

平成22年 5月19日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791365

研究課題名（和文）骨芽細胞が発現する破骨細胞ニッチ形成因子の同定

研究課題名（英文）Identification of osteoclast niches regulatory factor produced by osteoblasts

研究代表者

溝口 利英 (MIZOGUCHI TOSHIHIDE)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号：90329475

研究成果の概要（和文）：生体内における破骨細胞分化を観察し、以前我々が同定した静止期破骨前駆細胞（QuOPs）の分化、骨組織への遊走、骨芽細胞による支持機構を調べた。QuOPsは骨髄および末梢血中に存在した。末梢血中のQuOPsは、低Ca食誘導性の骨吸収に伴い骨組織に遊走し、破骨細胞に分化した。血流中のQuOPsの分化にはc-FosとRANKLは必要なかったが、骨組織におけるQuOPsの成熟にはc-Fosが必要であった。

研究成果の概要（英文）：We have identified “cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors: QuOPs” as the direct precursors of osteoclasts in vivo. In the present study, we examined characteristics of QuOPs in vivo. QuOPs were detected in mouse bone marrow and peripheral blood. QuOPs were circulated from peripheral blood into bone tissue in response to bone resorption-inducing stimuli. RANKL and c-Fos were not necessary for differentiation of circulating-QuOPs. c-Fos was necessary for maturation of QuOPs in the bone surface.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨吸収、マクロファージ、破骨細胞、破骨細胞前駆細胞、ニッチ、RANKL、M-CSF、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

(1) 以前我々は、骨芽細胞がM-CSF、RANKL

およびOPGと非依存的に、破骨細胞の形成部位を決定することを明らかにした

(Endocrinology 147:3366, 2006)。(2) 細胞周期の停止した静止期破骨細胞前駆細胞 (cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors、QuOPs) を同定した。(3) QuOPsは骨組織で骨芽細胞により支持されることを明らかにし、その環境を破骨細胞ニッチと名付けた。以上の結果から、骨芽細胞における新規の破骨細胞出現部位決定因子の存在が示唆された。

2. 研究の目的

本申請研究は、(1) 生体内でのQuOPsから破骨細胞への分化に伴う遊走を形態学的に観察し、QuOPsの分化、遊走機構を明らかにする。(2) QuOPsの支持に関与する因子を同定し、解析することにより破骨細胞ニッチの形成機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 生体内におけるQuOPsの検出

以前我々は、骨髄および末梢血中のRANK陽性細胞はB220陽性の画分と陰性の画分が存在することを明らかにした。そこで、マウス骨髄細胞および末梢血細胞よりセルソーターにてRANK(+)/B220(+)細胞およびRANK(+)/B220(-)細胞を分取し、M-CSF、RANKLによる破骨細胞分化能を調べた。

(2) 生体内におけるQuOPsの挙動の解析

Actin-プロモーターの下流で、全身性にDsRedを発現するマウス (DsRed発現マウス) の骨髄から、骨髄細胞を回収した。破骨細胞形成不全マウスであるc-Fos欠損マウスの心臓から骨髄細胞を移植し、10日間飼育した。マウスを安楽死させ、脛骨のパラフィン切片を作製し、TRAPおよびDsRed染色を行った。

(3) 骨吸収時におけるQuOPsの挙動の解析

①マウスの低Ca食による飼育は骨組織における急激な破骨細胞分化を誘導し、その結果骨吸収が亢進する。低Ca食飼育による骨髄および末梢血中のQuOPsの変化をFACSに

て解析した。

②DsRed発現マウスの末梢血から、末梢血単核球細胞を回収した。c-Fos欠損マウスの心臓から末梢血単核球細胞を移植し、低Ca食およびコントロール食にて10日間飼育した。マウスを安楽死させ、血中のTRAP活性、脛骨のTRAPおよびDsRed染色を行った。

(4) QuOPs分化誘導機構の解析

①破骨細胞分化に必須なRANKL、および転写因子c-Fosの遺伝子欠損マウスの骨組織には破骨細胞が存在しない。それぞれ遺伝子欠損マウスにおけるQuOPsの局在を免疫染色により解析した。

②RANKL欠損マウスおよびc-Fos欠損マウスの骨組織にも少量の骨髄細胞が存在する。そこで、これらのマウスより脛骨および大腿骨を回収し、骨髄細胞におけるQuOPsの存在をFACSにて調べた。

4. 研究成果

(1) 生体内におけるQuOPsの検出

マウス骨髄細胞および末梢血細胞よりセルソーターにてRANK(+)/B220(+)細胞およびRANK(+)/B220(-)細胞を分取し、M-CSF、RANKLにて破骨細胞を誘導した。その結果、末梢血および骨髄中のRANK(+)/B220(-)細胞は2-3日後にTRAP陽性細胞への分化が認められた。一方、RANK(+)/B220(+)細胞は破骨細胞分化誘導能を有さなかった。Rag1欠損マウスの骨髄では成熟B細胞がほとんど認められない(Mombaerts P et al. Cell 68:869 1992)。野生型マウスと比較し、Rag1欠損マウスの骨髄中にはRANK(+)/B220(+)細胞が殆ど認められなかった。この結果よりRANK(+)/B220(+)細胞は成熟B細胞画分の一部であることが示唆された。以上より、RANK(+)/B220(-)細胞 (QuOPs) は骨髄および末梢血中に存在することが明らかになった。

(2) 生体内におけるQuOPsの挙動の解析

DsRed発現マウス由来骨髄細胞をc-Fos欠損マウスに移植し、10日間飼育した。その結果、骨髄に多数のTRAP陽性破骨細胞の出現が確認され、全てがDsRed陽性細胞であった。以上より、破骨細胞前駆細胞は血流から骨髄に遊走し、10日以内に破骨細胞に分化することが明らかになった。

(3) 骨吸収時におけるQuOPsの挙動の解析

①マウスを10日間低Ca食により飼育し、骨髄中のRANK(+)/B220(-)細胞画分(QuOPs画分)をFACSにより解析した。その結果、低Ca飼育によるQuOPs画分の上昇が認められた。以上より、骨吸収亢進は骨髄中のQuOPs画分を増加させることが明らかになった。

②c-Fos欠損マウスの末梢血にDsRed発現マウス由来末梢血単核球細胞を移植し、コントロール食および低Ca食にて10日間飼育した。その結果、コントロール食群に比較し、低Ca食群の方が血中のTRAP5bが有意に高値を示した。さらに、コントロール食群に比較し、低Ca食飼育群の方が、より多くのTRAP陽性破骨細胞の出現が骨組織に認められた。すべてのTRAP陽性細胞はDsRed陽性であった。以上より、生体内における骨吸収促進は、末梢血中から骨組織中へのQuOPsの遊走を促進することが示唆された。

(4) QuOPs分化誘導機構の解析

①RANKL欠損マウスの骨組織にはRANK陽性細胞(QuOPs)が認められたが、c-Fos欠損マウスには認められなかった。

②RANKL欠損マウスおよびc-Fos欠損マウスの骨髄と末梢血中にも野生型マウスと同様にRANK(+)/B220(-)細胞画分がFACS解析により認められた。以上より、血流中に存在するQuOPs(circulating-QuOps)の出現にRANKLおよびc-Fosは必要ないことが示唆された。一方、骨組織に遊走したQuOPsの出現にはRANKLは必要ないが

c-Fosは必要であることが示唆された。

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7件)

① Takahashi N(1), Mizoguchi T(4) (他2名) Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *Adv Exp Med Biol.* (査読有)2010; 658:21-30.

② Koide M(1), Mizoguchi T(4) (他9名) Diphenylhydantoin inhibits osteoclast differentiation and function through suppression of NFATc1 signaling.

J Bone Miner Res. (査読有)2009; 24:1469-1480.

③ Narita N(1), Mizoguchi T(6) (他13名) Multiwalled carbon nanotubes specifically inhibit osteoclast differentiation and function. *Nano Lett.* (査読有)2009; 9:1406-1413.

④ Takahashi M(1), Mizoguchi T(2) (他11名) Docetaxel inhibits bone resorption through suppression of osteoclast formation and function different manners. *J. Bone Miner. Metab.* (査読有)2009; 27:24-35.

⑤ Mizoguchi T(1) (他19名) Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *J Cell Biol.* (査読有)2009; 184:541-554.

⑥ Nagasawa S(1), Mizoguchi T(6) (他10名) Nonlinear stress analysis of titanium implants by finite element method. *Dent Mater J.* (査読有)2008; 4:633-639.

⑦ Yamashita T(1), Mizoguchi T(3) (他6名) MKK6-p38 MAPK signaling pathway enhances survival but not bone-resorbing

activity of osteoclasts. *Biochem Biophys. Res. Commun.* (査読有)2008; 365:252-257.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 溝口利英、Characterization of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors、第 26 回内藤カンファレンス オステオバイオロジー、2009 年 11 月 5 日、兵庫・淡路夢舞台国際会議場
- ② 溝口利英、生体内における破骨細胞前駆細胞の同定と性状解析、骨発生・再生研究会 (第 12 回)、2009 年 10 月 31 日、東京・慶応義塾大学
- ③ 溝口利英、破骨細胞前駆細胞の同定と動態解析、運動器科学研究会 (第 10 回)、2009 年 9 月 18 日、東京・東京ステーションコンファレンス
- ④ 溝口利英、「ミニシンポジウム」骨芽細胞/ストローマ細胞が支持する破骨細胞ニッチ、日本骨代謝学会学術集会 (第 27 回)、2009 年 7 月 24 日、大阪・大阪国際会議場
- ⑤ 中道裕子、活性型ビタミン D3 による M-CSF 非依存的な破骨細胞形成における IL-34 の役割、日本骨代謝学会学術集会 (第 27 回)、2009 年 7 月 24 日、大阪・大阪国際会議場
- ⑥ 武藤昭紀、細胞周期の停止した静止期破骨細胞前駆細胞 (QOP) の性状解析-QOP は B 細胞マーカーを発現している-、日本骨代謝学会学術集会 (第 27 回)、2009 年 7 月 24 日、大阪・大阪国際会議場
- ⑦ 荒井敦、c-Fos 遺伝子欠損マウスを用いた静止期破骨細胞前駆細胞 (QOP) の解析-c-Fos は RANK の発現を誘導し QOP 分化を制御する-、日本骨代謝学会学術集会 (第 27 回)、2009 年 7 月 24 日、大阪・大阪国際会議場
- ⑧ 溝口利英、Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo、硬組織研究セミナー (第 5 回)、2009 年 7 月 1 日、東京・慶応義塾大学
- ⑨ Toshihie Mizoguchi、The influence of titanium-dioxide-doped phosphate-based glass on MC3T3-E1、87nd General Session & Exhibition of the IADR、2009 年 4 月 3 日、マイアミ・USA
- ⑩ 衣川さや、Minocycline が樹状細胞と破骨細胞の分化に及ぼす影響、日本骨代謝学会 (第 26 回)、2008 年 10 月 30 日、大阪 大阪国際会議場
- ⑪ 武藤昭紀、破骨細胞分化に特化した静止期前駆細胞 (QOP) は末梢血に存在し骨組織に遊走する、日本骨代謝学会 (第 26

回)、2008 年 10 月 30 日、大阪 大阪国際会議場

- ⑫ Nobuyo Narita、Multi-Walled Carbon Nanotubes Inhibit Osteoclast Differentiation by Inhibiting Nuclear Translocation of NFATc1、30th American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR)、2008 年 9 月 15 日、モントリオール・カナダ、Palais des congres de Montreal
- ⑬ Atsushi Arai、Cell Cycle-Arrested Quiescent Osteoclast Precursors (QOP) Are Cells Committed to the Osteoclast Lineage、30th American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR)、2008 年 9 月 15 日、モントリオール・カナダ、Palais des congres de Montreal
- ⑭ Akinori Muto、Cell Cycle-Arrested Quiescent Osteoclast Precursors (QOP) Circulate to Settle in the Osteoclast Niche、2nd International Conference on Osteoimmunology、2008 年 6 月 15 日、ロードス島・ギリシャ、Hilton Conference Center

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 利英 (MIZOGUCHI TOSHIHIDE)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：90329475

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：