

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590999

研究課題名（和文） RAGE シグナルによる骨芽/破骨細胞間ネットワークと
エピジェネティクス制御機構研究課題名（英文） Effect of RAGE on the interaction between osteoblasts and osteoclasts
and its epigenetic regulation

研究代表者

吉田 知彦 (YOSHIDA TOMOHIKO)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20422222

研究成果の概要（和文）：我々は、糖尿病合併症進展に関与する AGEs-RAGE 系の破骨細胞分化に対する影響を検討した。前破骨細胞系細胞 RAW264.7 細胞と前骨芽細胞系細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いた実験において、RAGE シグナルは骨芽細胞から分泌された因子を介して破骨細胞分化刺激増加をもたらし、破骨細胞分化過程に於いては同じ NFATc1 下流遺伝子でもそれぞれ別々の時期に発現増加のピークがあることが判明した。

研究成果の概要（英文）：The receptor for AGEs (RAGE) is implicated in the progression of diabetic complications. We were interested in determining the influence of RAGE on bone metabolism. In the experiments using pre-osteoclastic RAW264.7 cells and pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells, ligand-induced activation of RAGE stimulates osteoclastogenesis through factors secreted from osteoblasts. Each NFATc1-downstream gene has a different timing of its peak expression, suggesting stage-specific regulation of the each NFATc1 target genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病、シグナル伝達、エピジェネティクス、骨リモデリング、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨強度は 2000 年の NIH consensus 会議において 7 割が骨密度、残りの 3 割が骨質にて規定されるとされ、骨密度のみならず骨質の改善が重要であることが叫ばれている。骨密度については簡便かつ比較的正確に評価することが現在可能であるが、骨質については確立された評価法がないのが現状である。そ

のような中、2 型糖尿病患者に於いては骨密度が増加しているにも拘らず骨折リスクが増加するというパラドキシカルな現象が見られ、新たな骨質評価法の構築において格好の研究対象と考えられる。糖尿病における骨折リスク上昇の分子メカニズムとしては、Glycosuria が高カルシウム尿症をもたらすことや、骨同化作用を持つ Insulin-like

growth factor I が糖尿病患者で低下している可能性、炎症性サイトカインの上昇、微小血管障害の関与など、様々な可能性が示唆されているが、その中でも特に注目されているのが高血糖状態や老化で増加する Advanced glycation end products (AGEs) である。

AGEs と骨粗鬆症については高血糖による Collagen cross-link の glycosilation による AGEs の蓄積 (Pentosidine の蓄積) が骨脆弱性を悪化させることが知られる一方、AGEs 自体がその受容体 RAGE を介して作用することの重要性が報告されている (Santana R. B., et al. *Diabetes* 2003, Ding KH, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2006)。しかしながら、依然として詳細な分子メカニズムについては不明である。そこで我々は、RAGE の ligand の一つで immunoglobulin superfamily に属する calcium binding protein である S100 蛋白を用いて、RAGE-ligation による骨代謝への影響について検討した。すると予想に反して RAGE-ligand である S100 蛋白は骨芽細胞の増殖を抑制するとともに、破骨細胞増殖・分化についても抑制することが判明した。この結果を踏まえて我々は、S100 蛋白が骨芽細胞から何らかの破骨細胞増殖・分化促進因子の分泌を促すことにより最終的に破骨細胞分化が進むのではないかと考えた。実際に S100 蛋白を前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞に添加し、その conditioned medium を前破骨細胞様細胞株 RAW264.7 細胞に添加したところ、破骨細胞分化マーカーである Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 活性の上昇が S100 濃度依存性に認められた。このことから、RAGE シグナルにおいては骨芽細胞から何らかの破骨細胞分化促進因子の paracrine による破骨細胞分化制御が極めて重要であり、RANKL や M-CSF、OPG などの因子と協調して働く新たな破骨細胞分化制御機構の存在が推定された (Yoshida T, et al. *J Cell Biochem*, 2009)。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの結果を踏まえ、AGEs-RAGE シグナルを中心とした骨芽細胞と破骨細胞の cell-cell interaction における分子生物学的メカニズムを明らかにするため、S100 を投与した骨芽細胞の培養液における破骨細胞分化促進因子の濃度変化についてサイトカインを中心として網羅的に解析するとともに、破骨細胞分化の master regulator である NFATc1 に注目し、次世代型シーケンサーなどを用いて NFATc1 の DNA 結合部位や、ヒストン修飾、DNA メチル化、その他の調節エレメント部位について、さらにはその転写制御を司る co-factor の同定を行い、RAGE シグナルを中心とした細胞内代謝

環境変化による NFATc1 を介した破骨細胞分化エピジェネティクス制御について解明することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

骨芽細胞モデルとしてマウス頭蓋冠由来前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を、破骨細胞モデルとしてマウス前骨芽細胞系細胞 RAW264.7 細胞を用いた。

(2) Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) assay

MC3T3-E1 細胞と RAW264.7 細胞を 96-well plate 上で培養し、15 ng/ml の recombinant soluble RANKL 有りまたは無しの条件で、S100 蛋白を様々な濃度 (0, 2, 20, 200 nM) で添加した。37°C, 5% CO₂ で 72 時間培養後、10% (v/v) ホルマリンで固定し、3.7 mM *p*-nitrophenyl phosphatase 入り 50 mM クエン酸/10 mM 酒石酸ナトリウム緩衝液を加え、上清を 0.1 N 水酸化ナトリウムと反応させて生成した *p*-nitrophenol を 410 nm の吸光度で測定した。

(3) Cytokine assay

様々な濃度の S100 を添加した MC3T3-E1 細胞からの培養液を用いて MILIPLEX™ MOUSE SERUM ADIPOKINE を用いて解析した。

(4) RNA-seq, TSS 解析

RANKL 刺激前、刺激後の RAW264.7 細胞における遺伝子変化について、Illumina 社の Genome Analyzer を用いて検討した。

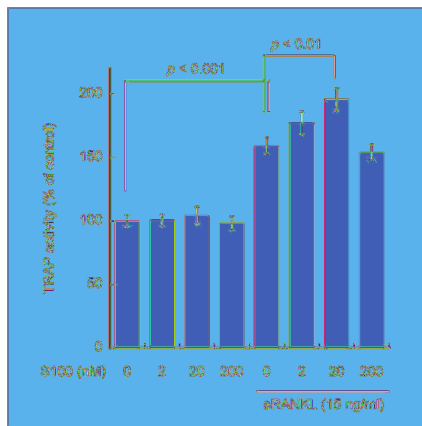
4. 研究成果

(1) 骨芽細胞と破骨細胞共培養系における RAGE-ligand S100 の役割

これまで RAGE-ligand である S100 を添加した MC3T3-E1 細胞から得た Conditioned Medium を用いて、破骨細胞系 RAW264.7 細胞の分化が促進されることを示してきたが、より生理的な骨芽細胞と破骨細胞の共培養系においても、S100 刺激により破骨細胞分化が促進されるかどうかについては明らかではない。そこで、MC3T3-E1 細胞と RAW264.7 細胞において S100 による RAGE シグナル刺激が破骨細胞分化にどのような影響を及ぼすかを検討した。

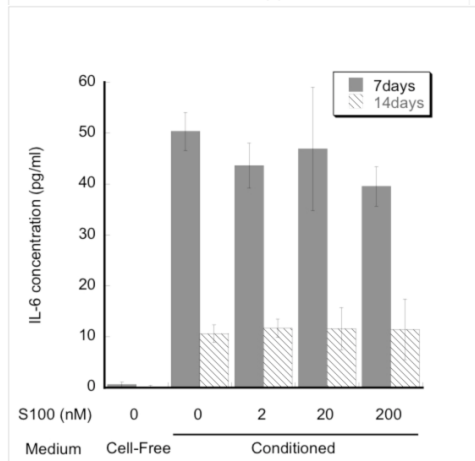
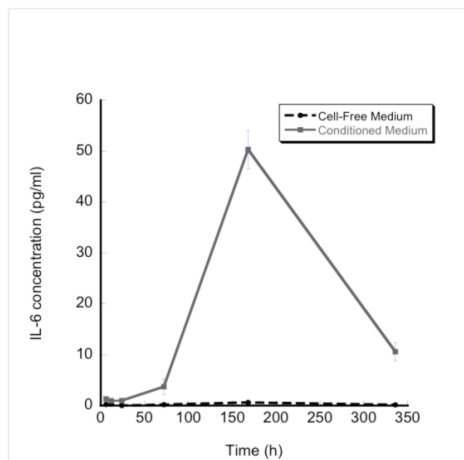
我々のこれまでの検討で S100 を添加した MC3T3-E1 細胞から得た Conditioned Medium を破骨細胞に添加すると、3-5 日前後から TRAP 活性が有意に上昇したことから、MC3T3-E1 細胞と RAW264.7 細胞の共培養系において、S100 添加 72 時間後の TRAP 活性の変化を検討した。RANKL 非刺激下においては、S100 の TRAP 活性上昇効果は認められなかつ

たが、RANKL 刺激下では 20 nM を最大とする S100 の TRAP 活性上昇効果が濃度依存的に認められた。



(2) S100 刺激による骨芽細胞培養液中のサイトカインの変化

閉経後骨粗鬆症や関節リウマチなどにおいては、Interleukin (IL)-1, IL-6 や TNF- α などの骨吸収性サイトカインの役割が重要であるが、我々は特に IL-6 に注目し、S100 による RAGE 刺激によって骨芽細胞からの IL-6 の分泌が亢進するかを検討した。MC3T3-E1 の通常の培養条件では、細胞培養時間の増加とともに IL-6 の増加が認められた。



しかしながら、S100 添加による IL-6 の分

泌増加は認められなかった。このことから、S100 による破骨細胞分化促進効果は IL-6 を介さないサイトカインによってもたらされると考えられた。

(3) RNA-sequencing, TSS 解析による破骨細胞分化における NFATc1 下流遺伝子の動き

マウス前骨芽細胞系細胞 RAW264.7 細胞の RANKL 刺激前後の動きを RNA-sequencing, TSS 解析により解析したところ、同じ NFATc1 下流遺伝子でも、それぞれ発現増加の認められる時期が異なることが確認された。また、RANKL 刺激で増加する遺伝子の中には、既知の micro-RNA や破骨細胞分化における役割が知られていない Linc RNA を含む多くの遺伝子が検出された。これらの結果は、様々な上流シグナルに応じた転写因子複合体形成を介して、機能の異なる多様な NFATc1 下流遺伝子発現制御により、破骨細胞の複雑な分化過程が制御されている可能性が示唆された。

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 4 件)

- ①. Tatsuno I, Suzuki S, Yoshida T, et al. (計 7 名) Disease-related Risk of Vertebral Fracture During Glucocorticoid Treatment of Collagen Vascular Diseases. *The Journal of Rheumatology*. 査読有、Vol. 38, No. 10, 2011、pp. 2270-2272、DOI: 10.3899/jrheum.110412
- ②. Sugiyama T, Suzuki S, Yoshida T, et al. (計 9 名) Age, Initial Dose and Increase are Independent Risk Factors for Symptomatic Vertebral Fractures in Glucocorticoid-Treated Male patients. *Internal Medicine*. 査読有、Vol. 50(8), 2011、pp. 817-824、DOI: 10.2169/internalmedicine.50.4443
- ③. 吉田知彦、龍野一郎、ステロイド骨粗鬆症、カレントセラピー、査読無、Vol. 29, No. 2, 2010、pp. 22-26.
- ④. Sugiyama T, Suzuki S, Yoshida T, et al. (計 7 名) Incidence of Symptomatic Vertebral Fractures in Women of Child bearing Age Newly Treated With High-Dose Glucocorticoid. *Gender Medicine* 査読有、Vol. 7, No. 3, 2010、pp. 218-229、DOI:10.1016/j.genm.2010.06.004

[学会発表] (計 4 件)

- ①. 吉田知彦 RANKL 依存性破骨細胞分化

におけるゲノムワイドでの転写産物解析、日本内分泌学会学術集会、2012年4月21日、名古屋

- ②. 吉田知彦 骨粗鬆症の診断と治療、千葉メディカルセンターベイサイドフォーラム、2011年11月25日、千葉
- ③. Yoshida T. Prevalence of Symptomatic Vertebral Fractures in Premenopausal Women Newly Treated with High-Dose Glucocorticoid. The American Society for Bone and Mineral Research. October 18, 2010, Toronto, Canada.
- ④. 吉田知彦 膠原病のステロイド治療にともなう疾患特異的椎体骨折リスク、日本骨代謝学会学術集会、2010年7月21日、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 知彦 (YOSHIDA TOMOHIKO)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20422222

(2) 研究分担者

龍野 一郎 (TATSUNO ICHIRO)
東邦大学・医療センター佐倉病院・教授
研究者番号：80282490

田中 知明 (TANAKA TOMOAKI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：50447299
(H23～H24：連携研究者)

(3) 連携研究者
()

研究者番号：