

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 年度～2010 年度

課題番号：21792104

研究課題名(和文) 矯正力負荷により制御される破骨細胞ニッチの解析

研究課題名(英文) Analysis of osteoclast niche regulated by correction power load

研究代表者

荒井 敦 (ARAI ATSUSHI)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号:00532772

研究成果の概要(和文)：本研究における破骨細胞形成不全マウスを用いた解析により，骨表面における破骨細胞前駆細胞の RANK の発現上昇には，RANKL ではなく c-Fos が必要であることを明らかにした．さらに，破骨細胞前駆細胞における c-Fos を介した RANK の発現上昇機構について検討した．その結果，破骨細胞前駆細胞において c-Fos は M-CSF/c-Fms シグナルの下流で RANK の発現上昇にも必要であることが明らかになった．

研究成果の概要(英文)：This research revealed that c-Fos, but not RANKL, is required for the up-regulation of RANK in osteoclast precursors. Then, we analyzed the mechanism of c-Fos-mediated up-regulation of RANK in osteoclast precursors. Researchers have believed that that c-Fos plays essential roles not only in RANKL-induced formation of osteoclasts but also in M-CSF-induced formation of osteoclast precursors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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・歯学 細目：矯正・小児系歯学

キーワード：破骨細胞前駆細胞，RANK，RANKL，c-Fos，M-CSF，

マクロファージ，メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

これまで歯の移動における破骨細胞出現メカニズムは，骨芽細胞や歯根膜細胞が発現する RANKL，OPG を中心に解析されてきた

(J Dent Res 80: 887, 2001; J Bone Miner Res 17: 210, 2002). 我々は静止期破骨細胞前駆細胞(QOP)を同定した. QOPは骨吸収部位へ血流を介して遊走し，破骨細胞に分化する(Mizoguchi et al. J Cell Biol

184: 541-54, 2009). 我々は、歯科矯正によるメカニカルストレスもQOPの遊走を促すことを想定しており、そのメカニズム解明が歯科矯正治療に貢献することを確信し本研究を開始した。以下の学術的背景からメカニカルストレスによるQOPの遊走機構が存在するという着想にいたった。

(1) *in vitro* 実験より、細胞周期が停止した、静止期破骨細胞前駆細胞 (QOP) を同定した (米国骨代謝学会 JBMR 22 Suppl 1: S082, 2007)。破骨細胞前駆細胞はQOPを経て破骨細胞へ分化する。In vivo において、QOPは骨芽細胞に近接して存在しており、QOPは骨芽細胞により支持される可能性が考えられた。この支持環境を破骨細胞ニッチと名付けた。

(2) 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のQOPの局在を解析した。野生型および RANKL 欠損マウスの脛骨ではQOPが存在するが、c-Fos 欠損マウスではQOPが認められなかった (第30回米国骨代謝学会 JBMR 23 Suppl 1: SU98, 2008) (図 3)。このことは、c-Fos がQOPへの分化、および骨組織への局在に必要であることを示唆する。

以上の研究成果より、QOPは骨吸収部位へ遊走し、骨吸収刺激因子で破骨細胞に分化することが明らかとなった。さらに、我々は c-Fos がQOPの骨組織への出現に必要であることを明らかにした。骨芽細胞や多くの細胞種で、メカニカルストレスによる c-Fos の発現上昇が報告されている (Cell Signal 12: 435, 2000; J Biol Chem 279: 49795, 2004)。以上より、メカニカルストレスがQOPの分化および骨吸収部位への遊走を促すという着想に至った。

2. 研究の目的

我々は、細胞周期が停止した静止期破骨細胞前駆細胞 (cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors, QOP) が破骨細胞形成部位に特異的に遊走することを明らかにしている。QOPは骨芽細胞により数週間、未分化状態で支持されることを確認し、この支持環境を破骨細胞ニッチと名付けた (米国骨代謝学会 JBMR 22 Suppl 1: S082, 2007) (Mizoguchi et al. J Cell Biol, in press)。歯科矯正治療において、骨吸収が認められる圧迫側にのみ、破骨細胞が出現する。このことは、メカニカルストレスが破骨細胞ニッチの形成を誘導することを示唆する。

我々は、破骨細胞ニッチの調節メカニズムの解明が、効率良い矯正治療の確立に役立つことを確信し、メカニカルストレスによる破骨細胞ニッチの調節機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、破骨細胞ニッチの調節メカニズムの解明を目的として研究計画を作製した。研究目的達成のためには学術的背景でも述べた c-Fos による破骨細胞前駆細胞の分化コントロールの解明を最優先課題とした。

(1) QOP の局在

RANKL 欠損マウスならびに c-Fos 欠損マウスの脛骨の凍結切片を作製し、RANK 抗体、c-fms 抗体、ならびに F4/80 抗体を使用し、免疫組織染色をおこなった。

(2) RANK の発現解析

RANKL 欠損マウス、ならびに c-Fos 欠損マウス脾臓由来のマクロファージより mRNA ならびにタンパクを回収し、それぞれ Real Time PCR 法および、Western blotting 法にて RANK

の発現量について解析をおこなった。

(3) c-Fos 発現誘導因子の同定

野生型マウス, c-Fos 欠損マウス脾臓由来のマクロファージに M-CSF を添加し RANK および c-Fos の発現変動を Real Time PCR 法および, Western blotting 法にておこなった。

4. 研究成果

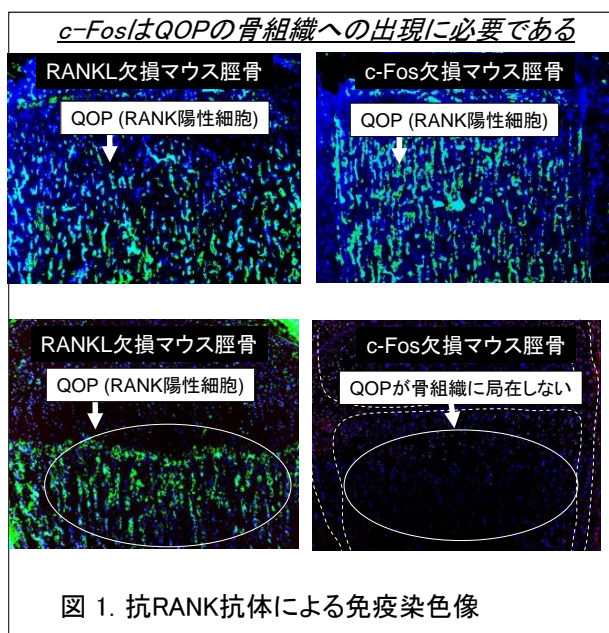
(1) QOP の局在

RANKL 欠損マウスおよび, c-Fos 欠損マウスの骨表面の RANK (QOP) の局在を解析した。

①F4/80 陽性マクロファージ (Mφ) は, RANKL 欠損マウスおよび c-Fos 欠損マウスの骨組織に存在した。

②M-CSF 受容体 (c-Fms) 陽性細胞は, RANKL 欠損マウスおよび c-Fos 欠損マウスの骨組織の両方に認められた。

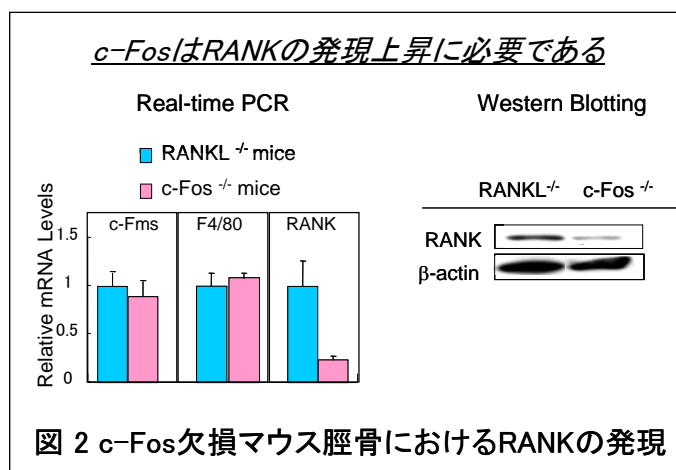
③RANK 陽性細胞は, RANKL 欠損マウスの骨表面にのみ存在し, c-Fos 欠損マウスでは全く認められなかった (図 1)。



(2) RANK の発現解析

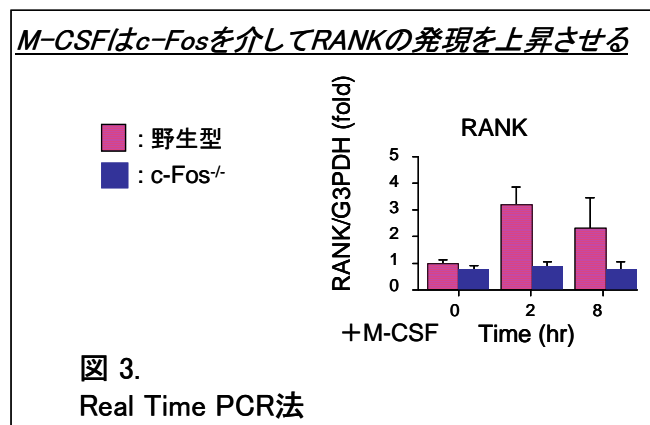
mRNA における RANKL 欠損マウス, c-Fos 欠

損マウスの c-Fms ならびに F4/80 の発現に差は認められなかったが, c-Fos 欠損マウスの骨組織における RANK の発現量は, mRNA およびタンパク質レベルで, RANKL 欠損マウスより低値であった (図 2)。



(3) c-Fos 発現誘導因子の同定

野生型マウス由来マクロファージに対する M-CSF 刺激は, c-Fos と RANK の発現を上昇させた。一方, c-Fos 欠損マウス由来マクロファージでは M-CSF 刺激による RANK の発現上昇は認められなかった (図 3)。



これまで c-Fos は, RANKL/RANK シグナルの下流でのみ破骨細胞分化に寄与すると考えられてきた。本研究により, 骨表面における破骨細胞前駆細胞の RANK の発現上昇には, RANKL は必要なく, c-Fos が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 3 件)

1. Takahashi N, Muto A, Arai A, Mizoguchi T. (2010) Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *Adv Exp Med Biol.* 658:21-30(査読有).
2. Mizoguchi T Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Yamashita T, Hosoya A, Ninomiya T, Nakamura H, Yamamoto Y, Kinugawa S, Nakamura M, Nakamichi Y, Kobayashi Y, Nagasawa S, Oda K, Tanaka H, Tagaya M, Penninger JM, Ito M, Takahashi N (2009) Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *Journal of Cell Biology* 184: 541-554(査読有).
3. 荒井 敦 (2009) 海外文献紹介 「インターフェロン調節因子8は破骨細胞形成を抑制することにより骨代謝を制御する」骨粗鬆症治療: Vol. 8 No. 4: 89(査読無).

[学会発表] (計 5 件)

1. 溝口利英, 武藤昭紀, 宇田川信之, 荒井敦, 小林泰浩, Penninger JM, 高橋直之: 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, 武藤昭紀, 荒井敦, 小林泰浩, 中道裕子, 宇田川信之, 高橋直之: 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.
3. 荒井敦, 溝口利英, 武藤昭紀, 小林泰浩, 川原一郎, 中村美どり, 宇田川信之, 山田一尋, 高橋直之: 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・国際会議所.

4. 武藤昭紀, 溝口利英, 荒井敦, 小林泰浩, 中道裕子, 吉成伸夫, 宇田川信之, 高橋直之: 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・国際会議所.

5. 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・国際会議所.

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 荒井 敦 (ARAI ATSUSHI)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 00532772

- (2) 研究分担者
()

研究者番号:

- (3) 連携研究者
()

研究者番号: