

平成 22 年 4 月 14 日現在

研究種目：若手研究（A）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19689036  
 研究課題名（和文） 骨リモデリングの開始と制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of bone remodeling

## 研究代表者

中島 友紀（NAKASHIMA TOMOKI）  
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
 研究者番号：00346959

## 研究成果の概要（和文）：

骨リモデリングの制御因子を明らかにするために、力学的条件下における骨細胞や、破骨細胞、骨芽細胞の分化過程における発現遺伝子を網羅的にスクリーニングし、遺伝子改変マウスの解析から候補遺伝子の生体における骨リモデリングの制御機構を解明した。また、マウスジェネティクスを用いて新規筋委縮骨粗鬆症モデルの構築とその骨量減少に伴う発現遺伝子プロファイルを試みた。

## 研究成果の概要（英文）：

Bone remodeling optimizes bone strength and mineral metabolism. Control of bone remodeling requires a tightly orchestrated interplay among osteoblasts (bone forming cells), osteoclasts (bone resorbing cells) in bone surface and osteocytes, which embedded into bone. To identify the regulation factor of bone remodeling, we performed a genome-wide screening of these bone cells and in vivo analysis of gene targeting mice.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 9,900,000  | 2,970,000 | 12,870,000 |
| 2008 年度 | 8,000,000  | 2,400,000 | 6,370,000  |
| 2009 年度 | 2,900,000  | 870,000   | 3,770,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 20,800,000 | 6,240,000 | 23,010,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学、骨代謝学

## 1. 研究開始当初の背景

生体の基軸である骨組織は、ダイナミックに生涯を通じて生まれ変わっている。この再構築は「骨リモデリング」と呼ばれ、健全な骨組織の維持のみならず、生体内カルシウムの貯蔵庫である骨を巧妙に制御している。し

かし、何時、どの様に破骨細胞が古い骨を認識し、骨吸収を開始および完了に至るか？さらに骨吸収終了後、骨芽細胞がどの様に誘導され骨形成を開始、完了していくのか？は、未だに不明な点が多いのが現状である。

骨リモデリングの制御機構を解明する糸

口として、最近、第3の責任細胞として骨細胞が注目されている。破骨細胞や骨芽細胞が骨表面上で機能する一方で、骨細胞は骨の中に埋め込まれた状態で存在する細胞である。それらは骨内に無数の突起を伸ばしながら網目状のネットワークを形成し、骨細胞同士あるいは骨表面の破骨細胞や骨芽細胞と密接に接触している。このような特殊な環境状態から力学的刺激の感受やシグナリング伝達に関わり、骨リモデリングを制御している可能性が想定されているものの、実体は長い間謎である。つまり、骨表面および骨組織内に存在する3つの責任細胞によるリモデリングネットワークを詳細に理解することが当研究領域を飛躍的に発展させるブレイクスルーポイントであると考えられる。

## 2. 研究の目的

骨細胞、骨芽細胞および破骨細胞のネットワークを司る骨リモデリング制御因子を明らかにする目的で、力学的条件下における骨細胞、破骨細胞や骨芽細胞の分化過程における発現遺伝子をゲノムワイドなスクリーニングし候補遺伝子を同定する。得られた候補遺伝子を強制発現およびノックダウンをすることでその機能を明らかにする。In vitro の結果を基に、遺伝子欠損マウスを作成し、候補遺伝子の生体における骨リモデリングへの制御機構を in vivo で解明する。

また、新規骨粗鬆症モデルの構築とその骨量減少に伴う骨構成細胞の遺伝子プロファイルを試み、骨量減少に伴う骨リモデリングの変化に関係する責任遺伝子を同定することを目指した。

## 3. 研究の方法

骨細胞において骨組織内を擬似するために新規3次元培養系を確立し、応力反応を含む様々な条件下で遺伝子発現を評価した。また破骨細胞は RANKL/M-CSF にて分化誘導し、骨芽細胞は破骨細胞支持および分化状態の遺伝子発現を Affymetrix の GeneChip にてゲノムワイドにスクリーニングした。選出された候補遺伝子はレトロウイルスによる遺伝子ノックダウンにより、その機能を評価した。さらに生体レベルでの遺伝子の機能を明らかにするため、遺伝子改変マウスを用いて骨形態の解析を行った。

さらに筋肉特異的に発現される Mck プロモーターの下流に Cre を発現するトランスジェニックマウスとミトコンドリア呼吸鎖を制御する因子で細胞死を誘導する遺伝子の Flox マウスと交配することで、筋肉組織が特異的に欠損するマウス (cKO) を作製した。当新規骨粗鬆症モデルマウスを用い急激な筋肉の減少が始まる前から完全に筋萎縮が終了するまでの過程で、得られる全骨組織か

ら骨形態計測・病理解析を実施し、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞の数、骨形成および骨破壊等を解析し、生体における力学的ストレスの変化に伴う骨リモデリングの責任細胞ならびにその発現遺伝子を検討した。

## 4. 研究成果

4-1) 破骨細胞の分化には、RANKL により活性化される転写因子 NFATc1 と ITAM 配列をもつ分子を介した共刺激シグナルが必須である。通常、ITAM の活性化シグナルと ITIM の抑制性シグナルのバランスにより、様々な免疫応答が規定されている。本研究では、NK レセプターファミリーの Ly49 (*Klra*) ファミリーに属する Ly49Q (*Klra17*) という分子に着目し、破骨細胞における機能を検討した。

Ly49 ファミリー分子の RANKL 刺激後の発現変化を GeneChip で比較したところ、Ly49Q が特異的に誘導されることが見出された (図1)。Ly49Q の破骨細胞における機能を明らかにするため、レトロウイルスを用いた shRNA (Ly49Q-1, 2) を作成し、Ly49Q のノックダウンを行った。興味深いことに、Ly49Q は ITIM を含む分子であるにもかかわらず、その機能を抑制すると破骨細胞形成が顕著に抑制された (図1)。この結果は Ly49Q が破骨細胞分化を正に制御している可能性を示唆した。

Ly49Q 発現が抑制された細胞における破骨細胞分化関連分子の発現を検討したところ、RANK や M-CSFR、c-Fos の発現レベルに変化はみられなかったが、カテプシン K、TRAP、OSCAR、DC-STAMP などの破骨細胞分化に伴って発現上昇がみられる分子は著しく低下していた。また、NFATc1 の発現も顕著に低下していた。さらに、PECAM-1 と SHP-1 の結合には変化がみられなかったが、PIR-B への SHP-1 のリクルートが促進されていることがわかった。つまり、Ly49Q は PIR-B と SHP-1 のリクルートを競合することで機能を発揮していることが示唆された。

予測通り、Ly49Q 欠損マウスの骨髄細胞では、破骨細胞への分化能は著しく抑制されていた。しかしながら、 $\mu$ CT 解析・骨形態計測における骨量や破骨細胞数など、いずれの結果においても野生型との明らかな違いはみられなかった。おそらく、生理的条件下では Ly49Q の欠損は他分子によって代償されている可能性が考えられた。実際、他の ITIM を含む分子、PIR-B や SIRP $\alpha$  の欠損マウスにおいても、骨の表現型はほとんど見られないことから、ITIM 分子からのシグナルは重複性であることが示唆される。しかしながら、Ly49Q のレセプターである古典的 MHC クラス I 分子は TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインによって発現が増強されることから、関節リウマチなど破骨細胞分化が促進され、骨破壊が引き起こされるような疾患では Ly49Q が機能してい

る可能性も考えられた(発表論文1)。

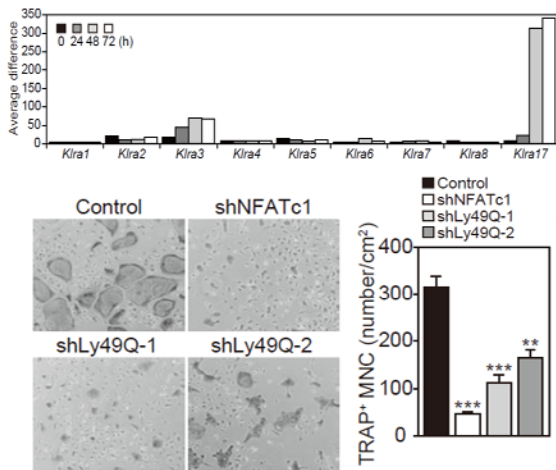


図1. 破骨細胞における Ly49Q の発現と機能

4-2) 破骨細胞分化は、RANKL と免疫グロブリン様受容体を介した ITAM シグナルに依存して誘導される転写因子 NFATc1 によって促進される一方、近年、MafB や IRF8 などの活性化マクロファージを誘導する因子が、NFATc1 の転写活性化能を直接的に抑制することで、破骨細胞分化を抑制する機能を持つことが明らかにされた。破骨細胞分化過程では、これら破骨細胞分化の抑制因子の発現が抑制される必要があるが、その分子機序は明らかとなっていない。

マウス骨髄細胞から破骨細胞を分化させる分化誘導系を用いて、トランスクリプトームデータを取得し、網羅的に転写因子の発現パターンの解析を実施した。選別された転写因子の中で、破骨細胞分化に伴い発現誘導される転写因子 Blimp1 に注目した。生体での破骨細胞分化に対する Blimp1 の役割を明らかにするために、破骨細胞特異的に Blimp1 を欠損したコンディショナルノックアウトマウスを作出した。解析の結果、Blimp1 の欠損に伴い、骨量の増加並びに破骨細胞数の低下が観察された(図2)。破骨細胞分化における Blimp1 の役割の解析を実施した結果、Blimp1 は、MafB や IRF8 の発現を直接的に抑制することが明らかとなった。

関節リウマチにおける骨破壊や閉経後骨粗鬆症に見られる骨量減少には、破骨細胞の活性化が観察されており、これらの疾患の有効な治療手段として、破骨細胞分化の抑制が挙げられる。今回、破骨細胞分化の抑制機構を抑える転写制御機構の一端が明らかとなったことから、今後、創薬ターゲットとしての発展が期待される(発表論文2)。

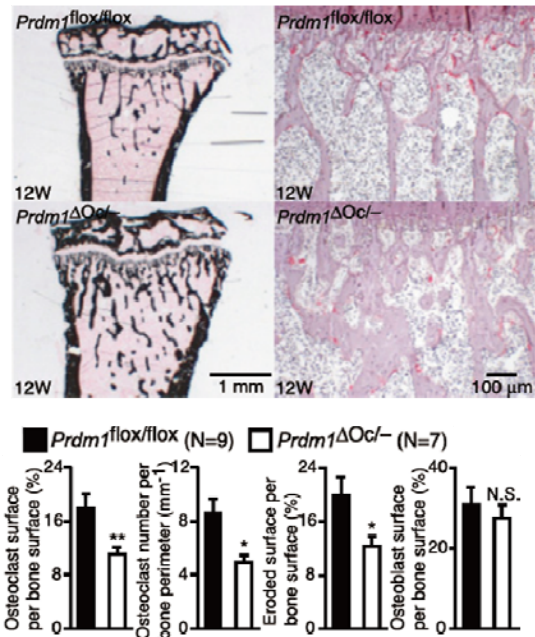


図2. Blimp1 欠損マウスの骨形態

4-3) 骨細胞は骨の中に埋め込まれた状態で存在する細胞である。それらは骨内に無数の突起を伸ばしながら網目状のネットワークを形成し、骨細胞同士あるいは骨表面の破骨細胞や骨芽細胞と密接に接触している。骨組織内を擬似化するため、骨細胞の伸張刺激負荷培養装置を開発した(図3)。コラーゲンゲル内で3次元培養した骨細胞(MLY0-4, 単離骨細胞)に、生理的範囲から骨質が破断し骨折を引き起こす程の骨変形量のメカニカルストレスを加えることが可能となった。このメカニカルストレスを与えた細胞のゲノムワイドスクリーニングを実施し、メカニカルストレス応答性の遺伝子発現を解析した。その結果、メカニカルストレス応答性遺伝子として知られる Ptgs, Vegfa などが顕著に上昇していることが見出された(図3)。現在、本実験系を用いて骨細胞のメカニカルストレス応答性の骨リモデリング因子の同定を進めている(未発表データ)。

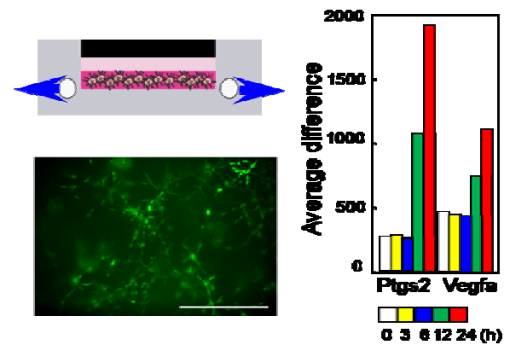


図3. 骨細胞の3次元培養系確立

4-4)本研究で作成した筋肉組織が特異的に欠損するマウス(cKO)は、興味深いことに、若年齢では筋萎縮が現れず、成獣にまでは正常に成長し、加齢に伴い筋肉量が野生型マウスと比べ急激に減少する。このcKOマウスでは筋組織以外の遺伝子には外部からの変異は加えられていないため、筋萎縮に伴う骨組織に対する力学的ストレスが直接的に反映していると考えられる。この筋萎縮の出現頻度は4ヶ月齢において100%であり、実験者が施術等を行う必要がないため、実験個体間の誤差が出にくい利点を持つ。筋肉の減少に伴いcKOマウスの骨量は顕著に減少し、脂肪髄の増加が見出された(図4)。

本モデルは、人間の加齢に伴う骨量減少と脂肪髄増加の病態に酷似しており、有用な実験モデルであると考えられる。当新規モデルマウスを用い急激な筋肉の減少が始まる前から完全に筋萎縮が終了するまでの過程で、得られる骨組織から骨形態計測・病理解析を実施し、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞の数、骨形成および骨破壊量を解析することで生体における力学的ストレスの変化に伴う骨リモデリングの責任細胞ならびにその機能変化を検討することが可能となる。また、力学的ストレスの変化に伴う各ステージ別の細胞から、mRNAを採取し発現遺伝子のスクリーニングを展開し、骨量減少の原因遺伝子の探索や新規治療薬の生体レベルでの薬効スクリーニングなどに活用されることが期待される(未発表データ)。

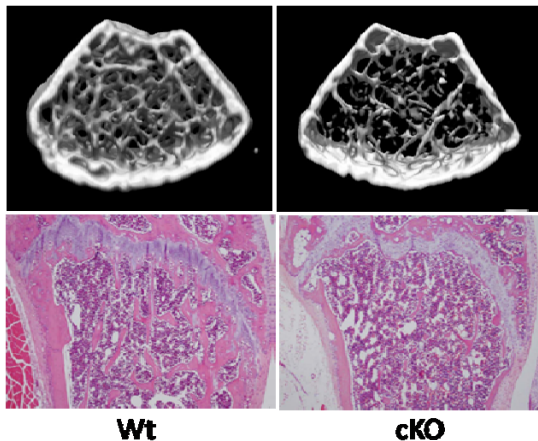


図4. 筋肉組織特異的欠損マウスの骨形態

#### 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 14 件)

1) Hayashi M, Nakashima T,

Toyama-Sorimachi, N Takayanagi H. Inhibitory NK receptor, Ly49Q, positively regulates osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 432-438 (2010) (査読有り)

- 2) Nishikawa K, Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kato S, Kodama T, Takahashi S, Calame K, and Takayanagi H. Blimp1-mediated repression of negative regulators is required for osteoclast differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 3117-3122 (2010) (査読有り)
- 3) Kayamori K, Sakamoto K, Nakashima T, Takayanagi H, Morita K, Nguyen ST, Omura K, Miki Y, Akashi T, Ogata E and Yamaguchi A: Roles of IL-6 and PTHrP in osteoclast formation associated with oral cancers: The significance of IL-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells, *Am J Pathol* 176, 968-980 (2010) (査読有り)
- 4) Nakashima T, Takayanagi T: Osteoimmunology: Crosstalk Between the Immune and Bone Systems. *J Clin Immunol* 29, 555-567 (2009) (査読有り)
- 5) Nakashima T, Takayanagi T: Osteoclasts and the immune system. *J Bone and Mineral Metab* 27, 519-29 (2009) (査読有り)
- 6) Nakashima T, Takayanagi T: The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system *Arch Biochem Biophys* 473, 166-171 (2008) (査読有り)
- 7) Pospisilik JA, Knauf C, Joza N, Benit P, Orthofer M, Cani PD, Ebersberger I, Nakashima T, Sarao R, Neely G, Esterbauer H, Kozlov A, Kroemer G, Kahn CR, Rustin P, Burcelin R, Penninger JM; Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes. *Cell* 131, 467-491 (2007) (査読有り)
- 8) Suematsu A, Tajiri Y, Nakashima T, Taka J, Ochi S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S and Hiroshi Takayanagi ; Scientific basis for the efficacy of combined use of antirheumatic drugs against bone destruction in rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.* 17, 17-23 (2007) (査読有り)
- 9) 中島友紀 : RANKL/RANK/OPG と骨疾患 *THE BONE* 23 37-46 (2009) (査読なし)
- 10) 中島友紀、高柳広 : 骨破壊制御の新たなアプローチ. *医薬ジャーナル* 45, 87-92

- (2009) (査読なし)
- 11) 中島友紀、高柳広：骨免疫学の最先端。 *Mebio* 25, 24-35 (2008) (査読なし)
  - 12) 林幹人、中島友紀、高柳広：免疫と骨：骨免疫学Osteoimmunologyの幕開け。 *臨床検査* 52, 556-560 (2008) (査読なし)
  - 13) 中島友紀、高柳広：Osteoimmunology - 破骨細胞の誘導と炎症。 *整形外科* 58, 1615-1624 (2007) (査読なし)
  - 14) 中島友紀、高柳広：破骨細胞と免疫系。 *生体と科学* 58, 196-204 (2007) (査読なし)

[学会発表] (計 15 件)

- 1) Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H. Identification of novel genes regulated by NFATc1 in osteoclastogenesis. The 26th Naito Conference on "Osteobiology" 5 Nov 2009, Awaji
- 2) 中島友紀 骨の恒常性を司る骨リモデリングシステムの解明 第22回長崎骨粗鬆症研究会 10月6日2009年 長崎 (招待講演)
- 3) 中島友紀 Meet the Expert 6 Bone cell biology 第27回日本骨代謝学会 7月25日2009年 大阪 (教育講演)
- 4) 中島友紀 骨の恒常性を司る骨リモデリングシステムの解明 Skeletal Research Meeting 6月27日2009年 京都 (招待講演)
- 5) 中島友紀 破骨細胞の分化機構 昭和大学大学院セミナー 2月6日2009年 東京 (招待講演)
- 6) Suematsu A, Tajiri Y, Nakashima T, Ochi S, Oda H, Nakamura K, Tanaka S, Takayanagi H. Effect of combined use of anti-rheumatic drugs on osteoclast differentiation. The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2008) 24 Sep 2008, Yokohama
- 7) Hayashi M, Nakashima T, Takayanagi H. NFATc1-dependent programme of osteoclast differentiation and function. The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2008) 24 Sep 2008, Yokohama
- 8) Nakashima T. The crucial role of RANKL in bone loss and cancer metastasis. The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2008) 26 Sep 2008, Yokohama (招待講演)

- 9) Inoue H, Nakashima T, Iwamatsu A, Suematsu A, Yamaguchi A, Takayanagi H. Novel Screening System for Bone Matrix Proteins That Control Bone Mineralization. The 30th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 12 Sep 2008 Montreal
- 10) 中島友紀 破骨細胞分化の分子機構 第49回歯科基礎医学会学術大会 8月29日2007年 札幌 (招待講演)
- 11) 末松綾子、佐藤浩二郎、中島友紀、青木和広、大谷啓一、山口朗、高柳広 CaMK/CREB 経路による破骨細胞制御メカニズム 第25回日本骨代謝学会 7月19日2007年大阪
- 12) 中島友紀 RANKLの役割 第25回内分泌・代謝学サマーセミナー 7月17日2007年 兵庫 (招待講演)
- 13) 末松綾子、田尻康人、中島友紀、越智小枝、織田弘美、中村耕三、田中栄、高柳広 抗リウマチ薬の併用による破骨細胞分化抑制作用の増強 第51回日本リウマチ学会 4月26日2007年 東京
- 14) 中島友紀 癌転移を制御する新規ターゲットとしてRANKL 第1回Bone Research Seminar 3月24日2007年 東京 (招待講演)
- 15) 中島友紀 癌転移を制御する新規ターゲットとしてRANKL 第5回口腔医学フロンティア 2月3日2007年 仙台 (招待講演)

[その他]  
ホームページ等

<http://homepage.mac.com/osteimmunology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 友紀 (NAKASHIMA TOMOKI)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：00346959

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし