

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792252

研究課題名(和文)破骨細胞融合における新規細胞融合制御因子の解明

研究課題名(英文)To clarify the new regulator of cell-cell fusion of osteoclasts

研究代表者

岩崎 良太郎 (Ryotaro, Iwasaki)

慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)

研究者番号：30365390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞は骨吸収を担う生体唯一の細胞であり、造血幹細胞を起源とする単球/マクロファージ系前駆細胞に由来する。骨芽細胞からのM-CSFの刺激によりRANK受容体を発現し、RANKLの刺激により破骨細胞前駆細胞に分化した後、多数の前駆細胞が融合し多核の破骨細胞を形成する。またマクロファージは慢性的な炎症に反応して巨細胞を形成することが知られている。今までに我々はDC-STAMPという破骨細胞融合において必須の分子を同定している。今回我々は、新たな破骨細胞融合因子OC-STAMPを同定し、癌の骨破壊や顎骨の骨吸収における分子メカニズムを解明することを目的とした。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts are multinuclear giant cells derived from hematopoietic stem cells or monocyte/macrophage lineage cells in the presence of M-CSF and RANKL. The multinucleation of osteoclasts is induced by a cell-cell fusion of mononuclear osteoclasts. Recently, we have isolated DC-STAMP (Dendritic Cell Specific Transmembrane Protein), a seven transmembrane protein, as an essential molecule for osteoclast/FBGC cell-cell fusion. This time, we identified the multitransmembrane protein, osteoclast stimulatory transmembrane protein(OC-STAMP), and found that OC-STAMP was also required for osteoclast and FBGC cell-cell fusion.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 細胞融合 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞はマクロファージを経て、M-CSF と RANKL で破骨細胞に、GM-CSF と IL4 刺激で Foreign body giant cell: 異物巨細胞(以下、FBGC)に分化するが、両細胞の共通点として細胞融合、多核化することが知られている。この細胞融合について、2005 に DC-STAMP KO マウスでは破骨細胞、FBGC の多核化ができないことから DC-STAMP がマクロファージの細胞融合に必須であることが報告されている。DC-STAMP の発現をみると RANKL や IL4 が加わることで上昇するが、では、DC-STAMP の発現がまだ低い M-CSF, GM-CSF 単独培養に DC-STAMP を強制発現させれば細胞融合は起こるのかと考え、DC-STAMP Tg マウス由来の細胞を M-CSF, GM-CSF 単独で culture してみたところ、細胞融合は起こらなかった。つまり、DC-STAMP は細胞融合の十分条件ではないことが分かり、他にも細胞融合を制御する分子が存在することが示唆された。

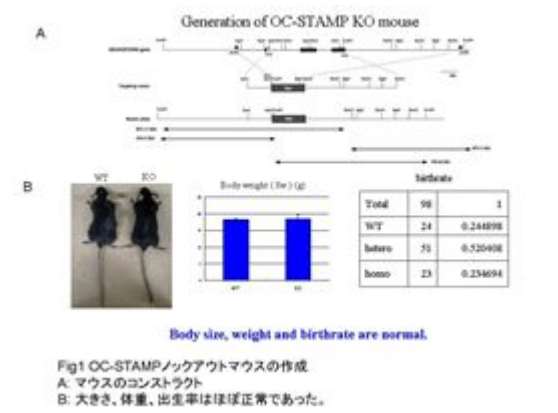
2. 研究の目的

そこで、マイクロアレイで単核細胞であるマクロファージと多核細胞である破骨細胞、異物巨細胞との間で発現分子を subtraction し、多核細胞だけに高発現している分子を拾ってきた。そのうち、ATpv0d2 に関しては KO mouse が 2006nature medicine で報告されている。そのため、我々は Car2, MT3, OC-STAMP という 3 つの KO mouse を作成し解析を行った。まずは、Car2, MT3 に関しては in vitro で培養を行なったところ、残念ながら KO マウスでも WT と同じくらい多核の破骨細胞、異物巨細胞の形成がみられたので Car2, MT3 は細胞融合には必須ではないということがわかった。培養を行なったところ、興味深いことに破骨細胞、異物巨細胞どちらの assay においても多核の細胞が全く形成されなかった。また、その際、NFATc1, cathepsinK など

の破骨細胞分化マーカーや、DC-STAMP などの細胞融合関連遺伝子の発現は野生型と比較して変化がないことから OC-STAMP は単独で細胞融合に必須であることが明らかになった。

3. 研究の方法

そこで OC-STAMP に関する解析を進めていくことにした。まず、OC-STAMP は osteoclast stimulatory transmembrane protein といい、2007年に最初の報告がされており、特徴として7回幕貫通型タンパク、DC-STAMP と構造上非常に似ているということが知られている。また、siRNAでの knock down で破骨細胞の多核化が完全ではないが抑制されるという報告が2007にあるが、過去の報告は非常に少なく、もちろん KO mouse の報告も現在までない。OC-STAMP KO mouse は、モデルとしてエクソンの3箇所を KO したものを作成した。



大きさや体重、出生率はほぼ正常であった。pit assay も行ったが、多核化しないことによって骨吸収能がかなり落ちていた。ただ骨密度をしてみると WT にくらべ多少高い程度で、pit 定量の差ほどはなかったので、今後は骨形態計測などで骨形成能への影響も見っていく必要がある。

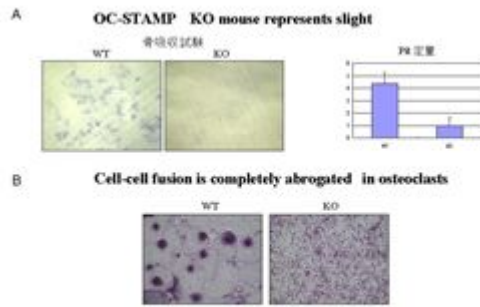


Fig2 OC-STAMPノックアウトマウス由来の破骨細胞の解析
 A: ノックアウトマウスの破骨細胞の骨吸収能は低下していた。
 B: *in vitro*で破骨細胞を形成誘導したところ、ノックアウトマウスでは細胞融合が完全に欠失していた。

発現遺伝子については、NFATc1, c-Fos, cathepsin K, TRAP といった破骨細胞分化に必要なものや、DC-STAMP など細胞融合に関与する分子についての発現では WT, KO で特に違いはなかった。つまり、OC-STAMP は他の因子には影響せず、単独で critical に細胞融合を制御していることがわかった。

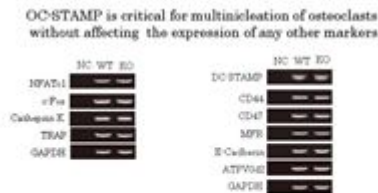


Fig3 破骨細胞の分化マーカーや細胞融合関連遺伝子の発現解析
 WTマウスとKOマウスで発現の差は認められなかった。
 ゆえに、OC-STAMPは他の因子には影響せず、
 単独でcriticalに細胞融合を制御していることがわかった。

では、OC-STAMP が破骨細胞、異物巨細胞の融合に本当に必須なものかどうかを調べるために、まずサイトカインの濃度や培養期間を変えてみたり、破骨細胞を骨芽細胞との co-culture といった培養条件を変えても融合はおこらないのかを検証した。

破骨細胞 assay で RANKL の濃度を上げたり、10 日といつもより培養期間を延ばしたりしたがやっぱり多核化しなかった。骨芽細胞と同様の間葉系細胞である ST2 細胞と共培養して vivo に近似した状況の assay を行ったが、融合は認められなかった。つまり、OC-STAMP は DC-STAMP と同様に破骨細胞の多核化に必須の分子であることがわかった。次に、FBGC についても同様にサイトカインの濃度を上げたり、長期間培養を行ったりしてみたがやっぱり多核細胞は認めら

れなかった。遺伝子発現も、FBGC 特異的とされる MMP9 や融合関連分子には差が認められなかった。今度は DC-STAMP との関係性を調べるため、DC-STAMP KO mouse における OC-STAMP の発現を見たが破骨細胞、異物巨細胞で特に発現は変わらなかった。つまり、DC-STAMP, OC-STAMP は independently に破骨細胞、FBGC の多核化を制御していることがわかった。

次に、シグナルについて解析を行った。まず、破骨細胞分化では、master regulator として NFATc1 が知られているので、OC-STAMP は NFATc1 の制御を受けるのか、を NFATc1 インヒビターである FK506 を添加した時の、OC-STAMP の発現を DC-STAMP とともにみてみたところ、real time PCR, RT-PCR で DC-STAMP, OC-STAMP とともに発現が大きく抑制されていた。このことから、破骨細胞分化においては NFATc1 が OC-STAMP の発現を制御していることが示唆された。

次に、FBGC の signal では、異物巨細胞は IL4, GM-CSF で誘導されるが、GM-CSF 単独では OC-STAMP はほとんど発現していないため、OC-STAMP は IL4 依存的に発現することがわかる。DC-STAMP に関しては GM-CSF 単独でも発現は見られるが、発現量は半分くらいになっているので、DC-STAMP は GM-CSF, IL4 双方から制御を受けていることが考えられる。そこで、IL4 の下流には STAT6 があるが、その STAT6 が OC, DC-STAMP を制御しているのかどうか、STAT6 KO mouse を使って解析を行った。KO mouse では IL4 のシグナルが入らないため、予想通り異物巨細胞が形成しておらず、その際 OC-STAMP はほとんど発現が見られない。DC-STAMP の発現も半分ほどになっている。通常、異物巨細胞形成には 4, 5 日はかかるのだが KO mouse では 2 日と超早期から異物巨細胞形成が亢進しているのが確認できた。つまり、STAT1 は異物巨細胞の形

成に negative に働いていることが示唆された。DC-STAMP, OC-STAMP の発現をみると DC-STAMP は KO で上昇していることから STAT1 は GM-CSF と IL4 assay では DC-STAMP の発現を抑制することが解る。次に、STAT6 と STAT1 の関係を調べるため、STAT6 KO マウスにおける STAT1 のリン酸化、および STAT1 KO マウスの STAT6 のリン酸化をみてみたところ、STAT6 KO では STAT1 のリン酸化が著しく上昇していた。逆に STAT1 KO での STAT6 はそれほど変化が見られなかった。このことから、異物巨細胞 assay では STAT6 は STAT1 を抑制するが、STAT1 は STAT6 に影響を及ぼさない、ということがわかった。

4. 研究成果

STAT6 が STAT1 を抑制し、STAT1 は DC-STAMP、OC-STAMP を抑制する。逆つまり、IL4-STAT6 のシグナルが入ると STAT1 の抑制がとれて OC, DC-STAMP の発現があがり、融合がおきる。このように、異物巨細胞の分化における OC, DC-STAMP, STAT1、STAT6 の関係、制御について明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1, Niibe K, Ouchi T, Iwasaki R, Nakagawa T, Horie N Osteonecrosis of the jaw in patients with dental prostheses being treated with bisphosphonates or denosumab. J Prosthodont Res. 2014 Sep 8.: S1883-1958 (査読有)

2, Mori T, Sato Y, Miyamoto K, Kobayashi T, Shimizu T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Tando T, Iwasaki R, Kawana H, Morioka H, Matsumoto M, Saya H, Toyama Y, Miyamoto T, TNF α promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state. Oncogene 12/2013; 545 (査読有)

3, Miyamoto H, Suzuki T, Miyauchi Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Hoshi H, Hashimoto K, Yoshida S, Hao W, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Takeya M, Toyama Y, Miyamoto T.

Osteoclast stimulatory transmembrane protein and dendritic cell-specific transmembrane protein cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells. J Bone Miner Res. 2012 Jun;27(6):1289-97 (査読有)

4, Hoshi H, Hao W, Fujita Y, Funayama A, Miyauchi Y, Hashimoto K, Miyamoto K, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Kitagawa K, Nakayama KI, Kawamoto T, Sano M, Fukuda K, Ohsawa I, Ohta S, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Miyamoto T. Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. J Bone Miner Res. 2012 Sep;27(9):2015-23 (査読有)

5, Miyamoto H, Katsuyama E, Miyauchi Y, Hoshi H, Miyamoto K, Sato Y, Kobayashi T, Iwasaki R, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Fujie A, Hao W, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T An essential role for STAT6-STAT1 protein signaling in promoting macrophage cell-cell fusion. J Biol Chem. 2012 Sep 21;287(39):32479-84. (査読有)

6, Yoshida S, Iwasaki R, Kawana H, Miyauchi Y, Hoshi H, Miyamoto H, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Nakagawa T, Miyamoto T. PDGFBB promotes PDGFR α -positive cell migration into artificial bone in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2012 May 18;421(4):785-9 (査読有)

〔学会発表〕(計 9 件)

1, 森田麻友, 岩崎良太郎, 吉田重之, 宮本健史, 河奈裕正, 中川種昭 破骨細胞に発現する Smad4 は破骨細胞の分化抑制から骨量を減少する 日本口腔外科学会総会・学術大会 2014 年 10 月 17 日 幕張メッセ 千葉県千葉市

2, Ryotaro Iwasaki, Takeshi Miyamoto, Mayu Morita, Tomoaki Mori, Taneaki Nakagawa, Hiromasa Kawana The both cytokines, TNF and IL-1 are essential for the tumorigenesis of mouse osteosarcoma. AAOMS 2014 Annual Meeting, 2014.9 Honolulu USA

3. 岩崎良太郎、宮本健史、森田麻友、白田慎、宮下英高、筋生田整治、中川種昭、河奈裕正
TNF および IL-1 はマウス骨肉腫細胞株 AX の腫瘍形成に必須である 第 58 回 (社) 日本口腔外科学会総会, 2013.10 福岡国際会議場 福岡県福岡市

4. R. Iwasaki, S. Yoshida, T. Miyamoto, T. Nakagawa, H. Kawana
PDGFR alpha-positive cells were migrated into artificial bone by PDGFBB in vivo.
10th Asian Congress on Oral and Maxillofacial surgery November 15-18, Discovery Kartika Plaza Hotel Bali-Indonesia

5. 吉田重之、岩崎良太郎、宮本健史、河奈裕正、中川種昭 *In vivo* において PDGFBB は PDGFR 陽性細胞の遊走を促進させる
2012.10.19-21 第 57 回 日本口腔外科学会総会・学術大会 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市

6. Yoshida S, Iwasaki R, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T
PDGF-BB promotes PDGFR α -positive cell migration into artificial bone in vivo
ASBMR annual meeting
October 12-15, 2012 Minneapolis convention center at Minneapolis, Minnesota, USA

7. 吉田重之、岩崎良太郎、戸山芳昭、中川種昭、宮本健史
PDGFbb は骨芽細胞分化を抑制することなく前骨芽細胞の遊走を促進する
2012.9.14-15 第 13 回 運動器科学研究会 アピカルイン京都 京都府京都市

8. 吉田重之、岩崎良太郎、河奈裕正、中川種昭、宮本健史
PDGFBB は人工骨の生体親和性を上昇させる
2012.7.19-21 第 30 回 日本骨代謝学会学術集会 京王プラザホテル 東京都新宿区

9. Yoshida S, Iwasaki R, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T
PDGF-BB promotes PDGFR α -positive cell migration into artificial bone in vivo
ASBMR Topical meetings bone and skeletal muscle
July 17 – 18, 2012 Westin Kansas City at Crown Center Kansas City, MO, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者
岩崎 良太郎 (IWASAKI RYOTARO)
慶應義塾大学医学部 講師 (非常勤)
研究者番号 : 30365390