

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460300

研究課題名(和文) 骨吸収窩における骨形成制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of bone formation mechanisms at resorption lacunae

研究代表者

黒田 有希子 (Kuroda, Yukiko)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70455343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨リモデリングの際に新たな骨形成が促される場である骨吸収窩には糖タンパク質が豊富に存在することが知られているが、その生理的役割はあまりよく分かっていない。本研究では、骨吸収窩に存在する糖タンパク質が破骨細胞から分泌されたものであること、レクチンアレイを用いて見出した「新規骨吸収窩認識レクチン」が生体内の破骨細胞と血管を特異的に認識すること、新規骨吸収窩認識レクチンに結合する糖タンパク質のうち、最も主要なタンパク質はマトリックスペロテアーゼであることを明らかにした。さらに、培養細胞を用いた実験系により、骨吸収窩が骨芽細胞の動きに影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Abundant glycoproteins exist in bone resorption pits, whereas their physiological roles remain unknown. In this study, I observed that glycoproteins sticking to the surface of resorption pits were produced by mature osteoclasts, but not osteoclast precursors. I also found a novel lectin that tightly bound to a bone resorption pit by lectin microarray analysis, and this lectin specifically recognized osteoclasts and blood vessels in vivo. Matrix metalloproteinase was identified as a major protein that bound to the lectin in those mature osteoclast secreted. Finally, the osteoblast culture experiment suggested the possibility that bone resorption pits could modulate osteoblast migration.

研究分野：骨生物学

キーワード：骨形成 糖鎖修飾 骨吸収窩 破骨細胞 骨芽細胞 糖タンパク質

1. 研究開始当初の背景

骨は大きさや形状が活発に変化するモデリング期はもちろん、成長後の骨を維持しているリモデリング期にも吸収と形成を絶えず繰り返していることが知られている。そのため、正常な骨形成機構を理解する上で、骨形成と骨吸収の相互作用を理解することは非常に重要である。申請者はこれまでに、破骨細胞の分化メカニズムを中心に研究を行い、その中で骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞の相互作用の重要性を明らかにしてきた。(Kuroda Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 2008;105(25): 8643-8, Kuroda Y. et al. Mol Cell Biol.2012; 32(14):2954-63)。これらの研究を行っていく過程で、申請者は生体内の骨形成が非常に複雑な制御を受けていること、骨形態制御機構は未だ不明な点が多いことを実感した。そこで、生体内の骨形態形成を理解するためには今まで研究が成されてこなかった新たな因子に注目することが重要であると考え、本研究の着想に至った。

現在、骨吸収部位に骨形成が起きる機構の中で重要な役割を担っている因子として、骨基質中に埋め込まれている TGF- 1 (transforming growth factor- 1)と IGF-1 (Insulin-like growth factor 1)が注目されている。これらの因子は破骨細胞による骨吸収により骨基質中から放出され、TGF- 1は骨芽細胞の起源である間葉系幹細胞の誘因物質として(Tang Y et al. Nat Med. 2009; 15(7): 757-65)、IGF-1は骨吸収窩において骨芽細胞分化を促進し、骨形成を促す因子として(Xian L et al. Nat Med. 2012; 18(7): 1095-1101)働くことが報告されている。以上の知見から、骨吸収された部位に骨形成を促すためには骨基質中の成長因子 (growth factor)が重要であることが分かる。しかしながら、ある決められた形態を目指して骨を作るためには、「骨吸収後に骨形成を促さず、骨を削るだけの場所(a)」、「骨吸収後に骨形成を促す場所(b)」が必要である(図1)。そこで本研究では、骨芽細胞に骨形成部位を提示する因子が骨吸収窩自体に存在するのではないかと考え、骨吸収窩における骨形成制御機構の解明を目指した。

一般的に、破骨細胞の骨吸収力を測定する方法として、in vitro bone resorption assay が用いられる。このアッセイはスライスした牛骨切片上に破骨細胞を培養し、破骨細胞が吸収した面積を骨吸収力として評価する方法である。その際、in vitro で形成された骨吸収窩は糖鎖を認識するレクチンの一つである小麦胚芽レクチン (Wheat germ agglutinin, WGA) によってきれいに認識されることから、WGA-HRP (horseradish peroxidase) を用いた DAB (diamino benzidine) 染色により骨吸収面を染色し、面積を測定する方法が広く用いられている (Selander K et al. Calcif Tissue Int.

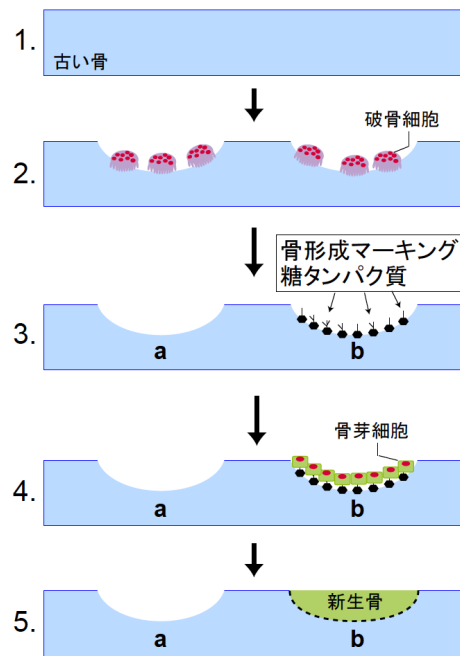


図1

仮説：骨吸収窩における骨形成制御機構

目的の形に骨が形成されるためには、古い骨 (step1) に、破骨細胞によって骨吸収が起きた後(step2)、全く骨形成が起きない骨吸収窩(a)、骨形成が活発に起きる骨吸収窩(b)が存在するはずである (step 5)。骨形成を促す骨吸収窩には骨芽細胞に骨を形成する場であることを認識させる「**骨形成マーキング糖タンパク質**」が存在し (step3)、その場で骨芽細胞による骨形成が促される (step4) と考えられる。

1994;55 (5): 368-75)。また、WGA を用いたラット骨切片のレクチン染色では骨芽細胞、破骨細胞、軟骨など多くの部位でシグナルが検出されるものの、破骨細胞が付着している骨表面もしっかりと認識される (Nakamura H and Ozawa H. Bone. 1992;13(6):411-6.)。つまり、生体内においても破骨細胞によって形成された骨吸収窩には多量の糖タンパク質が存在することは明らかである。さらに、申請者は、吸収窩の糖タンパク質が破骨細胞から分泌されたものであること、破骨細胞が移動・死滅した後も破骨細胞が存在していた痕跡を残すように糖鎖が存在し続けることを見出した。しかしながら、現在までに骨吸収窩における糖鎖はほとんど注目されておらず、その機能は調べられていない。糖鎖は細胞間の相互作用だけに留まらず、ウイルス感染時の宿主選択 (Glaser Let al. J Virol. 2005; 79 (17):11533-6.)など複雑で多様性に富んだ生命現象に深く関わっていることが報告されており、これらの知見からも骨吸収窩に存在する糖鎖が骨芽細胞に対して「骨形成の場」という複雑な位置情報を提示している可能性は十分に考えられる。そこで、本研究では骨吸収窩に多量に存在する

糖タンパク質に注目し、その構造解析から機能解明までを行なうことで新たな骨形成制御因子「骨形成マーキング糖タンパク質」を同定することを目指した。

2. 研究の目的

正常な骨の形成には、形成と吸収のバランスが保たれていることに加え、新しく形成される骨の場所が厳密に制御されていることも重要である。一般的に、骨を維持するリモデリング期の骨形成は骨吸収された場所を埋めるように起きる。一方、発生・成長の過程や骨粗鬆症などの病態では、骨形成を誘導しない骨吸収も存在する。すなわち、「骨形成を促す骨吸収窩」と「骨形成を促さない骨吸収窩」があると考えられる。しかし、両者の差異を説明する分子は未だ同定されていない。そこで本研究では、骨吸収窩に豊富に存在する糖タンパク質に着目し、その中から「骨形成を促す骨吸収窩を骨芽細胞に認識させる」機能をもつ新たな分子を同定することを目的とした。本研究期間内には骨吸収窩に特異的に存在する糖タンパク質およびその糖鎖構造の解析を通じて、骨吸収窩に存在する新たな骨形成制御因子の同定を目的とした。また、骨吸収窩における骨形成機構の *in vitro* 再構成系は未だ確立されていない。このアッセイ系を確立することが骨吸収窩の生理的意義を示すために重要な課題と考え、本研究期間内の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞単独培養

8週齢マウスから骨髓細胞を採取し、破骨細胞分化を誘導するサイトカインであるマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) とランクリガンド (RANKL) を加えて培養を行なった。本研究では、M-CSF のみを加えて2日間培養した細胞を破骨前駆細胞とし、M-CSF のみを加えて2日間培養した後、M-CSF と RANKL を加えて7日間培養を行なった細胞を成熟破骨細胞とした。骨吸収窩を作製する際には薄くスライスした牛骨片上で、破骨細胞分泌タンパク質を観察する際にはハイドロキシアパタイトペレット上で骨髓細胞の培養を上記の条件で行なった。

(2) レクチンアレイ

本研究では成熟破骨細胞から特異的に分泌される糖タンパク質に注目した解析を行なうため、分化段階の異なる破骨細胞の培養上清、疎水性画分、親水性画分の各画分を調製し、レクチンアレイを行なった。レクチンアレイは LecChip、GlycoStation を用いて測定および解析を行なった。

(3) 質量分析

破骨前駆細胞と成熟破骨細胞それぞれの培養上清から骨吸収窩認識レクチンに結合する糖タンパク質を抽出し、電気泳動を行な

った。銀染色によりタンパク質のバンドパターンを比較し、成熟破骨細胞に特異的なバンドを同定するため、質量分析にかけた。質量分析にはマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOFMS) を用いた。

(4) 骨吸収窩およびマウス脛骨のレクチン染色

破骨細胞単独培養により骨表面に吸収窩が形成された牛骨片とマウス脛骨パラフィン切片は、ビオチン標識レクチンとペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いて DAB 染色を行なった。

パラフィン切片は、固定・脱灰した4週齢マウス脛骨を包埋したパラフィンブロックから4 μm 厚で薄切することにより作製した。また、レクチン染色によりシグナルが検出された細胞が破骨細胞かどうかを確認するためには、破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) の活性を利用した TRAP 染色を行なった。

(5) 骨吸収窩付近における骨芽細胞動態の観察

本研究では、骨吸収窩付近における骨芽細胞の動態を観察するために、骨吸収窩をもつ骨片と骨吸収窩をもたない骨片上における骨芽細胞の動態を観察した。より詳細に細胞の動きや形態を解析することを目的とし、蛍光ラベルした細胞および骨片を実験材料として正立型共焦点顕微鏡による測定を行なった。具体的には、GFP を安定的に発現させた骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を骨芽細胞として用い、蛍光物質 TAMRA でラベルした牛骨片上での動きを観察した。

4. 研究成果

近年、骨形成と骨吸収のカップリングに関する研究が盛んに行なわれ、その重要性が強く認識されているが、複雑な骨の形がどのようにつくられていくのかは未だ不明な点が多い。また、骨リモデリングの際に新たな骨形成が促される場である骨吸収窩は糖タンパク質が豊富に存在することが報告されているが、その糖タンパク質に注目した研究はあまり行なわれていない。そこで本研究では、骨吸収窩の差異を生み出す分子を明らかにするため、骨吸収窩の糖タンパク質に注目し、「骨形成を促す骨吸収窩を骨芽細胞に認識させる」機能を持つ新たな分子を同定することを目的とした。

一年目には骨吸収窩を形成する細胞である破骨細胞から分泌され、かつ骨吸収窩に特異的に存在する糖タンパク質の同定を試みた。まず最初に、骨吸収窩に存在する糖タンパク質が破骨細胞から分泌されたものであるかを調べるために、破骨細胞単独培養系を用いてハイドロキシアパタイトペレット上に骨吸収窩を形成させ、骨吸収窩認識レクチ

ンとして用いられている小麦胚芽レクチン (Wheat germ agglutinin, WGA) による染色を行なった。その結果、骨吸収窩に存在する糖タンパク質が破骨細胞から分泌されたものである事を確認した。この実験結果から、骨吸収窩に特異的に存在する糖タンパク質を同定する実験材料として in vitro で培養した破骨細胞を用いることとした。また、骨吸収活性をもつ成熟した破骨細胞から分泌された画分に特徴的な糖タンパク質を同定するため、分化段階の異なる破骨細胞の培養上清、疎水性画分、親水性画分の各画分を調製し、レクチンアレイを用いた糖鎖構造解析を行なった。本研究では、成熟破骨細胞から分泌されるタンパク質に焦点を当てたため、特に疎水性画分と培養上清を用いたレクチンアレイの結果を重視した。レクチンは糖鎖結合タンパク質で、レクチンによってそれぞれ特定の糖鎖構造を認識することが知られている。レクチンアレイの結果、3種類の破骨細胞特異的レクチン候補を見出した。

二年目および三年目にはこれら3種類のレクチンのうち、マウス脛骨のパラフィン切片染色において破骨細胞を特異的に認識するレクチンを「新規骨吸収窩認識レクチン」として絞り込み、このレクチンに結合する糖タンパク質の同定を行なった。新規骨吸収窩認識レクチンに結合する糖タンパク質のうち、最も主要なタンパク質を MALDI-TOFMS (質量分析装置) を用いて同定した結果、MMP-9 であることが明らかとなった。MMP-9 は破骨細胞に強く発現していること、分泌タンパク質として骨基質を分解することが既に報告されていることから、骨吸収窩に存在するタンパク質としては予想できる分子であった。今後は、成熟破骨細胞から分泌された MMP-9 の糖鎖構造を明らかにしていくとともに、破骨細胞以外から分泌された MMP-9 の糖鎖構造との比較を行ない、成熟破骨細胞が分泌する MMP-9 が持つ糖鎖構造の特異的な役割を明らかにして行きたいと考えている。これまでの研究により、糖鎖修飾は、マトリックスポテアーゼである MMP-9 の酵素活性に大きな影響を与えないことが報告されている (Van den Steen PE et al. J Biol Chem. 2006, 281(27): 18626-37)。このことから、成熟破骨細胞から分泌された糖鎖修飾型 MMP-9 が全く新しい機能を持つ可能性は十分に考えられる。さらに最終年度は、骨吸収窩付近における骨芽細胞の動きを観察・解析するために、骨吸収窩の標識、骨芽細胞の可視化、観察方法の検討を行った。骨吸収窩付近における骨芽細胞の動きを観察する解析方法を確立後、実験系に新規骨吸収窩認識レクチンや抗 MMP-9 抗体を添加し、骨芽細胞の動きの変化を調べた。いずれの処理に関しても骨芽細胞の接着に大きな影響がみられ、動きの観察・解析をするには至らなかった。今後は骨芽細胞の接着に関する問題を除くため、骨吸収窩を作る骨片に関して素材やコーティング等の検討を

行なった後、本研究で同定した糖タンパク質が骨芽細胞の動きに与える影響を解析したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Kuroda Y, Maruyama K, Fujii H, Sugawara I, Ko SB, Yasuda H, Matsui H, Matsuo K. Osteoprotegerin Regulates Pancreatic -Cell Homeostasis upon Microbial Invasion. PLoS One. 査読有 2016;11(1):e0146544. doi: 10.1371/journal.pone.0146544.

2. Matsuo K, Kuroda Y, Nango N, Shimoda K, Kubota Y, Ema M, Bakiri L, Wagner EF, Takeda Y, Yashiro W, Momose A. Osteogenic capillaries orchestrate growth plate-independent ossification of the malleus.

Development. 査読有 2015;142(22):3912-20. doi: 10.1242/dev.123885.

〔学会発表〕(計5件)

1. Yukiko Kuroda, Atsushi Kuno, Hisashi Narimatsu, Koichi Matsuo Sialylated Glycans of MMP-9 Mark Bone Resorption Lacunae American Society for Bone and Mineral Research 2015 Annual Meeting 2015年10月9日~2015年10月12日 シアトル(アメリカ)

2. 黒田 有希子, 松尾 光一 Osteoprotegerin (OPG)は感染時におけるインスリン放出を阻害し、インスリン枯渇を防いでいる 第33回日本骨代謝学会学術集会 2015年7月23日~2015年7月25日 京王プラザホテル(東京都新宿区)

3. 枝元 美緒, 黒田 有希子, 松尾 光一 3D イメージングによる頭部骨の allometric な成長の観察 第33回日本骨代謝学会学術集会 2015年7月23日~2015年7月25日 京王プラザホテル(東京都新宿区)

4. 黒田 有希子 イノシトール三リン酸受容体を介したカルシウムオシレーション依存のおよび非依存的破骨細胞分化制御メカニズム 第88回日本薬理学会年会 2015年3月18日~2015年3月20日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

5. 黒田 有希子, 保田 尚孝, 丸山 健太, 松井 英則, 松尾 光一

感染時において、Osteoprotegerin (OPG)は骨だけではなく脾臓の保護にも貢献している

第32回日本骨代謝学会学術集会
2014年7月24日～2015年7月26日
大阪国際会議場（大阪府大阪市）

〔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

黒田 有希子 (KURODA, Yukiko)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70455343