

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462392

研究課題名(和文)NF- $\kappa$ B欠損マウスでの骨代謝のカップリング機構の破綻と破骨細胞前駆細胞の役割

研究課題名(英文)The dysfunction of macrophages/osteoclast precursors in bone metabolism after transplantation with RelA-deficient HSC.

研究代表者

三瀬 節子 (Mise-Omata, Setsuko)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：00269052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスに骨髄移植を行うと、何もしていない同週齢のマウスに比べ、骨芽細胞数の減少に伴い2次海綿骨が著しく減少する。転写因子NF- $\kappa$ BのRelAを欠損した胎児肝臓細胞を造血幹細胞として移植したマウス(ReIA欠損型移植マウス)では、更に骨が減少し骨訴訟症になる。このマウスの骨髄では、異常な活性化状態の炎症性のマクロファージが存在し、組織修復性マクロファージが減少していた。RelA欠損型移植マウスに野生型マクロファージを移植すると骨粗鬆症は回復する。RelA欠損型移植マウスでは、マクロファージの異常により放射線照射からの骨芽細胞のダメージを回復できないために骨粗鬆症になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lethal radiation of mice before HSC transplantation induces eradication of hematopoietic cells, but its effect on osteogenic cells may be less considered. The mice transferred with RelA-deficient fetal liver cells developed severe osteoporosis, and even the mice transferred with wild type cells reduced trabecular bones, suggesting that lethal radiation may damage to osteogenic cells. In contrast to wound healing M2 type macrophages reducing in bone marrow of the mice transferred with RelA-deficient HSCs, inflammatory M1 type macrophages were aberrantly activated. Co-transplantation of wild type macrophages have recovered osteoporosis which occurs in the mice transferred with RelA-deficient fetal liver cells, indicating that the dysfunction of RelA-deficient macrophages cause the uncoupling of bone metabolism.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨芽細胞 造血幹細胞移植 マクロファージ 炎症

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の生存や免疫反応に重要な転写因子 NF- $\kappa$ B は、哺乳類では RelA、RelB、c-Rel、NF- $\kappa$ B1、NF- $\kappa$ B2 の 5 分子が存在する。このうち RelA を欠損したマウスは肝臓細胞の細胞死のために、胎生 14 日目に死亡する。免疫系の細胞を RelA 欠損型に置き換えたマウスを作製するために、致死量の X 線を照射したマウスに、胎生 13.5 日の胎児肝臓細胞を造血幹細胞のソースとして造血幹細胞移植を行った。このマウス(以下 RelA 欠損型移植マウスと呼ぶ)は、リンパ球が減少しミエロイド系細胞が増加する造血異常を起こすと共に、重度の骨粗鬆症の病態を呈すること発見した。このマウスの骨粗鬆症は、移植した造血幹細胞由来の破骨細胞の過剰分化のせいではなく、宿主由来の骨芽細胞の骨形成の低下によって起こっていた。

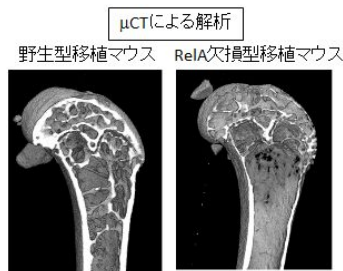


図1 野生型移植マウスとRelA欠損型移植マウスの大腿骨。μCT解析により、RelA欠損型では海綿骨が減少し、皮質骨が薄くなっている。

### 2. 研究の目的

RelA 欠損型移植マウスでは、野生型の宿主由来の骨芽細胞の機能低下によって骨粗鬆症になる。このことは、野生型マウスでは造血幹細胞由来の細胞が骨芽細胞に何らかの働きかけをして骨形成を支持しているが、RelA 欠損型移植マウスでは、造血幹細胞由来の細胞からの働きかけが破綻しているために、骨形成が低下してしまっていると考えられる。私は、破骨細胞の前駆細胞であり、骨形成を支持することがある骨髄内のマクロファージが、骨芽細胞の機能の支持を担っているのではないかとしているのではないかと考えた。

そこで本研究では、野生型移植マウスと RelA 欠損型移植マウスの骨髄マクロファージの機能を比較することによって、骨形成支持におけるマクロファージの役割を明らかにした。

### 3. 研究の方法

#### (1)造血幹細胞移植

宿主マウスは、C57BL6 - SJL(Ly5.1)の雄を用い、移植直前に 9Gy の X 線を全身照射した。RelA $^{+/-}$ マウスの交配より、野生型、RelA 欠損型胎児を胎生 13.5 日に回収し、遺伝子型を PCR によって判別すると共に肝臓細胞を回収した。骨髄細胞は、野生型(Ly5.2 雄)成体マウスから回収した。麻酔後のマウスに眼底静脈叢より細胞を移植した。

#### (2)骨髄マクロファージの単離

野生型マウスあるいは野生型・RelA 欠損型移植マウスの骨髄細胞を回収し、抗 F4/80 抗体-APC 標識でマクロファージを染色し、BD 社の FACS AriaIII でマクロファージを単離した。

#### (3)骨髄マクロファージの性質の解明

##### FACS 解析

骨髄細胞を回収し、FACS 解析により CD45.2+Ter119-7AAD-CD11b+F4/80+ の細胞のうち、CD11c 陽性の炎症性の M1 マクロファージと CD11c 陰性の組織修復性の M2 マクロファージの頻度を調べた。

##### マクロファージの発現遺伝子の解析

(2)の方法で単離した骨髄マクロファージから、RNA を抽出し、定量的 PCR によって様々な遺伝子の発現様式を解析した。

#### (4)骨組織の解析

##### X 線学的解析

移植マウスの大腿骨、脛骨を回収し、4% パラホルムアルデヒドで固定した。X 線画像、DEXA 解析、マイクロ CT 解析、pQCT 解析を行い、骨組織の状態を調べた。

##### 組織学的解析

骨組織を回収する 2 日前と 9 日前に骨に取り込まれる蛍光色素カルセインとアリザリンを皮下投与した。固定した脛骨を、川本法による凍結非脱灰切片を作製し、骨形態計測を行った。破骨細胞数、骨芽細胞数、石灰化面、骨形成速度を計測した。

### 4. 研究成果

#### (1)野生型骨髄細胞とマクロファージは、RelA 欠損型移植マウスの骨粗鬆症をレスキューする。

RelA 欠損型移植マウスの骨粗鬆症の原因を調べるために、RelA 欠損型胎児肝臓細胞を移植する際に、野生型の骨髄細胞を共に移植した。このマウスは RelA 欠損型移植マウスの骨粗鬆症も造血異常の完全にレスキューされた。このことは、RelA 欠損型の造血幹細胞由来の細胞の機能の喪失 (loss-of-function) のために異常が起こることを示している。

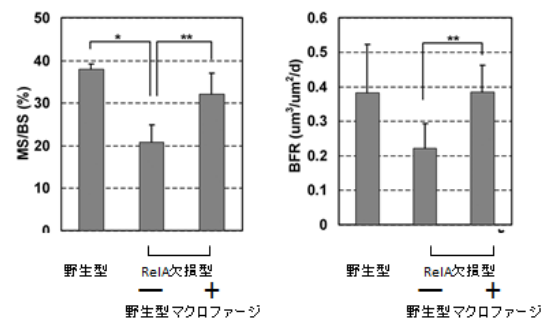


図2 野生型骨髄マクロファージによってRelA欠損型キメラマウスの骨形成の減少はレスキューする。

造血幹細胞由来の細胞の中でも特にマクロファージに原因があることを明らかにするために、野生型骨髄マクロファージを共移植した。その結果、RelA 欠損型移植マウスの骨粗鬆症は正常に回復した(図 2)。

この実験によって、RelA 欠損型移植マウスではマクロファージの異常によって、骨粗鬆症が起こっていることが明らかになった。

### (2)野生型と RelA 欠損型骨髄マクロファージの機能解析

野生型移植マウスと RelA 欠損型移植マウスの骨髄においては、炎症性 M1 マクロファージの頻度や数には大きな違いがなかったが、組織修復性 M2 マクロファージが RelA 欠損型で有意に減少していた。

骨髄から単離したマクロファージは、RelA 欠損型では M2 マクロファージのマーカー遺伝子である Arg1 や Ym1 の発現が低く、組織修復性マクロファージの分化が劣っていることが分かる。そう一方で、炎症性マクロファージが発現する NOS2 の発現が異常に高いが、IL-6 や TNF などはむしろ減少傾向にあることが分かった。このように、RelA 欠損型移植マウスでは、異常な活性化状態を示す炎症性マクロファージが多く存在することが分かった。

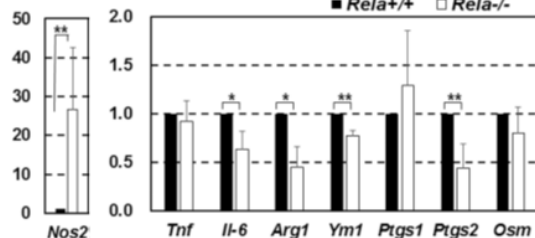


図3 野生型とRelA欠損型移植マウスの骨髄内マクロファージの遺伝子発現。  
RelA欠損型では、組織修復性マクロファージのマーカー遺伝子の発現が低く、一酸化窒素合成酵素の発現が異常に高かった。

### (3)マクロファージ特異的 RelA 欠損マウスの骨組織の表現系

RelA 欠損型移植マウスの骨組織の異常が、移植前の致死量 X 線照射による組織障害が原因であるかを調べるために、RelA をマクロファージで特異的に欠損しているが、移植処置を行っていないマウスの骨組織を調べた。このマウスの骨組織は野生型と同じく正常であった。このことから、RelA 欠損型移植マウスの骨粗鬆症は、移植に前処置に行われる X 線照射からの組織障害から回復できないために起こっていることが示唆された。

### (4)野生型骨髄を移植したマウスでの骨組織の解析

(3)の結果から、致死量の X 線照射が骨粗鬆症の原因を作っていることが示唆されたので、野生型の骨髄移植を行ったマウスと何も処置していない同週齢のマウスとを比較し

て、骨髄移植の処置そのものの骨への影響を調べた。その結果、骨髄移植を行うと 2 次海綿骨や骨梁が減少していた。これは移植後 5 ~ 10 日に既に減少し始めるため、移植直後の過剰な破骨細胞分化が原因である。しかし移植 3 ヶ月後の骨組織では、骨芽細胞数や骨石灰化面が著しく減少していた。このことは、致死量の X 線照射が、骨芽細胞を減少させ、骨芽細胞と破骨細胞との機能のカップリングを破綻させていることを明らかにした。

以上の結果から、骨髄移植の前処置で行われる致死量の X 線照射は骨組織の細胞にもダメージを与えるが、野生型の造血幹細胞を移植すると、組織修復性のマクロファージが骨髄内環境を修復する。しかし、RelA 欠損型の造血幹細胞を移植すると、RelA 欠損型のマクロファージは組織を修復することができず、骨髄内環境の悪化や骨形成不全が起こってしまうことを明らかにした(図 4)。

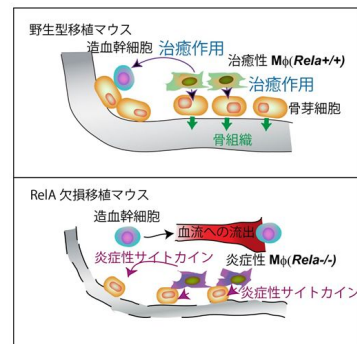


図4 RelA欠損移植マウスでの骨髄内微小環境の損傷のメカニズム

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Arai Y, Aoki K, Shimizu Y, Tabata Y, Ono T, Murali R, Mise-Omata S, Wakabayashi N. Peptide-induced de novo bone formation after tooth extraction prevents alveolar bone loss in a murine tooth extraction model. *Eur J Pharmacol* 査読有 782:89-97.(2016) doi: 10.1016/j.ejphar.2016.04.049.
2. Uehara T, Mise-Omata S, Matsui M, Tabata Y, Murali R, Miyashin M, Aoki K. Delivery of RANKL-Binding Peptide OP3-4 Promotes BMP-2-Induced Maxillary Bone Regeneration. *J Dent Res*. 査読有 95(6):665-72 (2016). doi: 10.1177/0022034516633170.
3. Kato G, Shimizu Y, Arai Y, Suzuki N, Sugamori Y, Maeda M, Takahashi M, Tamura Y, Wakabayashi N, Murali R, Ono T, Ohya K, Mise-Omata S, Aoki K. The inhibitory effects of a RANKL-binding peptide on articular and periarticular bone loss in a murine model of collagen-induced arthritis: a bone histomorphometric study.

- Arthritis Res Ther. 査読有 17, 251 (2015). doi: 10.1186/s13075-015-0753-8.
4. Fukazawa T., Hiraiwa N., Umemura T., Mise-Omata S., Obata Y., and Doi T. Egress of Mature Murine Regulatory T Cells from the Thymus Requires RelA. J. Immunol. 査読有 194, (7):3020-8 (2015). doi: 10.4049/jimmunol.1302756.
  5. Mise-Omata S., Obata Y., Doi TS. p100, a precursor of NF- $\kappa$ B2, inhibits c-Rel and reduces the expression of IL-23 in dendritic cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有 453, 332-337. (2014). doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.143.
  6. Mise-Omata S., Alles N., Fukazawa T., Aoki K., Ohya K., Jimi E., Obata Y., and Doi T. NF- $\kappa$ B RELA-deficient bone marrow macrophages fail to support bone formation and to maintain hematopoietic niche after lethal irradiation and stem cell transplantation. Int. Immunol. 査読有 26, 607-618. (2014). doi: 10.1093/intimm/dxu062

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Yukihiko Tamura, Setsuko Mise, Yasutaka Sugamori, Md. Zahirul Haq Bhuyan, Mariko Takahashi, Tomoki Uehara, Yuki Arai, Michiyo Miyashin, Noriyuki Wakabayashi, Kazuhiro Aoki. A pharmacological role of metallothionein in zinc-treated cartilage-progenitor cells. APFP 2016(The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologists Meeting) 2016 年 2 月 1~3 日 Bangkok(Thailand)
2. 田村幸彦、三瀬節子、菅森泰隆、Md Zahirul Haque Bhuyan、高橋真理子、上原智己、新井祐貴、宮新美智世、若林則幸、青木和広。亜鉛処理による軟骨前駆細胞(ATDC5)におけるメタロチオンエインの発現について第 133 回日本薬理学会関東部会 2015 年 10 月 10 日 柏市、柏の葉カンファレンスセンター (千葉)
3. 新井祐貴、青木和広、三瀬節子、清水康広、小野卓史、若林則幸。マウス抜歯窩に局所適用した RANKL 結合ペプチドと BMP-2 の併用による骨形成促進作用の評価。第 35 回日本骨形態計測学会 2015 年 6 月 4-6 日 倉敷市芸文館(倉敷)
4. Uehara T, Mise S, Arai Y, Sugamori Y, Kato G, Tamura Y, Tabata Y, Murali R, Wakabayashi N, Miyashin M, Aoki K. A rankl-binding peptide accelerates BMP-induced bone regeneration in murine maxilla by subperiosteal injections. 13th Congress of the Internatitonal Society of Bone Morphometry. 2015 年 4 月 27~29 日 東

東京ガーデンパレスホテル(東京)

5. Mise-Omata, S., Fukazawa, T., Obata, Y., Doi, TS., NF-kappaB rela-deficient macrophages fail to support bone formation and maintain the microenvironment for hematopoiesis after X-ray irradiation and HSC transplantation. 15h Intenational Congress of Immunology. 2013 年 8 月 22~27 日 Milan (Italy).
6. Mise-Omata, S., Alles, N., Fukazawa, T., Aoki, K., Ohya K., Jimi, E., Obata, Y., and Doi, T. NF-kappaB, rela-deficient bone marrow macrophages fail to support bone formation and maintain HSC niche after lethal irradiation and HSC transplantation. 21th International symposium of macrophage molecular and cellular biology 2013 年 5 月 20~21 日都市センターホテル(東京)

〔図書〕(計 1 件)

1. Mise-Omata, S., Doi, TS, Aoki K., Obata Y. Impact of radiation on hematopoietic niche. edd. Kursad Turksen In Biology in Stem Cell Niche. p147-160. Springer Humana Press (2015)

6. 研究組織

(1)研究代表者

三瀬 節子 (MISE-OMATA, Setsuko)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師  
研究者番号：00269052

(2)研究分担者

土井 貴裕 (Doi, S. Takahiro)  
独立行政法人理化学研究所・生体情報統合技術開発チーム・研究員  
研究者番号：60227684