

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670803

研究課題名(和文)胎生期のマクロファージを起源とする破骨細胞：新規細胞系譜解析と骨代謝制御

研究課題名(英文)Osteoclastogenesis from embryonic macrophages: Novel cell fate analysis and regulation of bone metabolism

研究代表者

久木田 敏夫(Kukita, Toshio)

九州大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70150464

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)：破骨細胞が胎生期マクロファージに由来する可能性について検討した。「Fate Mapping法」による実証を試みたが解析が困難となった。そこで胎生期のマクロファージ系細胞に由来すると考えられる新生仔の破骨細胞について解析を行なった。マクロファージ分化誘導能を持つ転写因子WT1の遺伝子発現について検討したところ新生仔破骨細胞がアンチセンスRNA(WT1asRNA)を高発現することを見出した。破骨前駆細胞にWT1asRNAを過剰発現させたところ、破骨細胞分化が顕著に促進された。これらの結果から、少なくとも新生仔ラットは胎仔期の前駆細胞から形成される際にWT1asRNAによる制御を受けることが分った。

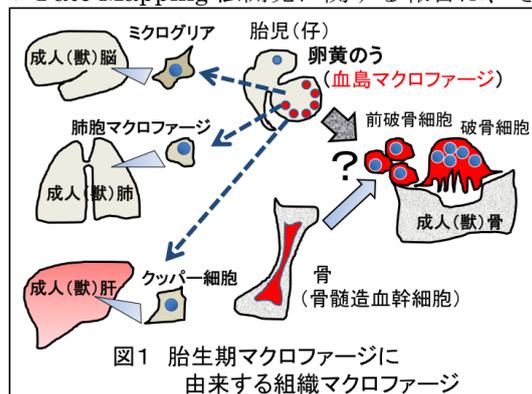
研究成果の概要(英文)：Purpose of this research is to verify a hypothesis that osteoclasts are derived from macrophages observed in the embryonic stages. As we could not obtain mice required for performing Fate Mapping analysis of the early embryonic macrophages, we have changed research strategy. We have characterized the properties of osteoclasts present in newborn animals, which are supposed to be formed from cells in macrophages-lineage present in embryos. We have focused on investigating an involvement of WT1, zinc-finger transcription factor having the ability to induce macrophage differentiation, in the generation of osteoclasts present in newborn rats. We have detected a marked expression of antisense RNA for WT1(WT1asRNA) in active osteoclasts present in newborn rats. Over-expression of WT1asRNA in osteoclast precursors significantly augmented osteoclastogenesis. These data show that osteoclastogenesis is controlled by WT1asRNA at least in osteoclastogenesis from fetal osteoclast precursors.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：破骨細胞 胎生期マクロファージ Fate Mapping解析 アンチセンスRNA 新生仔破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

組織マクロファージの由来は骨髄に存在する造血幹細胞であるという説が長い間信じられて来た。即ち、骨髄造血幹細胞から分化した単球が体内を循環している様々な臓器に浸潤し、各組織に特有のマクロファージ（肝臓のクッパー細胞、肺の肺泡マクロファージ、脳のマクログリア等）になると考えられていた。ところで、特定の分化状態にある細胞がどのような細胞に分化していくかを解析する細胞系譜解析法がフランス人の Le Douarin 博士によって開発された。この Le Douarin 博士の革新的な方法論により、多くの細胞の発生学上の運命が明らかになり、発生生物学が著しく進歩した。Le Douarin 博士はウズラ・ニワトリキメラ胚作成技術を開発し形態学的手法によって移植細胞の運命を追跡した。この方法はニワトリ胚を用いた移植実験系において、移植したウズラの細胞と宿主のニワトリの細胞を核の形態の違いによって識別する、という熟練と労力を要する手法であった。近年、遺伝子改変マウス技術を巧みに利用した新しい細胞系譜法 Fate Mapping 法が Ginhoux 等 (Science 2010) によって開発された。この方法は細胞が特定の分化状態になってマーカー遺伝子を発現するようになると蛍光蛋白質を発現して光る細胞となり、その後分化して他の細胞になっても光り続ける為、細胞系譜を追跡できる斬新かつ厳密な方法論である。「Fate Mapping 法」と呼ばれるが、Le Douarin 博士の系譜解析法をしのぐ、発生生物学上、極めて重要な方法論である。Ginhoux 等の Science 誌での Fate Mapping 法開発に関する報告は、そ



れまで骨髄幹細胞にのみ由来すると考えられてきた脳のマクログリアが胎生期の血島マクロファージに由来し、この胎生期マクロファージが発生中の脳に移動し、そのまま住みついたものがマクログリアである、という衝撃的な報告であった (図1)。更に炎症時には骨髄造血幹細胞に由来する単球が炎症で緩慢になった脳血液関門を通過して炎症性のマクログリアになることも分かっている。

破骨細胞は骨の組織マクロファージとして分類される細胞であるが、骨髄造血幹細胞

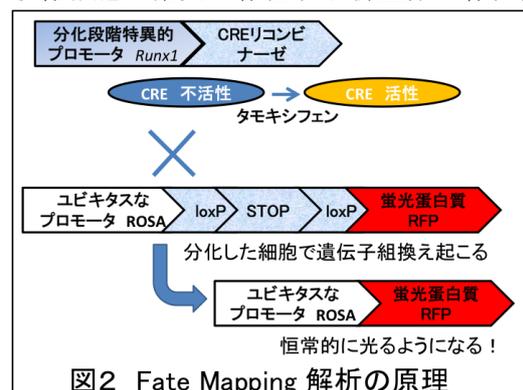
に由来することが知られている。骨は常に新陳代謝されており、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成により常に骨改造されている。この恒常的な骨改造において主役を演ずる破骨細胞と、関節炎周囲の骨破壊や歯周病における歯槽骨吸収等に関与する「病的破骨細胞」とを比較すると、明らかに機能や制御の違いが認められ、異なる細胞ポピュレーションを形成している可能性が考えられる。しかしながら、破骨細胞は「骨髄に存在する造血幹細胞に由来する」ということが前提となって研究されており、その由来に関する議論は長い間、影を潜めていた。しかしながら、マクログリアや表皮のランゲルハンス細胞等の組織マクロファージの多くが、胎生初期の血島マクロファージに由来することを考えると、胎生期後期から形成される骨髄に存在する骨髄マクロファージや破骨前駆細胞も胎生期マクロファージに由来し、出生後でも成体に残存している可能性が高い。

2. 研究の目的

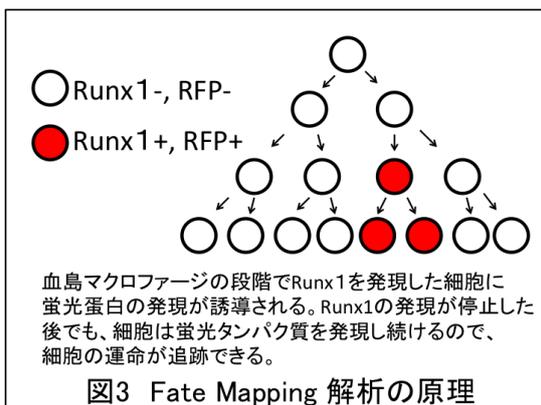
本研究では破骨細胞の由来に関する研究に Fate Mapping 法等を用いて破骨細胞の一部に胎生期マクロファージに由来するポピュレーションが存在する可能性を検討することを目的とした (図1)。胎仔性の細胞に由来すると考えられる新生仔の破骨細胞について、マクロファージ分化誘導遺伝子の発現を解析した。更に恒常的な骨改造を営む「正常な破骨細胞」と骨破壊を営む「病的な破骨細胞」について、それぞれの破骨細胞の前駆細胞ポピュレーションについて、胎仔性細胞の関与の違いも検討することとした。

3. 研究の方法

胎生期マクロファージの分子マーカーである転写因子 GATA-2 のプロモーター下流に Cre リコンビナーゼ (タモキシフェン感受性) を結合させたコンストラクトを導入したトランスジェニックマウスを準備する。このマウスと ROSA マウスを交配し、胎仔の造血が開始する時期に合わせて母体にタモキシフェンを投与し、胎生期マクロファージに蛍光タンパク質を発現させ、その後の追跡をおこなうこととした (図2、図3)。一方、胎生期マクロファージや造血幹細胞に由来する破骨細胞が確実に存在する新生仔の骨組織



について、マクロファージ分化を制御する遺伝子である WT1 遺伝子について発現解析を行った。



#### 4. 研究成果

Fate Mapping 解析に必要な Cre マウスの入手が手続き上、困難となったため、当研究室で Cre マウスの作成を試みたが、失敗に終わり、破骨細胞内での Fate Mapping 法による解析を断念せざるを得なかった。そこで、胎生期の前駆細胞から形成された破骨細胞を有する新生仔ラットの破骨細胞について解析を行った。小児腎癌 Wilms 腫瘍の原因遺伝子であり癌抑制遺伝子でもある WT1 遺伝子の産物である Zn finger 型転写因子 WT1 は腎形成に必須の分子であるとともに、マクロファージ分化を誘導する能力を有することが知られている。ラット新生仔の顎骨に於ける WT1 遺伝子の発現を特異的 RNA プローブを用いて解析したところ、WT1mRNA の極低レベルの発現が歯槽骨に存在する新生仔破骨細胞に認められた。全く予期していなかった所見であるが、非常に高レベルの WT1 アンチセンス RNA (WT1asRNA) を新生仔破骨細胞が発現することを見出した。更に、マウス破骨前駆細胞株 RAW-D 細胞を用いて WT1asRNA の機能を解析したところ、RANKL 依存性の破骨細胞形成を WT1asRNA が顕著に促進することを見出した。胎生期のマクロファージ系の細胞に由来すると考えられる新生仔破骨細胞の分化にアンチセンス RNA によるユニークな制御機構が存在していることを初めて見出した。この新生仔破骨細胞に於ける WT1asRNA 発現と機能に関するデータを *American Journal of Pathology* に投稿し、最近、受理された(現在、印刷中)。研究期間は終了したが、今後、Fate Mapping 法を用いた詳細な解析を進めていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

- 1) Extremely High Expression of Antisense RNA for Wilms' Tumor-1 in Active Osteoclasts: Suppression of WT1 protein expression during osteoclastogenesis  
Yin-Ji Li, A Kukita, Yukari Nakamura-Kyumoto, Toshio Kukita  
*Am J Pathol (in press)*
- 2) Membrane nanotube formation in osteoclastogenesis. Kukita T, Takahashi A, Zhang JQ, Kukita A. *Methods Mol Biol.* 1313:193-202, 2015.
- 3) Regulation of osteoclastogenesis through Tim-3: A possible involvement of Tim-3/galectin-9 system in the modulation of inflammatory bone destruction. Moriyama K., Kukita A., Li Y-J., Uehara N., Zhang J-Q., Takahashi I., Kukita T. *Lab. Invest.* 94(11):1200-1211, 2014.
- 4) Mesenchymal stem cell markedly suppress inflammatory bone destruction in rats with adjuvant-induced aarthritis. Takano T., Li Y-J., Kukita A., Yamaza T., Ayukawa Y., Moriyama K., Uehara N., Nomiyama H., Koyano K., Kukita T. *Lab. Invest.* 94:286-296,2014.
- 5) Tunneling nanotube formation is essential for the regulation of osteoclastogenesis. Takahashi A., Kukita A., Li Y-J., Zhang JQ., Nomiyama H., Yamaza T., Ayukawa Y., Koyano K., Kukita T. *J. Cell. Biochem.* 114:1238-1247, 2013.
- 6) Stage-specific function of leukemia/lymphoma -related factor (LRF) in the transcriptional control of osteoclast development. Tsuji-Takeuchi K., Negishi-Koga T., Sumiya E. Kukita A., Kato S., Maeda T., Pandolfi PP,

Moriyama K., Takayanagai H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:2561-2566, 2012.

7) The transcription factor FBI-1/OCZF/LRF is expressed in osteoclasts and regulates RANKL-induced osteoclast formation in vitro and in vivo. Kukita A., Kukita T., Nagata K., Teramachi J., Li YJ., Yoshida H., Miyamoto H., Gay S., Pessler F., Shoubuike T. *Arthritis Rheum.* 63(9):2744-54, 2011.

8) Involvement of deoxyadenosine and adenosine deaminase in the Methotrexate-induced suppression of inflammatory bone destruction. Qu P-F., Kukita A., Li Y-J., Moriyama K., Lei L., Kukita T. In "*Adenosine Receptors: Pharmacology, Functions and Therapeutic Aspects*" Ed. Kasandra Warrick, NOVA hardcover edited collection (by Selected Invited only). NOVA Science Publisher, N.Y. USA Chaptor V, 143-164.

[雑誌論文] (計 7 件)

[学会発表] (計 10 件)

[図書] (計 1 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

久木田 敏夫 (KUKITA TOSHIO)  
九州大学・歯学研究院・教授  
研究者番号：70150464

##### (2) 研究分担者

久木田 明子 (KUKITA AKIKO)  
佐賀大学・医学部・准教授  
研究者番号：30153266

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：