

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670799

研究課題名(和文) 間質細胞由来破骨細胞前駆細胞機能維持因子の同定と炎症性骨破壊における役割の解明

研究課題名(英文) Identification of stromal cell-derived factors required for maintaining functional osteoclast precursors and elucidation of the role of the factors in inflammatory bone destruction

研究代表者

天野 滋 (Amano, Shigeru)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：90167958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：M-CSF、Insulin-2、Nidogen-2、IGFBP-2そしてFibronectin N末端断片30kDa(Fn30kDa)が、マウス胎児頭蓋冠由来間葉系細胞培養上清中に存在する破骨細胞前駆細胞機能維持因子であると同定された。IGFBP-2とFn30kDaとの間に相同性の高いアミノ酸配列NGRGEが発見された。Fn30kDaは破骨細胞前駆細胞上のCD13に結合し、RANK、TRAF6、NFATc1、c-Fos発現を上昇させ、破骨細胞形成を促進させた。また、Fn30kDaの腹腔内投与は、末梢血中のCD11b/CD13強陽性細胞数を増加させ、LPS誘導性頭蓋冠骨吸収を促進させた。

研究成果の概要(英文)：M-CSF, Insulin-2, Nidogen-2, IGFBP-2 and N-terminal fragment 30-kDa of fibronectin (Fn30kDa) were identified as factors required for maintenance and proliferation of osteoclast precursor in conditioned media from mouse embryonic calvaria-derived stromal cells. The amino acid sequence NGRGE were conserved between IGFBP2 and Fn30kDa. Fn30kDa bound to CD13 expressed on osteoclast precursors, increased the expression of RANK, TRAF6, NFATc1 and c-Fos, and enhanced osteoclastogenesis. Intraperitoneal injection of Fn30kDa in mice increased the number of CD11b/CD13 positive cells in peripheral blood, and enhanced calvarial bone resorption induced by LPS.

研究分野：感染免疫

キーワード：破骨細胞前駆細胞株4B12細胞 破骨細胞前駆細胞機能維持因子 Insulin Fibronectin N末端 IGFBP-2
Nidogen-2 CD13 破骨細胞形成

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞分化・融合・機能発現過程に、骨芽細胞/間質細胞から産生される M-CSF と骨芽細胞や骨細胞の膜上に発現する RANKL の刺激が必要であることが知られている。M-CSF の機能的欠損により大理石骨病を引き起こす op/op マウスでは、マクロファージの減少と破骨細胞の欠損が起きることから、M-CSF は、破骨細胞前駆細胞(ある種のマクロファージ)に分化させるために必要な因子であると考えられている。RANKL または RANK のノックアウトマウスは破骨細胞分化に異常をきたし、大理石骨病様の病態を呈することから、RANKL/RANK シグナルが破骨細胞分化には必須であると考えられている。さらに RANKL/RANK シグナルによって遺伝子発現上昇・活性化してくる NFATc1 が、破骨細胞分化におけるマスター転写因子であることが、NFATc1 欠損した ES 細胞からの破骨細胞形成が障害されることから明らかになっている。ところで骨の局所でのみ破骨細胞が出現してくる理由が、この2つの因子による同時刺激が骨の局所でしか起こりえないためなのか、それともそれ以外の破骨細胞を骨の局所に出現させる別の機構が存在しているのか明らかにされていない。間質細胞の培養上清を添加して培養しなければ破骨細胞分化能が消失していく樹立化破骨細胞前駆細胞 4B12 細胞の存在から考えると、その上清中に存在する破骨細胞前駆細胞機能維持因子を同定し、その機能を明らかにすることはこのなぞを解く1つの鍵になるかもしれないと考えた。

2. 研究の目的

歯周疾患における破骨細胞性骨吸収や関節リウマチ性骨破壊は、骨形成を上回る成熟破骨細胞の数の増加と機能亢進によると考えられている。近年、破骨細胞分化・融合・機能発現過程に M-CSF/c-Fms と RANKL/RANK シグナルが重要であることが明らかにされている。また破骨細胞前駆細胞に関しても明らかにされてきているが、この細胞の増殖や機能維持に関する報

告は少ない。最近私共が樹立した破骨細胞前駆細胞株 4B12 細胞は、その細胞維持にマウス胎児頭蓋冠由来間質細胞の培養上清が必要不可欠であることを報告した。この結果は、破骨細胞前駆細胞機能維持因子が間質細胞から産生されている可能性を示唆している。本研究は、この因子の同定、発現調節機構、そして破骨細胞前駆細胞機能維持機構を明らかにし、炎症性骨破壊における役割を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

- 1) 細胞: 樹立化破骨細胞前駆細胞 4B12 細胞、マウス骨髄細胞由来 M-CSF 依存性マクロファージ。
- 2) 試薬: mM-CSF、sRANKL、ヒト Insulin、ヒト血漿由来 Fibronectin (Fn) の全長、N 末端部分の 30 kDa、45kDa、そして 70kDa、マウス IGFBP-2、マウス Nidogen-2 を用いた。
- 3) 破骨細胞前駆細胞分化機能維持活性測定法: 4B12 細胞を 96 穴 culture plate に 1000 ~ 5000 個播種し、各試料単独または M-CSF (5 ng/ml) との両刺激で 3 日間培養後、M-CSF と sRANKL 添加 10%FBS 加 α -MEM 培地中で 5 日間培養し、この培養上清中の酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 活性ならびに TRAP 陽性多核細胞数を測定した。
- 4) 破骨細胞前駆細胞分化機能維持因子の精製と同定: マウス胎児頭蓋冠由来間質細胞を無血清培地の E-RDF 培地で培養後、上清を回収し、Amicon ウルトラ-15 10K デバイスで濃縮、破骨細胞前駆細胞分化機能維持活性を指標に MonoQ、Superdex200 10/300GL、Resource RPC を用いて活性分画を順次精製した。SDS-PAGE でほぼ 1 バンドに近い状態に精製されたいくつかの画分を LC/MS/MS で解析した。
- 5) M-CSF の定量測定: マウス M-CSF ELISA kit を用いて、MonoQ で精製したサンプル中の M-CSF 量を測定した。
- 6) 細胞増殖測定: 4B12 細胞を 96 穴 culture

plate に 1000~5000 個播種し数日培養後、CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit を用いて蛍光強度を測定した。スタンダード曲線を作り、蛍光強度から細胞数に変換し測定値とした。

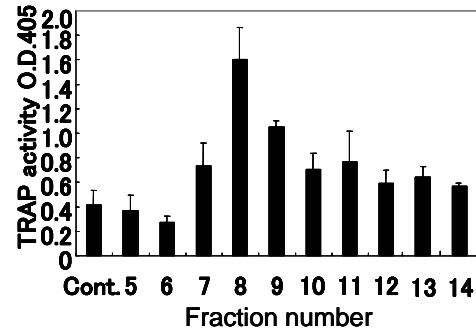
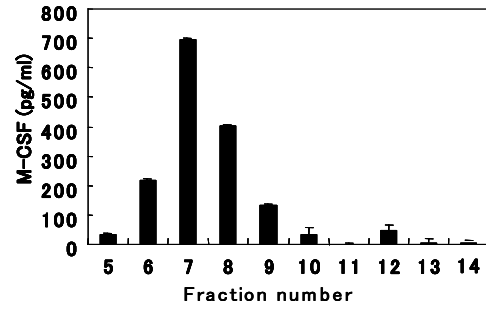
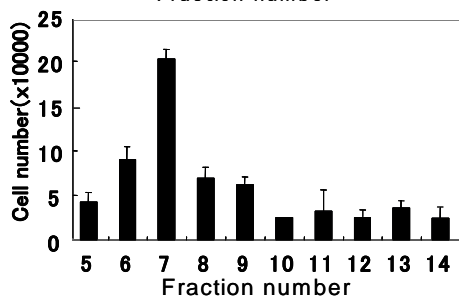
7)タンパク質の SDS-PAGE:銀染色で染めた。

8) CD11b/CD13 陽性細胞:FITC ラベル Rat anti-mouse CD11bとRPE ラベル Rat anti-mouse CD13 で染色後、ベックマンコールターALTRA で解析した。

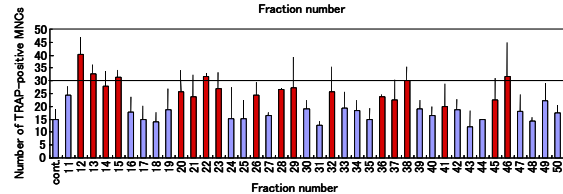
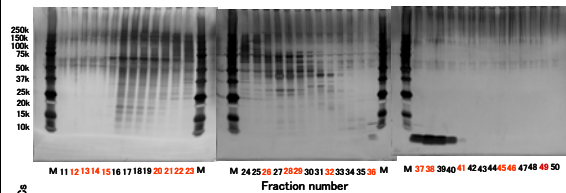
4. 研究成果

1)間質細胞の培養上清濃縮液を MonoQ に吸着後、20 分間の直線的グラジエントで分離した。各サンプルの SDS-PAGE による解析、さらに M-CSF 活性、4B12 細胞増殖能、破骨細胞形成能を調べた。4B12 細胞の増殖活性は、Fr.7 のところに認められた。M-CSF の活性は、Fr.7 のところで最も高かった。しかし、破骨細胞分化指標である TRAP 活性は、Fr.8 のところで最も高かった。破骨細胞前駆細胞の増殖には、現在までに知られているように間質細胞から産生されている M-CSF が主な役割を果たしていると思われるが、破骨細胞前駆細胞分化機能維持活性は、M-CSF 活性と4B12 細胞増殖活性の画分と異なることから、破骨細胞前駆細胞分化機能維持因子は、M-CSF 以外に存在する可能性が示唆された。

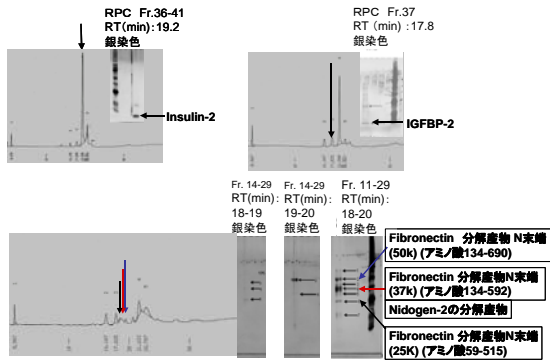
MonoQ サンプルの銀染色



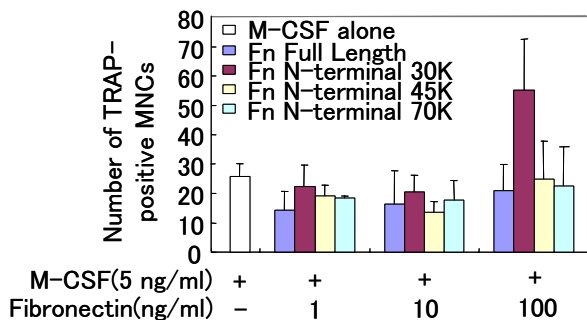
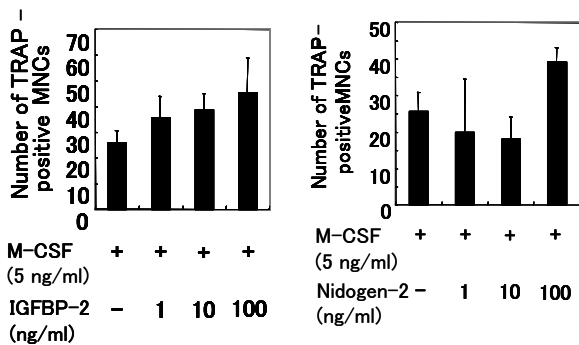
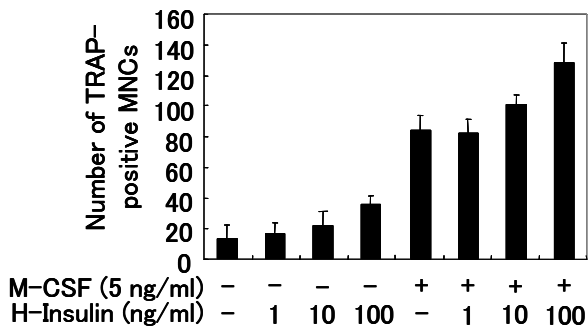
2) MonoQ 画分8を Superdex200 10/300GL を用い分子量による分画を行った。各サンプルの SDS-PAGE と TRAP 陽性多核細胞形成能を調べた。破骨細胞前駆細胞分化機能維持活性が、control の約2倍認められた分画は、Fr. 12-15、Fr.20-23、Fr.26、Fr.28-29、Fr.32、Fr.36-38、Fr.41、Fr.45-46 であった。



3) 上記の活性画分をさらに Resource RPC で分画を行った。破骨細胞前駆細胞分化機能維持活性が認められる単一のピーク(矢印で示す)画分を、SDS-PAGE(銀染色)でほぼ単一バンドが認められたバンドを切り出し、LC/MS/MS で同定を行った。破骨細胞前駆細胞分化機能維持活性を示す因子は、Insulin-2、IGFBP-2、Fn、Nidogen-2 である可能性が示唆された。

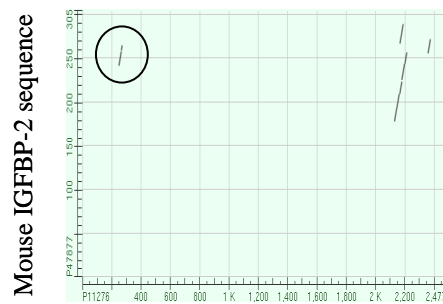


4) H-Insulin、IGFBP-2、Nidogen-2、Fn の破骨細胞前駆細胞分化機能維持活性に対する影響を検討した。M-CSF 不含有または含有培地中の4B12細胞を、各因子存在下で3日間刺激後、破骨細胞形成能を調べたところ、H-Insulin、IGFBP-2、Nidogen-2、Fn30kDa の4因子は100 ng/ml で明らかな活性が認められた。



5) 最近、IGFBP-2 ノックアウトマウスで破骨細胞形成抑制と骨吸収減少が認められることが報告され、破骨細胞前駆細胞維持機能因子の一つがIGFBP-2 であるという私共の結果は、これを裏付けるものであると考える。IGFBP-2とFn分解産物 N 末端部分で相同性の高いアミノ酸配列領域を basic local alignment search tool (BLAST)を用いて検索したところ、Asn-Gly-Arg-Gly-Glu (NGRGE)の配列が発見された。

Dot matrix比較

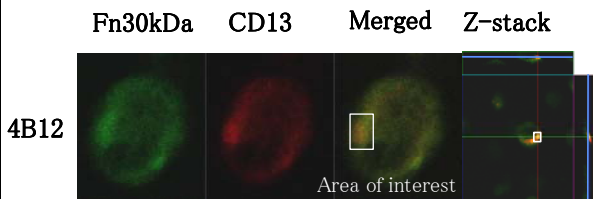


Fn N末端とIGFBP-2の2配列間でのアラインメント

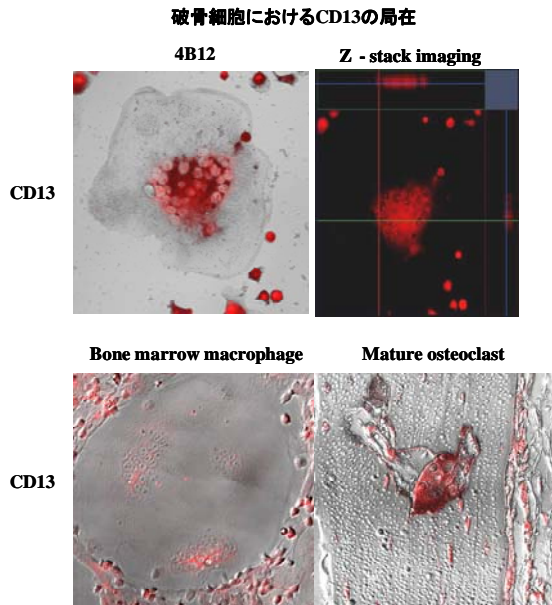
Fn (1-5) 250	KDNRGNLLQCVCTG NG -RGEWKC	271
IGFBP-2 243	KHGRYNLKQCKMSLNGQRGECWC	265
	* * * * * * * * * *	

6) 最近、NGR モチーフが腫瘍血管で発現しているCD13アイソフォームに結合すること、そしてこのCD13は単球、破骨細胞でも発現していることが知られていることから、Fn分解産物 N 末端30kDa (Fn30kDa)が破骨細胞前駆細胞株 4B12細胞に結合するか否か、ビオチンラベルしたFn30kDa を用いて調べたところ、共局在することから、Fn30kDaはCD13に結合するものと考えられた。

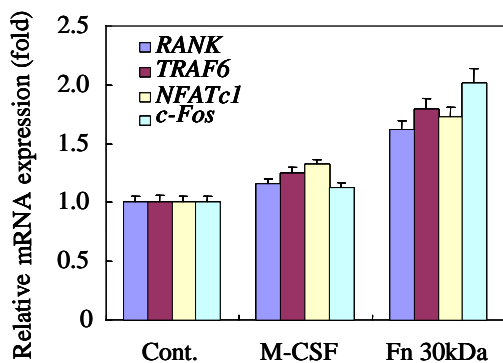
Fn30kDaとCD13との共局在



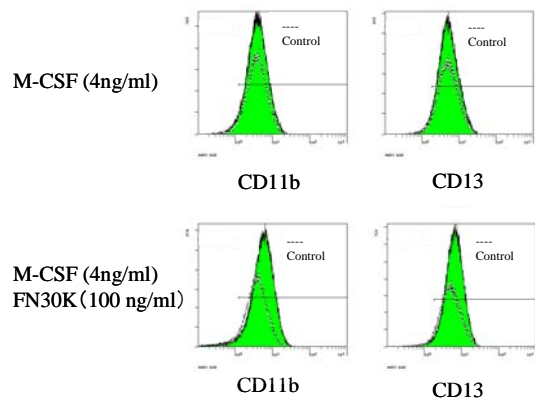
7) さらに破骨細胞分化における CD13 の局在を調べたところ、破骨細胞前駆細胞では細胞膜上に、分化した TRAP 陽性多核細胞では核周囲に、そして骨吸収を行っている成熟破骨細胞では ruffled border にその局在が認められた。



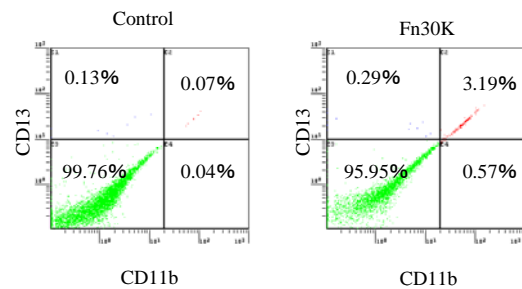
8) Fn30kDa 刺激による RANK、TRAF6、NFATc1、c-Fos 遺伝子発現に及ぼす作用を調べたところ、明らかにこれらの遺伝子発現を上昇させた。



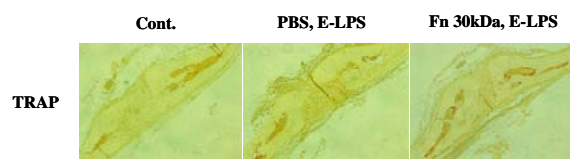
9) Fn30kDa 刺激による 4B12 細胞上の CD11b と CD13 の発現に対する影響を調べた。M-CSF 単独では CD11b/CD13 陽性細胞に変化はなかったが、M-CSF と Fn30kDa 共存下で 4B12 細胞を1週間培養したところ、明らかに CD11b/CD13 強陽性細胞へシフトした。



10) さらに、Fn30kDa のマウス腹腔内投与における *in vivo* での影響を調べた。Fn30kDa を4日間腹腔内に 0.625mg/kg 投与した後、末梢血中の CD11b/CD13 陽性細胞をベックマンコールターALTRA で解析したところ、Fn30kDa 投与によって明らかに CD11b/CD13 強陽性細胞が 0.07%から 3.19%に増加した。



11) 最後に、マウス頭蓋冠へのLPS局所投与における破骨細胞形成に対する Fn30kDa の腹腔内投与の影響を検討した。PBS または Fn30kDa を4日間腹腔内に 0.625mg/kg 投与した後、*E. coli*-LPS (0.1mg)を頭蓋骨部に局所投与し5日後の破骨細胞形成を調べたところ、明らかに Fn30kDa 投与によって頭蓋骨面に現れてくる破骨細胞の数が増加した。



[考 察] 間質細胞の培養上清中に存在する破骨細胞前駆細胞分化機能維持因子は、M-CSF 以外に Insulin-2、IGFBP-2、Nidogen-2、Fn 分

解産物 N 末端部分が同定された。IGFBP-2 と Fn 分解産物 N 末端部分で相同性の高いアミノ酸配列領域を BLAST で検索したところ、NGRGE の配列が発見された。この NGRGE を含む Fn30kDa は CD13 に結合し、破骨細胞前駆細胞の RANK、TRAF6、NFATc1、c-Fos 遺伝子発現を上昇させ、破骨細胞形成を促進させた。Fn30kDa 刺激は、*in vitro* 実験における破骨細胞前駆細胞 4B12 細胞上の CD11b/CD13 発現を上昇させるだけでなく、*in vivo* 実験によるマウス末梢血中の CD11b/CD13 強陽性細胞出現をも引き起こさせた。さらに、Fn30kDa 腹腔内投与は LPS 刺激による破骨細胞出現の上昇を引き起こした。Fn30kDa 中の Fn I 型ドメインは、Fn 内部のポリペプチドの繰り返し構造として発見された。つまり、破骨細胞前駆細胞維持活性を有する Fn N 末端 30kDa は、酵素で消化されて切られない限りは、表面に現れてこない部位である。この Fn I 型ドメインで構成されている Fn N 末端 30kDa は、Fn をトリプシン消化によって遊離されてくる断片であることも知られている。この Fn 分解産物 N 末端 30kDa が破骨細胞前駆細胞の CD13 に結合することによって破骨細胞前駆細胞からの成熟破骨細胞分化への潜在能力を高めるという今回の知見は、慢性歯周炎の重要な原因菌が *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* などのトリプシン様酵素産生菌であるというなぞを解き明かす糸口になるかもしれない。

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)

Shigeru Amano, Yu-Tzu Chang, Yasuhisa Fukui: ERK5 activation is essential for osteoclast differentiation. PLOS ONE, 17; 10(4): e0125054. (2015)

[学会発表] (計 3 件)

天野 滋、大森喜弘: 間質細胞から産生されている破骨細胞前駆細胞分化機能維持に影響する因子について. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会

Shigeru Amano, Yoshihiro Ohmori: Roles of N-terminal region of Fibronectin in maintaining of osteoclast precursors. The 57th Annual Meeting of Japanese Association for Oral Biology

Shigeru Amano, Yu-Tzu Chang, Yasuhisa Fukui: ERK5 activation is essential for the differentiation of preosteoclasts into osteoclasts. 4th Joint Meeting of ECTS and IBMS. Rotterdam, The Netherlands. 25 - 28 April 2015

[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

天野 滋 (AMANO SHIGERU)
明海大学・歯学部・准教授
研究者番号：90167958

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：