

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293376

研究課題名(和文)炎症性骨疾患の骨吸収への脂質の役割 - 特に酸化LDL受容体LOX-1の役割を探る -

研究課題名(英文) The elucidation of the role of lipid in bone resorption of inflammatory bone diseases; in particular, the exploration of the role of LOX-1 as an oxidized LDL receptor

研究代表者

羽毛田 慈之 (HAKEDA, Yoshiyuki)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：90164772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：レクチン様酸化LDL受容体-1 (LOX-1)は前破骨細胞の細胞融合抑制によって破骨細胞(OC)分化を負に調節する。LOX-1欠損マウスは骨吸収増加により海綿骨量が減少した。逆に、頭蓋骨の局所炎症誘発で、炎症性骨破壊がLOX-1欠損によって減少した。炎症で誘導されるOC分化トリガー分子RANKL発現がLOX-1欠損マウスで減少した。LOX-1欠損骨芽細胞(OB)と野生型OC前駆細胞の共存培養系で、IL-1 とPGE2で誘導されるOC形成はLOX-1欠損で減少し、OBのRANKL発現も減少した。以上のことから、LOX-1欠損は、定常状態でOC形成を促進するが、炎症性骨破壊に対して抵抗性を生む。

研究成果の概要(英文)：Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) was downregulated with osteoclast (OC) differentiation. LOX-1 negatively regulates OC differentiation by suppressing the cell-cell fusion of preOC. The LOX-1-deleted (LOX-1<sup>-/-</sup>) mice consistently decreased the trabecular bone mass because of elevated bone resorption. In contrast, when the calvaria was inflamed by LPS-injection, the inflammation-induced bone destruction was reduced by LOX-1 deficiency. The expression of RANKL, a trigger molecule for OC differentiation, evoked by the inflammation was abrogated in the LOX-1<sup>-/-</sup> mice. Osteoblasts (OBs), the major RANKL producers, expressed LOX-1 in response to IL-1 and PGE2. In the co-culture of LOX-1<sup>-/-</sup> OBs and wild-type OC precursors, the osteoclastogenesis induced by IL-1 and PGE2 decreased in parallel with the downregulation of RANKL expression in OBs. Thus, LOX-1 abrogation results in resistance to inflammatory bone destruction, despite promoting osteoclastogenesis in the steady state.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：炎症性骨破壊 破骨細胞 骨芽細胞 LOX-1

## 1. 研究開始当初の背景

骨吸収を司る破骨細胞は血液幹細胞に由来するモノサイト/マクロファージ系の細胞である。この10年の間に、破骨細胞分化を制御する主な分子機構が明らかとなり、女性ホルモンなどの全身性ホルモンはもとより、骨組織局所での様々なサイトカイン、とりわけ免疫機構と共通したサイトカインが、破骨細胞形成を大きく調節することが明らかとなった。このことより”osteimmunology-骨免疫学-”という新しい研究分野が登場した。その中で、骨芽細胞等の骨髄間質細胞と破骨細胞前駆細胞との相互作用から、RANKLがM-CSFと協調して破骨細胞形成を促進することが示された。そして多くの研究から、RANKLによって発現誘導される破骨細胞のマスター遺伝子であるNFATc1が酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP), cathepsin K (Tezuka K, Hakeda Y, Kumegawa M, et al. *J Biol Chem*, 269:1106, 1994)などの破骨細胞の機能タンパク質や破骨細胞融合タンパク質 (Atp6v0d2 と DC-STAMP) を発現誘導し、多核の骨吸収活性を持った成熟破骨細胞が形成されることが明らかとなり、破骨細胞分化の大筋は解明された (Asagiri M, et al. *Bone*. 40:251, 2007)。しかし、まだ不明な点も数多く残る。その1つが脂質代謝と破骨細胞の関係である。

高齢化社会を迎えた現在、様々な疾患が国民の健康および国家の医療費を脅かしている。その中で、メタボリックシンドロームに関連した脂質異常症は心筋梗塞や動脈硬化の原因因子となっている。さらに、脂質異常症は単に血管系の疾患だけの risk factor ではなく、骨粗鬆症との関連が疫学的調査から近年明らかになりつつある。例えば、血中 low-density lipoprotein (LDL) の高値を示す集団での骨密度は正常値の集団より明らかな低値を示す (Yamaguchi T, et al. *Endocr J*. 49:211, 2002)。さらに、*in vitro* の研究から、LDL は骨芽細胞の分化を抑制し、骨形成を阻害する一方で、破骨細胞の形成を促進することが示されている (Diascro Jr DD, et al. *J Bone Miner Res*. 13:96, 1998; Luegmayer E, et al. *Cell Death Differ*. 11:S108, 2004)。これらの結果は脂質代謝と骨代謝との接点を示唆するものである。

我々は、破骨細胞の分化過程で RANKL が誘導される未知遺伝子探索プロジェクトから、cholesterol を多く含む細胞膜のマイクロドメイン lipid rafts/caveolae の構成タンパク質 caveolin-1 (Cav-1) が RANKL によって発現誘導されることを発見し、さらに、細胞外 LDL を除去するところによって、もしくは、細胞膜から cholesterol を除去することによって破骨細胞分化シグナルが変調をきたし、破骨細胞形成が抑制されることを見いだした (*Bone*, 50:226-236, 2012)。そこで、我々は、cholesterol の供給元である LDL を認識し、LDL を internalization させる LDL receptor (LDLR) を欠損した LDLR-KO マウスを用いて、

cholesterol の取り込み機構と破骨細胞分化との関係を解析した。その結果、LDLR-KO マウスの破骨細胞形成は野生型と比較して有意に減少し、その減少は単核の前破骨細胞からの細胞融合不全が LDLR 欠損によってもたらされることを明らかにした。さらに、この細胞融合不全は、破骨細胞の融合タンパク質である Atp6v0d2 と DC-STAMP の細胞膜への trafficking の不全に起因した。また、この *in vitro* の結果と一致して LDLR-KO マウスの大腿骨と脛骨は、骨吸収パラメーターの減少によって骨量が増加し、大理石骨を呈した (*J Biol Chem*, 287: 19229-19241, 2012)。これらの結果は、破骨細胞分化が強く細胞外の LDL に依存することを示すとともに、骨吸収と脂質代謝の接点を示すものである。しかし、もう1つ重要な点が未解決のまま残されている。それは、酸化脂質と骨吸収の関係である。

慢性関節リウマチ (RA) といった自己免疫骨疾患や、歯科領域では歯周病や歯科矯正治療での歯牙移動などは、局所で炎症が発症し、その部位の骨吸収が増大する。そして、生体内の炎症部位では、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの産生誘導ばかりでなく、LDL の酸化をはじめとする様々な脂質の修飾がおり、多くの細胞が脂質酸化ストレスに曝される。すなわち、骨吸収の増大を伴う炎症性骨疾患では骨組織を構成する骨吸収系と骨形成系の細胞が脂質酸化ストレスを受けることになる。しかし、それら骨構成細胞に対する酸化脂質の作用はほとんど解明されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究は、lectin-like oxidized LDL (ox-LDL) receptor-1 (LOX-1) および scavenger receptor class A (SRA) などの酸化 LDL 受容体を knockout (KO) したマウスを用いて、破骨細胞による骨吸収と酸化脂質との関係すなわち炎症性骨疾患と脂質酸化ストレスとの関連を解明することを目的とする。特に先行研究を基に、LOX-1 の炎症性骨破壊での関与を重点的に解明する。これらを解決することによって、今までの我々の研究とあわせ、酸化脂質を含めた脂質代謝と破骨細胞による骨吸収との関係の全容が明確になると同時に、破骨細胞形成の新しい制御機構を *in vivo* および *in vitro* から提唱することが可能となる。

## 3. 研究の方法

### (1) LOX-1 KO および SRA KO マウス

LOX-1 KO は研究分担者 沢村達也 (信州大学) が作製した。SRA KO マウスは、Jackson Laboratory より購入した。両マウスは、C57BL/6 マウスを遺伝的背景に持つため、C57BL/6 野生型マウスと7回以上バッククロスを行った。ホモ欠損マウスと同腹の野生型マウス (WT) もしくは雄で週齢のマッチした C57BL/6 野生型マウスを実験に供した。すべてのマウスは SPF 飼育室にて飼育された。

なお、本研究は明海大学歯学部動物実験倫理委員会によって承認された（承認番号：A1011）。

## (2) *In vitro* における破骨細胞形成系

*In vitro* における破骨細胞形成は、4~8 週齢のオスの野生型 C57BL/6 マウスおよび LOX-1 遺伝子欠損マウスもしくは SRA 遺伝子欠損マウスの大腿骨および脛骨を無菌的に取り出し、得た骨髓細胞を M-CSF (100 ng/ml) 存在下で 3 日間培養した。培養後、非附着細胞の間質細胞を除去し、得られた M-CSF 依存性モノサイト・マクロファージを破骨細胞の前駆細胞とし、以下の実験に供した。回収した破骨細胞前駆細胞を M-CSF (20 ng/ml), sRANKL (10 ng/ml) を含む  $\alpha$ -MEM/10% FBS もしくは  $\alpha$ -MEM/10% FBS 培地で培養した。培養終了後に、細胞を固定し、破骨細胞のマーカー酵素である TRAP 活性を染色した。その後、3 核以上の TRAP 陽性の多核細胞(MNCs)を破骨細胞と見なし、その数を顕微鏡下で測定し、各種因子の破骨細胞形成に対する効果を検討した。また、TRAP 陽性 MNCs の面積と最大幅径を画像測定した。さらに、TRAP 陽性 MNCs の 1 細胞中に含まれる核数 (fusion index) を計測した。

## (3) RT-PCR および定量 real time-PCR 法

各種条件で破骨細胞前駆細胞を培養した後、total RNA を調製し、その total RNA (1  $\mu$ g) より cDNA を合成した。その cDNA を用いて種々の mRNA 量を RT-PCR および定量 real time-PCR で定量した。

## (4) Western blotting 分析

等量のタンパク質を含むサンプルを SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) で展開し、転写後、各種抗体を用いた Western blotting 分析を行った。

## (5) Lipopolysaccharide (LPS) の頭蓋骨骨膜下投与による炎症性骨破壊の *in vivo* 実験モデルを確立と LOX-1 KO および SRA KO マウスでの評価

炎症性骨破壊の *in vivo* 実験モデルとして、本研究では野生型 LOX-1 KO および SRA KO マウスの頭蓋骨頂部の骨膜下に 100  $\mu$ g/day の LPS を 5 日間連続で投与した。そこで、投与部位を中心に一定面積の頭蓋骨を切り出し、二等分し、片方に TRAP 染色を施し、もう片方の骨片から RNA を抽出する。抽出した RNA から常法に従って cDNA を作製し、TRAP などの種々の破骨細胞分化関連遺伝子の発現を定量 real-time RT PCR で測定した。

## (6) 野生型および LOX-1 欠損マウス頭蓋骨からの骨芽細胞分離と、それら骨芽細胞と野生型破骨細胞前駆細胞との共存培養系

野生型および LOX-1 KO マウスの頭蓋骨をコラゲナーゼトリスパーゼで逐次的に酵

素消化し、3 番目~5 番目の酵素消化で遊離した細胞を骨芽細胞とし、野生型破骨細胞前駆細胞と共存培養を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 破骨細胞分化に伴う ox-LDL 受容体の発現

破骨細胞分化過程でどのような ox-LDL 受容体が発現しているかを mRNA レベルで検討した。マウス骨髓細胞を M-CSF 存在下で 3 日間すると monocytes からなる破骨細胞前駆細胞を得ることができる。その前駆細胞を回収し、再び M-CSF と RANKL 存在下で培養すると、経時的に 1 日から 2 日にかけて、TRAP 陽性の単核細胞からなる前破骨細胞となり、2 日から 3 日にかけて前破骨細胞同士が融合し、多核の成熟破骨細胞へと分化する。monocyte/macrophage の主な ox-LDL 受容体である SRA, CD36 および LOX-1 のいずれも破骨細胞前駆細胞で発現していることが mRNA レベルで示された。3 つの受容体の中で LOX-1 は破骨細胞分化に伴い、特に前破骨細胞から成熟破骨細胞へ分化する過程で著しく発現が低下することが明らかとなった。一方、SRA および CD36 に関して、それらの発現量は破骨細胞分化過程で変化しなかった。

### (2) LOX-1 と SRA の破骨細胞形成に対する役割

CD36 の破骨細胞分化への関与は、CD36 KO マウスの実験から否定されている。そこで、LOX-1 と SRA が破骨細胞形成にどのような役割を演じているかを検討するため、LOX-1 KO および SRA KO マウスと用いて検討した。

まず、野生型(WT)マウスと SRA KO マウスの骨髓細胞を M-CSF と RANKL で処理すると、SRA KO マウスからの破骨細胞形成は野生型マウスの破骨細胞形成と全く差を認めなかった。一方、LOX-1 KO マウスの骨髓細胞からの破骨細胞形成は、TRAP 陽性の多核の破骨細胞形成が有意に野生型と比較して促進していた。そこで、LOX-1 遺伝子欠損による破骨細胞形成促進をより詳細に調べるために、形成された TRAP 陽性多核破骨細胞の最大幅径、面積および 1 個の破骨細胞に含まれる核数(fusion index)を計測した。その結果、LOX-1 が欠損することによって、前破骨細胞から多核の破骨細胞が形成される 2 日から 3 日にかけて、破骨細胞の最大幅径および面積が大きく増加した。そして、単核の前破骨細胞の細胞融合の頻度を示す fusion index において、野生型の破骨細胞よりも LOX-1 KO 破骨細胞は著明に高値を示した。これらの結果から、明らかに LOX-1 遺伝子が欠損することによって、破骨細胞の融合が促進することが明らかとなった。

すなわち、LOX-1 は破骨細胞形成において、その細胞融合の負の制御因子であることが

示唆された。また、単核の前破骨細胞から多核破骨細胞形成において LOX-1 の発現が著しく減少することから、破骨細胞融合は LOX-1 の抑制から解放されるものと考えられる。

### (3) LOX-1 KO マウスにおける破骨細胞分化関連分子の発現と情報伝達機構

LOX-1 欠損による破骨細胞分化の促進がどのような機構からもたらされているかを探るため、次に、破骨細胞分化関連分子の遺伝子レベルとタンパク質レベルでの発現を検討した。まず、破骨細胞の初期分化に必要な転写因子である *c-fos*、および、破骨細胞分化のマスター遺伝子である NFATc1 の発現は野生型および LOX-1 マウスの破骨細胞形成過程において差を認めなかった。また、破骨細胞特異的で骨吸収で主役を演じる cathepsin K の発現においても両遺伝子系で変化はなかった。さらに、破骨細胞の細胞融合に関与する DC-STAMP および Atp6v0d2 の発現量においても差を認めなかった。このことは LOX-1 欠損による破骨細胞形成促進は、単に破骨細胞関連分子の発現上昇からもたらされているのではなく、他の機構に起因することが示唆された。さらに、我々は破骨細胞分化の情報伝達機構への LOX-1 欠損による影響を調べた。破骨細胞の初期分化に必要な RANKL による Erk と JNK の活性化は野生型マウスおよび LOX-1 KO マウスの破骨細胞前駆細胞において、変化を認めなかった。しかし、破骨細胞の細胞融合タンパク質 DC-STAMP および Atp6v0d2 のさいぼうまくへの trafficking は明らかに LOX-1 KO 破骨細胞で増加した。

### (4) 成長期 LOX-1 KO マウスは野生型マウスに比べ骨量を減少させる

*In vitro* の結果から、LOX-1 は破骨細胞形成に負に作用する受容体であることが示唆されたが、実際に LOX-1 KO マウスの骨組織を形態学的に計測した。その結果、6 週までの LOX-1 KO マウスの大腿骨および脛骨の骨量は  $\mu$ CT 分析から明らかに野生型マウスより減少していた。さらに、組織学的計測においても、LOX-1 KO マウスの脛骨は骨形成パラメータに関しては野生型マウスと同等の値を示したが、骨吸収パラメータは有意に野生型マウスより LOX-1 KO マウスで上昇していた。このことから LOX-1 が破骨細胞形成に負に働くことが *in vivo* から示された。

### (5) *In vivo* 炎症実験モデルにおける炎症性骨破壊に対する LOX-1 の役割

これまでの *in vitro* の破骨細胞形成への LOX-1 の負の関与を示してきたが、実際の生体内でおこる炎症、それによって発生する酸化ストレスと LDL の修飾、それらがどのように炎症性骨破壊を関連しているかを探求するために、次に我々は、野生型、SRA KO および LOX-1 KO マウスの頭頂部骨膜下に 1 日

1 回、100  $\mu$ g の lipopolysaccharide (LPS) を 5 日間連続投与し炎症を誘発させた。

そして 6 日目で投与部位を中心に同面積の頭頂骨を摘出し、頭頂骨全体の  $\mu$ CT で撮影した。その結果、野生型マウスおよび SRA KO マウスでは矢状縫合部の左右に LPS による骨吸収像が観察されたが、LOX-1 KO マウスでは骨吸収を示す面積が減少した。さらに、頭頂骨から total RNA を抽出し、破骨細胞関連分子の遺伝子発現を検討した。その結果、野生型および SRA KO マウス頭頂部では、LPS 投与によって明らかに破骨細胞マーカーである TRAP, cathepsin K そして破骨細胞分化のマスター遺伝子である NFATc1 の発現上昇が認められた。それと一致して、TRAP 染色においても LPS 投与によって TRAP 活性の増加が認められた。このことは LPS 投与によって局所で炎症が惹起され、それに伴って破骨細胞形成が増加し骨吸収が進行していることを示している。しかし、LOX-1 KO マウスの頭頂骨に LPS を投与することによって惹起される破骨細胞関連遺伝子の発現上昇は、野生型および SRA KO マウスで見られた発現上昇よりも明らかに減少していた。このことは、炎症で引き起こされる骨破壊が LOX-1 欠損によって軽減することを示唆している。

そこで、LPS 投与が破骨細胞形成を誘導する炎症性サイトカインである RANKL と TNF- $\alpha$  の発現にどのような影響を及ぼすかを調べた。LPS 誘導性 TNF- $\alpha$  mRNA 量は野生型、SRA KO および LOX-1 KO の 3 系統マウス間で差は認められなかったが、RANKL mRNA 量は、破骨細胞関連遺伝子と同様に、野生型と SRA KO マウスでは LPS によって大きく増加するにもかかわらず、LOX-1 KO マウスではその増加が減少した。この 3 系統マウス間の RANKL 発現パターンは破骨細胞分化関連遺伝子の発現パターンと類似していた。

これらの結果は、LOX-1 欠損による炎症性骨吸収の減少は局所での RANKL 発現の減少によってもたらされることを示唆するものであり、炎症性骨破壊が LOX-1 に依存していることを意味する。

### (6) 炎症時における LOX-1 依存性 RANKL 産生細胞

炎症時において、骨芽細胞と T 細胞が RANKL 産生に大きく寄与することが数多く報告されているから、本研究での LPS によって惹起された炎症時における LOX-1 依存性 RANKL 産生細胞として、骨芽細胞と T 細胞が考えられる。そこで、LPS 投与による骨吸収促進に対する骨芽細胞および T 細胞の関与を調べるために、活性化 T 細胞の細胞表面マーカーである CD4 と骨芽細胞のマーカーである alkaline phosphatase (ALP) の mRNA 量を測定した。

野生型マウスでは LPS 投与によって CD4 mRNA 量が大きく増加し、炎症に伴って T 細胞の活性化もしくは活性化 T 細胞の浸潤が起

きていることが明らかになった。しかし、LOX-1 KO マウスではこの CD4 mRNA 量の上昇が減少した。このことは RANKL mRNA および破骨細胞関連分子の mRNA 発現パターンを同じであるが、それら遺伝子発現パターンが野生型マウスと同じ SRA KO マウスにおいても、CD4 mRNA 量は減少していた。一方、3 系統マウスでの LPS 投与による ALP の発現パターンは RANKL および破骨細胞関連分子の発現パターンと一致した。これらの結果は、LPS によって誘導される炎症部位における LOX-1 依存性 RANKL 産生細胞は T 細胞よりも骨芽細胞が有力であることを示唆している。

#### (7) 野生型マウスおよび LOX-1 KO マウス頭蓋骨から単離した骨芽細胞と野生型破骨細胞前駆細胞との共存培養

最後に、LPS によって誘導される炎症部位における LOX-1 依存性 RANKL 産生細胞としての骨芽細胞の役割を解明するために、野生型および LOX-1 KO マウス頭蓋骨より骨芽細胞を単離し、それぞれの骨芽細胞と野生型破骨細胞前駆細胞との共存培養を試みた。

分離骨芽細胞を 10% FBS を含んだ  $\alpha$ -MEM 培地で 28 日間長期培養すると分離骨芽細胞は自ら形成した結節上にリン酸カルシウムからなる結晶を沈着させ、*in vitro* においても石灰化能を有していた。この分離骨芽細胞を用いて、まず、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ 、LPS そして PGE<sub>2</sub> のどの組み合わせが *in vivo* の炎症時での骨吸収に模した微細環境となるかを野生型破骨細胞前駆細胞との共存培養から検討した。その結果、で示す通り、IL-1 $\beta$  単独および PGE<sub>2</sub> 単独処理によって共存培養系に TRAP 陽性の破骨細胞が形成された。しかし、その形成数は positive control である 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (VitD<sub>3</sub>) と dexamethasone (Dex) の組み合わせ処理に比べ、極めて少数であった。一方、IL-1 $\beta$  と PGE<sub>2</sub> 組み合わせ処理は大きく破骨細胞形成を促進し、その効果は VitD<sub>3</sub> と Dex の組み合わせ処理に匹敵もしくはそれ以上の効果を示した。事実、*in vivo* において、頭蓋骨への LPS 投与によって頭蓋骨での COX-2 (PGE<sub>2</sub> の誘導性合成酵素) と IL-1 $\beta$  の mRNA 発現は大きく上昇し、その上昇は LOX-1 欠損マウスにおいて減少していた。以上の結果から、炎症部位における LOX-1 依存性 RANKL 産生細胞としての骨芽細胞の役割を解明するために、分離骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞の共存培養系に IL-1 $\beta$  と PGE<sub>2</sub> を同時に加えてその効果を比較することとした。

まず、骨芽細胞に LOX-1 が発現しているかを定量 RT-PCR から検討した。その結果、骨芽細胞を IL-1 $\beta$  と PGE<sub>2</sub> で処理することによって LOX-1 の発現が大きく促進することを見出した。

そこで、野生型および LOX-1 KO 分離骨芽細胞と野生型破骨細胞前駆細胞を共存させ

IL-1 $\beta$  と PGE<sub>2</sub> で処理すると、野生型分離骨芽細胞と野生型破骨細胞前駆細胞の共存培養において破骨細胞形成は大きく促進し、VitD<sub>3</sub> と Dex の組み合わせ処理群の約 2 倍の破骨細胞形成が見られた。しかし、IL-1 $\beta$  と PGE<sub>2</sub> 組み合わせ処理による破骨細胞形成促進は LOX-1 KO 分離骨芽細胞と野生型破骨細胞前駆細胞の共存培養系において大きく減少し、その破骨細胞形成数は野生型分離骨芽細胞と野生型破骨細胞前駆細胞の共存培養系の約 25% であった。一方、VitD<sub>3</sub> と Dex の組み合わせ処理による破骨細胞形成促進に野生型分離骨芽細胞と LOX-1 KO 分離骨芽細胞との間に有意な差は認められなかった。これらの結果は IL-1 $\beta$  と PGE<sub>2</sub> に応答して破骨細胞形成を支持する骨芽細胞の能力が LOX-1 欠損によって大きく損なわれることを示すと同時に、炎症に呼応した骨芽細胞の RANKL 発現が LOX-1 に依存することを示唆している。そこで最後に、分離骨芽細胞の RANKL mRNA 発現に対する IL-1 $\beta$  と PGE<sub>2</sub> の作用を検討した。その結果、共存培養系での破骨細胞形成と同様に、野生型骨芽細胞は、未処理群 (cont) に比べ IL-1 $\beta$  と PGE<sub>2</sub> の組み合わせ処理群で大きく RANKL mRNA 発現が増加した。しかし、LOX-1 欠損骨芽細胞では IL-1 $\beta$  と PGE<sub>2</sub> で誘導される RANKL mRNA 発現上昇が低下した。一方、IL-1 $\beta$  と PGE<sub>2</sub> に呼応した OPG mRNA 発現は両遺伝子型群で差を認めなかった。VitD<sub>3</sub> と Dex に依存した RANKL 発現に関しては、野生型骨芽細胞と LOX-1 KO 骨芽細胞では同等の発現誘導が認められた。また、OPG mRNA 発現に対しては、野生型骨芽細胞と LOX-1 欠損骨芽細胞で有意な差は認められなかった。

以上の結果から、最初は ox-LDL 受容体として発見された LOX-1 は破骨細胞形成に対して、まだ未同定ではあるが ox-LDL 以外の ligand と LOX-1 が結合し、前破骨細胞から多核の破骨細胞になるための細胞融合を抑制し、破骨細胞の負の制御因子として働く。しかし、破骨細胞分化が進行するにつれて、LOX-1 の発現は消失する。それによって、LOX-1 の抑制から破骨細胞分化は解放される。一方、炎症性骨吸収に対して、破骨細胞分化のトリガー分子である RANKL を産生する骨芽細胞にも LOX-1 は発現し、IL-1 $\beta$  や PGE<sub>2</sub> などの炎症性シグナルを受け RANKL は発現誘導される。そして、その発現誘導は LOX-1 に依存している。その LOX-1 に依存して発現された RANKL は破骨細胞前駆細胞に作用し、破骨細胞分化が誘導されるとともに、再び、その分化の進行に伴って前破骨細胞の LOX-1 は消失し、破骨細胞形成がさらに進行するという新しい LOX-1 依存性の炎症性骨吸収メカニズムが本研究から示された。

従来の研究から ox-LDL 受容体として発見された LOX-1 は破骨細胞形成に対して、直接的には前破骨細胞から多核の破骨細胞になるための細胞融合を抑制し、破骨細胞の負の

制御因子であるが、破骨細胞分化が進行するにつれて、LOX-1の発現は消失する。それによって、LOX-1の抑制から破骨細胞分化は解放される。すなわち、現在まで関節リウマチの治療薬として抗RANKL抗体や抗TNF- $\alpha$ 抗体などが開発されてきているがその鋭酷な副作用から、まだ一般的には用いられていない。本研究で示したようにLOX-1を阻害することによって炎症性骨破壊が抑制されるとなれば、LOX-1は明らかに新しい炎症性骨破壊の標的分子となることが大いに期待できる。

#### 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1件)

Nakayachi M, Ito J, Hayashida C, Ohyama Y, Kakino A, Okayasu M, Sato T, Ogasawara T, Kaneda T, Suda N, Sawamura T, Hakeda Y. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 abrogation causes resistance to inflammatory bone destruction in mice, despite promoting osteoclastogenesis in the steady state. Bone. (査読有) 2015 Jun;75:170-82.  
doi:10.1016/j.bone.2015.02.025

##### [学会発表](計7件)

Nakayachi M, Ito J, Okayasu M, Hayashida C, Sato T, Suda N, Sawamura T, Hakeda Y. Role of lectin-like oxidized low-density of lipoprotein receptor-1 in regulating osteoclastogenesis and inflammatory bone destruction. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, Kobe, Japan. May, 2013

Nakayachi M, Ito J, Okayasu M, Hayashida C, Sato T, Suda N, Sawamura T, Hakeda Y. Lectin-like Oxidized Low-density of Lipoprotein Receptor-1 Is Involved in RANKL-production Elevated by Lipopolysaccharide-injection on Mouse Calvaria and thereby Contributes to Inflammatory Bone Destruction. 35th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Baltimore, Maryland, USA. October, 2013

伊東順太, 中谷地舞, 林田千代美, 岡安麻里, 大山洋子, 佐藤卓也, 羽毛田慈之. レクチン様酸化 LDL 受容体-1(LOX-1)の破骨細胞形成と炎症性骨破壊に対する役割の解明. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会, 岡山. 2013年9月

中谷地舞, 伊東順太, 岡安麻里, 須田直人, 羽毛田慈之. レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1)の破骨細胞形成および炎症性骨吸収に果たす役割. 第72回日本

矯正歯科学会大会, 松本 2013年10月中谷地舞, 伊東順太, 岡安麻里, 須田直人, 羽毛田慈之. レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1)欠損マウスは骨量を減少させるが炎症性骨吸収に抵抗を示す. 第73回日本矯正歯科学会大会. 幕張, 千葉. 2014年10月

伊東順太, 林田千代美, 大山洋子, 佐藤卓也, 羽毛田慈之. レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1)欠損は定常状態における破骨細胞形成を促進するが, LPS誘導炎症性骨破壊には抵抗性を示す. 第33回日本骨代謝学会学術集会. 京王プラザ(新宿). 2015年7月

伊東順太, 林田千代美, 大山洋子, 佐藤卓也, 羽毛田慈之. レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1)欠損は定常状態における破骨細胞形成を促進するが, LPS誘導炎症性骨破壊には抵抗性を示す. 第57回歯科基礎医学会学術大会. 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟) 2015年9月

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

羽毛田 慈之 (HAKEDA, Yoshiyuki)  
明海大学・歯学部・教授  
研究者番号: 90164772

##### (2)研究分担者

佐藤 卓也 (SATO, Takuya)  
明海大学・歯学部・講師  
研究者番号: 00316689

岡安 麻里 (OKAYASU, Mari)  
東京大学・医学部付属病院・特任臨床医  
研究者番号: 10610941

小笠原 徹 (OGASAWARA, Toru)  
東京大学・医学部付属病院・講師  
研究者番号: 20359623

沢村 達也 (SAWAMURA, Tatsuya)  
信州大学・医学部・教授  
研究者番号: 30243033

伊東 順太 (ITO, Junta)  
明海大学・歯学部・助教  
研究者番号: 40609096

林田 千代美 (HAYASHIDA, Chiyomi)  
明海大学・歯学部・助教  
研究者番号: 40710900

金田 利夫 (KANEDA, Toshio)  
星薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号: 70339521