

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659972

研究課題名（和文） 造血細胞は骨代謝回転を制御する

研究課題名（英文） Hematopoietic cells regulate bone metabolism

研究代表者

小林 泰浩 (Kobayashi Yasuhiro)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授

研究者番号：20264252

研究成果の概要（和文）：

加齢に伴い骨髄では、血液細胞が減少し、脂肪細胞が増加する。しかし、この組織変化が骨量に及ぼす影響は明らかでない。関節炎に伴い破骨細胞形成促進因子である Wnt5a の発現が増加し、Wnt5a の阻害因子である Sfrp5 の発現は減少した。Sfrp5 は、Wnt5a による破骨細胞形成亢進作用を抑制した。骨髄脂肪細胞は、Sfrp5 を発現した。関節炎マウスにおいて、Sfrp5 を発現させると、骨破壊が抑制された。以上より、関節炎に伴う Sfrp5 の減少が、Wnt5a による骨破壊を増悪することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Adipose tissues in bone marrow are increased with aging. We therefore explored effects of adipose tissues in bone marrow on bone formation and resorption. The expression of Wnt5a, which promotes osteoclast formation, was increased in arthritis model mice. The expression of Sfrp5, an inhibitor of Wnt5a, was decreased. Treatment with Sfrp5 inhibited the stimulatory effect of Wnt5a on osteoclast formation. Adipose tissues highly expressed Sfrp5. Enforced expression of Sfrp5 in arthritis mice abrogated bone destruction associated with arthritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学、破骨細胞、Wnt、関節炎、脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 加齢に伴い骨髄組織は変化する。造血幹細胞や血球系細胞が減少する。また、間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化が優位になるため、骨髄は脂肪組織に置換することが知られている。間葉系幹細胞は、骨芽細胞あるいは脂肪細胞に分化する。このため、加齢など脂肪髄になり易い環境下では、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が阻害され、骨形成が減少する。その結果、骨量が減少すると考えられる。しかし、造血細胞がどのように間葉

系幹細胞の分化を調節するか？その結果、どのように骨量が変わるかなど、その機構は明らかではない。

(2) 骨髄間質細胞は、造血幹細胞や前駆細胞の維持・分化を支持する。一方、骨髄間質細胞は、骨芽細胞や脂肪細胞に分化する。しかし、造血系細胞が、骨髄間質細胞の骨芽細胞と脂肪細胞の分化の振り分けを制御するかについては、明らかでない。

2. 研究の目的

(1) 成人では歯の移動速度が遅いことが知られる。これは加齢に伴い、骨吸収と骨形成のサイクルすなわち骨代謝回転が低下するためと考えられている。しかし、加齢により骨代謝回転が低下する分子基盤は明らかでない。

(2) 加齢に伴う骨髄環境の変化つまり造血系細胞の減少が間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させ、骨芽細胞前駆細胞を減少させる。その結果、骨代謝回転が遅くなるという仮説を本申請課題では明らかにする。また、造血系前駆細胞に発現する Wnt が、間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化を抑制し、骨芽細胞への分化を促進する可能性を分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 関節炎モデルマウスの組織学的検討：ヒト腫瘍壊死因子 (TNF- α) を全身の組織において過剰発現するマウス、TNF- α トランスジェニックマウスは、加齢に伴い関節炎を発症することが知られている。関節炎モデルマウスとして、このマウスを用いた。20 週齢 TNF- α トランスジェニックマウスの踝関節を採取し、通法に従い組織切片を作製した。切片をヘマトキシリン・エオジンで染色後、組織学的に観察した。

(2) II 型コラーゲン誘発関節炎モデルマウスの踝関節における Wnt リガンドおよび Wnt 阻害因子の発現：関節炎マウスあるいは正常マウスの踝関節骨より酸性フェノール法を用いて、RNA を抽出した。Total RNA より逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。この cDNA をテンプレートとして、リアルタイム PCR 法を行い、Wnt リガンドおよび Wnt 阻害因子の発現を解析した。

(3) 破骨細胞分化における Soluble frizzled related protein 5 (Sfrp5) の作用：生後 1 日齢のマウス頭蓋冠から骨芽細胞様細胞を調整した。また、8 週齢の脛骨から骨髄細胞を採取し、前述の骨芽細胞様細胞と共存培養した。この培養系に、活性型ビタミン D3 あるいは、インターロイキン 17 (IL-17) を添加し、破骨細胞分化誘導因子である RANKL 発現を誘導した。この共存培養系では、骨芽細胞から分泌される Wnt5a が破骨細胞形成を促進することを我々は明らかにしている。そこで、この培養系に Wnt5a の阻害因子である Sfrp5 を添加し、破骨細胞形成に及ぼす影響を解析した。

(4) Sfrp5 発現アデノウィルスの作製：Sfrp5 cDNA クローンより、PCR 法で full length の

Sfrp5 cDNA を増幅した。増幅した cDNA 断片を、アデノウィルスベクターに挿入した。作製した Sfrp5 アデノウィルスベクターを Human Kidney Epithelial 293T Cells (HEK293) にリポフェクタミン法を用いて遺伝子導入した。アデノウィルスを産生させた後、回収したアデノウィルスを HEK293 細胞にさらに感染させ、高タイトーの Sfrp5 アデノウィルスを調整した。

(5) 関節破壊における Sfrp5 発現の効果：Sfrp5 発現アデノウィルスを関節炎モデルである TNF- α TG マウスに尾静脈から投与した。マイクロ CT を用いて、関節骨の状態を観察した。さらに、通法に従い組織切片を作製し、組織学的観察を行った。

4. 研究成果

(1) 関節炎モデルマウスの組織学的検討：20 週齢の正常マウスの踝関節骨の骨髄は、脂肪組織で占められており、いわゆる脂肪髄を呈していた。一方、関節炎マウスの踝関節骨では、炎症細胞の浸潤が顕著に認められた。正常マウスとは異なり、顕著に脂肪組織が減少していた。免疫組織学的手法を用い、骨髄腔における Sfrp5 の発現を検討した。その結果、脂肪細胞は、Sfrp5 を強く発現することが明らかになった。

(2) II 型コラーゲン誘発関節炎モデルマウス (Type II collagen-induced arthritis, CIA) の踝関節における Wnt リガンドおよび Wnt 阻害因子の発現：関節炎マウスの踝関節骨における Wnt リガンドの発現を検討したところ、Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt7b および Wnt10a の発現が、有為に増加した。その中で

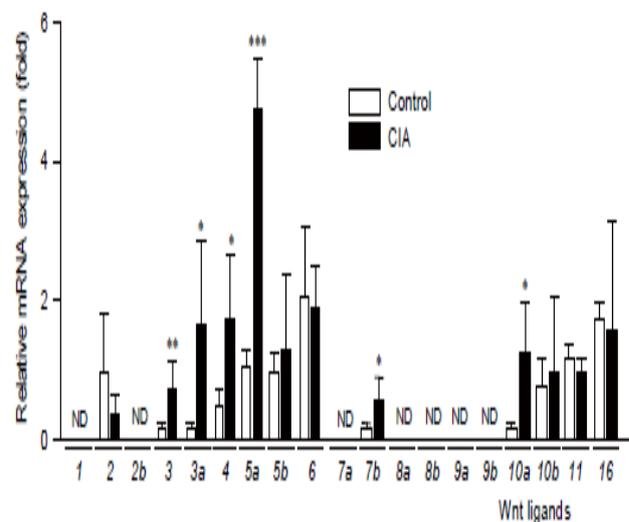


図1 II型コラーゲン誘発性関節炎マウス踝関節におけるWntリガンドの発現 (Nat Med 18, 405-412, 2012)

Wnt5a の発現増加が顕著に認められた (図 1)。また、関節炎マウスでは、Wnt/ β -カテニンシグナルの阻害因子である Dkk1 および Sfrp4 の発現が増加した。一方、Wnt5a の阻害因子である Sfrp5 の発現は有意に減少した。

Wnt5a が骨吸収を促進することを考え合わせると、関節炎において Wnt5a 阻害因子である Sfrp5 の発現減少は、骨吸収を増加させる可能性が示唆された。

(3)破骨細胞分化における Sfrp5 の作用：骨芽細胞と骨髄細胞を共存培養した。この培養系に Wnt5a 阻害剤である GST-s Ror2 を添加すると、活性型ビタミン D3 で誘導される破骨細胞形成が顕著に抑制された (図 2)。この結果は、共存培養において、骨芽細胞が Wnt5a を分泌し、破骨細胞形成を促進することを示唆する。次に、この共存培養系に IL-17 を添加すると骨芽細胞において RANKL 発現が誘導され、破骨細胞が形成された。しかし、IL-17 と同時に Wnt5a の阻害因子である Sfrp5 を添加した培養では、破骨細胞形成が有意に抑制された。つまり、Sfrp5 は、Wnt5a の活性を抑制し、破骨細胞形成を抑制することが示唆された。

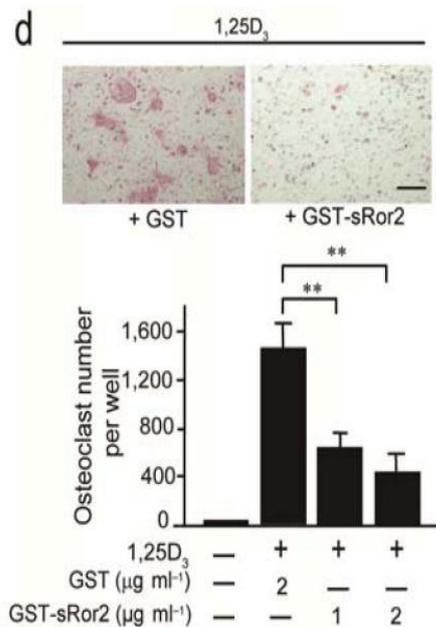


図2 破骨細胞形成におけるWnt5a阻害剤 GST-sRor2の効果(Nat Med 18, 405-412, 2012)

(4)Sfrp5 発現アデノウイルスの作製：Sfrp5 を過剰発現させるためのアデノウイルスを作製した。Sfrp5 アデノウイルスを感染させた骨芽細胞の細胞溶解液をウェスタンブロット法に供した。Sfrp5 発現アデノウイルスを感染させた骨芽細胞において、Sfrp5 の強い発現が確認された。また、前述の骨芽細胞

と骨髄細胞の培養系に Sfrp5 アデノウイルスを感染させたところ、活性型ビタミン D3 で誘導される破骨細胞形成が有為に抑制された。

(5)関節破壊における Sfrp5 発現の効果：

TNF- α トランスジェニックマウスに、Sfrp5 発現アデノウイルスあるいは対照である LacZ アデノウイルスを静脈内投与した。これらのアデノウイルスに感染した細胞は、蛍光タンパク質である ZsGreen を発現する。そこで、アデノウイルスを投与したマウスの肝臓、脾臓、脛骨を採取し、凍結切片を作製した。アデノウイルスの感染を組織学的に検討したところ、これらの臓器においてアデノウイルスの感染が確認された。

マイクロ CT を用いて、アデノウイルスを投与した関節炎マウスの踝関節を観察したところ、対照である LacZ アデノウイルスを投与したマウスでは、関節骨の著しい骨破壊が認められた。一方、Sfrp5 発現アデノウイルスを投与した群では、骨破壊が顕著に抑制された。さらに、組織切片を作製し組織学的検討を行った。その結果、LacZ アデノウイルスを投与した群と比較して、Sfrp5 発現アデノウイルスを投与した群では、破骨細胞の出現が有意に減少した。

以上より、関節炎に伴い脂肪組織から分泌される Sfrp5 は減少する。Sfrp5 の減少に伴い、Wnt5a の活性が上昇し、骨破壊を増悪す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 14 件)

- (1) Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N, Udagawa N. Osteoprotegerin-Deficient Male Mice as a Model for Severe Alveolar Bone Loss: Comparison With RANKL-Overexpressing Transgenic Male Mice. *Endocrinology* 154, 773-782, 2013 (査読有) DOI: 10.1210/en.2012-1928.
- (2) Nakamichi Y, Mizoguchi T, Arai A, Kobayashi Y, Sato M, Penninger JM, Yasuda H, Kato S, DeLuca HF, Suda T, Udagawa N, Takahashi N. Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through vitamin D-induced IL-34 expression in osteopetrotic op/op mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 10006-10011, 2012 (査読有) DOI:

10.1073/pnas.1207361109

- (3) Arai A, Mizoguchi T, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Yasuda H, Penninger JM, Yamada K, Udagawa N, Takahashi N. c-Fos plays an essential role in the up-regulation of RANK expression in osteoclast precursors within the bone microenvironment. *J Cell Sci* 125, 2910-2917, 2012 (査読有) DOI: 10.1242/jcs.099986
- (4) Shimizu M, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Nakamura H, Kawahara I, Narita N, Usui Y, Aoki K, Hara K, Haniu H, Ogihara N, Ishigaki N, Nakamura K, Kato H, Kawakubo M, Dohi Y, Taruta S, Kim YA, Endo M, Ozawa H, Udagawa N, Takahashi N, Saito N. Carbon Nanotubes induce bone calcification by bidirectional interaction with osteoblasts. *Adv Mater* 24, 2176-2185, 2012 (査読有) DOI: 10.1002/adma.201103832
- (5) Maeda K, Takahashi N, Kobayashi Y. Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *J Mol Med* 91, 15-23, 2013 (査読有) DOI: 10.1007/s00109-012-0974-0
- (6) Maeda K, Kobayashi Y (2), Mizoguchi T (6). (他 12 名) Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med* 18, 405-412, 2012 (査読有) DOI: 10.1038/nm.2653s.
- (7) Kinugawa S, Koide M, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Ninomiya T, Muto A, Kawahara I, Nakamura M, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N. Tetracyclines convert the osteoclastic-differentiation pathway of progenitor cells to produce dendritic cell-like cells. *J Immunol* 188, 1772-1781, 2012 (査読有) DOI: 10.4049/jimmunol.1101174.
- (8) Harada S, Mizoguchi T, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Takeda S, Sakai S, Takahashi F, Saito H, Yasuda H, Udagawa N, Suda T, Takahashi N. Daily administration of eldecalcitol (ED-71), an active vitamin D analog, increases bone mineral density by suppressing RANKL expression in mouse trabecular bone. *J Bone Miner Res* 2012 27, 461-473,

2012 (査読有) DOI: 10.1002/jbmr.555

- (9) 小林泰浩. Wntによる骨代謝制御機構 *The Bone* 26, 151-159, 2012 (査読無)
- (10) 小林泰浩, 前田和洋, 高橋直之 骨芽細胞系細胞と破骨細胞前駆細胞の間の Wnt5a-Ror2 シグナルは破骨細胞形成を亢進する *実験医学* 30, 1933-1936, 2012 (査読無)
- (11) 小林泰浩, 前田和洋, 上原俊介 Wntによる破骨細胞の分化制御機構 *細胞* 44, 274-277, 2012 (査読無)
- (12) 小林泰浩, 上原俊介 Wnt シグナルによる骨代謝制御 *日本抗加齢医学会雑誌* 8, 719-725, 2012 (査読無)
- (13) 小林泰浩 Wnt5a-Ror2 シグナルを標的にした新規骨吸収阻害薬の開発 *ケミカルエンジニアリング* 57, 921-925, 2012 (査読無)
- (14) 小林泰浩 Wnt シグナルによる骨代謝制御機構 *Clinical Calcium*. 22, 1701-1706, 2012 (査読無)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Kobayashi Yasuhiro Roles Wnt5a-Ror2 signals in bone resorption. 2012 年韓国骨代謝学会, 2012 年 11 月 16 日 Asan Medical Center (ソウル, 韓国)
- ② 小林泰浩, Wnt5a-Ror2 シグナルによる破骨細胞の分化と機能の制御機構. 東北大学大学院セミナー, 2012 年 9 月 13 日, 東北大学歯学部 (仙台)
- ③ 小林泰浩, Wnt5a-Ror2 シグナルによる破骨細胞分化制御機構, 第 54 回歯科基礎医学会学術集会「サテライトシンポジウム 6」2012 年 9 月 14 日, 奥羽大学歯学部 (郡山)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 泰浩 (Kobayashi Yasuhiro)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授
研究者番号: 20264252

(2) 研究分担者

溝口 利英 (Mizoguchi Toshihide)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講

師

研究者番号：90329475

(平成24年4月4日、辞退)