

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：83903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670182

研究課題名(和文)破骨細胞の骨基質認識に関わる遺伝子群の網羅的機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of multiple genes related to osteoclastic recognition to bone matrix

研究代表者

竹下 淳(TAKESHITA, SUNAO)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・国立長寿医療研究センター・研究室長

研究者番号：50263009

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)：申請者らが同定したCthrc1のカルシウム依存性遺伝子発現誘導のメカニズムを解明するために破骨細胞の骨基質認識制御に関わる遺伝子をマイクロアレイを用いて検索し、カルシウムにより発現上昇する遺伝子としてインテグリン 3、カルシトニン受容体、及びAtf3/7などを同定した。Atf3/7を破骨細胞で強制発現するとCthrc1やインテグリン 3の遺伝子発現が上昇することを突き止めた。さらに、インテグリン 3/ vは骨基質中のヒドロキシアパタイトを直接認識することを明らかにした。以上のことから、破骨細胞は骨吸収を介して自身の活性化とカップリングを促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found Cthrc1 as a coupling factor which is transcriptionally up-regulated by bone resorption. Then, to define a mechanism in which genes are regulated by bone resorption in osteoclasts, we screened genes regulating by bone matrix and calcium by a microarray. We successfully identified Itgb3, Calcr and Atf3/7, which are highly increased in osteoclasts cultured in the presence of high calcium. Enforced expression of Atf3/7 in osteoclasts increased the expression of Cthrc1, Itgb3 and Calcr mRNA, suggesting that the expression of Atf3/7 induced by bone resorption up-regulates both bone resorbing function and bone formation by a coupling mechanism.

研究分野：骨細胞生物学、骨代謝学

キーワード：骨代謝 骨吸収 骨基質

1. 研究開始当初の背景

骨吸収から骨形成へのカップリング機構は骨代謝を制御する重要なメカニズムの一つであり、近年その実体が少しずつ明らかにされつつある。申請者らは、破骨細胞が骨吸収特異的に分泌し骨形成を促進するカップリング因子として *Cthrc1* を同定した (Takeshita, 2013)。*Cthrc1* は、破骨細胞による骨吸収により骨基質から遊離されるカルシウムの濃度上昇により遺伝子発現が誘導されることを突き止め、同様な遺伝子発現パターンを有するものとしてインテグリンβ3 とカルシトニンレセプターを見出した。両受容体分子は破骨細胞分化に特異的に発現上昇し、それぞれ基質認識と骨吸収を司る重要な因子である。申請者らは、独自にインテグリンαv/β3 がビトロネクチン以外にヒドロキシアパタイト (HA) を認識することを突き止めた。そこで、これらの遺伝子発現がどのような転写制御を受け発現変動するのかを解析し、その制御機構を解析することにより骨吸収機能の本質を解明する。

2. 研究の目的

骨吸収から骨形成へのカップリング (共役) を制御する因子として *Cthrc1* を同定することに成功し、その遺伝子発現が骨吸収により骨基質から遊離されるカルシウムの濃度上昇により誘導されることを突き止めた。そこで、破骨細胞の骨基質への接着シグナルにより発現上昇する遺伝子群と骨吸収により制御される遺伝子群をマイクロアレイを用いて網羅的に発現解析し、破骨細胞における *Cthrc1* の発現制御機構を解明することにより破骨細胞の骨基質認識から骨吸収に至るまでに必須な因子を同定し、骨吸収の本質を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス骨髄細胞から破骨細胞を分化誘導し、骨髄由来マクロファージ (BMM)、単核プレ破骨細胞 (pOC)、非活性化破骨細胞 (mOCp)、活性化破骨細胞 (mOCd)、脱灰骨基質上培養破骨細胞 (mOCdd)、カルシウム添加破骨細胞 (mOCpCa)、低接着性単核破骨細胞 (mnOCsp)、低接着性破骨細胞 (mOCsp) の細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った (図1)。

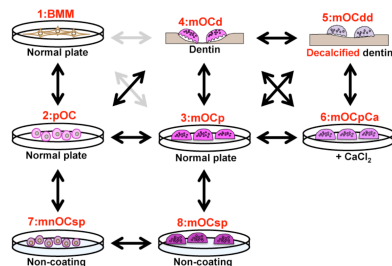


図1 マイクロアレイ解析に用いた種々の破骨細胞

(2) カルシウムで発現上昇する転写因子を特定し、cDNA クローニングしたものをレトロウイルスを用いてマクロファージで強制発現し、破骨細胞分化後に *Cthrc1* 遺伝子の発現を RT-PCR で解析した。

(3) レトロウイルスを用いてインテグリン αv (Itgav) とインテグリン β3 (Itgb3) を強制発現する L 細胞を樹立し、ヒドロキシアパタイトに対する接着性を解析した。カテプシン K-cre マウスとの交配により破骨細胞特異的 Itgav コンディショナル KO (cKO) マウスから骨髄細胞を採取し、BMM を調整した。Itgb3 遺伝子の発現を阻害する shRNA をレンチウイルスを用いて Itgav cKO BMM 細胞で Itgb3 を KO した細胞を作成し、M-CSF と RANKL により破骨細胞に分化誘導し、破骨細胞形成と骨吸収機能を解析した。

4. 研究成果

(1) 種々の培養条件下の破骨細胞におけるインテグリンの遺伝子発現
種々のインテグリンの中で Itgav、Itgb2、Itgb3、及び Itgb7 の発現が成熟破骨細胞で高く、特に Itgav と Itgb3 は種々の破骨細胞全般で高い発現が維持された (図2)。また、Itgav と Itgb3 はカルシウムと骨基質の両方の刺激で発現が上昇した。

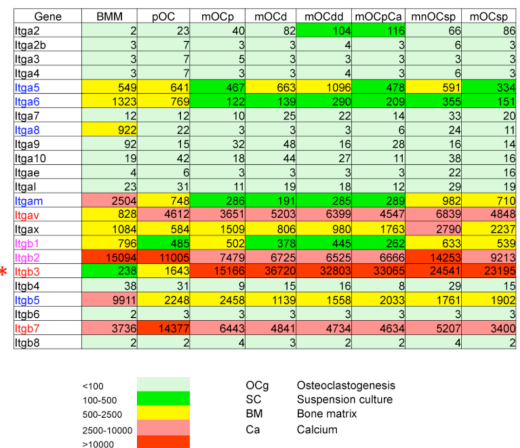


図2 破骨細胞におけるインテグリンの発現

(2) 種々の培養条件下の破骨細胞における遺伝子発現の変化 (破骨細胞で機能する遺伝子群)

Acp5 (Trap) の破骨細胞における遺伝子発現は培養条件により差は見られなかった。プロトンポンプ遺伝子群 (Atp6) は総じて破骨細胞で発現が高いが、カルシウムや骨基質による変動は見られなかった。また、骨吸収機能に重要な Car2、Clcn7、Ctsk、及び Mmp9 も同様に破骨細胞で高く、培養条件による差は見られなかった。興味深いことに、カルシウムの添加により *Cthrc1* だけではなく *Anxa8*、*C3*、*Pdgfa*、*Calcr*、*Nrp*、及び *Trem2* が発現上昇した (図3 AB)。さらに、骨基質により *Anxa8*、*Pdgfa*、*Pdgfb*、*Vegf*、*Fcgr2b*、*Nrp*、*c-Fos*

及び Dscr111 が上昇し、C3、Opn、Vegfc、Calcr、及び Oscar は減少した (図 3 ABC)。最も興味深いことに、bZIP ファミリーに属する転写因子である Atf3 と Atf7 はともにカルシウムで発現上昇し、骨基質により逆に発現低下することが判明した (図 3 C)。これら 2 つの転写因子がカルシウムによる発現上昇を制御している可能性が示唆された。Atf3 は Jdp2 により直接発現が抑制されヒストンのアセチル化を阻害することが知られている。また、Jdp2 KO マウスは破骨細胞形成が障害され大理石骨病を発症することも報告されている。

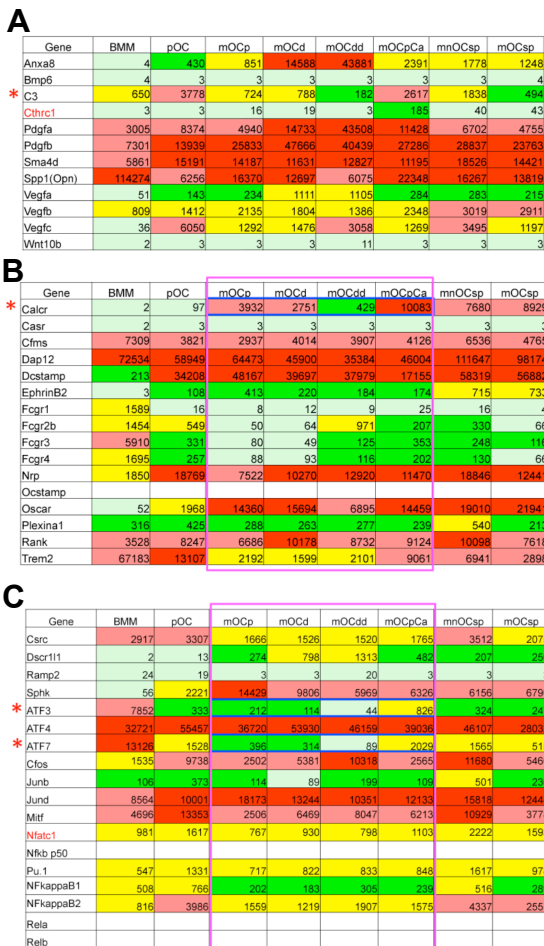


図 3 破骨細胞で機能する遺伝子群の発現解析

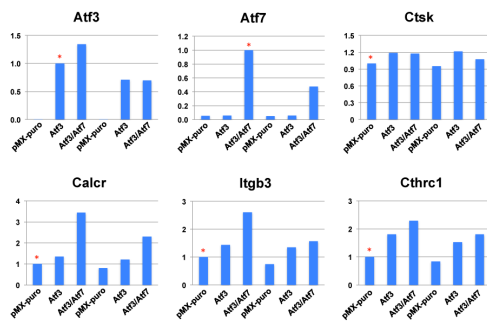


図 4 Atf3/Atf7 の強制発現はカルシウムの添加を模倣し、Cthrc1、Itgb3、及び Calcr の発現を上昇させる

(3) Atf3/Atf7 の破骨細胞における強制発現
そこで、破骨細胞において Atf3/Atf7 が Cthrc1 や Itgb3 の発現を上昇させるかどうかを解析するために、BMM で Atf3/Atf7 を強制発現させ、破骨細胞へ分化させたのちに RT-PCR によりそれぞれの遺伝子発現を解析した。その結果、Atf3/Atf7 の両方を強制発現させると Cthrc1 のみならず Calcr と Itgb3 の発現が上昇することが分かった (図 4)。また、これらの発現は Ctsk の発現には影響を与えなかった。

(4) Itgav/Itgb3 の強制発現

インテグリンは、ビトロネクチンやフィブロネクチンなどの RGD 配列を含むもの、コラーゲンやラミニンなどの基質タンパクや LFA-1 や ICAM-1 などの白血球の表面抗原などと結合し、細胞接着や増殖など様々な生理機能を発揮する。破骨細胞は、インテグリン $\alpha v / \beta 3$ を介して骨基質に強く接着し骨吸収機能に重要な役割を果たすことが知られている。インテグリンの中には、前述した基質タンパク以外にカドヘリンやその他の分子と結合することが知られているものもある。そこで、生体内においてヒドロキシアパタイトと破骨細胞のみが骨表面に局在すること、及びインテグリン $\alpha v / \beta 3$ は破骨細胞において特異的に発現上昇することなどから、インテグリン $\alpha v / \beta 3$ がヒドロキシアパタイトと結合するのではないかという仮説を立てた。まず、Itgav/Itgb3 遺伝子をマウス L 細胞で強制発現させ、ヒドロキシアパタイトでコートしたプレート上に特異的に結合するかどうかを調べた。その結果、コントロールのインテグリンを発現しない細胞と比較し、ヒドロキシアパタイトに対して明らかに接着性が高くなっていることが分かった (図 5)。さらに、この接着はインテグリンのリガンドである RGDS ペプチドの添加により濃度依存的に阻害されることからヒドロキシアパタイトへの結合がインテグリンを介していることが分かった (図 6)。

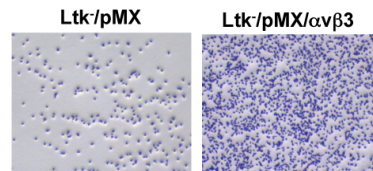


図 5 Itgav/Itgb3 の強制発現はヒドロキシアパタイトへの結合を増強する

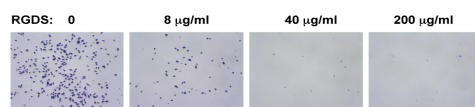


図 6 Itgav/Itgb3 の強制発現によるヒドロキシアパタイトへの結合は RGDS ペプチドで阻害される

(5) Itgav/Itgb3 欠損は骨吸収活性を抑制する

Itgb3 のノックアウトマウスはアクチンリングの形成不全により骨吸収活性が低下し骨量が増加することが知られている。ところが、Itgav/Itgb3 のダブルノックアウトマウスに関する報告はない。尚、Itgav のノックアウトマウスは胎生致死であることから骨解析に関する報告はない。そこで、カテプシン K-cre マウスを用いて破骨細胞特異的 Itgav cKO マウスを作出し、ex vivo で Itgb3 shRNA によりノックダウンし、Itgav/Itgb3 dKO 破骨細胞を作成した。Itgav 単独の KO 細胞はコントロールと比較し、破骨細胞形成と骨吸収活性に差は認められなかった (図 7)。Itgb3 単独の KO は骨吸収活性が低下し、dKO 破骨細胞は有意に骨吸収活性が低下した。

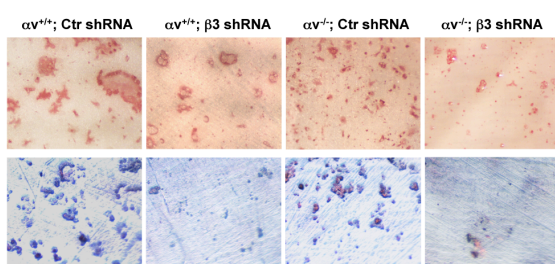


図 7 Itgav/Itgb3 の欠損は骨吸収活性を低下する

以上のことから、破骨細胞による骨吸収により骨基質から遊離したカルシウムや骨基質成分そのものにより破骨細胞内で Cthrc1、Calcr や Itgb3 などの特異的な遺伝子発現が上昇し、さらにそれら自身の遺伝子発現を上昇することで破骨細胞形成を促進するとともに骨基質への接着を促進することで骨吸収活性を効率良く活性化すること、及び Cthrc1 の発現上昇を介してカップリング機能を促進することが示唆された。

<引用文献>

- ① Takeshita S, Fumoto T, Matsuoka K, Park KA, Aburatani H, Kato S, Ito M, Ikeda K. Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption to formation. *J Clin Invest.*, **123**:3914-3924, 2013.

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 7 件)

- ① Ikeda K, Takeshita S. The role of osteoclast differentiation and function in skeletal homeostasis. *J*

Biochem., **査読有** 159:1-8, 2015

- ② Rahman MM, Takeshita S, Matsuoka K, Kaneko K, Naoe Y, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Ikeda K. Proliferation-coupled osteoclast differentiation by RANKL: cell density as a determinant of osteoclast function. *Bone.*, **査読有** 81:392-399, 2015.
- ③ Rahman MM, Matsuoka K, Takeshita S, Ikeda K. Secretion of PDGF isoforms during osteoclastogenesis and its modulation by anti-osteoclast drugs. *Biochem Biophys Res Commun.*, **査読有** 462:159-164, 2015.
- ④ Ikeda K, Takeshita S. Factors and mechanisms involved in the coupling from bone resorption to formation: How osteoclasts talk to osteoblasts. *J Bone Metab.*, **査読有** 21:163-167, 2014.
- ⑤ Takeshita S, Fumoto T, Naoe Y, Ikeda K. Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL. *J Biol Chem.*, **査読有** 289:16699-16710, 2014.
- ⑥ Matsuoka K, Park KA, Ito M, Ikeda K, Takeshita S. Osteoclast-derived complement component 3a stimulates osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.*, **査読有** 29:1522-1530, 2014.
- ⑦ Fumoto T, Takeshita S, Ito M, Ikeda K. Physiological functions of osteoblast lineage and T cell-derived RANKL in bone homeostasis. *J Bone Miner Res.*, **査読有** 29:830-842, 2014.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Takeshita S, Rahman MM, Ikeda. Proliferation-coupled osteoclast differentiation by RANKL. (ポスター発表) The 37th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. Seattle, Washington, USA, Oct. 10, 2015.
- ② 竹下 淳、破骨細胞が産生するカップリング因子 第 33 回日本骨代謝学会 “骨代謝カップリング機構の新展開” (シンポジウム講演)、東京 2015 年 7 月 25 日
- ③ Matsuoka K, Ikeda K, Takeshita S. Osteoclast-derived coupling factor Cthrc1 stimulates osteoblast differentiation through Rac1/PKCδ/ERK. (ポスター発表) The 36th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. Houston, Texas, USA, Sep. 12, 2014

- ④ 竹下 淳、Osteoclast-secreted Coupling Factors. 第11回 Bone Biology Forum 三島 2014年8月23日

[図書] (計4件)

- ① 竹下 淳、RANKL-RANK 系と骨リモデリング・カップリングのメカニズム 骨・臓器ネットワークとオステオサイト 臨床骨ネットワーク研究会 メディカルビュー社 p35-43, 2016.
- ② 竹下 淳、骨形成のメカニズム 骨・関節・軟骨治療のための新製品開発と臨床ニーズ 第3章 骨再生、骨破壊のメカニズム 株式会社情報協会、第3節 p52-56, 2015.
- ③ 竹下 淳、Keyword Cthrc1 骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典 日本骨代謝学会編集 羊土社 第2部6章、p193-195, 2015.
- ④ 竹下 淳、骨吸収から骨形成へのカップリング 実験医学 32:126-132, 2014.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncgg.go.jp/department/bjd/bjd/research.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 淳 (TAKESHITA, Sunao)

国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター・研究所運動器疾患研究部骨代謝制御研究室・研究室長

研究者番号： 50263009