

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390424

研究課題名(和文) NF- κ B の非古典的経路による骨代謝機構の分子基盤の解明と骨再生への応用研究課題名(英文) Molecular mechanism by which the alternative NF- κ B pathway regulates bone metabolism and bone regeneration

研究代表者

自見 英治郎 (JIMI, EIJIRO)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40276598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000 円、(間接経費) 4,410,000 円

研究成果の概要(和文)：NF- κ B の非古典的経路による骨芽細胞分化と破骨細胞分化の分子機構を明らかにした。aly/aly マウス由来の骨芽細胞を BMP2 で処理すると ALP 活性の上昇と Smad1 のリン酸化の亢進が認められた。aly/aly マウスの背部筋膜下に BMP2 を移植すると骨密度の充実した骨が形成された。

aly/aly マウス由来の骨髄細胞に RelB を過剰発現させると破骨細胞形成の抑制が解除された。RelB の過剰発現で Cot の発現が誘導され、さらに Cot の発現を抑制すると破骨細胞形成の抑制の解除が見られなくなった。以上の結果より、NF- κ B の非古典的経路は骨芽細胞分化を負に制御し、破骨細胞分化を亢進すること考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular mechanisms triggered by the alternative NF- κ B pathway in the regulation of osteoblast and osteoclast differentiation. Osteoblastic differentiation induced by BMP2, as shown by alkaline phosphatase activity. Smad1 phosphorylation was also enhanced in primary osteoblasts from aly/aly mice. The ectopic bone formation in vivo that was induced by BMP2 was enhanced in aly/aly mice compared with controls. On the other hand, the overexpression of RelB in aly/aly bone marrow cells rescues RANKL-induced osteoclastogenesis by inducing p100 processing. Cot, an MAP3K, was up-regulated by RelB overexpression and knocking down of Cot expression significantly reduced the RANKL-induced osteoclastogenesis induced by RelB overexpression. Thus, the alternative the NF- κ B pathway via the processing of p52 from p100 negatively regulates osteoblastic differentiation by modifying BMP activity and positively regulates RANKL-induced osteoclastogenesis.

研究分野：口腔生化学

科研費の分科・細目：歯学、機能系基礎歯科学

キーワード：骨芽細胞 破骨細胞 NF- κ B

研究分野：口腔生化学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨芽細胞、破骨細胞、NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

骨吸収と骨形成の過程からなる骨リモデリングは、破骨細胞と骨芽細胞の細胞間コミュニケーションにより制御されていると考えられる。特に破骨細胞による骨吸収部位には、骨芽細胞による骨形成(カップリング)を促す機構が存在し、骨吸収と骨形成の動的な平衡状態を保つことで、骨の形や量が維持される。閉経後の高齢女性に見られるエストロゲン欠乏性骨粗鬆症では、骨吸収の亢進と共に代償性の骨形成の亢進が認められる。また、治療薬として骨吸収抑制作用のあるエストロゲン製剤やビスフォスフォネート製剤を投与すると、骨吸収が抑制されると共に骨形成も抑制される。一方、老人性骨粗鬆症の場合には、骨吸収も骨形成も亢進していない低代謝回転型で、治療薬として骨形成促進効果のある薬剤の開発が期待されている。しかし、骨粗鬆症に対して骨折防止効果が明確に証明されたビスフォスフォネート製剤は、歯科治療を契機とした顎骨壊死を引き起こす可能性が報告されており、新たな骨粗鬆症治療薬の開発が急務である。

転写因子NF- κ Bは、5つのサブユニット(p50, p65, cRel, p52およびRelB)のホモまたはヘテロダイマーで、炎症の発症や維持、免疫応答などの様々な生命現象を調節する。NF- κ Bの活性化には、IL-1やTNF α などの炎症性サイトカインによるI κ Bの分解を伴うp50/p65を介した古典的経路と、CD40やリンホトキシン β などのリンパ器官の形成に関わるサイトカインによるNIK(NF- κ B-inducing kinase)依存的なp100のプロセッシングによるp52/RelBを介した非古典的経路が存在する。1997年に2つの研究グループがp50とp52サブユニットの2重欠損マウスは破骨細胞の存在しない大理石骨病を呈することを報告し、NF- κ Bが破骨細胞形成に必須であることが判明した。

我々はこれまでに、非古典的経路のNIKに機能喪失型変異を有する*aly/aly*マウスでは、p100の分解が起こらず、破骨細胞数の減少による骨吸収の低下と、骨形成の亢進による骨量増加が認められた。一方、非古典的経路のp100のC末が欠失し構成的にp52が存在するp100欠損マウスは、非古典的経路が構成的に活性化されており、骨吸収の亢進と骨形成の抑制による骨量減少が認められた。

これらの結果は、NF- κ Bの非古典的経路が骨形成と骨吸収に重要なだけでなく、NF- κ Bの非古典的経路を標的とすることで、骨カップリングに非依存的に骨吸収を抑制しつつ、骨形成を促進し、骨量を増加させる理想的な治療法の開発が可能であることを示唆することから、本研究を立案した。

2. 研究の目的

転写因子NF- κ Bは、破骨細胞による骨組織の吸収と骨芽細胞による骨形成の両過程に重要な働きをしている。本研究では、2系統あるNF- κ Bのシグナル伝達系のうち、特に非古典的経路による骨代謝制御機構の分子基盤を解明し、骨再生への応用を目指す。具体的には以下の3点を達成目標とする。

- (1) 骨芽細胞分化と骨形成における非古典的NF- κ B経路の役割の解明。
- (2) 破骨細胞分化を制御する非古典的NF- κ B経路に関与する分子の探索。
- (3) NF- κ Bを標的として、骨吸収を抑制しながら骨形成を促すような新しい生体活性物質の開発。

3. 研究の方法

転写因子NF- κ Bの非古典的経路による骨吸収と骨形成の制御機構の分子基盤を解明し、その基盤に基づく新しい骨量増加法の確立を目指す。まずNF- κ Bの非古典的経路に関わる分子(RelB, NF- κ B2, P100)の各遺伝子改変マウスを用いて、特にこれまでほとんど明らかにされていない骨形成、骨吸収に重要な分子を同定する。さらに各遺伝子改変マウスを用いたBMPによる異所性骨形成の解析と破骨細胞分化の新たな分子メカニズムについて検討する。

【骨芽細胞分化に関する研究】

- (1) RelB, NF- κ B2, P100欠損マウスの骨形態計測：軟X線および μ CT写真撮影、骨密度測定および骨形態計測をおこなう。
- (2) BMP2刺激による骨芽細胞の分化誘導：各マウス由来の初代骨芽細胞をBMP2(またはBMP4)存在下で培養し、72時間後にALP活性の測定と染色をおこなう。また骨芽細胞の分化マーカーの発現をリアルタイムPCRで検討する。さらにBMPシグナル伝達分子Smad1/5/8のリン酸化、転写活性について比較検討する。
- (3) BMP含有コラーゲンペレットの移植による異所性骨形成の検討：各遺伝子改変マウスにBMP2(2 μ g)含有コラーゲンペレットを移植し、2週間後、3週間後にカルセインを腹腔投与し、4週間後に誘導された骨を摘出する。

肉眼的解析：形成された骨の軟X線および μ CTを撮影し、さらにpQCTで骨密度を測定する。

組織学的解析：骨形成のマーカーであるvon Kossa染色および破骨細胞のマーカーであるTRAP染色を行なう。また蛍光顕微鏡でカルセインラベルを観察し、骨形成速度を比較する。

生化学的解析：形成された骨から脱灰液を調製し、Ca/P比を測定する。骨から全RNAを調製し、骨芽細胞分化マーカーの発現を検討す

る。

【破骨細胞分化に関する研究】

- (1) RANKL 刺激による破骨細胞の分化誘導: 各マウス由来の骨髄細胞を RANKL 存在下で培養し、6 日後に酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色をおこなう。また破骨細胞の分化マーカーの発現をリアルタイム PCR で検討する。
- (2) RelB 過剰発現による破骨細胞分化誘導: *aly/aly* マウス由来骨髄細胞に RelB を過剰発現させ、RANKL 刺激による破骨細胞形成の抑制が解除できるか検討する。さらに RelB 依存的に発現が誘導される分子を選別し、破骨細胞分化に関わる分子を同定する。
- (3) RANK 下流シグナルの検討: 各マウス由来の破骨細胞前駆細胞を RANKL で刺激し、経時的に IKK α のリン酸化、p100 のプロセッシングについて各抗体を用いたウェスタンブロットで検討する。□

4. 研究成果

野生型および *aly/aly* マウス由来の骨芽細胞を BMP2 で処理すると野生型マウス由来骨芽細胞と比較して、*aly/aly* マウス由来の骨芽細胞ではアルカリホスファターゼ (ALP) 活性の上昇、骨芽細胞の分化マーカーである *Id1*, *Osterix* および *Runx2* の発現上昇、さらに Smad1/5/8 のリン酸化の亢進が認められた。野生型および *aly/aly* マウスの背部筋膜下に BMP2 を移植すると野生型マウスと比較して、*aly/aly* マウスでは、骨密度の充実した大きな異所性骨が形成された。そこで p100 から p52 へのプロセッシングが起きない p100 の変異体 p100 Δ GRR を NF- κ B2 欠損マウス由来の骨芽細胞に過剰発現させると ALP 活性の上昇と Smad1/5/8 のリン酸化の亢進が認められたが、p52 を過剰発現させるとこれらの作用は現弱した。

一方、RelB を *aly/aly* マウス由来の骨髄細胞に過剰発現させて、RANKL で刺激すると p100 から p52 へのプロセッシングが起こり、破骨細胞形成の抑制は解除された。RelB の過剰発現で Cot の発現が誘導され、さらに Cot の発現をノックダウンすると RelB の過剰発現による破骨細胞形成の抑制の解除が見られなくなった。RelB によって誘導された Cot は IKK α の 23 番目のトレオニンをリン酸化することで活性化され p100 のプロセッシングを引き起こすことで破骨細胞形成を誘導した。

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7件)

1. Taniguchi R, Fukushima H, Osawa K, Maruyama T, Yasuda H, Weih F, Doi T, Maki K, Jimi E. RelB-induced Expression of Cot, an

MAP3K Family Member, Rescues RANKL-induced Osteoclastogenesis in Alymphoplasia Mice by Promoting NF- κ B2 Processing by IKK α . **J Biol Chem.** 2014 289(11):7349-7361.

2. Jimi E. Basic research focused on solving the clinical problems of bone metabolism regulated by transcription factor NF- κ B. -My personal historical narrative about the role of NF- κ B in bone metabolism- **J Oral Biosci.** 2013 55(3):109-115.
3. Nakamura H, Aoki K, Masuda W, Alles N, Nagano K, Fukushima H, Osawa K, Yasuda H, Nakamura I, Mikuni-Takagaki Y, Ohya K, Maki K, Jimi E. Disruption of NF- κ B1 prevents bone loss caused by mechanical unloading. **J Bone Miner Res.** 2013 28:1457-67.
4. Shin M, Ohte S, Fukuda T, Sasanuma H, Yoneyama K, Kokabu S, Miyamoto A, Tsukamoto S, Hohjoh H, Jimi E, Katagiri T. Identification of a novel bone morphogenetic protein (BMP)-inducible transcript, BMP-inducible transcript-1, by utilizing the conserved BMP-responsive elements in the Id genes. **J Bone Miner Metab.** 2013 31:34-43.
5. Jimi E, Hirata S, Osawa K, Terashita M, Kitamura C, Fukushima H. The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects. **Int J Dentistry** 2012:148261-7
6. Seo Y, Fukushima H, Maruyama T, Nakao Kuroishi K, Osawa K, Nagano K, Aoki K, Weih F, Doi T, Zhang M, Ohya K, Katagiri T, Hosokawa R, Jimi E. Accumulation of p100, a precursor of NF- κ B2, enhances osteoblastic differentiation *in vitro* and bone formation *in vivo* in *aly/aly* mice **Mol Endocrinol** 2011, 26:414-422.
7. Ohte S, Kokabu S, Iemura SI, Sasanuma H, Yoneyama K, Shin M, Suzuki S, Fukuda T, Nakamura Y, Jimi E, Natsume T, Katagiri T. Identification and functional analysis of Zranb2 as a novel Smad-binding protein that suppresses BMP signaling. **J Cell Biochem.** 2011, 113:808-814.

〔学会発表〕(計16件)

1. 谷口礼, 福島秀文, 自見英治郎, 牧憲司: RelB による Cot の発現上昇は破骨細胞分化に重要である。第52回一般社団法人日本小児歯科学会大会、平成26年5月16日・17日
2. Taniguchi R, Fukushima H, Maki K, Jimi E: RelB-induced Cot expression rescues RANKL-induced osteoclastogenesis by Cot/IKK α -induced NF- κ B2 processing.

- Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2014, Kyushu Dental University, Kitakyushu, Japan Jan 25th 2014
3. 谷口礼、福島秀文、自見英治郎、牧憲司: RelB の過剰発現は破骨細胞分化を誘導する、第 31 回日本小児歯科学会九州地方会大会、福岡歯科医師会館、平成 25 年 10 月 20 日
 4. 谷口礼、福島秀文、自見英治郎、牧憲司: RelB は NF- κ B2 のプロセッシングを誘導し、*aly/aly* マウスの破骨細胞分化抑制を解除する、第 55 回歯科基礎医学会学術大会、岡山コンベンションセンター、平成 25 年 9 月 20 日-22 日
 5. Taniguchi R, Fukushima H, Jimi E, Maki K : Processing of NF- κ B2 and the nuclear localization of RelB are required for RANKL induced osteoclast differentiation, The 24th International Congress of IAPD 2013 in Seoul, Korea, Coex convention center, June 12-15, 2013
 6. 谷口礼、福島秀文、自見英治郎、牧憲司: NF- κ B2 のプロセッシングと RelB の核移行は破骨細胞分化を誘導する、第 51 回一般社団法人日本小児歯科学会大会、長良川国際会議場、平成 25 年 5 月 23 日・24 日
 7. 谷口礼、福島秀文、牧憲司、自見英治郎: RelB の過剰発現は *aly/aly* マウスの破骨細胞分化抑制を解除する、第 73 回九州歯科学会学術大会、九州歯科大学講堂、平成 25 年 5 月 18 日・19 日
 8. Taniguchi R, Fukushima H, Maki K, Jimi E : Processing of NF- κ B2 and the nuclear localization of RelB are required for osteoclast differentiation, Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2013, Kyushu Dental University, Kitakyushu, Japan Jan 26th 2013
 9. 谷口礼、福島秀文、高村伊都子、自見英治郎、牧憲司: 破骨細胞分化には NF- κ B2 のプロセッシングと RelB の核移行が関与する、第 30 回日本小児歯科学会九州地方会大会、長崎大学医学部良順会館医学部記念講堂、平成 24 年 10 月 28 日
 10. 谷口礼、福島秀文、牧憲司、自見英治郎: 破骨細胞分化には NF- κ B2 のプロセッシングと RelB の核移行が関与する、第 54 回歯科基礎医学会学術大会、奥羽大学記念講堂、平成 24 年 9 月 14-16 日
 11. 大澤賢次、福島秀文、Alles Neil、青木和広、張皿、大谷啓一、自見英治郎: NF- κ B2 の p100 のプロセッシングは骨代謝において重要である、日本歯科基礎医学会、奥羽大学、平成 24 年 9 月 15 日 福島
 12. 自見英治郎: Clinical Problem を見据えた転写因子 NF- κ B による骨代謝調節機構の解明 日本歯科基礎医学会、奥羽大学、平成 24 年 9 月 15 日 福島

13. 自見英治郎: 転写因子 NF- κ B による骨形成制御機構 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科大学院講義 平成 24 年 9 月 7 日、長崎
14. 自見英治郎、片桐岳信: NF- κ B, p65 サブユニットは Smad4 と会合し、Smad の DNA 結合を抑制することで BMP シグナルによる骨芽細胞分化を抑制する 第 34 回日本分子生物学会年会 平成 23 年 12 月 16 日 横浜
15. 自見英治郎: 転写因子 NF- κ B による骨形成抑制機構 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部『医療系クラスターによる組織的大学院教育』の「骨と Ca クラスター」ミニリポート 平成 23 年 12 月 10 日 兵庫
16. 妹尾吉訓、福島秀文、片桐岳信、青木和広、永野健一、大谷啓一、細川隆司、自見英治郎: NF- κ B 非古典的経路による骨形成の抑制 第 53 回歯科基礎医学会学術大会 9 月 30 ~ 10 月 2 日 岐阜

〔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
<http://www2.kyu-dent.ac.jp/depart/biochem/J/Home.html>

6 . 研究組織
(1) 研究代表者
自見 英治郎 (EIJIRO JIMI)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号 : 4 0 2 7 6 5 9 8

(2) 研究分担者
青木 和広 (KAZUHIRO AOKI)
東京医科歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40272603

片桐 岳信 (TAKENOBU KATAGIRI)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80245802

福島 秀文 (HIDEFUMI FUKUSHIMA)

九州歯科大学・歯学部・助教

九州歯科大学・歯学部・講師

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：70412624

(3)連携研究者：なし