

平成22年 4月20日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20791342

研究課題名（和文）：破骨細胞におけるラフト・カベオラの機能解析

研究課題名（英文）：Analysis of raft/caveolae function in osteoclasts

研究代表者

増原 正明 (MASUHARA MASAOKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：70372901

研究成果の概要（和文）： 生体内では骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収がバランスよく行われており、このバランスが崩れると骨大理石病や骨粗鬆症などの疾病が引き起こされる。骨代謝と脂質代謝の間に相関があることが疫学的に明らかになりつつあるが、メカニズムについてはほとんど分かっていない。本研究ではコレステロールが破骨細胞分化に及ぼす影響について解析を行い、細胞膜のコレステロールを含むドメインによるシグナル調節が破骨細胞分化に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Disruption of the balance between osteoblastic bone formation and osteoclastic bone resorption causes various bone disorders, such as osteopetrosis and osteoporosis. Some epidemiological works clarify the contribution of lipid metabolism to the bone metabolism, but there are few knowledge about the molecular mechanisms how it concerns. We researched the effects of cholesterol on the osteoclastogenesis, and revealed that regulations of the cytokine signals by raft/caveolae are important in the differentiation of osteoclasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
年度			
年度			
年度			
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細胞生物学・分子生物学・薬理学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：破骨細胞、ラフト、カベオラ、コレステロール

1. 研究開始当初の背景

骨組織は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が均衡を取ることによって維持されており、このバランスが崩れると骨粗鬆症などの疾病が引き起こされる。骨吸収を担う破骨細胞はマクロファージ系前駆細胞から分化する細胞であり、この分化過程については多くのことが解明されてきた。

しかしながら、

(1) 骨量の低い患者では脳卒中などの血管障害への高いリスクが示されるなど、血管障害を引き起こす脂質代謝と骨代謝の間に高い相関が示されている。

(2) 閉経後の女性ではコレステロール値が上昇しやすく骨粗鬆症に罹患するリスクも高くなる。

(3) 高脂血症の治療薬であるスタチン系薬物（血中のコレステロール値を下げる）は骨形成を促進、骨吸収を抑制する。

などのように、破骨細胞の機能とコレステロールについて様々な知見が得られてはいるものの、どのような機構が存在するかについては全く分かっていない。

2. 研究の目的

コレステロールは生体内で各種ホルモンの原料として働くほか、細胞膜の構成成分として柔軟性や膜の強度に寄与する。近年の研究により細胞膜のコレステロールは均一に分布しているのではなく、スフィンゴ脂質とともに局在して「ラフト」と呼ばれるマイクロドメインを形成していることが明らかとなった。このラフトに受容体タンパク質やシグナル分子が集積することによってシグナル伝達の制御が行われているのではないかと考えられている。このラフトをさらに詳細に解析した結果、「いかだ」として存在するラフトと、裏打ちタンパク質であるカベオリンがラフトに集積してフラスコ状のくぼみ構造を取っている「カベオラ」に分類されること、シグナル制御の他にエンドサイトーシ

ス・エキソサイトーシスへも関与していることが明らかになってきた。

つまり、細胞膜は均一な脂質二重膜ではなく、ラフト・カベオラといったマイクロドメインが存在しており、そこで受容体からのシグナル制御の調節などが行われている、ということである。このような調節はTリンパ球やBリンパ球の免疫レセプターからのシグナルで見いだされている。

本研究ではリンパ球と同じく血液細胞由来である破骨細胞の分化・機能に、ラフト・カベオラがどのように影響しているか、またコレステロールがどのように影響しているか、について解析を行った。

3. 研究の方法

破骨細胞の形成は骨髄細胞からの *in vitro* 培養系を用いた。つまり、ICR 雄マウスから大腿骨・脛骨を取り、ここから骨髄細胞を回収した。マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF) 存在下で3日間培養を行い、強固に接着している細胞を破骨細胞前駆細胞として用いた。さらにM-CSF およびRANKL 存在下で3日間の培養を行い、TRAP 陽性・多核の破骨細胞を得た。

なおノックアウトマウスはジャクソンラボラトリから購入した。

破骨細胞分化の各段階でRNA とタンパク質を回収し、RT-PCR や Western Blotting などの分子生物学的解析を行った。また、各種抗体を用いて蛍光免疫染色などを行った。

なおこれらの研究は明海大学の遺伝子組換え実験安全管理規則および動物実験規則に則って行った。

4. 研究成果

(1) *in vitro* での破骨細胞分化系および蛍光ディファレンシャルディスプレイ法を用い、破骨細胞分化に従って誘導される遺伝子の検索を行った結果、63個の遺伝子をクローニングすることができ、シーケンス解析により24個のクローンが得られた。受容体、

酵素、分泌タンパク質、細胞骨格タンパク質などの遺伝子の他、機能未知であるものも約3分の1存在した。

そのうちの1つがカベオラの裏打ちタンパク質 Caveolin-1 であった。RT-PCR およびウエスタンブロッティングでの検証の結果、Caveolin-1 の発現誘導はRANKL 刺激依存的に分化の非常に早い段階で起こることが判明した (図1)。また誘導された Caveolin-1 はすみやかに細胞膜のラフト画分に移行した。

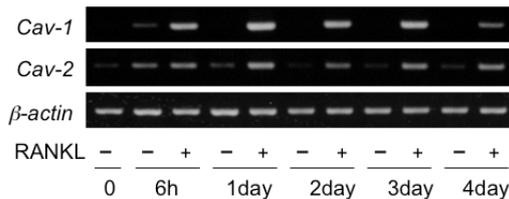


図1 破骨細胞分化における Caveolin 遺伝子の発現誘導

(2) siRNA 法を用いた caveolin-1 のノックダウン実験では破骨細胞形成が非常に抑制されたが、caveolin-1 ノックアウトマウスにおいてはある程度の抑制は見られるものの、顕著な差は認められなかった。

これまでの caveolin-1 ノックアウトマウスの報告では Caveolin-1 の消失による Caveolin-2 の不安定化が報告されているが、破骨細胞ではそのような不安定化は見られなかった。Caveolin-2 の不安定化の詳細な機構は分かっていないが、破骨細胞では分解、もしくは安定化に関与する分子の発現パターンが他の細胞と異なる可能性が考えられる。

caveolin-1 ノックアウトマウスで顕著な差が認められなかった理由も Caveolin-2 による代償作用ではないか、と推測される。

(3) ラフトに多く含まれているコレステロールを除去することによって破骨細胞分化がどのように影響されるかについて解析を行った。破骨細胞分化時にコレステロール除去血清を用いると破骨細胞への分化がほぼ完全に阻害されること、また、この分化阻害は LDL の添加によって回復することが明らかとなった (図2)。この時サイトカイン RANKL 刺激によるシグナル活性化に異常が生じていること、特に Erk の恒常的活性化と Akt の活性化阻害が起きていることが判明した (図

3)。さらに破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 の核移行および ITAM モチーフを持つ FcR γ のラフト移行が阻害されていることも明らかにした。

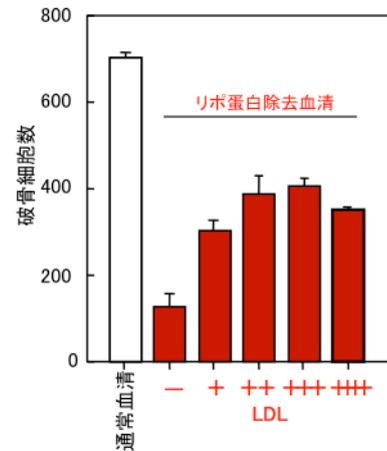


図2 破骨細胞分化へのコレステロールの影響

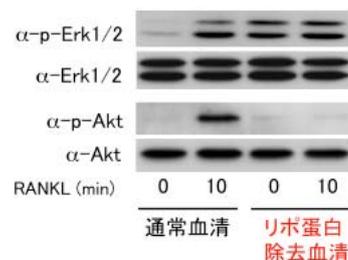


図3 コレステロール除去による Erk, Akt 活性化異常

メチル-β-シクロデキストリンを用いて細胞膜からコレステロールを除去してラフトを破壊した場合も同様のシグナル異常が見られた。

(4) これまで破骨細胞分化にはサイトカイン M-CSF と RANKL のシグナル、および ITAM モチーフを持つ受容体 OSCAR, TREM-2 から FcR γ , DAP12 を介したシグナルが重要であることが分かっていた (図4左)。それらと同時に細胞膜マイクロドメインであるラフト・カベオラの寄与も分化シグナルに重要であることが本研究によって明らかとなった。

つまり、分化の初期にカベオラの裏打ちタンパク質 Caveolin-1 の発現が誘導され、細胞膜マイクロドメインに変化が起こり、おそらくは受容体分子やアダプター分子等の局在変化によって正常な分化に必要なシグナ

ルの調節が行われているものと考えられる。特に FcR γ は通常の分化条件ではラフトに局在していることが本研究で判明しており、調節に大きく関与しているものと考えられる。

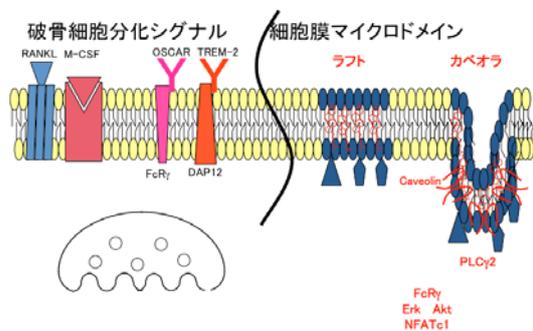


図4 破骨細胞分化シグナルの調節因子

なお、本研究の大部分は明海大学歯学部において行い、研究代表者は平成21年10月に鹿児島大学大学院医歯学総合研究科に異動した。

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3件)

① 増原正明;

サイトカインと破骨細胞分化におけるシグナル伝達
鹿児島大学歯学部紀要, 査読無,
2010, Vol.30, 45-53

② Sato T, Masuhara M, Hada N, Okayasu M, Hakeda Y;

IFN- ζ /limitin inhibits generation of osteoclast precursors.
J. Meikai Dent. Med., 査読有,
2009, 38(1), 1-8

③ Masuhara M, Sato T, Hada N, Hakeda Y;

Protective protein/cathepsin A down-regulates osteoclastogenesis by associating with and degrading NF- κ B p50/p65.
J. Bone Miner. Metab., 査読有,
2009, 27(1), 46-56

[学会発表] (計5件)

① 塚原飛央、永山知宏、増原正明、佐藤友昭

りんごの果実と果皮の慢性的経口投与は卵巣摘出マウスの認知と情動に影響を及ぼす
日本薬理学会
2010年3月18日 大阪

② 増原正明、佐藤卓也、岡安麻里、羽田直人、金田利夫、羽毛田慈之

破骨細胞分化における RANKL に依存して発現する caveolin-1 と lipid/raft の役割
日本骨代謝学会
2008年10月30日 大阪

③ 佐藤卓也、増原正明、羽田直人、岡安麻里、羽毛田慈之

破骨細胞前駆細胞において I 型インターフェロンにより発現調節される microRNA の網羅的解析
歯科基礎医学会
2008年9月25日 東京

④ 真野博、清水純、増原正明、羽毛田慈之、河田哲典、和田政裕

ビタミン B12 はマウス破骨細胞形成の必須因子である
日本ビタミン学会
2008年6月14日 仙台

⑤ 増原正明

破骨細胞におけるカベオリン-1 の機能解析
明海歯科医学会
2008年6月5日 埼玉

[その他]

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増原 正明 (MASUHARA MASA AKI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号：70372901