

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：33602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670792

研究課題名(和文)破骨細胞から分泌されるスクレロスチン発現抑制因子は骨代謝共役因子か？

研究課題名(英文)Osteoclast-derived factors for inhibiting sclerostin expression is a bone coupling factor.

研究代表者

小林 泰浩 (Kobayashi, Yasuhiro)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号：20264252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨リモデリングは破骨細胞と骨芽細胞および骨細胞の連携により行われる。骨細胞から分泌されるSclerostin(Sost)は、Wnt/ β -カテニンシグナルを阻害し、骨形成を抑制する。OPG欠損マウス(OPG-KO)は骨吸収と骨形成活性が共に高い骨代謝回転を示す。OPG-KOでは、Sostの発現が著しく低下することを見出している。この所見は、骨吸収に伴い増加する因子によりSostの発現が抑制されることを示唆する。破骨細胞の培養から調整した培養上清中にSostの発現を抑制する活性を見出した。破骨細胞はサイトカインXを分泌し、Sostの発現を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Bone remodeling is achieved by the cooperation of bone forming osteoblasts, bone resorbing osteoclasts, and matrix-embedded osteocytes. Sclerostin (Sost) secreted from osteocytes inhibits the Wnt/ β -catenin signaling, which in turn, suppresses bone formation. OPG-deficient mice (OPG-KO) exhibit increased bone resorption and formation activity. We have found that the expression of Sost is significantly reduced in OPG-KO mice. This finding suggests that the expression of Sost is regulated by factors associated with the increased bone resorption. We also found that culture supernatant collected from osteoclast cultures suppressed the expression of Sost in UMR106 cells. Thus, this study revealed that osteoclasts secrete cytokines X and then suppress the expression of Sost.

研究分野：生化学

キーワード：スクレロスチン 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨リモデリングは、骨吸収相から逆転相を経て骨形成相のサイクルを繰り返す。このサイクルは、破骨細胞と骨芽細胞、骨細胞など機能の異なる細胞の連携により担われており、正常な骨リモデリングを遂行するためには、骨を構成する細胞同士のシグナルネットワークが重要である。破骨細胞と骨芽細胞間のコミュニケーション分子の解析は進んでいる。しかし、破骨細胞から骨細胞へのコミュニケーション分子の解析は進んでいない。

Sclerostin は、骨細胞から分泌される因子である。Wnt とその共受容Lrp5/Lrp6 との結合を阻害し、Wnt/ β -catenin シグナルをブロックする。その結果、骨形成が抑制される。我々は、Osteoprotegerin 遺伝子欠損マウス (OPG-KO) を解析し、以下の所見を得ている。

(1) OPG-KO では、骨吸収の亢進に伴って、骨形成の異常な亢進が起こる。

(2) 骨吸収を抑制すると、骨形成活性はほぼ正常に戻る (Endocrinology, 144: 5441, 2003)。これらの所見は、骨吸収から骨形成への共役機構があることを示唆している。

(3) OPG-KO マウスの骨組織では、Sclerostin の発現が著しく低下することを見出している。以上から、骨吸収に伴って骨組織に分泌されるSclerostin の発現抑制因子が骨リモデリング共役因子の本態であると考えた。

2. 研究の目的

骨リモデリングは破骨細胞と骨芽細胞、骨細胞など機能の異なる細胞の連携により担われる過程である。骨リモデリングが行われるためには、骨を構成する細胞同士のシグナルネットワークが重要である。骨芽細胞 破骨細胞間に比べ、破骨細胞から骨細胞へのコミュニケーション分子は未解明のままである。骨リモデリングにおける骨吸収から骨形成への移行には、共役因子が必要であるが、その実体は明らかではない。我々は、破骨細胞から

分泌される新規因子が、骨細胞から分泌されるWnt/ β -cateninシグナルの抑制因子であるSclerostin の発現を抑制する結果、骨代謝共役が起こるとの仮説を立てた。本申請課題は、骨リモデリングを統合的に理解する上で重要な研究課題であるとともに、新たな骨粗鬆症治療の指針になり得る。

3. 研究の方法

(1) Sclerostin発現抑制因子の同定

Sclerostin は骨細胞から分泌され、Wnt とLrp5 あるいはLrp6 との結合を阻害し、骨形成を阻害する。我々は、OPG 遺伝子欠損マウス (OPG-KO) は骨吸収と骨形成が共に高い骨代謝回転を示すことを報告した

(Endocrinology 144: 5441-5449, 2003)。骨組織におけるSclerostin 発現を免疫組織学的に解析したところ、OPG-KO マウスではSclerostin の発現が著しく低下していることを見出している。この所見は、骨吸収に伴い骨基質より遊離される因子あるいは破骨細胞自身から分泌される因子によりSclerostin の発現が抑制されることを示唆する。

(2) OPG-KO および野生型マウスに抗RANKL 抗体を投与した際のSclerostin の発現解析：抗RANKL 抗体を投与すると破骨細胞の分化が抑制され、破骨細胞が観察されなくなる。このときのSclerostin の発現を免疫組織化学的に解析する。さらに、骨形態計測を行い骨吸収と骨形成の状態を解析する。

(3) OPG-KOおよび野生型マウスにビスフォスフォネートを投与した際のSclerostin の発現解析：ビスフォスフォネートは骨吸収活性を著しく抑制するが、破骨細胞の分化は抑制しない。Sclerostin の発現と骨形成を上記の方法に従い解析する。

(4) 破骨細胞から分泌されるSclerostin 発現抑制因子の同定：上記(1)および(2)の結果から、破骨細胞から分泌される因子がSclerostin の発現を低下させる可能性があ

る場合、破骨細胞が分泌するSclerostin 発現抑制因子の同定を試みる。骨芽細胞様細胞であるMC3T3E1 を石灰化誘導培地で培養すると、Sclerostin 発現が上昇することを見出している。この培養系に破骨細胞の培養上清あるいは破骨細胞の細胞抽出液を添加し、Sclerostin 発現抑制活性を確認する。

Sclerostin 発現抑制活性が確認できた場合、クロマトグラフィーを用いて破骨細胞の培養上清を分画する。強いSclerostin 発現抑制活性を有する画分を質量分析に供し、Sclerostin 発現抑制因子の候補を同定する。

(5) 新規因子の強制発現：上記の解析で同定された候補分子が既知の遺伝子の場合、Open biosystemよりcDNA クローンを購入し、強制発現のためのアデノウィルスを作製する。

MC3T3E1 細胞に候補分子を発現させ、Sclerostin 発現が抑制できるか免疫組織学的に確認する。

(6) 新規因子の生体内での強制発現：作製したアデノウィルスをマウスに静脈投与し、生体内で発現させる。このときの骨組織におけるSclerostin の発現を免疫組織学的に解析する。アデノウィルスを投与した際の骨組織での遺伝子発現は、予備実験で確認している。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスに比べ、OPG-KO では、Sost の発現が低下した (図 1)。

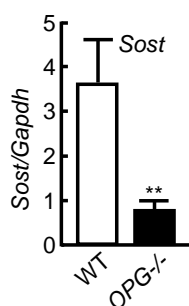


図1 OPG欠損マウスにおけるSostの発現

(2) OPG-KO および野生型マウスに抗 RANKL 抗体を投与すると、破骨細胞の分化が抑制され、

Sost の発現は増加した (図 2)。

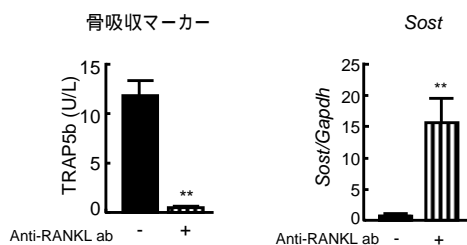


図2 OPG欠損マウスに抗RANKL抗体を投与した際の骨吸収マーカー(左)とSostの発現(右)

(3) 破骨細胞が分泌するsclerostin (Sost) 発現抑制因子の解析：ラットの骨肉腫細胞であるUMR106 は、Sostを過剰発現する。破骨細胞の培養から調整した培養上清の存在下でUMR106を培養したところ、Sostの発現が抑制された。

(4) Sost発現抑制因子の同定：破骨細胞が分泌するSost発現抑制因子を同定するため、破骨細胞の培養から精製したRNAをマイクロRNA解析に供した。分泌タンパク質に絞って解析したが、発現が高い遺伝子の中で、候補を絞りこめなかった。

(5) 破骨細胞から分泌されるサイトカイン X (X) の解析：マイクロ RNA 解析において、破骨細胞はXを発現することが明らかになった。さらに、ウェスタンブロット解析とリアルタイム PCR 解析において、破骨細胞は、サイトカイン X (X) を顕著に発現することを確認した。さらに、中和抗体を用いて、破骨細胞の培養上清の X を中和すると、Sost 抑制効果が消失した。以上より、破骨細胞は X を分泌し、Sost の発現を抑制する。これにより、Wnt シグナルを高め、骨形成を誘導することが示唆された。

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 10 件)

Thirukonda GJ, Uehara S, Nakayama T, Yamashita T, Nakamura Y, Mizoguchi T, Takahashi N, Yagami K,

Udagawa N, Kobayashi Y. The dynamin inhibitor dynasore inhibits bone resorption by rapidly disrupting actin rings of osteoclasts. *J Bone Miner Metab.* (in press, 2016).
Kobayashi Y, Uehara S, Udagawa N, Takahashi N. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. *J Biochem.* 159: 387-392, 2016. doi: 10.1093/jb/mvv124.
Weivoda MM, Ruan M, Hachfeld CM, Pederson L, Howe A, Davey RA, Zajac JD, Kobayashi Y, Williams BO, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Wnt Signaling Inhibits Osteoclast Differentiation by Activating Canonical and Noncanonical cAMP/PKA Pathways. *J Bone Miner Res.* 31:65-75, 2016. doi: 10.1002/jbmr.2599.
Kanemoto S, Kobayashi Y, Yamashita T, Miyamoto T, Cui M, Asada R, Cui X, Hino K, Kaneko M, Takai T, Matsuhisa K, Takahashi N, Imaizumi K. Luman is involved in osteoclastogenesis through the regulation of DC-STAMP expression, stability and localization. *J Cell Sci.* 128: 4353-4365, 2015. doi: 10.1242/jcs.176057.
Kobayashi Y, Uehara S, Koide M, Takahashi N. The regulation of osteoclast differentiation by Wnt signals. *Bonekey Rep.* 4: 713, 2015. doi: 10.1038/bonekey.2015.82.
Kobayashi Y, Thirukonda GJ, Nakamura Y, Koide M, Yamashita T, Uehara S, Kato H, Udagawa N, Takahashi N. Wnt16 regulates osteoclast differentiation in

conjunction with Wnt5a. *Biochem Biophys Res Commun.* 463:1278-1283, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.102.
Nishikawa K, Iwamoto Y, Kobayashi Y, Katsuoka F, Kawaguchi S, Tsujita T, Nakamura T, Kato S, Yamamoto M, Takayanagi H, Ishii M. DNA methyltransferase 3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosylmethionine-producing metabolic pathway. *Nat Med.* 21: 281-287, 2015. doi: 10.1038/nm.3774.
Okamoto M, Udagawa N, Uehara S, Maeda K, Yamashita T, Nakamichi Y, Kato H, Saito N, Minami Y, Takahashi N, Kobayashi Y. Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ β -catenin signaling during osteoblastogenesis. *Sci Rep.* 4: 4493, 2014. doi: 10.1038/srep04493.
Watanabe C, Morita M, Hayata T, Nakamoto T, Kikuguchi C, Li X, Kobayashi Y, Takahashi N, Notomi T, Moriyama K, Yamamoto T, Ezura Y, Noda M. Stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via CNOT3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111: 2692-2697, 2014. doi: 10.1073/pnas.1316932111.
Yamashita T, Uehara S, Udagawa N, Li F, Kadota S, Esumi H, Kobayashi Y, Takahashi N. Arctigenin inhibits osteoclast differentiation and function by suppressing both calcineurin-dependent and osteoblastic cell-dependent NFATc1 pathways. *PLoS One.* 9:e85878, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0085878.

1. 小林泰浩：Wnt 非古典経路による破骨細胞の分化・機能制御，愛媛大学大学院医学研究科大学院セミナー、東温市、2015年（招待講演）
2. 小林泰浩：Wnt シグナルによる骨吸収制御機構、第 13 回 RCGM フロンティアシンポジウム、埼玉医科大学、入間市、2015年（招待講演）
3. 小林泰浩：Regulation of osteoclast differentiation and function by Wnt signals. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会日韓合同シンポジウム、新潟市、2015 年（招待講演）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 泰浩 (KOBAYASHI Yasuhiro)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号：20264252

(2)研究分担者

小出 雅則 (KOIDE Masanori)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：10367617

(3)連携研究者 無し

(4)研究協力者 無し