胞培養系を利用して検討する。LTGF- β を共有結合させた培養プレート表面にリン酸カルシウム結晶をコーティングして疑似骨基質を作り、その上でマウスマクロファージ由来の RAW264 細胞を可溶性 RANKL(GST-RANKL, 300 ng/mL)存在下で培養する。RAW264 細胞は RANKL を添加してから 3 日目で破骨細胞分化を完了するので、培養 4 日目までに溶かされたリン酸カルシウムコーティングの面積を測定し骨吸収能として評価する。

(2) 破骨細胞の分化段階で異なる TGF- β の影響

以下の条件で RAW264 細胞の培養を行う。基本培地(10%牛胎児血清含有 MEM)のみ(-) RANKL(300 ng/mL)を 3 日間添加(R) RANKL を 3 日間と TGF- β (1ng/mL)を 3 日間添加(RT123) RANKL を 3 日間と TGF- β を 0~1 日目のみ添加(RT1) RANKL を 3 日間と TGF- β を 2~3 日目のみ添加(RT3)する。培養 3 日目で破骨細胞の分化マーカーである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)活性、定量 RT-PCR 法による遺伝子発現を測定し、4 日目で骨吸収能を測定する。

(3) 破骨細胞が産生するカップリング因子に及ぼす TGF- β の影響

培養条件、
、
、
で培養した RAW264 細胞の培養上清をマウス骨髄細胞由来の ST2 細胞に BMP2 と共に添加し、骨芽細胞分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)活性を測定する。同様に培養上清をラット骨細胞様細胞 UMR106 に添加し破骨細胞分化誘導因子の RANKL とその阻害因子オステオプロテジェリン(OPG)、骨芽細胞分化誘導因子の Wnt1 とその阻害因子スクレロスチンの遺伝子発現を定量 RT-PCR で測定する。

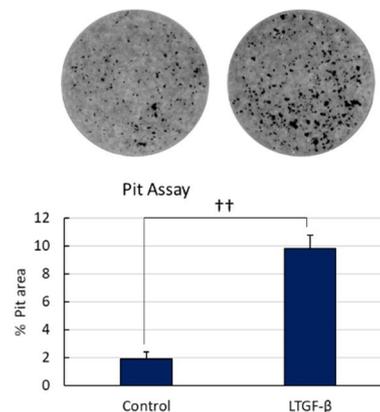
4. 研究成果

(1) 培養細胞系で検討する骨基質内 TGF- β の破骨細胞に及ぼす影響

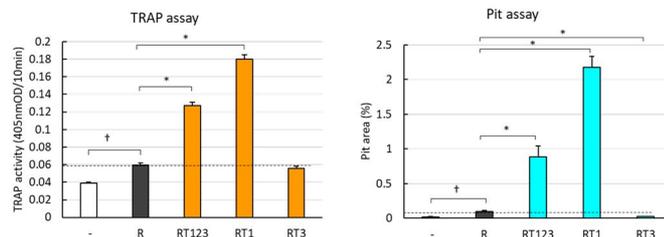
RANKL を添加した RAW264 細胞は培養 3 日目には破骨細胞に分化し、リン酸カルシウム結晶コーティングの表面に吸収窩を形成してプレート表面を露出させた。培養 4 日目にアンモニアで細胞を除去して吸収窩の面積を測定したところ、未処理のプレート表面のものよりも LTGF- β を共有結合した表面の吸収窩の面積が有意に広がっていた。この結果より RANKL によって分化誘導された破骨細胞は酸で吸収窩を形成すると同時に表面に露出した LTGF- β から TGF- β を放出・活性化して骨吸収を促進したことが示唆された。

(2) 破骨細胞の分化段階で異なる TGF- β の影響

破骨細胞分化と骨吸収能

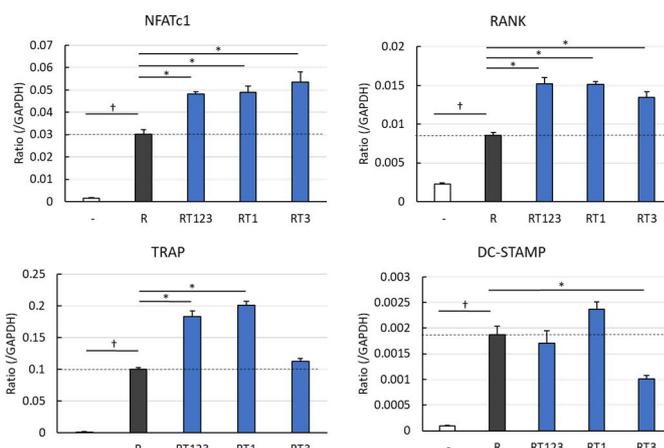


RAW264 細胞を RANKL 存在下(R)で培養すると破骨細胞に分化し TRAP 活性が上昇し吸収窩が形成される。この反応は TGF- β によって促進されるが、その添加のタイミングによって促進効果は異なり、TGF- β を 3 日間全て添加(RT123)するよりも 0~1 日目だけ添加(RT1)した方が TRAP 活性は約 1.5 倍、吸収窩の面積は 2 倍以上の促進効果がみられた。しかしながら培養 2 日以降(RT3)に TGF- β を添加しても促進効果はみられなかった。この結果により、TGF- β の破骨細胞分化と骨吸収の促進効果は分化初期(RT1)が最も有効であり分化後期にはほとんど効果がないことが示唆された。



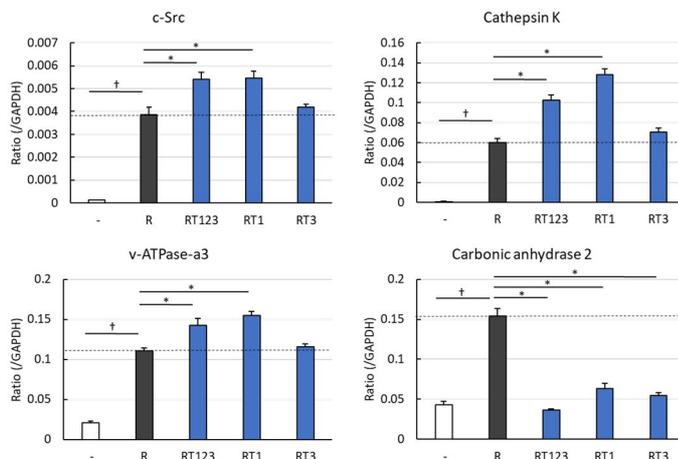
破骨細胞分化関連遺伝子の発現

分化マスター遺伝子の NFATc1、RANKL の受容体 RANK、破骨細胞分化マーカーの TRAP、細胞融合に必須の DC-STAMP を定量 RT-PCR で測定した。NFATc1 と RANK 遺伝子はどのタイミングで TGF- β を添加しても RANKL による発現上昇を促進したが、TRAP 遺伝子は TRAP 活性と同様に、2~3 日目(RT3)の TGF- β 添加では促進効果がみられなかった。DC-STAMP 遺伝子は TGF- β 添加の促進効果がみられず、2~3 日目(RT3)の添加では逆に抑制効果がみられた。



骨吸収関連遺伝子の発現

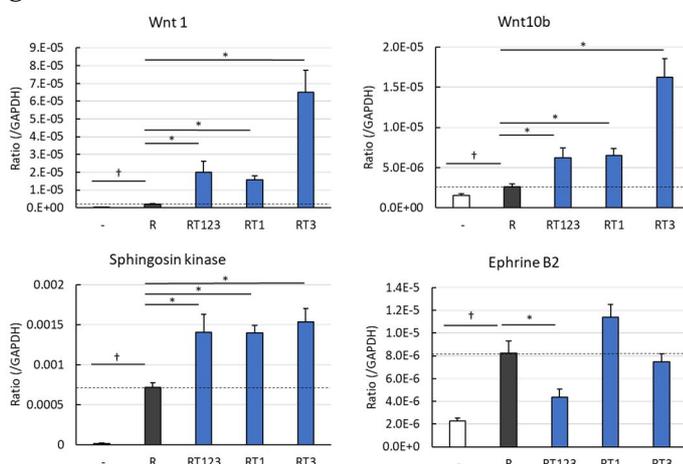
骨吸収に必須のチロシンキナーゼ c-Src、骨基質タンパク質を分解する Cathepsin K およびプロトンポンプのフラグメント v-ATPase-a3 は RT123 と RT1 で促進効果を示し RT3 では効果がみられなかった。一方で酸産生に必須の Carbonic anhydrase 2 はいずれの添加のタイミングでも TGF- β に強く抑制された。骨吸収遺伝子発現に対する TGF- β の促進効果は 2-1)の結果と同様に分化後期では効果がないことが示唆された。



カップリング因子遺伝子の発現

破骨細胞が産生するカップリング因子[3, 4, 5]である Wnt1、Wnt10b、EphrinB2 およびカップリング因子 S1P の合成酵素 Sphingosine kinase の遺伝子発現を観察した。Wnt1、Wnt10b および Sphingosine kinase の遺伝子発現はいずれの添加タイミングでも TGF- β で促進され、特に Wnt1 と Wnt10b は RT3 で最も促進効果が高かった。しかし EphrinB2 は TGF- β の促進効果がみられず、RT1 でむしろ抑制がみられた。

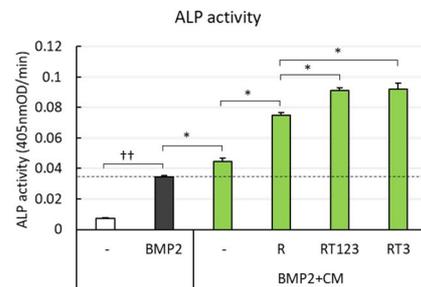
これらの結果より、TGF- β の破骨細胞分化や骨吸収に対する促進効果は破骨細胞分化初期の添加が有効であり、カップリング因子の産生に対する効果は破骨細胞分化後期の添加が有効であることが示唆された。



3) 破骨細胞が産生するカップリング因子に及ぼす TGF-β の影響

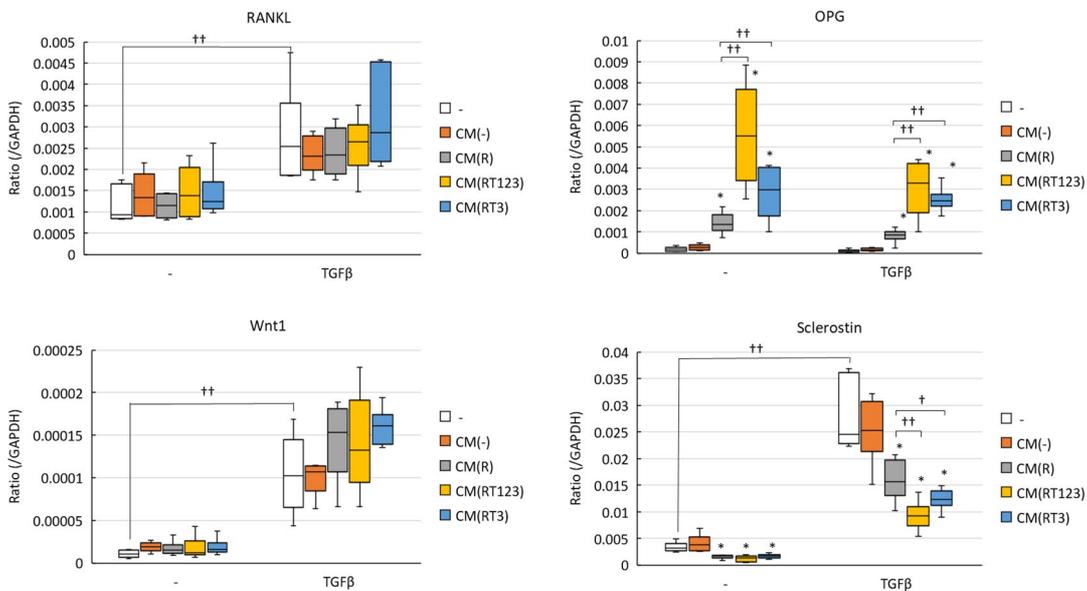
骨芽細胞分化に及ぼす破骨細胞の培養上清の影響

方法で述べた培養条件、
RAW264 細胞の培養上清 CM(-)、CM(R)、CM(RT123)、CM(RT3)を 50%の濃度で ST2 細胞に BMP2 (0.5 μg/mL)と共に添加し、添加 3 日後に骨芽細胞分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)活性を測定した。BMP2 によって誘導された ALP 活性は破骨細胞培養上清 CM(R)によって促進されたが、TGF-β 存在下で培養した上清である CM(RT123)と CM(RT3)はさらに強い促進効果を示した。この結果から破骨細胞の培養上清には骨芽細胞分化を誘導する因子が存在し、TGF-β はその因子の産生を促進する効果があることが示唆された。



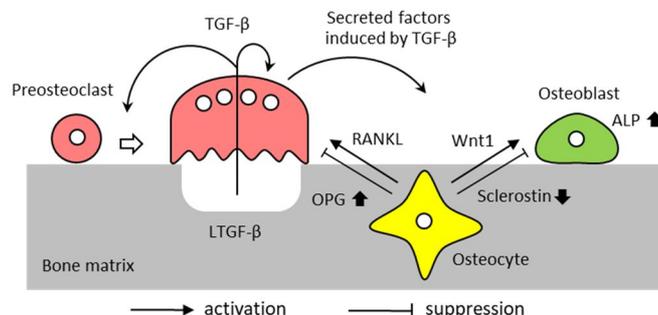
骨細胞のカップリング因子遺伝子発現に及ぼす破骨細胞の培養上清の影響

上記と同様の条件の破骨細胞培養上清を骨細胞様 UMR106 細胞に 50%の濃度で添加し TGF-β 存在下または非存在下で 24 時間培養して RANKL、OPG、Wnt1、Sclerostin の遺伝子発現を定量 RT-PCR で測定した。UMR106 の RANKL、Wnt1、Sclerostin の遺伝子発現は TGF-β によって誘導された。そのうち Sclerostin 遺伝子は破骨細胞培養上清 CM(R)で抑制され、TGF-β 存在下で培養した CM(RT123)と CM(RT3)でさらに強く抑制された。一方、OPG 遺伝子発現は TGF-β に影響されないが、CM(R)で誘導され CM(RT123)と CM(RT3)でそれがさらに促進された。この結果は破骨細胞の培養上清には骨細胞の Sclerostin 遺伝子発現を抑制する因子と OPG 遺伝子発現を誘導する因子が含まれ、TGF-β はそれら因子の産生を促進することが示唆された。



(まとめ)

我々は骨基質中の潜在型 TGF-β(LTGF-β)が骨吸収によって放出・活性化され、破骨細胞の骨吸収能を促進させることを細胞培養系で示した。一方で TGF-β は破骨細胞を介して骨形成の促進と骨吸収の抑制をしていることが示唆された。



引用文献

- [1] Omata Y, et al. *JBMR* 30(5), 2015, 869-77.
- [2] Tang Y, et al. *Nat Med* 15(7), 2009, 757-67.
- [3] Weivoda MM, et al. *JBMR* 31(1), 2016, 76-85.
- [4] Ota K, et al. *Endocrinology* 154(10), 2013, 3745-52.
- [5] Sato C, et al. *BBRC* 423, 2012, 200-5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 唐木田丈夫、大熊理紗子、山越康雄
2. 発表標題 破骨細胞の骨吸収に及ぼすTGF-βの影響
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大熊理紗子、唐木田丈夫、山越康雄
2. 発表標題 骨吸収が破骨細胞へ与える影響について
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大熊理紗子、唐木田丈夫、山越康雄
2. 発表標題 骨吸収によるTGF-βが破骨細胞へ与える影響
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022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	山越 康雄 (Yamakoshi Yasuo) (20182470)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山本 竜司 (Yamamoto Ryuji) (20410053)	鶴見大学・歯学部・講師 (32710)	
研究分担者	斉藤 まり (Saito Mari) (60739332)	鶴見大学・歯学部・助教 (32710)	
研究分担者	大熊 理紗子 (Ohkuma Risako) (50804887)	鶴見大学・歯学部・学部助手 (32710)	

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