

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390463

研究課題名（和文） 骨リモデリングにおける破骨細胞分化の時空的制御機構の解明

研究課題名（英文） Spatiotemporal analysis of osteoclastogenesis during bone remodeling

研究代表者

中浜 健一（NAKHAMAMA KENICHI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：60281515

研究成果の概要（和文）：本研究は骨細胞を中心とした骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞前駆細胞および破骨細胞の細胞間コミュニケーションによる破骨細胞分化調節機構を解明することを目的とした。破骨細胞前駆細胞が多核の破骨細胞に分化する際に、細胞間の接着分子を介した結合が重要な役割を果たしていることを見いだした。また、骨芽細胞と骨細胞間のギャップ結合が破骨細胞の分化に関わっている可能性を見いだした。

研究成果の概要（英文）：We aimed to find the roles of cell communication in bone remodeling. We found an important role of cell communication between osteoclast precursors in osteoclastogenesis via adhesion molecule. Next, we showed the possibility that the gap junctional intercellular communication between osteoblasts and osteocytes controlled osteoclastogenesis via cyclic AMP signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：分子細胞学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞、コネキシン 43、cAMP

1. 研究開始当初の背景

本研究は骨全体から見て、骨代謝の本質とは何かを明らかにする事を目的とし、骨を形成している細胞間の相互作用が骨代謝に及ぼす影響を解明する。

骨代謝は「古い骨領域が分解され、その場所に新たに骨が形成される」ということの繰り返しであると考えられている。近年、骨形成や破骨細胞形成の詳細なメカニズムも明らかになってきた。しかし正常な骨代謝では、なぜ古い骨領域のみに破骨細胞が分化してくるのかという素朴、且つ重要な問題につい

ては未だ解明されていない。海綿骨は1年間の間に25%が新しく生まれ変わっていると報告されている (Huiskes et al. Nature, 405, 704-706, 2000)。それでは、骨の寿命を決定するものはいったい何であろうか？体内のほとんどの組織は常に新しい細胞と置き換わることにより組織としての形態と機能を維持している。骨については、その中に埋もれている骨細胞がその実質細胞であり、骨の寿命は骨細胞の寿命であり、骨細胞が死んだ骨部は古い骨領域と見なされると考えられることが出来る。このような考え方は、

Verborgt 等によって報告された疲弊した骨の微小な“ひび”(microcrack)領域特異的に骨吸収がおこるという実験事実によっても支持される(Verborgt O. et. al, J. Bone and Mineral Res, 15(1), 60-67, 2000)。最近、骨細胞特異的に細胞死を誘導したマウスでは骨粗鬆症になる事も示された(Tatsumi S. et. Al, Cell Metabolism 5, 464-475, 2007)

2. 研究の目的

本研究は骨細胞を中心とした骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞前駆細胞および破骨細胞の細胞間コミュニケーションによる破骨細胞分化および活性化調節機構を解明しようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 細胞の接着に関する研究

成熟した破骨細胞は破骨細胞前駆細胞が細胞融合し、多核破骨細胞となる。その際に破骨細胞前駆細胞同士の認識が必要となる。その機構について接着分子の中和抗体、遺伝子ノックダウン法などを用いて明らかにする。

(2) 骨細胞が及ぼす骨芽細胞の形質転換に関する研究

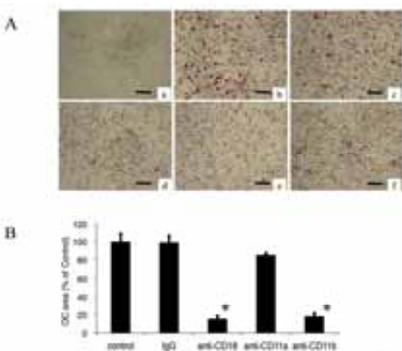
骨芽細胞と骨細胞の共培養系を用いて、骨細胞が骨芽細胞の破骨細胞分化支持能に及ぼす効果を調べ、サイクリック AMP(cAMP)のギャップジャンクションを介した移動を観察することによりそのメカニズムを明らかにする。

(3) 遺伝子改変マウスを用いた骨代謝におけるコネキシン 43 の役割解明

Cx43^{fllox/fllox} マウス(Cx43 遺伝子の第 1 エクソンの上流と下流に loxP サイトをノックインしたマウス)と Osx1-GFP::Cre マウス(オステリクスプロモーター依存的に、且つドキシサイクリンに(Dox)よりその発現が調節される cre 発現マウス)を交配させることによりコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを準備する。ドキシサイクリン非存在下で骨芽細胞特異的ノックアウトを誘導した後、骨の形態計測等をおこなう。

4. 研究成果

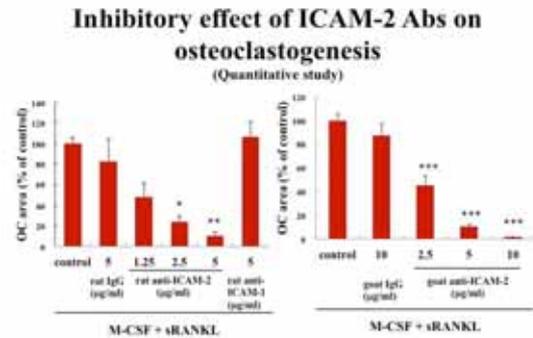
(1) 細胞の接着に関する研究



我々は Mac-1 (macrophage-1 antigen) が破骨細胞前駆細胞同士の認識に重要

図 1

であることを 2008 年に報告した(FEBS Lett. 2008;582(21-22):3243-8.)。図 1 はマウス骨髄由来単核球(BMM)の RANKL 刺激による破骨細胞分化に対する接着分子の中和抗体を用いた阻害効果を検討した結果である(無刺激 Aa, RANKL 刺激 Ab, B コントロール, IgG 対照群 Ac, B IgG, 抗 CD18 Ad, B anti-CD18, 抗 CD11a Ae, B anti-CD11a, 抗 CD11b Af, B anti-CD11b)。定量的に比較すると CD18 および CD11b で破骨細胞分化抑制が認められた。次に Mac-1(CD11b/18)の結合する相手について検討した。BMM に発現する接着分子をフローサイトメーターで解析したところ、BMM の約 50%の細胞が Mac-1 の結合する候補である ICAM-1 および ICAM-2 を発現していた。図 2



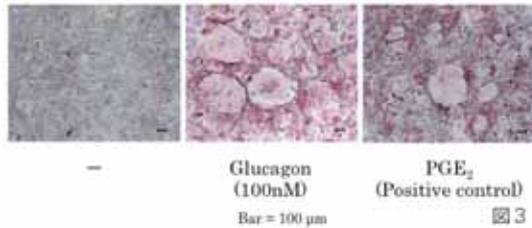
The areas occupied by osteoclast were analyzed. Values are presented as the mean \pm S.E. n=4. *Significantly different from IgG group (*, **, ***P<0.05, 0.01, 0.001). ANOVA was followed by Dunnett's multiple comparison test.

図 2

に示されたように ICAM-2 の中和抗体(2種類の抗体)は BMM の破骨細胞分化を用量依存的に強力に抑制したが、ICAM-1 の中和抗体にその抑制作用は認められなかったことから、Mac-1 の結合する相手は ICAM-2 であろうと考えられた。リンパ球系の細胞も ICAM-2 を発現することから、BMM 中のリンパ球系細胞をフローサイトメーターで解析した結果 T(BMM 中約 1%) および B 細胞系(BMM 中約 20%)でも ICAM-2 の発現が認められた。リンパ球系細胞が発現する ICAM-2 の関与を明らかにするために、SCID マウス(リンパ球系の細胞分化不全)の BMM から破骨細胞分化を誘導した際の ICAM-2 中和抗体の効果を調べた。その結果 SCID マウスの BMM でも同様に中和抗体の作用が求められたことから、ICAM-2 と Mac-1 の結合は破骨細胞前駆細胞同士で起こっていると考えられた(現在投稿準備中)。

(2) 骨細胞が及ぼす骨芽細胞の形質転換に関する研究

骨芽細胞が破骨細胞分化支持能を發揮するためには骨芽細胞内の cAMP 濃度の上昇が十分条件であることを示すために、プロスタグランジン E2 刺激で破骨細胞支持能を獲得する細胞株にグルカゴンレセプターを強制発現させた細胞(hGR-TMS14)を作製した。本細胞と BMM を共培養することにより、骨芽細胞の破骨細胞支持能を検討した。図 3 に示されるように本細胞はグルカゴン刺激でも破



骨細胞支持能を獲得することが示され、骨芽細胞内 cAMP 濃度の上昇が骨芽細胞の破骨細胞支持能の獲得に重要であることが示された。

次に、骨芽細胞と骨細胞との間にコミュニケーションが存在する場合に骨芽細胞の破骨細胞支持能に変化が見られるかどうか検討した。骨組織におけるギャップジャンクションの主な構成タンパクであるコネキシン43(Cx43)を発現している骨細胞株である MLO-Y4 または shRNA で Cx43 をノックダウンした骨細胞株 (shCx43 MLO-Y4) と骨芽細胞 (GR-TMS14) を共培養した後、BMM と共培養をおこない、骨芽細胞の破骨細胞支持能について検討した (図 4)。

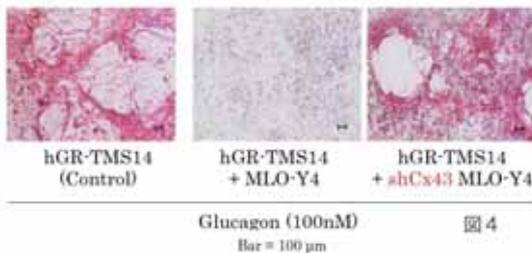


図 4 に見られるように骨細胞は骨芽細胞の破骨細胞支持能を強力に抑制したが、Cx43 をノックダウンした骨細胞ではその作用は認められなかった。この結果から、骨細胞は骨芽細胞とギャップジャンクションを介したコミュニケーションを介して骨芽細胞の破骨細胞支持能を抑制していると考えられた。さらに、cAMP のギャップジャンクションを介した細胞間の移動を可視化する目的で、ルシフェラーゼのアミノ酸配列の途中に cAMP 結合領域を挿入した cAMP 感受性ルシフェラーゼをコードする遺伝子 (図 5) を hGR-TMS14 に強制発現させた細胞 (hGRGloS-TMS14) を作製した。hGRGloS-TMS14 はグルカゴン刺激によって上昇した細胞内の cAMP 濃度をルシフェリンを基質とした発光により検出できることを確認した (図 6)。

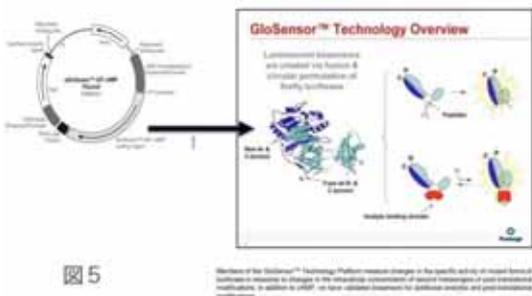


図 5

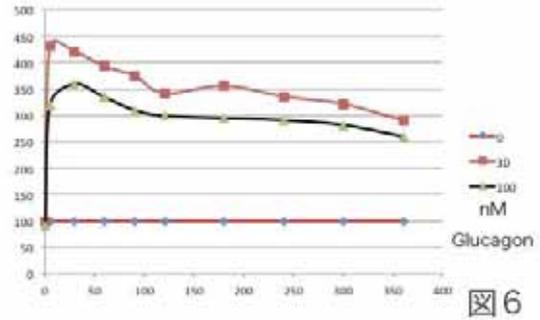
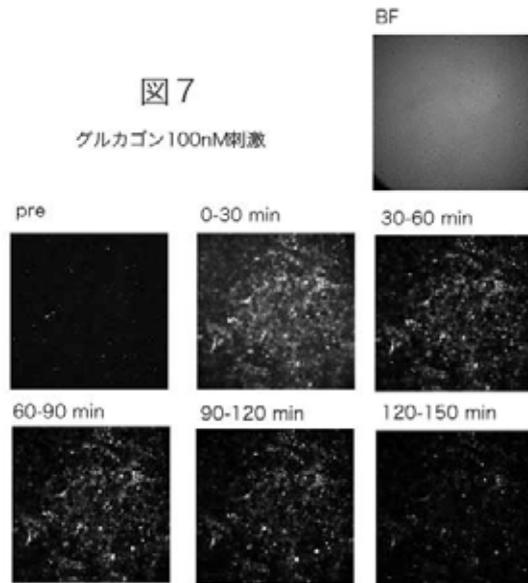


図 6

さらに、細胞での cAMP を捉えるために発光顕微鏡を用いて検出した (図 7)。



次に、骨芽細胞から骨細胞への cAMP の移動を捉えるために骨細胞にも cAMP センサーを導入し、骨芽細胞をグルカゴンで刺激した際に骨細胞にも発光が見られるかどうかを発光顕微鏡を用いて検討した (図 8)。

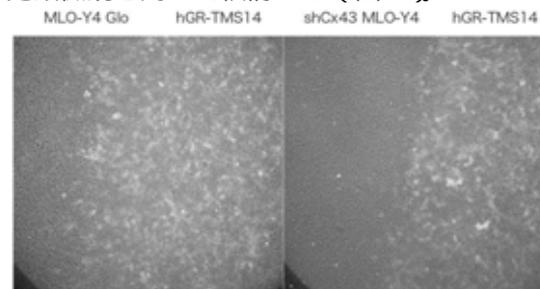


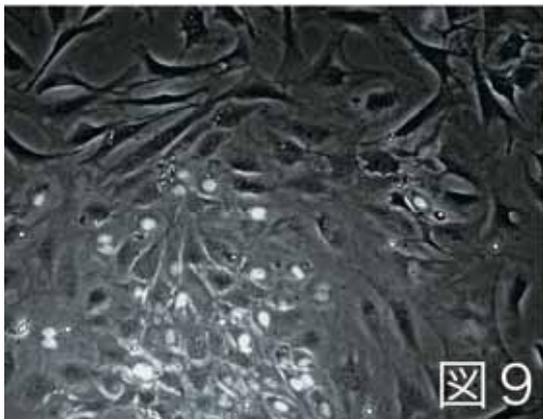
図 8

左側に骨細胞、右側に骨芽細胞を播種し、48 時間培養しギャップジャンクションが形成された後、グルカゴンで細胞を刺激した。細胞の発光領域がギャップ結合依存的に MLO-Y4 へと広がっていく様子が確認された。これらのことから、我々は骨細胞はギャップジャンクションを介した cAMP の移動により骨芽細胞の破骨細胞支持能を抑制していると結論づけた (現在論文投稿準備中)。

(3) 遺伝子改変マウスを用いた骨代謝におけるコネクシン43の役割解明

Osx1-GFP::Cre マウスの頭頂骨をレーザー顕微鏡で観察し、GFP が骨芽細胞および骨細胞に発現していることを確認した。

また、頭頂骨由来骨芽細胞の細胞核が GFP 陽性であった(図9)。



現在、Osx1-GFP::Cre マウスと Cx43^{fllox/fllox} マウスをかけ合わせ、コンディショナルノックアウトマウスを作り、フェノタイプの解析を始めているところである。

総括

本研究で、接着分子やギャップジャンクションを介した細胞間情報伝達が破骨細胞分化に非常に大きな役割を果たしている可能性が示唆された。本研究中に海外から総説執筆の依頼が来るなど、大きな評価を受けている。今後は、コンディショナルノックアウトマウスのフェノタイプの詳細に調べることにより、更なる情報を世界に発信していく所存であります。

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、全て査読有り)

1. Cellular communications in bone homeostasis and repair. Nakahama K. *Cell Mol Life Sci.* 2010 Dec;67(23):4001-9.
2. Amyloid β Enhances Migration of Endothelial Progenitor Cells by Upregulating CX3CR1 in Response to Fractalkine, Which May Be Associated With Development of Choroidal Neovascularization. Wang J, Ohno-Matsui K, Nakahama KI, Okamoto A, Yoshida T, Shimada N, Mochizuki M, Morita I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011, in press.
3. Optimized method for culturing outgrowth endothelial progenitor cells. N.

Oshima-Sudo, Q. Li, Y. Hoshino, K. Nakahama, T. Kubota, I. Morita, *Inflammation and Regeneration* 2011 Mar; 31(2): 219-227

4. Cell-printing and transfer technology applications for bone defects in mice. Tsugawa J, Komaki M, Yoshida T, Nakahama KI, Amagasa T, Morita I. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011 Jan 10. In press.

5. The effects of polyunsaturated fatty acids and their metabolites on osteoclastogenesis in vitro. Yuan J, Akiyama M, Nakahama K, Sato T, Uematsu H, Morita I. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010 Jun;92(1-4):85-90.

6. Implantation of capillary structure engineered by optical lithography improves hind limb ischemia in mice. Akahori T, Kobayashi A, Komaki M, Hattori H, Nakahama K, Ichinose S, Abe M, Takeda S, Morita I. *Tissue Eng Part A.* 2010 Mar;16(3):953-9.

7. Potential enhancement of osteoclastogenesis by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 protein. Obitsu S, Ahmed N, Nishitsuji H, Hasegawa A, Nakahama K, Morita I, Nishigaki K, Hayashi T, Masuda T, Kannagi M. *Arch Virol.* 2009;154(9):1457-64.

8. Regulation of chemokine gene expression by hypoxia via cooperative activation of NF-kappaB and histone deacetylase. Safronova O, Pluemsampant S, Nakahama K, Morita I. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Nov;41(11):2270-80.

9. Direct formation of proteo-liposomes by in vitro synthesis and cellular cytosolic delivery with connexin-expressing liposomes. Kaneda M, Nomura SM, Ichinose S, Kondo S, Nakahama K, Akiyoshi K, Morita I. *Biomaterials.* 2009 Aug;30(23-24):3971-7.

10. The steady-state expression of connexin43 is maintained by the PI3K/Akt in osteoblasts. Bhattacharjee R, Kaneda M, Nakahama K, Morita I. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 May 1;382(2):440-4.

11. The reduction in pigment epithelium-derived factor is a sign of malignancy in ovarian cancer expressing low-level of vascular endothelial growth factor. Tsuchiya T, Nakahama K, Asakawa Y, Maemura T, Tanaka M, Takeda S, Morita M, Morita I. *Gynecol Endocrinol.* 2009 Feb;25(2):104-9.

12. The role of Mac-1 (CD11b/CD18) in osteoclast differentiation induced by

receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. Hayashi H, Nakahama K, Sato T, Tuchiya T, Asakawa Y, Maemura T, Tanaka M, Morita M, Morita I., *FEBS Lett.* 2008 Sep 22;582(21-22):3243-8.

13. Altered function of factor I caused by amyloid beta: implication for pathogenesis of age-related macular degeneration from Drusen. Wang J, Ohno-Matsui K, Yoshida T, Kojima A, Shimada N, Nakahama K, Safranov O, Iwata N, Saido TC, Mochizuki M, Morita I., *J Immunol.* 2008 Jul 1;181(1):712-20.

14. Vitamin K2 suppresses malignancy of HuH7 hepatoma cells via inhibition of connexin 43. Kaneda M, Zhang D, Bhattacharjee R, Nakahama K, Arai S, Morita I. *Cancer Lett.* 2008 May 8;263(1):53-60.

〔学会発表〕(計 件)

(李 香蘭), 穠山 雅子, 中浜 健一, 興石 太郎, 竹田 省, 森田 育男、破骨細胞分化における ICAM-2 の役割、第 3 3 回日本分子生物学会年会、第 8 3 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド

(中浜 健一), 小沢 仁, 鈴木 岳史, 森田 育男、ギャップジャンクションを介した破骨細胞分化抑制作用の検討、第 3 3 回日本分子生物学会年会、第 8 3 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド

(小沢仁) 鈴木岳之、中浜健一、森田育男、異なるタイプの細胞間 GJIC を介した cAMP 量の変動、第 83 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月 18 日、大阪

(Praween Wayakanon), Rajib Bhattacharjee, Makato Kaneda, Ken-ichi Nakahama and I kuo Morita, **The Role of C-terminus of Cx43 in Gap Junction Plaque Internalization**, 第 2 0 回細胞間ジャンクション研究会、2010年1月23日、東京

(Jizhong Yuan), 穠山雅子、中浜健一、佐藤孝浩、植松 宏、森田育男、破骨細胞分化に及ぼす多価不飽和脂肪酸の影響、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、横浜 (Bhattacharjee R), Kaneda M, Nakahama K and Morita I., The steady-state expression level of connexin43 is maintained by the PI3K/Akt pathway. 10th International Symposium on Mechanism of Vasodilatation, June 1-3, 2009, Matsushima, Miyagi, Japan

(津川順一) 小牧基浩、中浜健一、天笠光雄、森田育男 . 印刷技術を用いて羊膜に転写

した骨芽細胞による骨再生療法 . ポスター演題 . 第 26 回日本骨代謝学会学術集会 . 大阪 . 2008 年 10 月 29 ~ 31 日

(林 秀隆) 中浜健一、森田育男 . 破骨細胞形成における Mac-1, (CD11b/CD18) の役割について . ポスター演題 . 第 26 回日本骨代謝学会学術集会 . 大阪 . 2008 年 10 月 29 ~ 31 日 (Nakahama K), Hayashi H, Sato T, Morita I. The role of Mac-1 (CD11/CD18) in osteoclast differentiation induced by receptor activator of nuclear factor- B ligand (RANKLE). 48th The American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, USA, December 13-17, 2008

(Bhattacharjee R), Kaneda M, Nakahama K, Morita I. Phosphatidylinositol 3-kinase akt regulates connexin43 expression through mRNA stability osteoblasts. 48th The American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, USA, December 13-17, 2008

〔その他〕

ホームページ URL

<http://www.tmd.ac.jp/dent/cell/> 分子細胞機能学分野 TOP.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中浜 健一 (NAKAHAMA KEN-ICHI)
東京医科歯科大学・准教授
研究者番号: 60281515

(2) 研究分担者

森田 育男 (MORITA IKUO)
東京医科歯科大学・教授
研究者番号: 60100129

横山 知永子 (YOKOYAMA CHIEKO)

東京医科歯科大学・COE 特任教授
研究者番号: 90200914

佐藤 孝浩 (SATO TAKAHIRO)

東京医科歯科大学・寄付講座職員
研究者番号: 20397003

市野瀬 志津子 (ICHINOSE SHIZUKO)

東京医科歯科大学・助教
研究者番号: 60015146

(3) 連携研究者

穠山 雅子 (AKIYAMA MASAKO)

東京医科歯科大学・特任助教
研究者番号: 30436646