

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592786

研究課題名(和文)好中球の細胞分化調節による歯槽骨代謝制御システムの構築

研究課題名(英文)Regulations of bone metabolism by bovine- and neutrophil-derived lactoferrin

研究代表者

二宮 禎(Ninomiya, Tadashi)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号：00360222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、牛由来(bLF)および好中球由来ラクトフェリン(nLF)の骨代謝におよぼす作用を検討した。培養実験において、bLFは、骨髄マクロファージ(BMM)の破骨細胞分化を抑制し、未分化間葉系細胞の骨芽細胞分化を促進した。また、これらの細胞に対して、好中球のconditioned mediumを用いた培養、および、nLFを添加した実験においても、同様な結果が得られた。また、LFの受容体であるLipoprotein receptor-related protein 1の発現は、間葉系細胞およびRANKL刺激後のBMM に認められた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the roles of lactoferrin for the bone metabolism, we examined the effects of bovine- (bLF) and neutrophil-derived lactoferrin (nLF) on osteoblast and osteoclast differentiation. In vitro studies using mesenchymal stromal cells (MSCs) showed that bLF and nLF promoted the mRNA expressions of osteoblast markers and increased a number of ALPase-positive cells. On the other hand, formation of TRAP-positive cell from bone marrow macrophages (BMM) and the mRNA expressions of osteoclast markers in BMM were inhibited by these LF. In addition, neutrophil-cultured conditioned medium accelerated osteoblast differentiation of MSCs and inhibited osteoclast differentiation of BMM. Lipoprotein receptor related protein 1 as a receptor of lactoferrin expressed in BMM with the stimulation of RANKL and MSCs.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：ラクトフェリン 骨芽細胞 破骨細胞 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

- (1) 骨粗鬆症モデルマウスへの牛ラクトフェリン(bLF)の経口投与は、骨量低下を抑制し、骨質を高める。
- (2) bLF は、抗原提示細胞や T 細胞に作用し、TNF- α や RANKL 産生を低下させ、破骨細胞分化を抑制する。
- (3) 好中球は、ラクトフェリン(LF)を産生し、血中に分泌する。
- (4) これまでに、骨代謝を支持する好中球の機能に関する報告はない。

2. 研究の目的

好中球の骨代謝制御機構を解明し、歯槽骨維持法を確立するため、以下の点を明らかにする。

- (1) LF の標的細胞の同定：LF の受容体として、LRP-1 が知られている。骨髄細胞(間葉系細胞および血球系細胞)における LRP-1 受容体をもつ細胞を同定する。
- (2) LF による骨髄細胞分化調節メカニズムの解明：骨髄細胞から分化する際の LF の作用を遺伝子解析により検索する。
- (3) 好中球による細胞分化調節機能の解析：好中球が骨芽細胞分化および破骨細胞分化に関与することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 骨粗鬆症モデル動物に対する bLF の作用 外科手術により卵巣を摘出(OVX)した SD ラット(7 週齢、雌)に対して、bLF (10, 100 mg/kg body weight)の経口投与を 3 週間行った。ラットの長管骨を骨形態計測学的および組織化学的に評価した。また、未分化間葉系株化細胞やマウス由来骨髄マクロファージ(BMM ϕ)を用いて、骨芽細胞分化および破骨細胞分化におよぼす bLF の作用を検討した。

(2) bLF 標的細胞の同定

未分化間葉系細胞と BMM ϕ における LRP-1 タンパク発現および mRNA 発現を Western-blotting と RT-PCR により検索した。

BMM ϕ の破骨細胞分化過程における LRP-1 発現を Westernblotting により検索した。

(3) 好中球による細胞分化調節機能

間葉系細胞の骨芽細胞分化に対する好中球の作用を明らかにするため、未分化間葉系株化細胞である C3H10T1/2 細胞と好中球の共存培養、transwell に入れた好中球と C3H10T1/2 細胞の培養、好中球を培養した培地(conditioned medium)を用いた C3H10T1/2 細胞の培養、以上の培養系で骨芽細胞分化を評価した。

BMM ϕ の破骨細胞分化に対する好中球の作用を明らかにするため、RANKL を用いた BMM ϕ の破骨細胞分化誘導系に、好中球を共存培養、また、好中球の conditioned medium を用い

て培養した実験系において、破骨細胞分化の評価を行った。

ヒト好中球由来 LF を培地に添加し、骨芽細胞分化および破骨細胞分化を評価した。

4. 研究成果

(1) OVX ラットに対する bLF の作用

bLF を経口投与して 3 週間後の bLF 投与群の海綿骨量は、Sham 群よりも減少していたが、OVX 群よりも多く、残っていた(図 1)。また、この骨量および骨梁幅は、OVX 群と比し、bLF 投与群は、有意な増加が認められた。

骨組織形態計測学的評価においては、bLF 投与群で、bone formation rate(BFR)が増加し、破骨細胞数(Oc.N/TA)の減少が認められた(図 2)。

培養実験においては、C3H10T1/2 細胞の培地に bLF(1 μ g/ml)を添加すると、骨芽細胞分化マーカー(osterix, runx2, osteocalcin)の mRNA 発現は増加した。一方、BMM ϕ の培地に bLF(1 μ g/ml)を添加すると、破骨細胞分化マーカー(cathepsin K, calcitonin receptor, NFATc1)の mRNA 発現は抑制された。これらの結果より、bLF は、骨芽細胞分化および破骨細胞分化を調節することが示唆された。

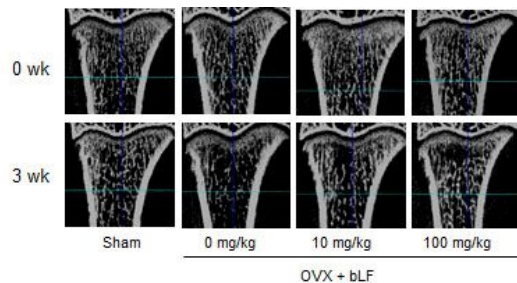


図1: マイクロCTによる骨量評価

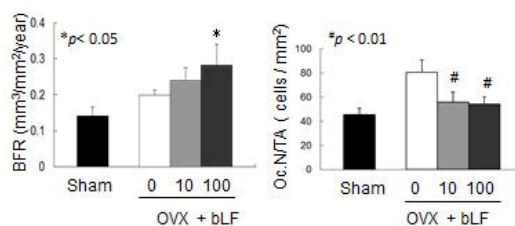


図2: 骨形成速度と破骨細胞数

(2) 標的細胞の同定

骨髄由来間葉細胞(BMSC)や未分化間葉系株化細胞(C2C12, C3H10T1/2, ST2)において、LF のタンパク発現は見られなかったが、その受容体である LRP-1 のタンパク発現が認められた(図 3)。一方、骨髄から採取した直後の BMM ϕ では、LRP-1 は、発現していないが、RANKL を添加することで、発現が認められた(図 3)。また、BMM ϕ は、LF を発現しているが、RANKL の添加により LF の発現は、消失した(図 3)。RT-PCR による mRNA 発現解析は、タンパク発現と同様な結果となった。これらの結果より、

bLF のターゲット細胞は、間葉系細胞と RANKL 刺激後の BMMφ であることが示された。

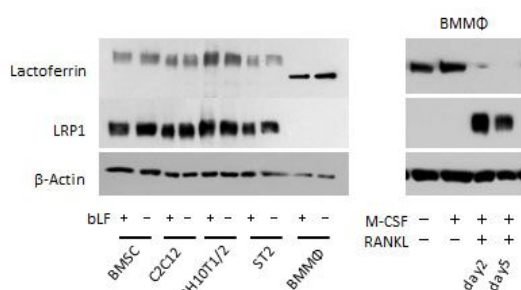


図3: 間葉系細胞および骨髄マクロファージの LRP-1とlactoferrinのタンパク発現

(3) 好中球による細胞分化調節機能
C3H10T1/2 細胞と好中球 (1×10^5 cells 以上) と共存培養することで、ALPase 陽性 C3H10T1/2 細胞が増加し、骨芽細胞分化が促進された (図 4)。また、transwell および conditioned medium の実験においても、同様に C3H10T1/2 細胞の骨芽細胞分化が促進された (図 4)。

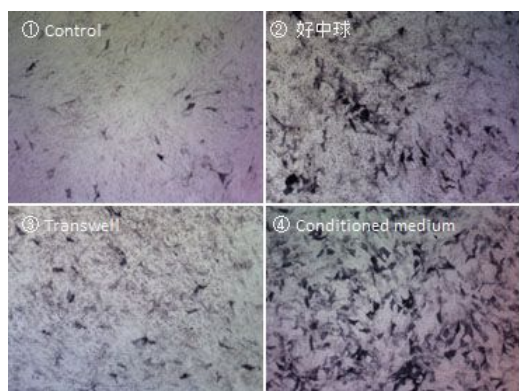


図4: 骨芽細胞分化における好中球の作用
① C3H10T1/2細胞のみの培養、② C3H10T1/2細胞と好中球 (1×10^5 cells) を共存培養、③ トランスウェルに好中球 (1×10^5 cells) を入れて、C3H10T1/2細胞を培養、④ 好中球を培養した培地を75%添加し、C3H10T1/2細胞を培養

破骨細胞分化において、好中球 (1×10^6 cells) と共存培養することで、BMMφの破骨細胞分化が抑制された (図 5)。また、conditioned medium の実験においても、同様に BMMφの破骨細胞分化が抑制された (図 5)。市販の好中球由来 LF を添加した実験においても、同様な結果が得られた。これらの結果より、好中球の分泌物に含まれる LF が、骨芽細胞および破骨細胞の分化調節に関与していることが示唆された。



図5: 破骨細胞分化における好中球の作用
① 骨髄マクロファージ細胞のみの培養、② 骨髄マクロファージと好中球 (1×10^6 cells) を共存培養、③ 好中球を培養した培地を75%添加し、骨髄マクロファージを培養

以上、本研究により、LF は、間葉系細胞と破骨細胞分化前の BMMφ をターゲットとして、骨芽細胞分化を誘導し、破骨細胞分化を阻害する。その結果、骨形成を促進し、骨吸収を抑制することで、骨粗鬆症による骨量低下を抑制することが示された。また、LF を含有する好中球による分泌物もまた、骨芽細胞分化および破骨細胞分化調節において、同様な機能を有することが明らかになった。

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 20 件)

Ninomiya T, Hiraga T, Hosoya A, Ohnuma K, Ito Y, Takahashi M, Ito S, Asashima M, Nakamura H (2014) Enhanced bone-forming activity of side population cells in the periodontal ligament. Cell Transplantation 23:691-701 査読有

DOI: 10.3727/096368913X663587

Mochizuki N, Sugino N, Ninomiya T, Yoshinari N, Udagawa N, Taguchi A (2014) Association of cortical shape of the mandible on panoramic radiographs with mandibular trabecular bone structure in Japanese adults: a cone-beam CT image analysis. Oral Radiology 30:160-167 査読有

<http://link.springer.com/article/10.1007/s11282-013-0155-z>

Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N, Udagawa N (2013) Osteoprotegerin-efficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: comparison with RANKL-overexpressing transgenic male mice. Endocrinology 154:773-782 査読有

DOI: 10.1210/en.2012-1928

Hosoya A, Yukita A, Ninomiya T, Hiraga T, Yoshida K, Yoshida N, Kasahara E, Nakamura H (2013) Localization of SUMOylation factors and Osterix in odontoblast lineage cells during dentin formation and regeneration. Histochem Cell Biol 140:201-211 査読有

DOI: 10.1007/s00418-013-1076-y

Chen YC, Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Miyazawa H, Nakamura H (2012) $1\alpha, 25$ -dihydroxy vitamin D_3 inhibits osteoblastic differentiation of mouse periodontal fibroblasts. Arch Oral Biol 57:453-459 査読有

DOI:10.1016/j.archoralbio.2011.10.00

Nakamura H, Yukita A, Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T (2012) Role of heparan sulfate proteoglycans surrounding osteoblast lineage cells. J Oral Biosci 54:43-47 査読有
DOI:10.1016/j.job.2012.01.005

Kinugawa S, Koide M, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Ninomiya T, Muto A, Kawahara I, Nakamura M, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N (2012) Tetracyclines Convert the Osteoclastic-Differentiation Pathway of Progenitor Cells To Produce Dendritic Cell-like Cells. J Immunol 188:1772-1781 査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.1101174

Hosoya A, Hiraga T, Ninomiya T, Yukita A, Yoshiba K, Yoshiba N, Takahashi M, Ito S, Nakamura H (2012) Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. Histochem Cell Biol 137:733-742 査読有
DOI: 10.1007/s00418-012-0928-1

〔学会発表〕(計 36 件)

細矢明宏、二宮 禎、吉羽邦彦、吉羽永子、中塚美智子、中村浩彰：象牙芽細胞分化における Bmi-1 の機能、第 56 回歯科基礎医学会学術大会 2014 年 9 月 27 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

Mochizuki N, Sugino N, Ninomiya T, Yoshinari N, Udagawa N, Taguchi A, Association of cortical porosity with trabecular structures on the mandible. 91st IADR, March 23, 2013 Seattle, Wash, USA

Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Koide M, Nakamura H, Bovine lactoferrin inhibits differentiation of osteoclasts and prevents bone loss in ovariectomized rats. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, May 28, 2013 Kobe Japan

Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N Osteocyte-derived OPG contributes to prevention of alveolar bone loss. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, May 28, 2013 Kobe Japan

Hosoya A, Yukita A, Nakamura H

Formation of bone-like tissues by dental pulp cells after tooth transplantation. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, May 28, 2013 Kobe Japan

Hiraga T, Ito S, Nakamura H Function roles of the cancer stem cell marker CD44 in the development of bone metastasis. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, May 31, 2013 Kobe Japan

細矢明宏、雪田 聡、二宮 禎、平賀 徹、吉羽邦彦、吉羽永子、中村浩彰：分化直後の象牙芽細胞に局在する SUMO 化修飾因子と Osterix、第 118 回日本解剖学会 2013 年 3 月 28 日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場（香川県高松市）

二宮 禎：ラクトフェリンによる細胞分化調節機能、第 11 回松本ボーンフォーラム 2012 年 5 月 25 日、信州大学（長野県松本市）

望月慎恭、杉野紀幸、二宮 禎、田口 明：パノラマ X 線写真における骨粗鬆症スクリーニング指標と顎骨海綿骨との関係、第 215 回日本歯科放射線学会 2012 年 7 月 8 日、日大松戸歯学部（千葉県松戸市）

二宮 禎、細矢明宏、平賀 徹、小出雅則、中村浩彰：ラクトフェリンの細胞分化調節機能、第 30 回日本骨代謝学会、2012 年 7 月 21 日、京王プラザホテル（東京都新宿区）

小出雅則、二宮 禎、小林泰浩、中村美どり、保田尚孝、高橋直之、宇田川信之：抗 RANKL 抗体による OPG 遺伝子欠損マウスの歯槽骨吸収の抑制効果、第 30 回日本骨代謝学会、2012 年 7 月 20 日、京王プラザホテル（東京都新宿区）

二宮 禎、細矢明宏、平賀 徹、小出雅則、中村浩彰：ラクトフェリンは細胞分化を制御し、卵巣摘出ラットの骨量減少を抑制する、第 54 回歯科基礎医学会学術大会、2012 年 9 月 16 日、奥羽大学（福島県郡山市）

〔図書〕(計 2 件)

中村浩彰 (2013) 最新の骨粗鬆症学 骨の血管系と神経系、pp.39-42、日本臨床社

平賀 徹 (2012) がん骨転移治療 ビスホスホネート治療による Bone Management -、pp.49-55、先端医学社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二宮 禎 (NINOMIYA TADASHI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：00360222

(2) 研究分担者

中村 浩彰 (NAKAMURA HIROAKI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：50227930

平賀 徹 (HIRAGA TORU)
松本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：70322170

小出 雅則 (KOIDE MASANORI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：10367617