

平成23年 5月30日現在

機関番号：33602  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21791817  
 研究課題名(和文) 破骨細胞前駆細胞の誕生および供給における新規サイトカイン IL-34 の役割  
 研究課題名(英文) Role of a new cytokine IL-34 in occurrence of osteoclast precursors and their movement to bone.  
 研究代表者  
 中道 裕子 (NAKAMICHI YUKO)  
 松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師  
 研究者番号：20350829

研究成果の概要(和文)：M-CSF は、RANKL とともにマクロファージから破骨細胞(OC)への分化に必要である。最近、M-CSF 受容体の第2リガンド IL-34 が発見された。本研究により、IL-34 は脾臓において、M-CSF は骨において OC 前駆細胞の維持に関与することが明らかになった。OC 形成における活性型ビタミンDの新しい役割は、脾臓の血管や骨組織においてIL-34の発現を上昇させることで、OC 前駆細胞の脾臓から血流への動員、および骨への定着を促進することであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：M-CSF and RANKL are essential cytokines for differentiation from macrophages into osteoclasts (OCs). IL-34 is a recently discovered ligand for M-CSF receptor (M-CSFR). Here we show that IL-34 is responsible for the distribution of OC precursors in spleen. On the other hand, M-CSF is responsible for the distribution in bone. We found that active vitamin D could induce OCgenesis in M-CSF-deficient op/op mice. Our previous study showed that active vitamin D enhanced in vivo OCgenesis through the upregulation of RANKL in bone. In present study, we unveiled new roles of active vitamin D in OCgenesis. Active vitamin D upregulates IL-34 expressions in splenic blood vessels and bone. That results in facilitating the mobilization of OC precursors from spleen to blood stream and subsequent their settlement to bone.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
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：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：IL-34, M-CSF, 破骨細胞前駆細胞, 破骨細胞, 活性型ビタミン D

### 1. 研究開始当初の背景

M-CSF は、RANKL とともにマクロファージから破骨細胞(OC)への分化にも必要である。最近、M-CSF 受容体の第 2 リガンド IL-34 が発見された。一方、我々は、M-CSF 欠損の op/op マウスにおいて活性型ビタミン D 投与により破骨細胞が誘導されることを見出していた。さらに我々は、細胞周期が停止した OC 前駆細胞は、M-CSF および RANKL 非依存的に形成され、かつ OC 前駆細胞が、血中を循環することを見出した。(J Cell Biol 184:541, 2009, 2008 年 日本骨代謝学会プログラム抄録集 p.185)。申請者はこれらの知見より、RANKL および M-CSF 以外の第 3 の因子が骨以外の組織で OC 前駆細胞の形成を促し、最終的には血流を介して骨に供給しているという仮説を立てた。この第 3 の因子の候補が IL-34 であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、「OC 前駆細胞の形成に IL-34 が関与している」、という仮説をもとに OC 前駆細胞誕生および骨組織への供給のメカニズムを解明することを目的とする。即ち、IL-34 が OC 形成のどの段階にどの部位で関与しているか、および M-CSF と IL-34 の役割分担を明らかにすることを目的とする。さらに、M-CSF および IL-34 と活性型ビタミン D の関わりについても明らかにすることも目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) 破骨細胞前駆細胞の分布における M-CSF, IL-34 および RANKL の役割を明確にするために、脾臓と骨における OC 前駆細胞 (RANK 陽性細胞) の分布を解析した。
- (2) ①op/op マウスにおいて、活性型ビタミン D

投与により、脾臓の IL-34 発現が上昇するか調べた。②op/op マウスにおいて、脾臓の OC 前駆細胞が活性型ビタミン D による OC 出現に必要なか検証するため、脾臓摘出実験を行った。さらに、③op/op マウスにおいて、活性型ビタミン D による OC 誘導に IL-34 が必要であるか検証するため、*in vivo* において IL-34 をノックダウンした。

- (3) op/op マウスの加齢による破骨細胞の出現への、IL-34 の関与について検討するため、脾臓摘出後の 5 週間後の骨組織を解析した。
- (4) M-CSF と IL-34 の活性の相違を明らかにし、*in vivo* における役割分担を明確にした。

### 4. 研究成果

- (1) IL-34 は脾臓の血管内皮細胞特異的に発現し、骨での発現は著しく低かった。op/op マウスにおいて、OC 前駆細胞に分化し得る M-CSFR 陽性マクロファージや OC 前駆細胞である RANK 陽性細胞が、骨には存在せず脾臓に存在した。一方 RANKL KO マウスでは、この両者とも骨と脾臓に存在した。
- (2) ①op/op マウスに活性型ビタミン D を投与すると、脾臓の血管内皮細胞において IL-34 の発現が上昇した。②op/op マウスに脾臓摘出を施すと、活性型ビタミン D による破骨細胞誘導が認められなかった。③IL-34 siRNA の静脈投与により IL-34 発現をノックダウンした後、活性型ビタミン D を投与したところ、破骨細胞形成が完全に抑制された。以上、脾臓の IL-34 発現が活性型ビタミン D による破骨細胞形成に関与していること

が示された。

- (3) op/op マウスおよび野生型マウスの骨と脾臓の双方において、加齢に伴いIL-34 発現レベルの著しい上昇を認めた。op/op マウスに脾臓摘出を施すと、加齢に伴う破骨細胞出現が抑制された。従って、加齢に伴う破骨細胞出現にも IL-34 が関与することが示唆された。
- (4) 培養系においてIL-34 は、M-CSFと同様にOC 分化および延命を促進した。

以上の結果より、IL-34 は脾臓において、M-CSF は骨においてOC 前駆細胞の維持に関与することが明らかになった。OC 形成における活性型ビタミン D の役割は、脾臓の血管や骨組織においてIL-34 の発現を上昇させることで、OC 前駆細胞の脾臓から血流への動員、および骨への定着を促進することであると考えられた。そして最終的に活性型ビタミン D は、骨芽細胞のRANKL 発現上昇を介してOC 分化を促進することがわかった。

#### 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 8 件)

- ① Kariya Y, Honma M, Hanamura A, Aoki S, Ninomiya T, Nakamichi Y, Udagawa N, Suzuki H.; Rab27a and Rab27b are involved in stimulation-dependent RANKL release from secretory lysosomes in osteoblastic cells. **J Bone Miner Res** (査読有) **26**:689-703, 2011
- ② Ikawa T, Kawaguchi A, Okabe T, Ninomiya T, Nakamichi Y, Nakamura M, Uehara S, Nakamura H, Udagawa N, Takahashi N, Nakamura H, Wakitani S.; Hypergravity suppresses bone resorption in

ovariectomized rats. **Adv Space Res** (査読有) **47**: 1214-1224, 2011

- ③ Aoki S, Honma M, Kariya Y, Nakamichi Y, Ninomiya T, Takahashi N, Udagawa N, Suzuki H.; Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. **J Bone Miner Res** (査読有) **25**:1907-1921, 2010
- ④ Lee JW, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Udagawa N, Takahashi N, Im NK, Seo HJ, Jeon WB, Yonezawa T, Cha BY, Woo JT.; Alisol-B, a novel phyto-steroid, suppresses the RANKL-induced osteoclast formation and prevents bone loss in mice. **Biochem Pharmacol** (査読有) **80**:352-361, 2010
- ⑤ 中村美どり, 中道裕子, 宇田川信之; 骨吸収と骨形成の調節機構の解明を目指す 日本歯科評論(査読無)**70**: 9-11, 2010
- ⑥ Uchiyama M, Nakamichi Y, Nakamura M, Kinugawa S, Yamada H, Udagawa N, Miyazawa H.; Dental pulp and periodontal ligament cells support osteoclastic differentiation. **J Dent Res** (査読有) **88**: 609-614, 2009
- ⑦ 中道裕子, 小林泰浩, 宇田川信之; RANKL/RANK/OPG システムと骨吸収性疾患. **細胞** (査読無) **41**: 312-315, 2009
- ⑧ 中村美どり, 中道裕子, 中村浩志, 宇田川信之; 破骨細胞の形成と骨吸収 日本臨床 (査読無) **67**: 889-896, 2009

[学会発表] (計 9 件)

- ① 中道裕子; 破骨細胞形成における IL-34 の役割, 第 4 回骨・軟骨フロンティア, 2010 年 11 月 20 日, ベルサーレ八重洲(東京都中央区)
- ② 中道裕子; 破骨細胞形成における IL-34 の役割, 第 28 回日本骨代謝学会, 2010 年 7 月 23 日, 京王プラザホテル(東京都

- 新宿区)
- ③ 青木茂樹, 本間雅, 苅谷嘉顕, 中道裕子, 二宮禎, 高橋直之, 宇田川信之, 鈴木洋史; OPG による RANKL 細胞内選別選別輸送機構の解析, 第 28 回日本骨代謝学会, 2010 年 7 月 23 日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)
  - ④ 苅谷嘉顕, 本間雅, 青木茂樹, 二宮禎, 中道裕子, 宇田川信之, 鈴木洋史; 骨芽細胞における Rab27a および Rab27b を介した RANKL 放出制御, 第 28 回日本骨代謝学会, 2010 年 7 月 23 日, 京王プラザホテル (東京都新宿区)
  - ⑤ 中道裕子; 破骨細胞前駆細胞の形成と供給における M-CSF と IL-34 の役割, 第 9 回松本ボーンフォーラム, 2010 年 5 月 22 日, 松本歯科大学 (長野県塩尻市)
  - ⑥ Nakamichi Y, Udagawa N, Mizoguchi T, Kobayashi Y, Takahashi N; The role of splenic IL-34 in CSF-1-independent osteoclastogenesis induced by active vitamin D<sub>3</sub>, 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, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)
  - ⑦ Nakamichi Y, Udagawa N, Mizoguchi T, Kobayashi Y, Takahashi N.; The role of splenic IL-34 in CSF-1-independent osteoclastogenesis induced by active vitamin D<sub>3</sub>, 第 31 回米国骨代謝学会, 2009 年 9 月 11 日および 12 日, Colorado Convention Center, デンバー (米国コロラド州)
  - ⑧ 中道裕子, 宇田川信之, 溝口利英, 小林泰浩, 高橋直之; 活性型ビタミン D<sub>3</sub> 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, 2009 年 7 月 23 日, 第 27 回日本骨代謝学会, 大阪国際会議場(大阪市北区)

- ⑨ 中道裕子; 破骨細胞前駆細胞の誕生と供給における活性型ビタミン D<sub>3</sub> の役割, 東京大学分子細胞生物学研究所・核内情報研究分野・OB 会セミナー, 2009 年 7 月 11 日, 東京大学農学部 (東京都文京区弥生)

[その他]  
ホームページ等  
[http://www.mdu.ac.jp/laboratory/research\\_contents/index.html](http://www.mdu.ac.jp/laboratory/research_contents/index.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中道 裕子 (NAKAMICHI YUKO)  
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師  
研究者番号: 20350829

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし