

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870540

研究課題名(和文)炎症によって惹起される骨芽細胞のLOX-1依存的RANKL発現機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms underlying inflammation-induced LOX-1-dependent RANKL expression in osteoblasts

研究代表者

伊東 順太(Ito, Junta)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：40609096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、炎症性骨破壊におけるRANKL発現とレクチン様酸化LDL受容体-1(LOX-1)の関連を明らかにすることを目的とした。その結果、炎症に惹起されたRANKL発現がLOX-1に依存していること、その発現細胞の1つが骨芽細胞であることを見出した。さらに、WT骨芽細胞(OB)とWT破骨細胞前駆細胞(OCpre)の共存培養において大きく促進したOC形成は、LOX-1 KO OBとWT OCpreの共存培養で減少した。これらの結果から、炎症に惹起された骨芽細胞のLOX-1依存性RANKL発現が破骨細胞形成を促進したことが示され、LOX-1が炎症性骨疾患の治療ターゲットになりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to clarify the relationship between osteoblastic RANKL expression and lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) in inflammatory bone destruction. I found that the RANKL expression in the inflamed bones was dependent on LOX-1 that was expressed in osteoblasts. In the co-culture of LOX-1-deleted osteoblasts and wild-type osteoclast precursors, the osteoclastogenesis induced by interleukin-1b and prostaglandin E2 decreased; this process occurred in parallel with the downregulation of osteoblastic RANKL expression. These results indicate that LOX-1-dependent osteoblastic RANKL expression in response to inflammation in bones promote osteoclast formation and bone resorption, suggesting that the blockage of LOX-1 could be a therapeutic target for inflammatory bone disease.

研究分野：医歯薬学

キーワード：LOX-1 炎症性骨破壊 破骨細胞 骨芽細胞 RANKL

1. 研究開始当初の背景

高齢化が急速に進むわが国では、運動や咀嚼機能と密接につながる硬組織の健康を維持し、全身の健康管理と ADL・QOL の維持向上への要求が高まっている。とりわけ歯周病や関節リウマチ(RA)などの炎症性骨疾患は、関節や歯槽骨が破壊され機能障害に至り、日常生活に著しい支障をきたし、健康寿命の維持に大きな影響を及ぼすために、急務の健康課題である。慢性炎症に伴う骨破壊性疾患は、『破骨細胞による骨破壊』だけでなく、『免疫亢進による炎症反応の惹起』という2つの病的現象に依存している。したがって、この骨破壊性疾患の発症プロセスを合目的に制御できる新しい治療法の基盤確立が必要であると考えた。

申請者はこれまでに野生型マウス、レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1) 欠損(KO) およびスカベンジャー受容体クラス A (SRA) KO マウスを用いた LPS による炎症性骨破壊実験を行い、図 1 に示すように、野生型マウスと SRA KO マウスでは LPS 投与により同等の TRAP mRNA および RANKL mRNA の誘導がおこるが LOX-1 KO マウスではこれらの遺伝子の発現が大きく減少することを見出した。この結果から炎症部位では破骨細胞分化を支持する RANKL 発現細胞が LOX-1 に依存して破骨細胞形成を促進し、結果的に骨破壊が増大することが示唆された。

炎症時に惹起される骨吸収に対して、骨芽細胞と T 細胞による RANKL 産生が大きく寄与することが知られている。そこで LPS 投与による骨吸収促進に対する骨芽細胞および T 細胞の関与を調べるために、それぞれの細胞のマーカーの mRNA 量を測定した。図 2 に示すように、3 遺伝子型マウスの LPS 投与による CD4 mRNA 量の発現パターンは RANKL および TRAP mRNA のそれとは異なる傾向を示した。一方、ALP mRNA の発現パターンは野生型マウスおよび SRA KO マウスで大きく上昇し、LOX-1 KO ではその発現上昇が減少するという RANKL および TRAP mRNA の発現パターンと一致した。したがって、以上のことから LPS によって誘導される炎症部位における LOX-1 依存性 RANKL 産生細胞として、骨芽細胞が有力であると考えられた。

図 1

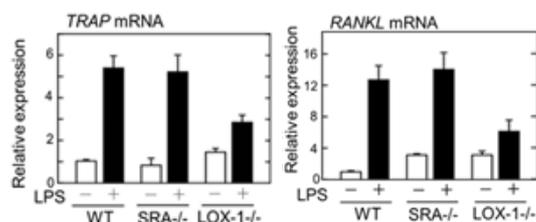
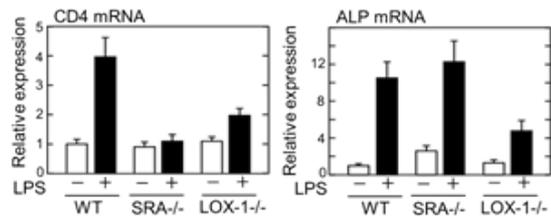


図 2



2. 研究の目的

本研究は、炎症性骨破壊部位における骨芽細胞の RANKL 発現に注目して、骨芽細胞における RANKL 発現機構に対する LOX-1 の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞前駆細胞と初代骨芽細胞前駆細胞との共存培養

先行研究から、LPS によって誘導される炎症部位における LOX-1 依存性 RANKL 産生細胞として、骨芽細胞が有力であると考えられた。そこで、*in vivo* の炎症性骨吸収を模した微細環境を再現するため、野生型および LOX-1 KO マウス頭頂骨より分離した骨芽細胞を用いて、野生型破骨細胞前駆細胞との共存培養から検討した。初代骨芽細胞前駆細胞は、コラゲナーゼ逐次消化法を用いて、生後 3-6 日のマウス頭蓋骨から分離培養した。共存培養はマウス大腿骨から分離した破骨細胞前駆細胞とを行い、破骨細胞形成を検討した。

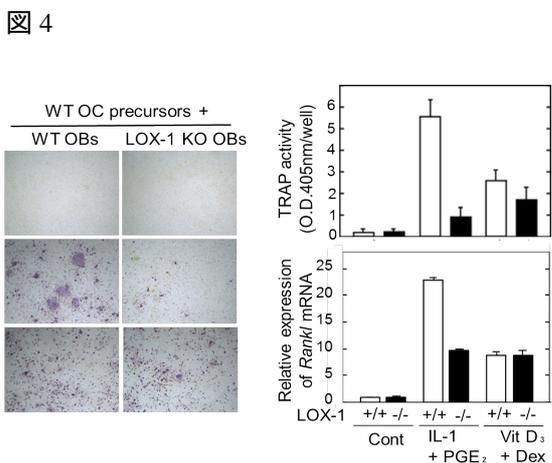
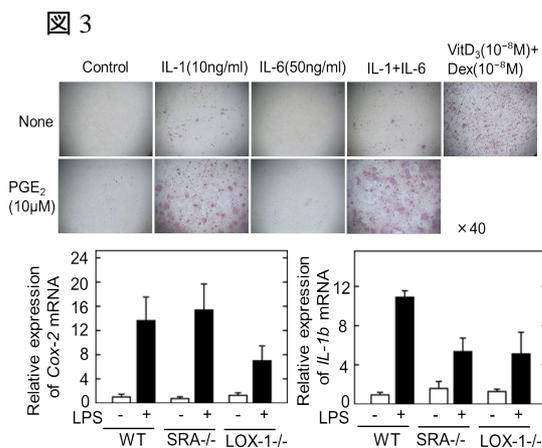
(2) 頭蓋骨炎症性骨破壊モデル作製

8 週齢雄性のマウスをソムノペンチル麻酔下にて、頭頂部骨膜下に 1 mg/ml の LPS を 100 μ L 投与する。LPS 投与は、1 日 1 回 5 日間連続で投与する。最終投与の 24 時間後に頸椎脱臼により屍殺し、頭蓋骨を摘出する。摘出したマウス頭蓋骨はマイクロ CT を用いて骨吸収量を形態学的に評価した。

4. 研究成果

骨芽細胞における RANKL 発現を誘導する経路は、(1) 活性型ビタミン D₃ のシグナルを伝達する vitamin D receptor (VDR) 経路、(2) PGE₂ のシグナルを伝達する cAMP/PKA 経路、(3) IL-6 や IL-11 のシグナルを伝達する gp130/STAT3 経路、(4) IL-1 β や LPS のシグナルを伝達する Ca/PKC-ERK 経路が存在する。このことを踏まえて、野生型および LOX-1 KO マウス頭頂骨より分離した骨芽細胞を用いて、どのサイトカインの組み合わせが *in vivo* の炎症性骨吸収を模した微細環境となるのかを野生型破骨細胞前駆細胞との共存培養から検討した。その結果、IL-1 β と PGE₂ の組み合わせ処理が大きく破骨細胞形成を促進し、その効果

は活性型ビタミン D₃ とデキサメタゾンの組み合わせ処理に匹敵するほどの効果を示した(図3)。事実、*in vivo*において、LPS 投与によって頭頂骨における COX-2 (PGE₂の誘導性合成酵素)と IL-1βの mRNA 発現は大きく上昇し、LOX-1 KO マウスでは減少していた。以上の結果から、炎症部位における LOX-1 依存性 RANKL 産生細胞としての骨芽細胞の役割を解明するため、野生型および LOX-1 KO マウス頭頂骨より分離した骨芽細胞と野生型破骨細胞前駆細胞の共存培養系に IL-1βと PGE₂を同時に加えその効果を比較した。その結果、野生型分離骨芽細胞と野生型破骨細胞前駆細胞の共存培養に比べ LOX-1 KO 分離骨芽細胞と野生型破骨細胞前駆細胞の共存培養における破骨細胞形成が減少した(図4)。さらに分離骨芽細胞の RANKL mRNA 発現に対する IL-1βと PGE₂の作用を検討した。その結果、共存培養系での破骨細胞形成と同様に、野生型骨芽細胞は IL-1βと PGE₂の組み合わせ処理によって大きく RANKL mRNA を発現するのに対し、LOX-1 KO 骨芽細胞は IL-1βと PGE₂に依存した RANKL mRNA 発現上昇を低下させた(図4)。これらの結果は IL-1βと PGE₂に反応して破骨細胞形成を支持する骨芽細胞の RANKL 発現が LOX-1 に依存することを示唆している。



さらに、WT OB および LOX-1 KO OB を用いて、LPS 存在下における LOX-1 に依存した RANKL 発現機構を評価した。WT OB において LPS の濃度依存的に LOX-1 の発現が誘導された。これと同時に LPS によって炎症惹起された WT OB における RANKL および IL-1b mRNA 発現は、LPS の濃度依存的に大きく増加したが、LOX-1 KO OB では減少した。一方、LPS によって促進した WT OB の COX-2 発現は、LOX-1 KO OB では減少しなかった。これらのことから、LPS によって炎症惹起された骨芽細胞は LOX-1 を介して、RANKL および IL-1b を発現させ、破骨細胞分化を促進し、骨破壊を増悪させていると示唆された。本研究結果から、炎症性骨破壊部位における骨芽細胞および破骨細胞の活性化に対して、LOX-1 は重要なタンパク質であることが示され、炎症性骨疾患に対する炎症性サイトカインをターゲットにした従来の治療法とは異なり、LOX-1 をターゲットにした今までは全く別の治療法の確立への道が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakayachi M, Ito J, Hayashida C, Ohshima Y, Kakino A, Okayasu M, Sato T, Ogasawara T, Kaneda T, Suda N, Sawamura T, Hakeda Y. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 abrogation causes resistance to inflammatory bone destruction in mice, despite promoting osteoclastogenesis in the steady state. *Bone*. 2015 Jun; 75: 170-82. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.025. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 伊東順太. 炎症性骨破壊における RANKL の発現に対する lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)の役割に関する研究. 明海歯科医学会第 23 回学術大会, 2014 年 6 月 5 日, 坂戸 (埼玉)
- (2) 中谷地舞, 伊東順太, 岡安麻里, 須田直人, 羽毛田慈之. レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1) 欠損マウスは骨量を減少させるが炎症性骨吸収に抵抗を示す. 第 73 回日本矯正歯科学会大会, 2014 年 10 月 20 日 ~ 2014 年 10 月 22 日, 幕張 (千葉)
- (3) 伊東順太, 林田千代美, 大山洋子, 佐藤卓也, 羽毛田慈之. レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1) 欠損は定常状態における破骨細胞形成を促進するが、LPS 誘導性炎症性骨破壊に抵抗性をもたらす. 第 33 回日本骨代謝学会学術大会, 2015 年 7 月 23 日 ~ 2015 年 7 月 23 日, 新宿 (東京).

- (4) 伊東順太, 林田千代美, 大山洋子, 佐藤卓也, 羽毛田慈之. レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1) 欠損は定常状態の破骨細胞形成を促進するが, LPS 誘導炎症性骨破壊には抵抗性を示す. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会. 2015 年 9 月 11 日 ~ 9 月 13 日, 新潟 (新潟).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東順太 (ITO JUNTA)
明海大学・歯学部・助教
研究者番号: 26870540