

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791033
 研究課題名 (和文) 骨リモデリングと破骨細胞形成における骨形成因子の機能の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of function of bone morphogenetic protein signaling in bone remodeling and osteoclast formation
 研究代表者
 岡本 美奈 (OKAMOTO MINA)
 大阪大学・医学系研究科・特任研究員
 研究者番号：50457008

研究成果の概要 (和文)：骨形成因子 (BMP) は骨代謝において重要なタンパクである。これまでに、BMP が骨芽細胞に作用し、分化を促進することが知られているが、破骨細胞に対する作用は明らかにされていない。そこで、破骨細胞での BMP シグナルの作用メカニズムを解析した結果、骨リモデリングにおける BMP シグナルは、破骨細胞においても重要な役割を担っており、骨組織の形成維持に不可欠である事が分かった。

研究成果の概要 (英文)：Bone morphogenetic protein (BMP) is an important protein in the skeletal metabolism. So far it is known that BMP signaling promote osteoblastic differentiation, but its role in osteoclasts is not clear. So we analyzed the key role of BMP signaling in osteoclast. We found that BMP signaling in bone remodeling plays an important roles in the osteoclast, and we considered it is necessary for bone tissue formation and maintenance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：(1) 骨形成因子 (2) コンディショナルノックアウトマウス (3) 破骨細胞
 (4) 骨代謝 (5) カテプシン K

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨形成因子 (BMP) は異所性骨化を誘

導する物質であり、骨の形成過程において重要な役割を果たしている。骨形成の維持には、

骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスで行われ、リモデリングを受ける。

(2) これまでに、BMP は主に骨芽細胞に対する作用が調べられ、BMP が骨芽細胞の分化を促進することが知られている。一方で、BMP が骨芽細胞を介して破骨細胞を制御する事や破骨細胞に直接作用する可能性を示唆する報告もみられる。しかし、生体の骨に対する作用メカニズムは十分には解明されていない。

(3) 申請者らは、生体の骨組織に対する BMP シグナルの作用を調べるため、BMP のアンタゴニストである *noggin* を骨組織特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製、解析した。このマウスでは骨芽細胞の機能の低下と共に、破骨細胞数の減少も認められ、結果として骨量が増加した。つまり、BMP が骨芽細胞だけでなく、破骨細胞も直接刺激する可能性があることを示した。骨芽細胞だけでなく、破骨細胞に対する作用が明らかになる意義は大きいと思われる。

2. 研究の目的

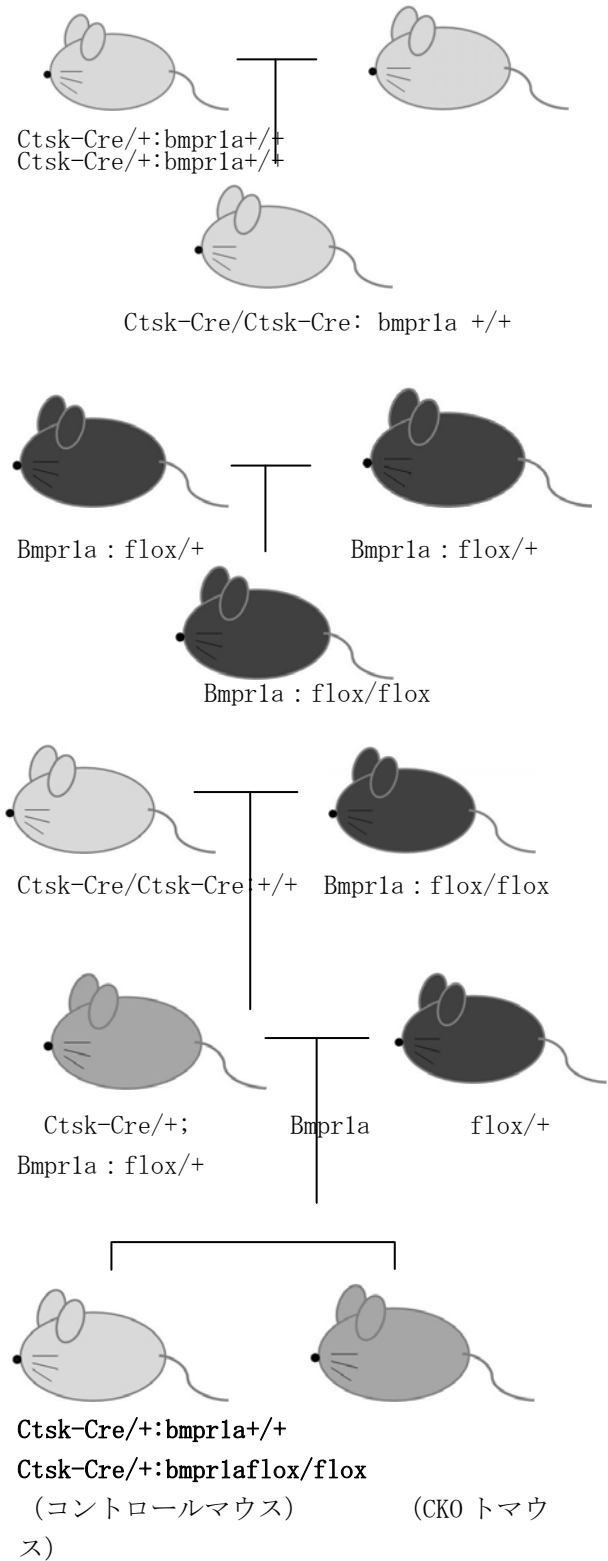
(1) 内軟骨性骨化における BMP の機能を総合的に解析する。破骨細胞において IA 型 BMP 受容体シグナルを抑制したマウスを作製することによって、BMP シグナルが骨組織において破骨細胞形成・維持に与える影響を解析する。

(2) 破骨細胞に対する BMP シグナルの作用メカニズムを分子レベルで解析し、リモデリングへの影響を調べる。

3. 研究の方法

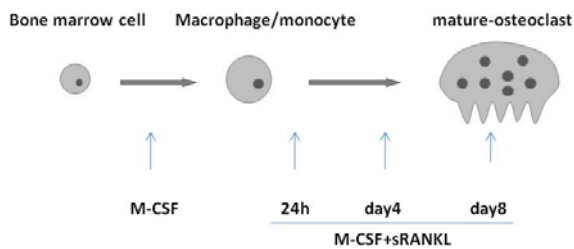
BMP シグナルの破骨細胞における機能の重要性を決定するため、破骨細胞特異的に BMP シグナルを抑制したマウスを作製した。まず、IA 型 BMP 受容体遺伝子 (*Bmpr1a*) の floxed マウス (Mishina et al., 1995) と、破骨細胞特異的 *Ctsk-Cre* ノックインマウス (Nakamura et al., 2007) を交配し、破骨細胞特異的に IA 型 BMP 受容体を欠失した

Ctsk-Cre/+;Bmpr1a flox/flox コンディショナルノックアウトマウス (CKO) を作製し、コントロールマウス (*Ctsk-Cre/+;Bmpr1a +/+*) と比較検討した。



(1) 生後2日のマウスの脛骨組織において、抗 *bmpr1a* 抗体 (50 倍希釈) と抗 *cre recombinase* 抗体 (500 倍希釈) の免疫染色を行った。破骨細胞の評価は、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色を行うことによって、CKO マウスにおける破骨細胞での *bmpr1a* 受容体と *cre recombinase* タンパクの発現を調べた。

(2) 成熟破骨細胞からゲノム DNA の抽出を行い、*bmpr1a* が欠失しているかを確認した。具体的には、骨髄細胞 Bone marrow cell を M-CSF で培養することによって、破骨細胞前駆細胞のみを分化させ、さらに M-CSF と RANKL を添加することによって、8 日程で成熟破骨細胞を形成できる。そこで、破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞を形成するまでの各段階 (24 時間後、4 日後、8 日後) において抽出したゲノム DNA を解析した。



(3) 8 週齢マウスを用いて、X 線、micro CT により表現形及び骨格の形態と質の評価を行った。

(4) 8 週齢マウスの組織切片を作製し、骨形態計測を行った。テトラサイクリンとカルセインによるラベリングによって、破骨細胞数、骨吸収面などの破骨細胞機能の他、骨形成速度、骨芽胞面などの骨芽細胞機能の評価を行った。

(5) *in vitro* での破骨細胞形成能を調べるため、CKO マウスの脾細胞を用いて、破骨細胞の分化に必要な M-CSF と RANKL 存在下で単培養を行った。さらに、コントロールマウスの calvaria 由来の培養骨芽細胞と CKO マウ

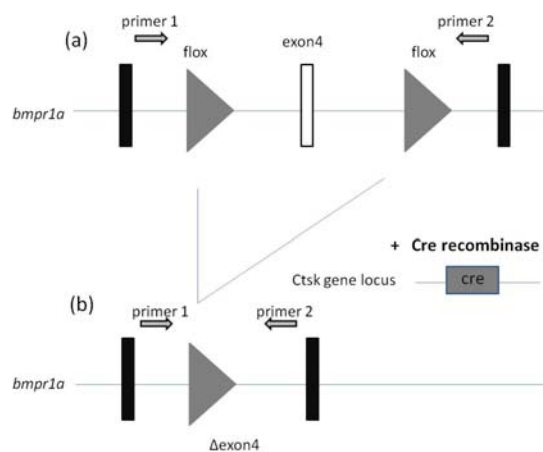
スの脾細胞を用いて VitaminD₃ 存在下で共存培養を行った。培養多核破骨細胞は TRAP 染色で評価を行った。

(6) 成熟破骨細胞から RNA の抽出を行い、*Bmpr1a* 及び、*MMP9*, *NFATc1*, *cathepsin K*, *TRAP* などの破骨細胞のマーカー遺伝子の発現量を調べた。

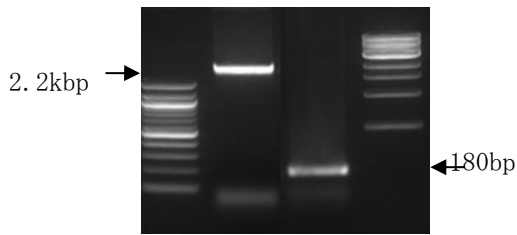
4. 研究成果

(1) 生後2日のマウスの骨組織において、抗 *Bmpr1a* 抗体を用いた免疫染色の条件検討を行ったが、非特異的なシグナルが組織全体にみられ、良好な結果を得ることができなかった。そこで、抗 *cre recombinase* 抗体を用いて免疫染色を行った。抗原の賦活処理として、プロテイナーゼ K・タンパク分解酵素処理を行った。連続切片を用いて TRAP 染色を行った結果、CKO マウスでは破骨細胞特異的に *cre recombinase* タンパクが発現しており、破骨細胞特異的に IA 型 BMP シグナルがノックアウトされている事がわかった。

(2) 骨髄細胞を M-CSF と RANKL 存在下で培養することによって、破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞に分化させる各段階において抽出したゲノム DNA を解析した。*cre/loxP* システムでは、*cre recombinase* が発現すると、*flox* 遺伝子配列間で組み換えが起こり、*bmpr1a* の exon4 が欠失したマウスを作成することができる。そこで本研究では、*flox* 遺伝子配列の外側に primer1、primer2 を設計した。つまり、*flox* 遺伝子の組み換えが起こらない場合は 2.2kb、組み換えが起こった場合は、180bp のバンドが検出される。

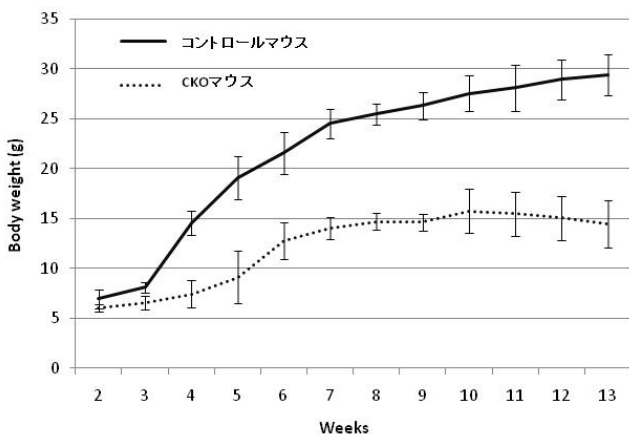


※ (a: コントロールマウス, b:CKO マウス)



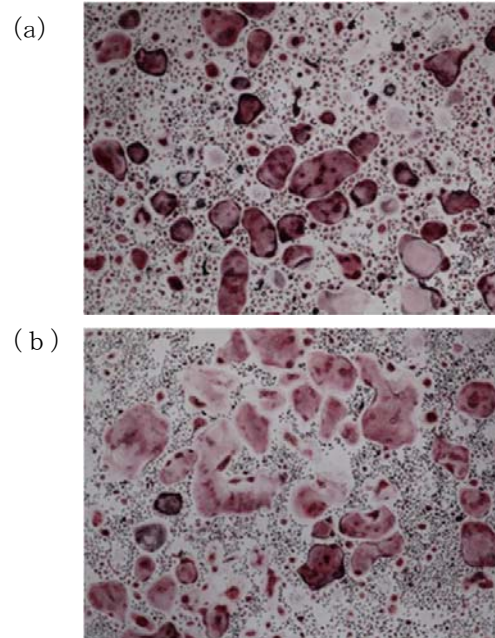
このプライマーを用いた PCR 解析の結果、CKO マウスでは M-CSF のみの刺激では組み換えは見られず、RANKL 刺激を始めて 24 時間後から組み換えが起こり始め、成熟破骨細胞になる 8 日目にはほぼ完全に組み換わっていることが確認された。一方コントロールマウスでは、成熟破骨細胞形成後も組み換えが起こらないことを確認した。

(3) X 線と microCT による解析の結果、CKO マウスの体は小さく、特徴的な頭の形をしていた。レントゲン写真より、頭骸骨縫合部に異常がみられた。致死率は高かった。頸骨の microCT 像から、CKO マウスでは海綿骨の増加と皮質骨の肥厚が観察された。また、体重を比較したところ、CKO マウスはコントロールマウスの約半分であり、8 週齢以降体重に変化は見られなかった。



(4) 8 週齢マウスの骨形態計測の結果、CKO マウスではコントロールマウスと比較して、破骨細胞数及び骨吸収面は減少しており、骨量が増加していた。

(5) CKO マウスの脾臓を用いた単培養、及び脾臓と calvaria 由来の培養骨芽細胞との共培養どちらの方法においても破骨細胞形成は誘導された。さらに、骨吸収活性を評価する上で重要なアクチンリングも観察された。



(a) コントロールマウスの脾臓由来 TRAP 陽性細胞
(b) CKO マウスの脾臓由来 TRAP 陽性細胞

(6) CKO マウスの脾臓から誘導した、成熟破骨細胞の RNA を用いて定量 Real time RT-PCR を行った。その結果、TRAP などの破骨細胞マーカー遺伝子の発現も認められ、コントロールマウス由来の破骨細胞の各マーカーと比べ、発現量は下がっていなかった。

(7) 以上の結果より、BMP は骨芽細胞だけでなく、破骨細胞に対しても重要な働きを担っている事が明らかになった。破骨細胞において BMP シグナルをノックアウトすることで、生体内では骨量が増加し、骨組織全体では異常が認められた。この事から、破骨細胞における BMP シグナルは、骨形成と骨吸収のリモデリングにおいて重要な役割を担っており、全体として骨質の形成、維持に不可欠であると考えた。

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 1 件)

1. Murai, J., Ikegami, D., Okamoto, M., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N.:
Insulation of the Ubiquitous Rxb Promoter from the Cartilage-specific Adjacent Gene, *Col11a2*.
J Biol Chem, 283:27677-27687, 2008.

[学会発表] (計 2 件)

1. Ikegami, D; Akiyama, H; Kaneko, K; Okamoto, M; Nakamura, T; Yoshikawa, H; Tsumaki, N
Sox9 is Essential for Survival and Hypertrophy of Mature Chondrocytes
56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society
Mar 6-9, 2010
New Orleans, Louisiana

2. T. Iwai, J. Murai, K. Hiramatsu, D. Ikegami, M. Okamoto, H. Yoshikawa, N. Tsumaki,
Smad7 inhibits chondrocyte differentiation at multiple steps during endochondral bone formation.
7th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins. 7/9-13, 2008 Lake Tahoe, California,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 美奈 (OKAMOTO MINA)
大阪大学・医学系研究科・特任研究員
研究者番号 : 50457008

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

