

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593004

研究課題名(和文)炎症性サイトカインによる破骨細胞性骨吸収に対するカルデクリンの分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of caldecrin on osteoclastic bone resorption by inflammatory cytokine

研究代表者

田村 暢章 (TAMURA, Nobuaki)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：00363218

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)：野生型マウス長管骨由来骨髄細胞の初代培養を用いたLPSの破骨細胞分化誘導活性化にはRANKLによる前処理(プライミング)が必要であった。カルデクリンはRANKLによるLPS応答能を増強させるプライミングステップを抑制した。

LPS環境下においてカルデクリンはRANKLによるプライミング効果を抑制することより、さまざまな炎症作用に対する予防薬として期待ができると考えられる。これまでに破骨細胞分化過程において、カルデクリンはRANKL刺激によるカルシウム・カルシニューリン系を介する転写因子NFATc1を抑制することで破骨細胞の分化誘導を抑制することが明らかになっている。

研究成果の概要(英文)： We collected primary cells derived from murine bone marrow. LPS promoted osteoclastic differentiation of primary bone marrow cells after priming activation with RANKL. Caldecrin inhibited this priming step. It suggests that Caldecrin will be valuable therapeutic agent for inflammatory diseases associated with bone resorption.

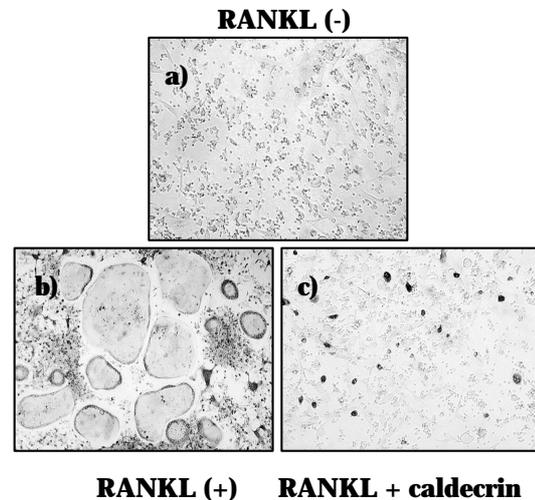
研究分野：顎顔面口腔外科・歯科インプラント

キーワード：カルデクリン 炎症性骨吸収

1. 研究開始当初の背景

TNF (tumor necrosis factor) スーパーファミリーに属する RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) は破骨細胞の受容体 RANK (receptor activator of NF- κ B) を介し、分化誘導を行うことが知られており、また炎症性サイトカインによる破骨細胞の分化と機能の調節には、TNF- α (tumor necrosis factor- α) や IL-1 (interleukin-1) のように RANK-RANKL を介さないシステムがあり、これらは OPG (破骨細胞形成抑制因子 osteoprotegerin) でも抑制されないといわれている。

カルデクリンは友村らによって精製・クローニングされた急性膵炎発症時に頻発する低カルシウム血症の惹起因子であるが、近年、「破骨細胞の分化を抑制する因子」として、また「成熟破骨細胞機能を抑制する因子」として報告された。これまでにリウマチ患者の滑膜線維芽細胞において炎症性サイトカインによる RANKL mRNA の発現の促進をカルデクリンが抑制することを見出し報告していることから、RANKL 発現が亢進している炎症組織内での破骨細胞分化をカルデクリンが抑制することが示唆された。また TNF- α による破骨細胞の分化誘導もカルデクリンは抑制することが予備実験により分かっているため、炎症性に作用する破骨細胞へのカルデクリンによる抑制機構のメカニズムをより詳細に探り、解析していくことで、インプラント周囲炎のような炎症性骨吸収治療への創薬をめざす基盤研究として計画した。



2. 研究の目的

炎症性骨吸収を抑制する新規物質としてのカルデクリンについての詳細な研究を進めることによって、炎症性骨破壊に対する新たな予防薬ならびに創薬として応用できる期待が高い。

そこで、マウス破骨細胞前駆細胞を用いて RANKL 刺激による破骨細胞分化に対して、さまざまな炎症性サイトカイン存在下における破骨細胞の分化段階をカルデクリンがどのようにして抑制するのかを、分子レベル（炎症性サイトカイン下流の破骨細胞シグナルへの影響）で解明することを目的とし、さらに炎症性骨吸収モデルマウスを用いてカルデクリンの抑制効果を評価し、臨床応用へのステップとする。

3. 研究の方法

【材料および方法】

本研究は明海大学動物実験倫理委員会の承認（承認番号A1421）を得たうえで動物実験を行った。マウスはddyマウス（日本SLC社；静岡）で、頭蓋冠由来骨芽細胞は新生児マウス（1日齢）よりコラゲナーゼ（和光純薬；大阪）およびディスパーゼ（エーディア；東京）を用いて単離した。マウス骨髄細胞は5-7週齢マウスの大腿骨および脛骨より採取した。M-CSF 10ng/mlおよびRANKL (R & D Systems, Minneapolis, MN)、10%ウシ胎児血清

(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)、1%ペニシリン - ストレプトマイシン溶液 (10unit/ml Penicillin G + 10 µg Streptomycin sulfate, Invitrogen 社, CA)を含む無血清 MEM 培地 (和光純薬;大阪)にて、37 °C、5%CO₂ の条件下で培養した。

野生型マウス長管骨由来骨髓細胞の初代培養を用い、M-CSF(10ng/ml)存在下で3日間培養後、低濃度(1ng/ml)でのRANKL存在下でマクロファージの培養を行った(プライミングステップ)のち、LPS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)による影響を評価した。またマウス骨髓マクロファージとマウス頭蓋冠由来骨芽細胞での共存培養においても同様にして評価した。さらにマウスマクロファージ様破骨細胞前駆細胞株であるRAW-D細胞についても実験に使用した。これらの細胞を用いてLPS存在下での破骨細胞分化・増殖に対するカルデクリンの効果を検討した。TRAP染色は培地の除去後、細胞を100%メタノールで1分間固定し、破骨細胞のTRAP活性染色をLeukocyte acid phosphatase kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)を用いて行った。すなわち基質としてnaphthol AS-B 1 phosphoric acidを用いて染色後、methyl greenで核染色を行い、位相差顕微鏡下で細胞当たり3つ以上の核を含むTRAP陽性多核細胞を破骨細胞として評価した。

TRAP活性測定は、培養上清を用いて行った。回収した培地を遠心分離(500 x g, 10分)後の培養上清50 µlにTRAP buffer (pH5.5) (17.6mg/ml L-ascorbic acid, 9.2mg/ml sodium tartrate dehydrate, 3.6mg/ml 4-nitrophenylphosphate sodium salt, 0.3% Triton X-100, 6.0mM EDTA, 600mM NaClを含む600mM sodium acetate)を50 µl加え、37 °C・1時間反応させた。その後、300mM NaOHを100 µl添加し、反応を停止させ、405nmの吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。対照としては細胞を含まない

培地を使用した。

リアルタイム RT-PCR 法: 様々な処理を行った細胞から Isogen 試薬 (ニッポンジーン社)を用いて total RNA を抽出し、oligo dT プライマーを用いて cDNA に逆転写した。20000 倍希釈した SYBR Green I (CAMBREX 社)を加えて PCR 反応を行い、反応中の蛍光を LightCycler® Nano System(Roche)で行い、LightCycler® Nano Soft Ware 1.1(Roche)で読み取り、発現していた mRNA の量を解析した。

ウエスタンブロット法: 実験に用いた細胞は RIPA buffer で溶解し、10%ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行った。泳動後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜にトランスファーし、5%スキムミルク TBST でブロッキングを行った。1 次抗体と反応させた後、ペルオキシダーゼ (POD) 標識 2 次抗体と反応させた。その後、ルミノール試薬で化学発光させ、X 線フィルムに焼付け、現像を行った。

カルデクリンの活性化は trypsin をモル比 1:50 の割合で添加し、37 °C・30 分間処理し、p-APMSF を trypsin のモル比の 2 倍量加え、室温で 10 分間処理によって trypsin 活性を停止させ、処理濃度は 6 µg/ml とした。

4 . 研究成果

LPS での条件を検討したところ、100ng/ml が破骨細胞形成を誘導するのに最適な濃度であることが分かった。マウス骨髓細胞培養系において3日間のLPS単独添加では破骨細胞分化を抑制していたが、低濃度(1ng/ml)RANKL刺激(24-48hr)での Priming 処理をしたうえで同等の LPS 添加であれば破骨細胞への分化と機能の発現がみられたが、予想に反してLPSが共存するとRANKLによる破骨細胞分化が抑制された。このことから低濃度のRANKL処理がLPSによる破骨細胞分化誘導に必要であることが明らかになり、LPS刺激による破骨細胞形成系が構築できた。

マウス骨髓マクロファージ培養系におい

カルデクリンはこうした RANKL による LPS 応答能を増強させるプライミングステップを抑制した。

またこれに加えて、骨髄マクロファージと骨芽細胞を用いた共存培養法において検討したところ、LPS による破骨細胞分化 (TRAP 陽性) をカルデクリン添加により抑制傾向を示したが、有意な結果ではなかった。

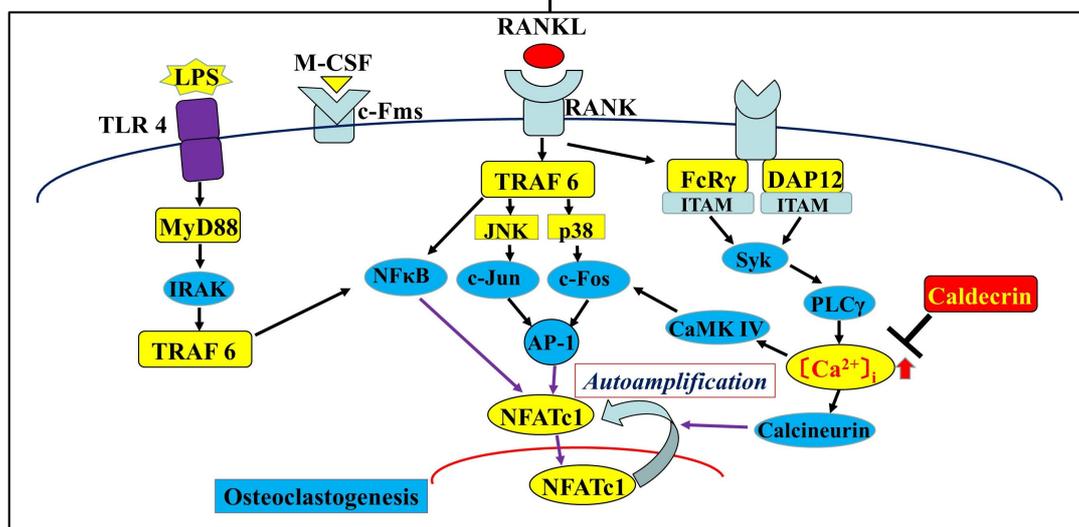
LPS による破骨細胞分化誘導における遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法で解析したところ、RAW-D 細胞を用いた低濃度 RANKL によるプライミング処理によって TRAP ならびにカテプシン K の mRNA 発現量は有意に増加し、LPS 添加に伴いさらなる増加を示した。カルデクリンはこれらの遺伝子を抑制することが予想される。

またプライミングを行った RAW-D 細胞を LPS で刺激し、その時の細胞内シグナルをウェスタンブロット法により確認したところ ERK、p38、NF- κ B の活性化が認められたが、Akt の活性化は確認ができなかった。この結果はプライミングを行っていないマクロファージと同様の結果であり、またカルデクリンにより活性化されるシグナル経路との関連を明らかにすることができなかった。今後、詳細な解析が必要である。

これらの結果から予想される細胞内シグナルは以下の通りである。

【引用文献】

- (1) 血清カルシウム降下因子 caldecrin による破骨細胞分化誘導抑制効果 . 木戸政水 , 他 . 明海歯学 35 (1/2), 86-97, 2006
- (2) 血清カルシウム降下因子 (カルデクリン) による滑膜線維芽細胞の RANKL 発現の抑制 藤本健吾 , 他 明海歯学 39 (1), 42-51, 2010
- (3) Serum Calcium-decreasing Factor, Caldecrin, Inhibits Osteoclast Differentiation by Suppression of NFATc1 Activity. Hiroya Hasegawa, et. al. The Journal of Biological Chemistry 285(33), 25448-25457, 2010
- (4) 閉経後骨粗鬆症モデルマウスに対する血清カルシウム降下因子カルデクリンの遺伝子導入による骨吸収抑制効果 . 大井迪 , 他 . 明海歯学 40 (2), 146-154, 2011



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1件)

Tomomura M, Suzuki R, Shirataki Y, Sakagami H, Tamura N, Tomomura A. Rhinacanthin C Inhibits Osteoclast Differentiation and Bone Resorption: Roles of TRAF6/TAK1/MAPKs/NF- κ B/NFATc1 Signaling. PLoS One. 査読有 2015,10(6) e0130174.
doi: 10.1371/journal.pone.0130174.

[学会発表](計3件)

田村暢章、友村 美根子、坂東健二郎、川口 祥子、嶋田 淳、友村 明人
第 33 回日本骨代謝学会(京王プラザホテル): 2015.7.23-25

細菌内毒素による破骨細胞分化誘導に対するカルデクリンの抑制効果

田村暢章、竹島 浩、川口祥子、嶋田 淳
第 45 回日本口腔インプラント学会学術大会(ホテルグランヴィア岡山): 2015.9.21-23

Caldecrin の細菌感染に伴う骨破壊への抑制効果

田村暢章、坂東健二郎、友村 美根子、川口 祥子、友村 明人、嶋田 淳
第 60 回日本口腔外科学会総会(名古屋国際会議場): 2015.10.16-18

細菌感染による破骨細胞分化に対する Caldecrin の抑制効果

[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:
出願年月日:
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

田村暢章(TAMURA Nobuaki)
明海大学歯学部助教
研究者番号: 00363218

(2)研究分担者

友村明人(TOMOMURA Akito)
明海大学歯学部教授
研究者番号: 60188810

(3)連携研究者

()
研究者番号: