

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890048

研究課題名(和文)骨細胞におけるRANKL細胞内動態の解析

研究課題名(英文)Subcellular behavior of RANKL in osteocytes

研究代表者

苅谷 嘉顕(Kariya, Yoshiaki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20633168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：骨細胞に発現するRANKL分子による破骨細胞活性化の重要性が近年示されたが、詳細な制御様式は不明確であり、その解明を本研究では試みた。In vitroで骨細胞形質を長期間維持可能な三次元共培養系を構築し、この系にて骨細胞との直接接触が破骨細胞活性化に重要であることを見出した。背後の細胞内イベントとして、骨細胞におけるOPG分子を介したRANKLのリソソームへの輸送、リソソームから細胞表面への刺激依存的輸送が主要な役割を果たすことを見出した。過去に提唱されていた骨細胞の細胞死のみならず、生存骨細胞が能動的に破骨細胞形成を制御することを示した知見であり、骨代謝・関連疾患の理解に非常に重要である。

研究成果の概要(英文)：Although the significance of RANKL expressed in osteocytes has been elucidated very recently, the detailed mechanisms behind it remained unclear. We have approached this by constructing a culture system which enables long term culture of osteocytes without losing their properties. Analyses based on this system have revealed that the direct cell-to-cell contact between osteocytes and osteoclast progenitor cells plays crucial roles in osteoclastogenesis. It has been also elucidated that OPG expressed in osteocytes regulates RANKL lysosomal sorting and that stimulation-triggered RANKL release from lysosome in osteocytes is key to efficient osteoclastogenesis. These study outcomes are marked in that the critical role of live osteocytes was unraveled while osteocyte death had been shown to induce osteoclastogenesis previously. Furthermore, these findings have enhanced and will potentially promote the understanding of bone homeostasis and its related disorders.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：骨代謝 骨細胞 破骨細胞活性化 RANKL 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、閉経後の女性の3割以上が罹患し、日本での総患者数は1000万人超と推定される疾患である。しかし、代表的な治療法である破骨細胞活性化抑制は、長期加療により骨折リスクを増大する可能性が指摘されており(FDA, 2010)、適切な治療法確立は喫緊の課題である。過去二十数年来の研究から、破骨細胞活性化は、骨芽細胞に発現する Receptor Activator of NF-kappaB (RANK) ligand (RANKL) と破骨前駆細胞に発現する受容体 RANK を介するシグナル伝達により制御されること、が提唱されてきた。しかし、昨年、破骨細胞活性化を惹起する RANKL は、主に骨細胞により供給されることが複数の研究者により示され、パラダイムシフトが起きた(Nakashima T. et al. Nat Med. 2011, Xiong J. et al. Nat Med. 2011)。そのため、臨床的・社会的要請を満足させ得る治療法確立には、骨細胞による破骨細胞活性化制御の理解が不可欠である。

これまでに明らかとなった骨細胞と破骨細胞活性化の関係は、主に次の三点である。一点目は、骨細胞特異的な RANKL 欠失に伴い、破骨細胞がほぼ消失し、骨量が大幅に増大すること(Nakashima T. et al., 2011)、二点目は、骨細胞死の誘導は、破骨細胞を過剰に活性化し、骨量を劇的に減少させること(Tatsumi S. et al. Cell Met. 2007)、三点目は、骨細胞は、外界の力学的負荷を検知し、負荷が微弱でも、過剰でもアポトーシスし、破骨細胞を活性化すること(Atkins GJ et al. Osteoporos Int. 2012)である。これらの知見から、骨細胞死が破骨細胞活性化に重要であると説明されることがあるが、糖質コルチコイド誘導の骨細胞死では破骨細胞が活性化しないこと(Weinstein RS et al. Endocrinol. 2011)や、力学的負荷に伴ってマイクロクラックが生じた際も、クラック周辺の骨細胞がすべて死滅している訳ではなく、逆に、クラックから離れた部位でも破骨細胞形成が観察されること(Colopy SA et al. Bone 2004)、さらに、骨細胞死と破骨細胞活性化の関連は、*in vitro* 系で検証された報告もなく、普遍的な説明ではない。加えて、RANKL 供給源である骨細胞の死は、破骨細胞活性化を一定期間維持する際に、必ずしも生体として効率的とは考えられず、骨細胞死が関与しない破骨細胞活性化様式の存在を確信するに至った。以上を考慮し、申請者は、破骨細胞活性化は、力学的負荷やマイクロクラックに応答する急性活性化と、負荷非依存的な基底状態での骨リモデリングのための破骨細胞活性化の二通りに分類されると考えた。骨全域のリモデリング状態が変動する疾患である骨粗鬆症などの代謝疾患は、基底状態の破骨細胞活性化の影響が大きいと考えられるが、その活性化を惹起する因子、制御する骨細胞内分子機構、および、その生理的寄与等は、いずれ

も未解明であった。

2. 研究の目的

本申請研究代表者らは、これまでに骨芽細胞における RANKL 細胞内動態を、世界に先駆けて検討を進めてきた。骨細胞は、骨芽細胞が骨基質に埋没し、終末分化した細胞であるため、骨芽細胞にて得られた知見は、骨細胞における RANKL 動態制御においても一部共通していると想定される。しかし、*in vivo* ではアクチン繊維による架足を三次元的に骨中に張り巡らし、その架足を介し破骨細胞を活性化させることが想定される点で、破骨細胞分化制御の様式が骨芽細胞と大きく異なる可能性が想定される。そこで、骨芽細胞においてこれまで解析されてきた RANKL 細胞内動態の知見を基に、骨細胞における RANKL 細胞内動態の詳細を検討し、骨芽細胞との共通点および相違点を検証することで、RANKL 細胞内動態制御が、生理的な破骨細胞形成に主要な役割を果たすのか、さらには生存骨細胞による破骨細胞形成支持能に対する生理的寄与の有無の解明を目的とした。

3. 研究の方法

1) 初代培養骨細胞、骨芽細胞、骨髄細胞の単離培養

初代培養骨細胞は、1~4日齢 C57BL6 マウス(野生型および OPG 欠損型)より頭蓋を単離し、0.1% コラゲナーゼおよび 0.2% ディスパーゼにより処理し、骨芽細胞、繊維芽細胞、その他何組織を除去した後、残骨片を EDTA により処理することで単離、採取した。単離した骨細胞は、培養ディッシュ上での平面培養、あるいは、I 型コラーゲンゲル中での 3 次元培養を行った。

初代培養骨芽細胞は、1~4日齢 C57BL6 マウスより頭蓋を単離し、細切後に I 型コラーゲンゲル中に包埋し、3日間培養した後、骨片より遊走した細胞をコラゲナーゼ処理することでゲル中より回収することで取得した。取得した細胞は、培養ディッシュ上で平面培養した。

また、6~8週齢 C57BL6 マウスの長間骨より骨髓液を回収し、10 ng/mL MCSF 存在下で 16 時間培養した後に浮遊している細胞を骨髓細胞として用いた。

2) mRNA 定量

定量的 PCR により、以下に示すプライマーを用いて骨細胞および骨芽細胞特異的マーカー分子の発現量を評価した。Mouse SOST: 5' -CTT CAG GAA TGA TGC CAC AGA GGT-3' and 5' -ATC TTT GGC GTC ATA GGG ATG GTG-3' , mouse FGF23: 5' -ACT TGT CGC AGA AGC ATC-3' and 5' -GTG GGC GAA CAG TGT ACA

A-3', mouse DMP1: 5' -GGC TGT CCT GTG CTC TCC CAG-3' and 5' -GGT CAC TAT TTG CCT GTC CCT C-3', mouse E11/gp38: 5' -CAG TGT TGT TCT GGG TTT TGG-3' and 5' -TGG GGT CAC AAT ATC ATC TTC A-3', mouse osteocalcin: 5' -CCA AGC AGG AGG GCA ATA-3' and 5' -AGG GCA GCA CAG GTC CTA A-3', mouse ALP: 5' -GGG CGT CTC CAC AGT AAG CG-3' and 5' -ACT CCC ACT GTG CCC TCG TT-3', mouse RANKL: 5' -GTC TGT AGG TAC GCT TCC CG-3' and 5' -CAT TTG CAC ACC TCA CCA TCA AT-3', mouse GAPDH: 5' -GTC TGT AGG TAC GCT TCC CG-3' and 5' -CAT TTG CAC ACC TCA CCA TCA AT-3'.

3) 生細胞での RANKL 局在観察

まず、リソソームマーカーLAMP-1、ゴルジ体マーカーFTCD、ER マーカーCalnexin に関して、各遺伝子にクサビラオレンジ蛍光蛋白質 (KuOr) を融合した蛋白質をエンコードするレンチウイルスを構築した。同様に、GFP を融合させた RANKL をエンコードするレンチウイルスを構築した。これらのレンチウイルスを観察対象とする細胞に一過性に感染させ、その後発現する各種蛍光蛋白質融合遺伝子の局在を、共焦点顕微鏡を用いた通常の局在観察及び、Z 軸方向の断面像を連続取得し 3 次元に再構築することで観察した。

4) 細胞表面上の蛋白質定量

細胞を NHS-SS-ビオチン溶液に暴露することで、細胞表面上に発現する蛋白質のリジン残基をビオチン化した。その後、細胞を可溶化し、ストレプトアビジンビーズを用いてビオチン化蛋白質を回収し、還元剤により処理することでビオチン化蛋白質を溶出、回収した。回収したビオチン化蛋白質は、免疫ブロッティングにより、定量評価した。

5) 共培養実験および RANK ビース刺激実験

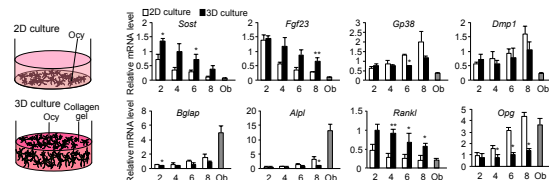
3 次元培養した骨細胞と骨髄細胞 (破骨前駆細胞) との共培養実験系として、骨細胞を 3 μ m の多孔子膜上に一過性に培養した。細胞定着直後に、細胞播種面が下面来るようにコラーゲンゲル上に多孔子膜を静置し、培養した。多孔子膜上面には、骨髄細胞を播種し、50 ng/mL MCSF 含有培地で培養した。これにより、破骨前駆細胞は多孔子膜を通過した骨細胞の架足部のみと直接接触できる系とした。その後、3 日毎に培地を交換し、7 日目に破骨細胞分化の指標として TRAP 酵素活性を測定した。

また、RANK ビースによる骨細胞刺激実験においては、成就痛の共培養系における骨髄細胞に変わり、Protein G コートされたビースの表面に、RANK 細胞外領域および抗体 Fc 領域の融合タンパク質 (RANK-Fc) を固相化したビース (RANK ビース) を用い、刺激後の RANKL 細胞内動態解析などに用いた。

4. 研究成果

1) コラーゲン包埋培養による骨細胞の形質維持

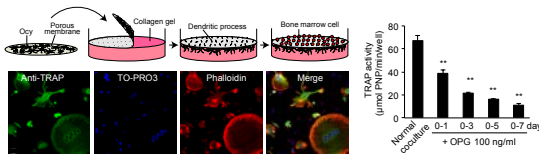
骨細胞は、平面培養した場合に脱分化し、骨細胞様の形質を失い、骨芽細胞様細胞に脱分化することが過去に示唆されている。そこで、骨細胞内での RANKL 細胞内動態を適切に評価するために、まず骨細胞の形質を維持する培養系の構築を試みた。骨細胞は、生理的環境において骨基質中に埋没しているため、何らの三次元構造に支持された環境下でない場合に脱分化する可能性を想定し、コラーゲンゲル中に単離した骨細胞を包埋した状態および平面培養した状態での、培養開始時からの 8 日間の経時的な骨細胞または骨芽細胞マーカー分子の発現量変動を定量的 PCR 法にて評価した。その結果、後期骨細胞マーカーである SOST、FGF23 の発現量は、コラーゲンゲル包埋した場合に有意に高く、逆に、骨芽細胞マーカーである ALP、Osteocalcin の発現量上昇は、平面培養では認められたものの、コラーゲンゲル包埋した場合には、その上昇幅は微弱であった。加えて、コラーゲンゲル包埋下における単離骨細胞の形質を観察した結果、骨細胞の特徴であるアクチン繊維に裏打ちされた架足を複数有していることが確認された。以上の結果から、コラーゲンゲル包埋した培養 (以下、三次元培養) は、少なくとも培養開始後 1 週間程度は骨細胞の形質を維持しうる系であることが明らかとなった。



2) 三次元培養下の骨細胞による破骨細胞分化誘導系の確立

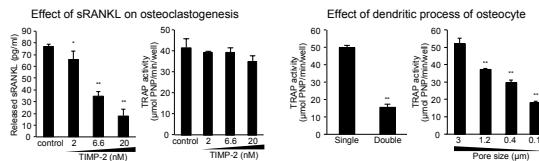
生理的条件下における骨細胞による破骨細胞活性化は、骨細胞が骨基質中に埋没していることを考慮すると、骨細胞の架足を介して膜結合型 RANKL が破骨前駆細胞上の RANK に直接接触するか、あるいは、骨細胞が可溶性 RANKL (sRANKL) を放出することが想定される。そこで、いずれの場合でも評価可能な系として、上述の多孔子膜を用いた分離共培養系を構築した。その結果、構築した培養系における多核化破骨細胞形成が認められた。また、共培養過程のどの時間が効率的な破骨細胞分化に重要であるかを検証することとした。RANKL-RANK 結合を阻害する OPG 組み換えタンパク質を培養開始から 1、3、5、7 日間でそれぞれ添加した条件における破骨細胞活性化能を評価した結果、1 日のみ添加した場合でも、破骨細胞形成が 7 日目の破骨細胞形成は、半分程度まで減弱していた。

これらの結果から、本共培養系は、培養開始初期における骨細胞由来の RANKL が大きく破骨細胞形成に寄与することが示唆された。



3) 破骨細胞活性化を制御する RANKL 実態へのアプローチ

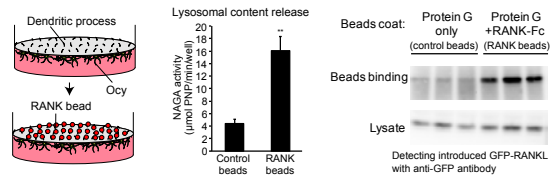
過去に行われてきた骨芽細胞と破骨前駆細胞の共培養実験では、破骨細胞活性化に支配的な因子は、sRANKL よりも骨芽細胞上の膜結合型 RANKL であることが示唆されてきた。骨細胞での RANKL 供給形態に関する検討を加えた。まず、sRANKL による寄与を検討するため、膜結合型 RANKL を切断し、sRANKL を生成する酵素を阻害する TIMP-2 による処理を行い、破骨細胞活性化への影響を評価した。その結果、sRANKL 生成量が 20 %程度まで低下する条件下においても、破骨細胞形成へは、有意な影響が認められず、sRANKL の破骨細胞形成への寄与は、骨細胞による破骨細胞分化誘導の場合も微弱であることが示唆された。RANKL 供給が、骨細胞表面上に発現する膜結合型 RANKL と破骨前駆細胞上 RANK の直接接触である場合、骨細胞の架足と破骨全区細胞は上述 2) の培養系においても接触していると考えられたため、各細胞に蛍光色素を前負荷した後に共焦点顕微鏡による観察を行った。その結果、多孔子膜を通過した骨細胞の架足部と破骨前駆細胞が接触している像が確認された。また、多孔子膜を二重に積層し多場合や孔子径を小さくすることで、通過する架足本数を少なくした条件において、共培養を行うと破骨細胞形成の有意な減弱が認められた。以上のことから、骨細胞による破骨細胞成熟には膜結合型 RANKL が重要な役割を果たすと考えられた。



4) 骨細胞内における RANKL 細胞内動態

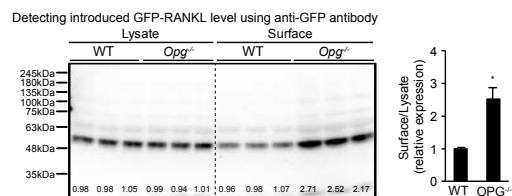
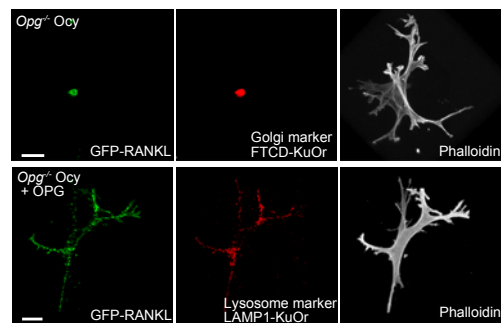
上述の検討から膜結合型 RANKL の骨細胞表面上発現量を規定する因子として、骨細胞内での RANKL 細胞内動態の重要性が示唆された。そこで、まず RANKL の骨細胞内を観察した。各種オルガネラマーカーとの局在比較を共焦点顕微鏡により行った結果、骨細胞内では RANKL は主としてリソソームに局在し、基底状態において細胞表面上に局在する割合は極めて少ないことが明らかとなった。また、過去の骨芽細胞の研究から、RANK ビーズとの接触刺激が RANKL のリソソームから細胞表面への移行を促進する可能性が想定されたため、この点を検証した。その結果、RANK ビーズ刺激により、骨細胞内のリソソーム酵素の細胞外へのリーク量が増大し、同時に RANK ビーズには、確かに RANKL が結合していることが確認され、RANK 刺激を起点として、リソソーム上の RANKL が細胞表面に移行することが示唆された。また、生体では、RANK ビーズ同様、細胞表面に RANK を発現する破骨前駆細胞が、RANKL の骨細胞表面への移行促進に寄与することが想定された。

ズ刺激により、骨細胞内のリソソーム酵素の細胞外へのリーク量が増大し、同時に RANK ビーズには、確かに RANKL が結合していることが確認され、RANK 刺激を起点として、リソソーム上の RANKL が細胞表面に移行することが示唆された。また、生体では、RANK ビーズ同様、細胞表面に RANK を発現する破骨前駆細胞が、RANKL の骨細胞表面への移行促進に寄与することが想定された。



5) 骨細胞における RANKL のリソソームターゲティング機構

骨細胞内の RANKL リソソーム局在の生理的重要性が示唆されたため、その機構に関して検討を加えた。RANKL は、骨芽細胞内では OPG と結合し細胞内 RANKL のリソソームターゲティングに関与することを過去に見出しているため、OPG 発現が認められる骨細胞でも同様に検討した。まず、OPG 欠損マウスより単離した骨細胞における RANKL 局在を観察したところ、主としてゴルジ体に集積する像が観察された。一方で、OPG 欠損骨細胞に OPG を外来から遺伝子導入し多場合には、RANKL はリソソーム局在となったことから、RANKL のリソソームターゲティングは、骨再微雨においても OPG の発現に依存することが明らかとなった。また、OPG 欠損骨細胞での細胞表面上 RANKL 発現量をビオチン化法により評価した結果、野生型骨細胞と比較して、全 RANKL 発現量に占める細胞表面上 RANKL 量の割合は有意に高値出ることが明らかとなった。このことから、OPG 欠損によりゴルジ体に集積した RANKL は、刺激非依存的に直接細胞表面へ輸送されるため、骨細胞表面 RANKL 量が増加し、過剰な破骨細胞形成が起こると考えられた。一方で、OPG を介してリソソームへと輸送された RANKL は、RANK 刺激依存的に細胞



表面へ輸送され秩序だった骨代謝の維持に寄与すると想定された。

6) 低分子量 G 蛋白質関連分子による骨細胞内 RANKL 動態制御

骨細胞内での RANKL 細胞内輸送の詳細を更に検討するために、リソソームの細胞内動態、特に、細胞表面付近への輸送を担うことが下の報告から示唆された Rab27a あるいは Rab27b 分子に着目した検討を行った。アデノウイルスを用いて shRNA を発現させることで、Rab27a あるいは Rab27b を発現抑制した骨細胞を上述の構築した三次元共培養系にて、野生型の骨髄前駆細胞と共培養し、破骨細胞形成を評価したところ、骨細胞内 Rab27a および Rab27b の発現抑制は共に破骨細胞形成を減弱させた。加えて、Rab27a/b と共役して機能する Slp2-a 分子を発現抑制した際にも同様の傾向が確認された。さらに、Slp2-a ノックアウトマウス (全身ノックアウトマウス) の骨表現型を解析した結果、野生型と比較して有意に大腿骨骨端において骨密度 (BV/TV) が上昇していた。以上のことから、骨細胞における Rab27a/b および Slp2-a が関与する輸送形式が、骨細胞依存的な破骨細胞分化誘導能に影響を与える可能性が示唆された。RANKL 輸送に与える影響は、詳細を現在検討中である。

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 Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H.、Regulatory mechanisms of RANKL presentation to osteoclast precursors.、Current osteoporosis reports、査読有、Vol. 12、2014、115-120
- ② Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H.、Establishment of optimized in vitro methods for evaluating osteocyte functions.、Journal of bone and mineral metabolism、査読有、2014 Epub
- ③ Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Hayashi M, Hayashi N, Aoki S, Suzuki H.、RANKL subcellular trafficking and regulatory mechanisms in osteocytes.、Journal of bone and mineral research、査読有、Vol. 28、2013、1936-1949

[学会発表] (計 1 件)

- ① Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Hayashi M, Hayashi N, Aoki S, Suzuki H.、RANKL subcellular trafficking in osteocytes.、European Calcified Tissue Society Congress 2013、Bone

Abstract (2013) 1 PP240

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻谷 嘉顕 (KARIYA, Yoshiaki)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20633168

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし