

機関番号：32622

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592185

研究課題名 (和文) 炎症性骨破壊における破骨細胞の動態—バイオイメージング手法による解析—

研究課題名 (英文) In vivo imaging of osteoclast precursor recruitment to the inflammatory site where extensive bone destruction occurs

研究代表者

鈴木 恵子 (KEIKO SUZUKI)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：50119187

研究成果の概要 (和文)：骨破壊の担当細胞である破骨細胞と、炎症細胞および免疫細胞が複雑に相互作用する炎症性骨破壊の病態解明のため、疾患モデル動物体外から観察できる破骨前駆細胞を用いてバイオイメージング手法により実験を行った。その結果、全身的に投与した破骨前駆細胞が MCP1 および MIP1alpha の作用を介して炎症部位にリクルートされ、成熟破骨細胞へと分化することが確認された。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we investigated the mobilization of osteoclast precursor cells (OCPs) in living mice, in which the interrelationship among different cell types are maintained, by using in vivo imaging techniques. Within 3 days of luciferase (Luc)-Tg OCPs injection, Luc-positive cells were detected in the inflammation site, secondary lymph nodes and spleen; and furthermore, expression of TNFalpha, IL-1beta, IL-6, MCP-1 and MIP-1alpha mRNAs were significantly increased in LPS- or Pam3-injected mice. These findings indicate that OCPs circulating in the bloodstream migrate into the local inflammation site through MCP-1/MIP-1alpha activation and can take part in the rapid and extensive bone destruction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：炎症性骨破壊、破骨細胞、イメージング、骨吸収治療薬

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ、歯周病、骨転移腫瘍などでは骨代謝バランスの崩壊により、重篤な骨破壊が起こる。その結果、歩行困難・歯の喪失・耐え難い骨痛などが生じ、患者の QOL は著しく損なわれる。骨代謝カプリングは全身因子および局所因子の両方により厳密に制御されているが、骨破壊部位では骨吸収活性を有する破骨細胞のみならず、炎症・免疫細胞が

深く関与するため、その病態は非常に複雑である。すなわち、病態を解明するためには複数の細胞種がインタクトな相互作用を保っている in vivo における研究が必須であると考えられる。近年、医療・生物学へのレーザー共焦点顕微鏡など蛍光観察技術の応用が確立され急速に進展している。このような可視化技術は非侵襲の状態で体外からの観察が可能であることから、麻酔下で生きたまま

の動物、すなわち同一動物体内の変化を詳細に検討できるという極めて有用な手法である。

2. 研究の目的

本研究では生きたままの病態モデル動物を使い、複数の細胞種が相互に関連する骨破壊の病態を解明し、正常な骨代謝へと復帰させる新規治療薬を開発することを目的として以下の検討を行った。

(1) バイオイメージング手法の確立

麻酔下で生きたままの動物、すなわち同一動物体内の変化を詳細に検討できるという極めて有用な手法である。これに発光が検出できる luciferase transgenic ラットおよび蛍光タンパク質 EGFP transgenic ラット由来の破骨前駆細胞を併用することにより、更に詳細な破骨細胞の体内動態の解析を可能にする。

(2) 炎症性骨破壊の病態モデル動物作製と骨破壊評価法の確立

歯周病や骨髄炎などでは、細菌感染に対して本来は生体防御のために起きた炎症反応が過剰な骨組織破壊につながり、ひいては修復不可能な深刻な病態を引き起こすことになる。この反応過程には Toll-like receptor (TLR; グラム陽性菌は TLR2, グラム陰性菌は TLR4) が関与することが知られている。これら TLRs に特異的なリガンドを動物に投与することにより、骨破壊を起こさせるとともに、小動物用 X 線 CT を用いて、骨吸収像の観察および骨密度変化が計測できるようにする。

3. 研究の方法

(1) 炎症性骨破壊モデル動物を用いる in vivo imaging

従来の研究成果から、破骨細胞形成が促進されることが示された細菌由来成分である Pam3CSK4 (Pam3) および LPS をマウス頭蓋骨骨膜下に投与して炎症性骨破壊モデル動物を作製する。このマウスに Luciferase transgenic (LucTg) または EGFP transgenic (EGFPTg) ラット由来骨髄細胞を adoptive transfer により移入し、細胞の生体内動態について IVIS™, OV110™ を用いて in vivo imaging を行う。

(2) 炎症性骨破壊モデル動物についての生化学的検討

In vivo imaging 実験終了直後の動物から、頭蓋骨、頭部炎症皮膚、脾臓、骨髄を採取する。これらの組織から Lysing matrix™ を用いて total RNA を調製し、real time RT-PCR により遺伝子発現を調べる。

(3) 炎症性骨破壊モデル動物についての組織化学的検討

In vivo imaging 実験終了直後の動物から、頭蓋骨、脾臓、大腿骨を採取する。凍結切片作製後、免疫蛍光染色を行い、レーザー共焦

点顕微鏡により標的分子の局在について検討する。

4. 研究成果

(1) LucTg ラット由来骨髄細胞を MCSF, RANKL 存在下で培養して破骨前駆細胞を調製した。この細胞を LPS, Pam3CSK4 投与により炎症性骨破壊を起こした SCID マウスに adoptive transfer により移入し、細胞の生体内動態について in vivo imaging を行った結果、細胞移入後 3 日以内に骨破壊部位に Luc 由来の発光を観察することができた (図 1)。

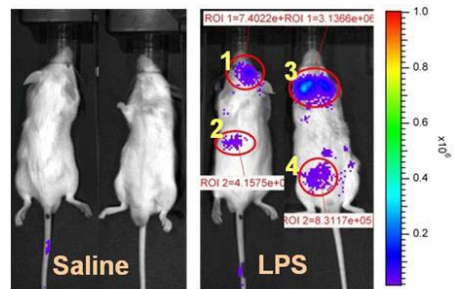


図 1

これに対して、前駆細胞に分化していない主としてリンパ球からなる骨髄細胞画分を投与した場合には、2 次リンパ節を中心として全身的に分布していたことから、破骨細胞前駆細胞のみが、炎症部位に特異的にリクルートされることが示された。

(2) 骨破壊部位における細胞についてさらに詳細に検討するために、EGFP Tg ラット由来の骨髄細胞を用いて、同様の in vivo imaging を行った結果、炎症を惹起したマウスでは頭蓋骨に蛍光をもつ多核細胞が分布することが示された (図 2)。

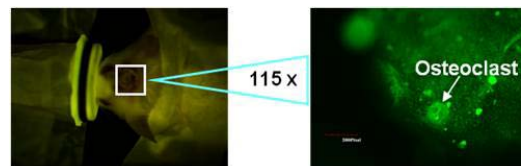


図 2

凍結切片を作製して免疫染色後、レーザー共焦点顕微鏡により観察した結果、多核で TRAP 活性をもつ EGFP 陽性細胞が確認された。このことから、移入したラット由来前駆細胞が宿主であるマウス体内で成熟破骨細胞へと分化したことが示された。

(3) LucTg ラット由来の破骨前駆細胞を移入したマウスの頭蓋骨サンプルの遺伝子発現について real-time RT-PCR により解析した結果、luciferase, rat GAPDH の発現、さらに rat TRAP mRNA 量の増加がみられたことから、全身投与した骨髄細胞由来の破骨前駆細胞が炎症部位まで遊走し、TRAP 活性を有する破骨細胞へと分化したことが示された。また、現在開発中の治療薬および Zoledronate 同時投与により当該遺伝子の発現は減弱し

たことから、治療薬により前駆細胞の炎症部位へのリクルートが抑制されると考えられた。

(4) LPS および Pam3 を投与したマウスの頭蓋骨の遺伝子発現について real-time RT-PCR により解析した結果、骨吸収マーカー (TRAP, cathepsinK, MMP9)、炎症性サイトカイン (TNFalpha, IL1beta, IL6)、および (MCP1, MIP1alpha) の発現上昇が認められた。また、それぞれの受容体である TLR4 および TLR2 欠損動物では骨破壊が完全に抑制され、上記の遺伝子発現も全く観察されなかったことから、細菌由来成分はそれぞれの自然免疫反応を介するメカニズムで骨破壊を起こすことが示された。

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 6 件)

- ① Hisashi Shinoda, Sadaaki Takeyama, Keiko Suzuki, Shinobu Murakami and Shoji Yamada: Pharmacological topics of bone metabolism: A novel bisphosphonate for the treatment of periodontitis, J Pharmacol. Sci, 査読有、106: 555-558, 2008.
- ② Akiko Karakawa, Yukiko Fukawa, Masako Okazaki, Katsuhiko Takahashi, Tsuneyoshi Sano, Hitoshi Amano Matsuo Yamamoto and Shoji Yamada: Diclofenac sodium inhibits NFkappaB transcription in osteoclasts. J Dent Res, 査読有、88: 1042-47, 2009.
- ③ Keiko Suzuki and Shoji Yamada: Triacylated lipopeptide, a component of Gram-positive bacteria, induces osteoclastogenesis in the absence of RANKL and resorbs calvarial bone *in vivo* through Toll-like receptor 2. Oral Ther Pharmacol, 査読有、29: 9-14, 2010.
- ④ Nobuhiro Sakai, Keiko Suzuki, Tomio Morohashi and Shoji Yamada: Na⁺/Ca²⁺ exchanger mRNA and orientation of F-actin filaments in cultured osteoblastic cells. Dent Med Res, 査読有、30: 117-123, 2010.
- ⑤ Akiyoshi Hoshino, Keiko Suzuki, Kenji Yamamoto et al., Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes osteopenia due to impaired functions of osteoclasts and osteoblasts. J Biol Chem, 査読有、285: 28826-37, 2010.
- ⑥ Akiko Karakawa, Tsuneyoshi Sano, Hitoshi Amano and Shoji Yamada: Inhibitory mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drugs on osteoclast differentiation and activation. J Oral Bios, 査読有、52: 119-124, 2010.

[学会発表] (計 17 件)

- ① Keiko Suzuki, Akiyoshi Hoshino, Kenji

Yamamoto and Shoji Yamada: Pam₃CSK₄, a TLR2 agonist, induces osteoclastogenesis RANKL-independently. (The 81st Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Yokohama, March 2008)

- ② Keiko Suzuki, Susan R. Rittling, David T. Denhardt, Shoji Yamada and Jaro Sodek: Immunocytochemical Analysis of Osteopontin Function in Osteoclast Formation and Activation (CIHR Group in Matrix Dynamics Symposium, Toronto, May 2008)

- ③ 村上忍、竹山禎章、鈴木恵子、山田庄司、篠田 壽: 歯周病治療薬としての [(4-methylthio) phenylthio] methanebisphosphonate の妥当性 (日本薬理学会北部会、Sendai, September 2008)

- ④ 篠田 壽、村上忍、竹山禎章、鈴木恵子、山田庄司: ワークショップ「歯周疾患による骨量減少の薬物療法」骨形成作用をもつ新規ビスフォスフォネートに関する知見 (第 50 回 歯科基礎医学会学術大会、Tokyo, September 2008)

- ⑤ 森脇佐和子、鈴木恵子、宮内睦美、高田隆、新飯田俊平: 細菌由来の gamma-グルタミルトランスペプチダーゼは骨破壊因子か (第 50 回 歯科基礎医学会学術大会、Tokyo, September 2008)

- ⑥ 鈴木恵子、新飯田俊平、山田庄司: Toll-like receptor 2 アゴニストによる RANKL-および TNFalpha-非依存的な破骨細胞誘導 (第 26 回日本骨代謝学会、Osaka, October 2008)

- ⑦ 川添祐亮、宮内睦美、田口明、田妻進、鈴木恵子、新飯田俊平、高田隆: 胆汁うっ滞性肝疾患に伴う gamma-glutamyl transpeptidase 血症が骨破壊に及ぼす影響について (第 26 回日本骨代謝学会、Osaka, October 2008)

- ⑧ Keiko Suzuki, Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya, Kenji Yamamoto and Shoji Yamada: Visualization of preosteoclast movement in a murine model of inflammatory osteolysis induced by lipopolysaccharide. (The 82nd Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Yokohama, March 2009)

- ⑨ 鈴木恵子、山田庄司: 「炎症・免疫システムの新たな paradigm による病態の解明と治療法の開発」—炎症性骨破壊における破骨細胞の動態—バイオイメージング手法による解析— (平成 20 年度昭和大学共同研究成果発表会、Tokyo, March 2009)

- ⑩ 鈴木恵子、山田庄司: 炎症性骨破壊モデル動物における破骨細胞の体内動態 (第 27 回日本骨代謝学会、Osaka, Sep 2009)

- ⑪ 篠田 壽、鈴木恵子、村上 忍、竹山禎章、山田庄司: Anabolic な作用を持つ新規

ビスホスホネート、[4-(methylthio)phenylthio] methanebisphosphonate (第 27 回日本骨代謝学会、Osaka, Sep 2009)

⑫ 篠田 壽、鈴木恵子、村上 忍、竹山禎章、山田庄司：新規ビスホスホネート、[4-(methylthio)phenylthio] methanebisphosphonate の骨形成促進作用 (第 60 回日本薬理学会北部会、Toyama, Sep 2009)

⑬ Keiko Suzuki, Fumitaka Takeshita, Kenji Yamamoto, Shoji Yamada and Takahiro Ochiya: Recruitment of osteoclast precursor cells into the inflammatory site where extensive bone destruction occurs. (The 83rd Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Yokohama, March 2010)

⑭ Keiko Suzuki, Fumitaka Takeshita, Kenji Yamamoto, Shoji Yamada, Hisashi Shinoda and Takahiro Ochiya: In Vivo Imaging of Osteoclast Precursor Recruitment to the Inflammatory Site where Extensive Bone Destruction Occurs. (ASBMR 2010 Annual Meeting, Toronto, Oct 2010)

⑮ Hisashi Shinoda, Keiko Suzuki, Mirei Chiba, Shinobu Murakami, Sadaaki Takeyama, Yuka Narusawa, Hiroaki Hirotani, Shoji Yamada, Kaoru Igarashi and Paula Stern: A Novel Bisphosphonate with Potent Anabolic Action. (ASBMR 2010 Annual Meeting, Toronto, Oct 2010)

⑯ Hisashi Shinoda, Shinobu Murakami, Keiko Suzuki, Mirei Chiba, Sadaaki Takeyama, Yuka Narusawa, Hiroaki Hirotani, Shoji Yamada, Kaoru Igarashi and Paula Stern: Structure-activity Relationships of Bisphosphonates with Respect to their Effect on the LPS-induced Increase in the Synthesis of Prostaglandin E2 and Nitric Oxide. (ASBMR 2010 Annual Meeting, Toronto, Oct 2010)

⑰ Akiko Karakawa, Hitoshi Amano, Keiko Suzuki and Shoji Yamada: Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Inhibit Osteoclast Activation by Inhibiting Nuclear Translocation of NFκB. (ASBMR 2010 Annual Meeting, Toronto, Oct 2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

① 名称：[4-(メチルチオ)フェニルチオ]メタンビスホスホン酸又は薬学的に許容され得るその塩を有効成分とする骨形成促進剤
発明者：篠田 壽、五十嵐 薫、村上 忍、鈴木 恵子

種類：特許

番号：特願 2008-225484

出願年月日：H20 年 9 月 3 日

国内外の別：国内

② 名称：[4-(メチルチオ)フェニルチオ]メタンビスホスホン酸又は薬学的に許容され得るその塩を有効成分とする骨形成促進剤
発明者：篠田 壽、五十嵐 薫、村上 忍、鈴木 恵子

種類：特許

番号：PCT/JP2009/003758

出願年月日：H21 年 8 月 5 日

国内外の別：国外

③ 名称：OSTEOGENESIS PROMOTER COMPRISING

[4-(METHYLTHIO)PHENYLTHIO]METHANE BISPHTHONIC ACID OR PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALT THEREOF AS ACTIVE INGREDIENT

発明者：Hisashi Shinoda, Kaoru Igarashi, Shinobu Murakami, Keiko Suzuki

種類：特許

番号：09811231.1-1216

出願年月日：H22 年 4 月 28 日

国内外の別：国外

[その他]

① IN Cell Image Competition 2010、アジアチャンピオン

② Bio Techniques, 48(3) 表紙掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 恵子 (KEIKO SUZUKI)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：50119187

(2) 研究分担者

山田 庄司 (SHOJI YAMADA)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：00111617