

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592230

研究課題名(和文) ADAM10が制御するNotchシグナル伝達の骨代謝への関与

研究課題名(英文) Involvement in bone metabolism of Notch signaling regulated by ADAM10

研究代表者

依田 昌樹 (YODA, MASAKI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：30464994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ADAM10はNotch活性化に必須である酵素として有力視されている。我々はAdam10遺伝子欠損マウス(A10/Mx1マウス)を作出し、骨代謝におけるADAM10-Notchシグナルの機能解明を試みた。A10/Mx1マウスは骨髄系細胞・造血幹細胞の増加が認められ、G-CSF産生が亢進していることが明らかとなった。この結果からADAM10-NotchシグナルはG-CSF産生を負に制御し骨髄系細胞の増殖を抑制していることが示された。一方A10/Mx1マウスは破骨細胞前駆細胞が増加していること、成熟骨芽細胞が多数存在していることが明らかとなり、骨吸収だけでなく骨形成も亢進していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：ADAM10 is considered to be essential for the activation of Notch signaling. In this study, we generated mutant mice in which Adam10 is disrupted under the control of an inducible Mx1-Cre transgene (A10/Mx1 mice) and aimed to elucidate the potential functions of ADAM10-Notch signaling in bone metabolism. A10/Mx1 mice exhibited the increase in population of Gr-1+CD11b+ cells and hematopoietic stem cells. Furthermore, lack of ADAM10 in the non-hematopoietic cells lead to aberrant production of G-CSF. These results revealed that ADAM10-Notch signaling negatively regulates the production of G-CSF in non-hematopoietic cells and indirectly suppresses myelopoiesis in a non-cell-autonomous manner. On the other hand, A10/Mx1 mice exhibited an increase of osteoclast progenitor cells in the bone marrow, and many osteocalcin+ cells, a marker for mature osteoblast, existed on the trabecular bone. This result suggests A10/Mx1 mice accelerated not only bone resorption but also bone formation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：ADAM10 Notch 骨代謝 shedding 造血

1. 研究開始当初の背景

生物の恒常性維持には秩序だった細胞間の情報伝達が不可欠であり、それは細胞膜上に存在する膜型タンパク質が関与している。一般的に、膜型タンパク質は転写後にさまざまな修飾および活性調節を受けて機能的なタンパク質として作用することが知られている。この機能調節の一つとして shedding があげられ、近年この shedding を担う重要な分子として ADAM 分子が注目されている。その中で ADAM10 は Notch をはじめとした数種のレセプター、膜型リガンド、接着分子を shedding することが示されている。Notch シグナルは、さまざまな細胞の分化・増殖、移動やアポトーシス、発生時の細胞運命の振り分け、幹細胞・前駆細胞の機能維持などに必須なメカニズムであり、そのシグナル伝達には ADAM10 による Notch の切断が不可欠である。骨領域では発生段階における Notch シグナルの重要性が報告されており、細胞の分化段階による Notch シグナルの関与に関する報告は近年増えてきている。しかしながら、成体における骨の恒常性維持に関与している Notch シグナルの理解は十分ではない。また、ADAM 分子の骨代謝へ関与も徐々に報告されつつあるが、ADAM10 を対象とした骨代謝分野の報告はほとんどない。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では成体の骨代謝に及ぼす ADAM10-Notch シグナルの役割について明らかにすることを目的とした。Notch シグナルの最上流で働く ADAM10 を欠損させた遺伝子改変マウスを作成し、4 つ存在する Notch からのシグナルをすべて遮断可能なマウスモデルを使用し解析を行う。骨髄微細環境中には骨代謝に直接かかわる破骨細胞や骨芽細胞のほかに血液系細胞、間葉系細胞といったさまざまな細胞が混在している。これらの細胞は直接的および間接的に骨代謝調節を支持していることが知られている。そこで、骨髄微細環境中の Notch シグナルが骨代謝にどのように作用しているかをマウスモデルの表現型解析と *in vitro* の分化誘導試験にて評価する。

3. 研究の方法

(1) 組織特異的 *Adam10* 遺伝子欠損マウスモデルの表現型解析

Adam10 遺伝子欠損マウスは胎生致死のため、骨髄を中心に広範に *Adam10* 遺伝子を欠損させた組織特異的遺伝子欠損マウス (*Adam10^{fl/fl}; Mx1/Cre⁺*、以後 *A10/Mx1* マウス) を作製し実験に供した。生後 4 週齢で合成 2 本鎖 RNA (polyinosinic-polycytidylic acid; pIpC) を投与し *Adam10* 遺伝子を欠損させ、9 週齢の成体を実験に供した。*A10/Mx1* マウスは重度の造血異常が認められたため、脾臓、骨髄および肝臓の組織学的解析を行った。次に *A10/Mx1* マウスにおける造血異常のメカニ

ズムの解明のために *A10/Mx1* マウスおよび野生型マウスの末梢血の CBC 測定を行い、さらに脾臓および骨髄細胞を採取し FACS 解析を行って、末梢血および造血組織における血液系細胞の性状解析を試みた。また、脾臓組織から mRNA を抽出し Notch 標的分子の遺伝子発現を real-time PCR により解析した。*A10/Mx1* マウスにおける造血異常のメカニズム解明のために、造血亢進に関与している血清中液性因子の網羅的解析をプロテインアレイと ELISA にて行った。また、骨髄移植を行い表現型の移植もしくは回復の有無を解析し、造血亢進の原因が骨髄由来の血液系細胞によるものなのか、非血液系細胞によるものであるのかを精査した。

(2) *A10/Mx1* マウスにおける骨形成および骨吸収の組織学・細胞学的解析

A10/Mx1 マウスおよび野生型マウスの脛骨を採取し病理標本 (H&E 染色、Van Gieson 染色) を作製し骨組織の形態学的な評価を行った。骨髄微細環境中の成熟骨芽細胞の分布を脛骨の凍結切片をフィルム法 (川本法) により作製し免疫染色を行い評価した。また、脛骨海綿骨における骨形態計測を実施し、骨構造および骨代謝の評価を行った。*In vitro* における破骨細胞分化誘導試験は *A10/Mx1* マウスおよび野生型マウスから採取した骨髄細胞を M-CSF (マクロファージコロニー刺激因子) と可溶性 RANKL 刺激によって破骨細胞へと分化させた。その後、TRAP (酒石酸耐性酸性ホスファターゼ) 染色を行い、多核の成熟破骨細胞数を計測した。また、マウス骨髄細胞を用いて破骨細胞前駆細胞 (CD11b^{du11}CD115⁺CD117⁺細胞) の FACS 解析を行い、大腿骨および脛骨中に存在している破骨細胞前駆細胞数を見積もった。

4. 研究成果

(1) 組織特異的 *Adam10* 遺伝子欠損マウスモデルの表現型

今回使用した *A10/Mx1* マウスは pIpC 投与によって *Cre* 遺伝子を誘導できることから、成体に成長後に *Adam10* 遺伝子を欠損させることができる。それゆえ成体での造血および骨代謝における ADAM10 の関与を評価するには適したモデルである。*A10/Mx1* マウスは重度の脾腫を呈し組織学的解析から脾臓および肝臓において髄外造血の亢進が観察された。*A10/Mx1* マウスは末梢血中の白血球の増加が CBC 測定から確認され、脾臓における CD11b⁺Gr-1⁺で示される骨髄系細胞の増加、脾臓および骨髄における造血幹細胞 (Lin⁻Sca1⁺c-kit⁺細胞) の増加が FACS 解析から明らかとなった (図 1A)。また、Notch 標的分子である Hes1、Hey1、Hey2 の遺伝子発現が *A10/Mx1* マウスの脾臓において野生型マウスと比較して有意に低下していることが示された (図 1B)。この結果から Notch シグナルの低下が骨髄系細胞の増殖を惹起して

いることが示唆された。

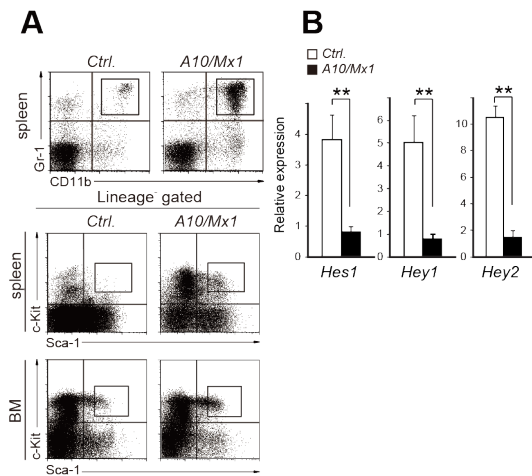


図1 脾臓・骨髄細胞のFACS解析および脾臓組織における遺伝子発現解析
A;脾臓における骨髄系細胞の頻度(上段)および脾臓・骨髄における造血幹細胞の頻度(下段)
B;脾臓組織におけるNotch標的分子の遺伝子発現

血清中液性因子の定量的な解析から *A10/Mx1* マウスでは G-CSF 濃度が野生型と比較して有意に上昇していた(図 2A)。G-CSF は骨髄系前駆細胞の増殖、分化、生存などの促進作用をもつことが知られており、*A10/Mx1* マウスにおける骨髄系細胞の増加が G-CSF 濃度の上昇によって引き起こされたと考えられた。そこで、血清中の G-CSF 濃度上昇と ADAM10 欠損の因果関係を精査するために骨髄移植試験を行い、ADAM10 欠損が血液系細胞(ドナー側)あるいは非血液系細胞(レシピエント側)のどちらの場合で骨髄系細胞の増殖亢進が認められるかを確認した。その結果、どちらの場合においても骨髄系細胞の増殖が確認されたが、非血液系細胞で ADAM10 を欠損させた場合は顕著な骨髄系細胞の増殖亢進が確認された(図 2B)。血清中の G-CSF 濃度を測定した結果、大変興味深いことに非血液系細胞で ADAM10 を欠損させた場合のみ G-CSF 濃度の上昇が確認された(図 2C)。

上記の結果から、*A10/Mx1* マウスは重度な骨髄系細胞の増殖亢進が認められ、この増殖は ADAM10-Notch シグナルの破綻により非血液系細胞が産出する G-CSF が主な原因であることが明らかとなった。

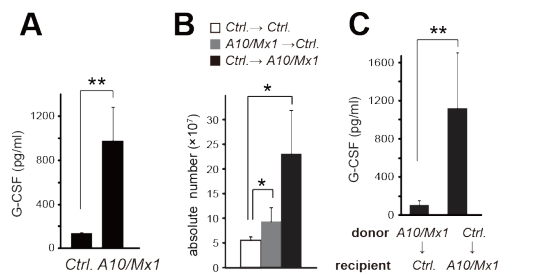


図2 G-CSF の定量的解析および骨髄移植試験

A;血清中 G-CSF 濃度
B;骨髄移植による脾臓中の骨髄系細胞数
C;骨髄移植後の血清中 G-CSF 濃度

(2) *A10/Mx1* マウスにおける骨形成および骨吸収の組織学・細胞学的解析

A10/Mx1 マウスおよび野生型マウスの脛骨の病理組織標本から *A10/Mx1* マウスでは成長軟骨板の軟骨骨境界部に線維化層が出現し、周辺部の骨梁の走行が不規則になっていることが観察された。また、骨形態計測の結果から *A10/Mx1* マウスでは骨吸収および骨形成のパラメーターが有意に上昇していることが明らかとなった(図 3A)。また、カルセイン色素の2重標識の結果から、*A10/Mx1* マウスでは骨梁の4方の骨面に2重標識が確認され、方向性を問わず骨量が増加していることが示された。成熟骨芽細胞の指標であるオステオカルシンの免疫染色を脛骨組織で行った結果、*A10/Mx1* マウス脛骨海綿骨面にオステオカルシン陽性細胞が多数観察された(図 3B)。

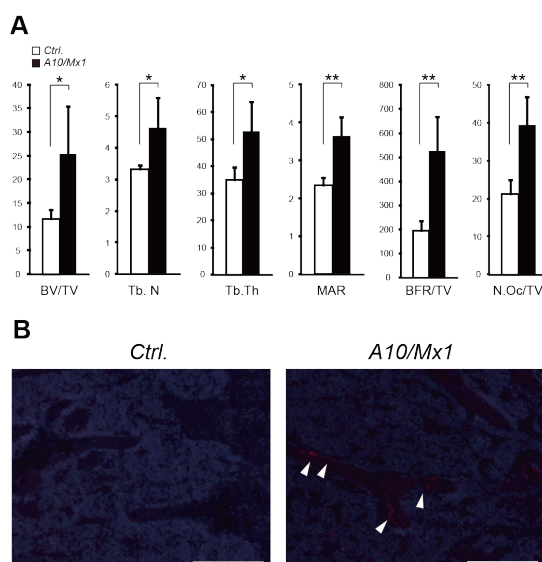


図3 脛骨海綿骨の骨形態計測およびオステオカルシンの免疫染色

A;左から骨量、骨梁数、骨梁幅、石灰化速度、骨形成速度、破骨細胞数
B;オステオカルシン(赤;矢印)陽性細胞の分布

(1)の結果から *A10/Mx1* マウスは骨髄系細胞の有意な増加が認められた。破骨細胞は骨髄系細胞から分化することが知られていることから骨髄中に存在する破骨細胞前駆細胞を精査したところ、*A10/Mx1* マウスは野生型マウスと比較して有意に破骨細胞前駆細胞数が増加していることが明らかとなった(図 4A)。さらに、骨髄細胞を材料に *in vitro* で破骨細胞分化誘導試験を行った結果、TRAP 陽性の多核成熟破骨細胞が *A10/Mx1* マウスにおいて野生型マウスより有意に形成されることが示された(図 4B)。

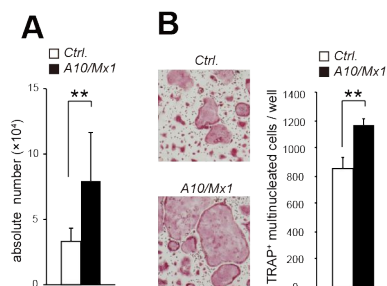


図 4 破骨細胞前駆細胞の FACS 解析および *in vitro* における破骨細胞分化誘導試験
A; 骨髄中に存在している破骨細胞前駆細胞数
B; TRAP 陽性多核破骨細胞像(左)と TRAP 陽性多核破骨細胞数(右)

以上の結果から、*A10/Mx1* マウスでは ADAM10-Notch シグナルの破綻から生じる骨髄系細胞の増殖亢進により破骨細胞前駆細胞数が増加し、骨吸収が亢進すると同時に骨形成も亢進していることが明らかとなった。しかしながら、ADAM10-Notch シグナルと骨形成に関する直接的なメカニズムは本研究期間中に解明できなかったため、今後は骨芽細胞特異的 *Adam10* 欠損マウスモデルを使用した更なる検討が必要であると考えられた。

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. Saito K, Horiuchi K, Kimura T, Mizuno S, Yoda M, Morioka H, Akiyama H, Threadgill D, Okada Y, Toyama Y, Sato K. Conditional inactivation of TNF -converting enzyme in chondrocytes results in an elongated growth plate and shorter long bones. PLoS One. 2013;8(1):e54853. doi:10.1371/journal.pone.0054853. 査読あり.
2. Yoda M, Kimura T, Tohmonda T, Morioka H, Matsumoto M, Okada Y, Toyama Y, Horiuchi K. Systemic overexpression of TNF -converting enzyme does not lead

to enhanced shedding activity in vivo. PLoS One. 2013;8(1):e54412. doi:10.1371/journal.pone.0054412. 査読あり.

3. Yoda M, Kimura T, Tohmonda T, Uchikawa S, Koba T, Takito J, Morioka H, Matsumoto M, Link DC, Chiba K, Okada Y, Toyama Y, Horiuchi K. Dual functions of cell-autonomous and non-cell-autonomous ADAM10 activity in granulopoiesis. Blood. 2011 Dec 22;118(26):6939-42. doi:10.1182/blood-2011-06-357210. 査読あり.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 依田昌樹, 戸山芳昭, 堀内圭輔. ADAM10-Notch シグナル伝達を介した骨髄系細胞分化は G-CSF 依存的および非依存的な経路によって制御されている. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11-14 日, 福岡.

〔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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

依田 昌樹 (YODA MASAKI)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号: 30464994

(2)研究分担者

堀内 圭輔 (HORIUCHI KEISUKE)
慶應義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号: 30327564

(3)連携研究者 なし