

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462318

研究課題名(和文) ADAM10を介した骨・軟骨形成の制御機構

研究課題名(英文) Regulation of bone and cartilage formation by ADAM10

研究代表者

依田 昌樹 (Yoda, Masaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：30464994

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)：本研究では膜型メタロプロテアーゼADAM10による骨・軟骨形成および破骨細胞分化の制御機構を明らかにすることを目的とした。軟骨特異的にADAM10を欠損させたマウスの解析から、軟骨細胞の最終分化にADAM10は必須であることが明らかとなった。また、骨芽細胞特異的にADAM10を欠損させたマウスの解析から、ADAM10を骨芽細胞で欠損させると血液中のTSLP濃度が上昇し重篤な皮膚炎を発症することが明らかとなった。さらに、ADAM10を欠損させた破骨細胞前駆細胞を用いた分化誘導実験から、ADAM10の基質であるNotchレセプターからのシグナルが破骨細胞分化を完全に抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the regulation mechanisms of bone / cartilage formation and osteoclast differentiation by membrane type metalloprotease ADAM10. Analysis of mice abrogated ADAM10 in cartilage revealed that ADAM10 is essential for final differentiation of chondrocytes. In addition, analysis of osteoblast-specific ADAM10 deficient mice revealed that these mice indicated an increase in TSLP concentration in the serum and exhibited severe dermatitis. Furthermore, the experiment for osteoclast differentiation using osteoclast precursor lacking ADAM10 revealed that the signaling from Notch receptor, which is one of substrates for ADAM10, on the cell membrane of osteoclast precursor completely suppresses osteoclast differentiation.

研究分野：骨・軟骨代謝

キーワード：ADAM10 骨・軟骨代謝 シェディング Notchシグナル

1. 研究開始当初の背景

正常な骨は常に活発な代謝（吸収と形成）によって恒常性が維持されている。この骨吸収と骨形成のバランスが破綻すると関節リウマチにおける骨関節破壊、骨粗鬆症、大理石病などの病態を呈する。このバランスの維持は破骨細胞、骨芽細胞をはじめとする骨髄微細環境中に存在する細胞間の秩序だった情報伝達が不可欠である。一般的に細胞間情報伝達には細胞膜上に発現する膜型蛋白質がレセプターもしくはリガンドとして機能している。この膜型蛋白質はさまざまな翻訳後の調節を受けて機能蛋白質として作用していることが知られており、この調節機構の一つとして shedding が挙げられる。この shedding を担う分子として近年 ADAM 分子が重要視されており、特に ADAM10 および ADAM17 が代表的分子として、炎症性疾患、癌、アレルギー疾患に関与する膜型蛋白質調節因子として研究が進められている。ADAM10 の基質蛋白質において代表的な分子として Notch およびカドヘリン（カテニンと結合し Wnt/カテニンシグナルを調節する）が挙げられる。Notch および Wnt/カテニンシグナルは細胞の運命決定、分化・増殖に関与しているだけでなく、白血病や癌といった疾患にも関連していることから制御機構の解明は重要であると考えられている。一方で、細胞膜分子を介したシグナル伝達は骨・軟骨代謝分野においても極めて重要な機構であり、近年 ADAM 分子が制御している機能調節機構が注目されつつある。また、Cre-loxP システムによる組織特異的遺伝子欠損（コンディショナルノックアウト；cKO）マウスの解析から、骨・軟骨代謝分野における shedding の重要性は徐々に理解されつつあるものの ADAM10 による機能調節機構への解釈はまだまだ乏しく、シグナル伝達機構を含めた一層の理解が必要である。

2. 研究の目的

Adam10 遺伝子欠損マウスでは Notch やカドヘリンが関与しているシグナル伝達の最上流においてシグナルを遮断することができるため有用なモデルと考え、骨・軟骨および破骨細胞において Adam10 を欠損させた cKO マウス系統をそれぞれ作出した。これらの cKO の *in vivo* および *in vitro* 解析から、新生仔および成獣における骨のリモデリングを含めた骨・軟骨形成における ADAM10 の機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

骨形成および骨代謝に関連する細胞群特異的に ADAM10 を欠損させるため、Cre-loxP システムにより軟骨細胞特異的 (II 型コラーゲンプロモーター制御下で Cre リコンビナーゼ発現)・骨芽細胞特異的 (Osterix プロモーター制御下で Cre リコンビナーゼ発現)・破骨細胞特異的 (Mx1 プロモーター制御下で Cre

リコンビナーゼ発現) Adam10 欠損マウス (それぞれ A10/Col2・A10/Sp7・A10/Mx1 マウス) を作出した。A10/Col2 および A10/Sp7 マウスにおいては表現型解析を中心に行った。また、破骨細胞分化における ADAM10-Notch シグナルの制御に関しては A10/Mx1 マウスより採取した骨髄細胞を用いた *in vitro* の実験系を中心に行った。

4. 研究成果

(1) ADAM10 は軟骨最終分化を制御している

ADAM10 が軟骨分化を制御しているかを検証するために、II 型コラーゲンプロモーター制御下で Adam10 を欠損させたマウスモデル (A10/Col2 マウス) を中心に表現系解析および遺伝子発現解析を中心に行った。A10/Col2 マウスはメンデルの法則に従って出生してくるが、離乳をさかいに死亡個体が目立ち 8 週齢まで生存する個体はわずかであった。また A10/Col2 マウスは 2 週齢で顕著な体重減少を示し、長管骨は 4 週齢において有意に短縮していることが観察された。また組織学的観察から A10/Col2 マウスは 3 週齢において二次骨化中心の出現が遅延していることが観察された (図 1)。しかし、この現象は一過性であり 8 週齢の段階では野生型マウスと比較して差は見られなかった。軟骨細胞の増殖について検討を行ったところ、2 週齢における BrdU 取り込み実験において組織学的に有意な差は見られなかった。さらに新生仔から採取した肋軟骨細胞の増殖実験においても有意な差は見られなかった。しかし組織学的観察により A10/Col2 マウスの肥大軟骨細胞層の短縮が観察され、さらに肥大軟骨細胞が小型化していることが明らかとなった。2 週齢における膝軟骨の遺伝子発現解析から Notch シグナルの下流分子である Hes1 Hey1, HeyL が A10/Col2 マウスにおいて有意に低下していることが明らかとなった (図 2A)。また軟骨最終分化マーカーである Mmp13 の有意な発現低下が A10/Col2 マウスにおいて観察された (図 2B)。これらの結果から、A10/Col2 マウスでは Notch シグナルの低下によって軟骨細胞の最終分化に異常をきたし、重度な成長障害を呈することが明らかとなった。

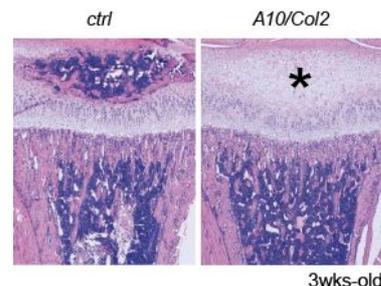


図 1 3 週齢における脛骨の組織像
A10/Col2 マウスでは二次骨化中心の出現が遅延している (*)

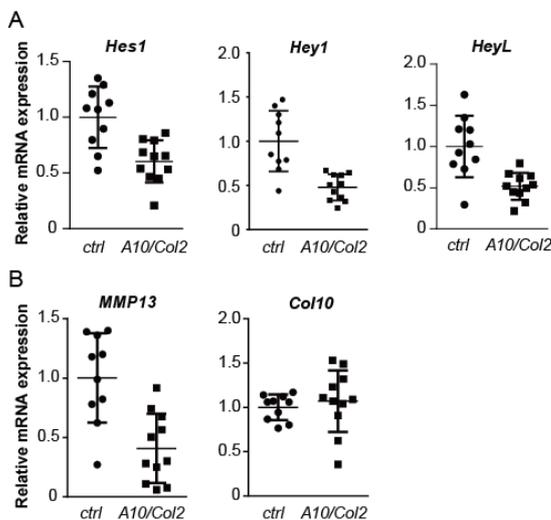


図2 2週齢の膝軟骨における遺伝子発現
A, Notch シグナル下流分子の遺伝子発現
B, 軟骨最終分化マーカーの遺伝子発現

(2) 骨芽細胞において ADAM10 を欠損すると重篤な皮膚炎を生じる

骨芽細胞特異的に ADAM10 を欠損させるために、オステリックス (Sp7) プロモーター制御下で *Adam10* を欠損させたマウスモデル (*A10/Sp7* マウス) を作出した。このマウスモデルは Tet-off システムが導入されており、通常は Cre リコンビナーゼが発現しており *Adam10* 遺伝子が Sp7 プロモーター制御下で欠失するが、ドキシサイクリン (Dox) 存在下では Cre リコンビナーゼ発現が抑えられており *Adam10* 遺伝子の欠損は生じない。最初に、Dox 投与なしの環境下で飼育した 8 週齢の個体における骨形態計測を行った結果、*A10/Sp7* マウスは骨量の低下傾向が認められた。また、大変興味深いことに *A10/Sp7* マウスでは 7 週齢で重篤な皮膚疾患が観察された。Sp7 は成獣では骨芽細胞特異的に発現するとされているが、胎生期に Sp7 を発現した細胞の一部が新生仔の骨髄中のストローマ細胞に分化するという報告がある。そこで *A10/Sp7* マウスでみられた皮膚疾患の表現型が成獣の骨芽細胞における ADAM10 欠損によって生じているかどうかを確認するために、胎児期から離乳 (3 週齢) まで Dox 投与し、Dox 投与解除 4 週後に解析を行った結果、同様な皮膚疾患が観察された (図 3A)。しかし、Dox 投与を続けた群では *A10/Sp7* マウスにおいても皮膚疾患は観察されなかった (図 3B)。この結果から、骨芽細胞で ADAM10 を欠損させると重篤な皮膚疾患が生じることが示された。また、組織学的解析およびフローサトメトリー解析の結果から *A10/Sp7* マウスでは軽度の脾腫および脾臓における骨髄系細胞の増加が観察された。以前 ADAM10 を *Mx1* プロモーター下制御下で欠損したマウス (*A10/Mx1* マウス) の解析を行い、重度の脾腫および骨髄系細胞の著しい増加が認められた。その一因として血清中の顆粒球コロニ

一刺激因子 (G-CSF) の増加が関与していることを示し報告した (yoda *et al.*, 2011)。また未発表ではあるが *A10/Mx1* マウスにおいて *Adam10* 遺伝子を欠損させてから 6 か月後の個体で同様な皮膚疾患が観察され、皮膚疾患に關与するサイトカインである胸腺間質性リンパ球新生因子 (TSLP) が 12 週齢で有意に増加していることが確認されている。そこで 7 週齢の *A10/Sp7* マウスの血清中 G-CSF 濃度を測定したところ野生型マウスと比較して有意な差は見られなかったが、TSLP の血清中濃度は有意に上昇していた。この結果から、*A10/Sp7* マウスにおける重篤な皮膚疾患は TSLP によって引き起こされている可能性が考えられた。しかしながら、上皮細胞が産生する TSLP がなぜ骨芽細胞特異的に ADAM10 を欠損させたマウスにおいて高値を示すのかは明らかになっておらず、今後の検討課題として残った。

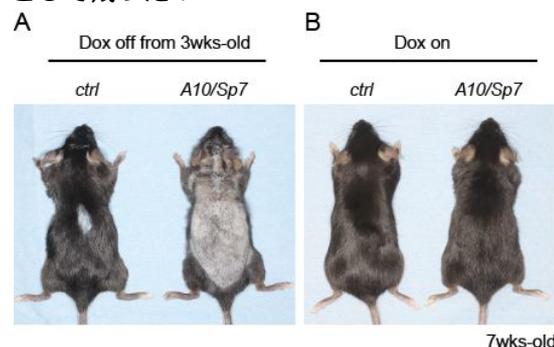


図3 *A10/Sp7* マウスにおける皮膚疾患

(3) 破骨細胞前駆細胞における ADAM10-Notch シグナルは破骨細胞分化を制御している

骨代謝において正常な骨形成は秩序だった骨吸収のもとに成り立っている。骨吸収は破骨細胞によって担われているが、破骨細胞の分化には周囲の細胞からの刺激が影響している。研究代表者は無秩序な破骨細胞分化は骨吸収亢進が生じ骨組織の恒常性が維持されないため、破骨細胞前駆細胞が周囲の細胞から分化抑制制御を受けている可能性を考えた。これまで各種の幹細胞および前駆細胞が Notch シグナルにより分化が抑制され未分化性を維持しているという報告がある。そこで、破骨細胞前駆細胞に働く分化抑制機構の候補として Notch シグナルを考え実験を行った。In vitro での分化誘導実験の系で、Notch シグナルが破骨細胞前駆細胞の分化を制御している可能性を検証するため、人為的に細胞培養プレートに Notch リガンド (Delta-like 1, Jagged1) を固相化し実験に用いた。野生型マウスから骨髄細胞を採取し、マクロファージコロニー刺激因子存在下で培養することにより破骨細胞前駆細胞を作出し、RANKL 刺激により破骨細胞分化を上述の培養プレート上で行った。驚くことに、リガンドを固相化したプレート (5 $\mu\text{g/mL}$) 上では破骨細胞分化は全く起こらなかった。さらに、リガンドを固相化した条件において

RANKL 刺激 1 日後の細胞の遺伝子発現解析を行った結果、破骨細胞分化に必須な転写因子である *Nfatc1* および *Fos* の発現が低下していた。一方で、*Nfatc1* および *Fos* を抑制する分子 (*Irf8*, *Maib*) の遺伝子発現が上昇していた。近年、ADAM10 は Notch シグナル伝達には必須な分子であることが明らかとなってきた。そこで、骨髄細胞で ADAM10 を欠損させた *A10/Mx1* マウスから誘導した破骨細胞前駆細胞を用いてリガンド固相化培養プレート上で分化誘導を行った。その結果、破骨細胞分化が誘導され、上述の *Irf8* および *Maib* の発現も抑えられていた。これらの結果から、Notch シグナルが *Irf8* および *Maib* の遺伝子発現を上昇させ破骨細胞分化を抑制している可能性が示唆された。さらに生体内において、破骨細胞前駆細胞が周囲の細胞からの Notch リガンド刺激により分化抑制している可能性を検証するため骨髄移植実験を行った。その結果、Notch シグナルが伝達されない *A10/Mx1* マウスの骨髄を野生型に移植すると骨量が有意に低下することが明らかとなった。このことから生体内においても破骨細胞前駆細胞は Notch シグナルにより分化を抑制されている可能性が考えられた。

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 2 件)

- (1) Mizuno S, Yoda M, Shimoda M, Tohmonda T, Okada Y, Toyama Y, Takeda S, Nakamura M, Matsumoto M, Horiuchi K. A Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10) Is Indispensable for Maintenance of the Muscle Satellite Cell Pool. *J Biol Chem*. 2015 Nov 20;290(47):28456-64. doi: 10.1074/jbc.M115.653477. 査読あり
- (2) Uchikawa S, Yoda M, Tohmonda T, Kanaji A, Matsumoto M, Toyama Y, Horiuchi K. ADAM17 regulates IL-1 signaling by selectively releasing IL-1 receptor type 2 from the cell surface. *Cytokine*. 2015 Feb;71(2):238-45. doi: 10.1016/j.cyto.2014.10.032. 査読あり

[学会発表](計 4 件)

- (1) 水野早季子, 依田昌樹, 松本守雄, 中村雅也, 堀内圭輔. 筋衛星細胞における ADAM10 の機能解析. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 2015 年 10 月 22-23 日, 富山国際会議場(富山県, 富山市)
- (2) 水野早希子, 依田昌樹, 松本守雄, 中村雅也, 堀内圭輔. ADAM10-Notch シグナルは筋衛星細胞の恒常性維持に必須である. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会,

2015 年 7 月 23-25 日, 京王プラザホテル (東京都, 新宿区)

- (3) 依田昌樹, 水野早希子, 秋山治彦, 戸山芳昭, 松本守雄, 堀内圭輔. 軟骨細胞における ADAM10-Notch シグナルの抑制は顕著な成長障害を来たす. 第 28 回日本骨代謝学会, 2015 年 3 月 6-7 日, 東京医科歯科大学(東京都, 文京区)
- (4) 依田昌樹, 水野早希子, 秋山治彦, 松本守雄, 戸山芳昭, 堀内圭輔. 軟骨特異的な ADAM10-Notch シグナルの抑制は顕著な成長障害を来たす. 第 32 回日本骨代謝学会学術集会, 2014 年 7 月 21-26 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)

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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

依田 昌樹 (YODA MASAKI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 30464994

(2) 研究分担者

堀内 圭輔 (HORIUCHI KEISUKE)
慶應義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号: 30327564

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし