

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792077

研究課題名 (和文) 骨折治癒におけるTIMP3の機能的意義と、新規骨折治癒促進薬の創薬

研究課題名 (英文) Clarification of the function of TIMP3 in fracture healing and development of new fracture healing drug

研究代表者

日浅 雅博 (HIASA MASAHIRO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：90511337

研究成果の概要 (和文)：単球は破骨細胞と樹状細胞に分化することが知られているが、その分化振り分けの機序は不明な点が多い。我々は骨髄間質細胞がTIMP3を豊富に産生することを見だし、これによって単球のTACE活性を阻害し単球上のM-CSF受容体発現を誘導することで、破骨細胞分化を促進し樹状細胞分化を抑制することを明らかとした。さらには破骨細胞分化に従い単球自身のTIMP3発現も誘導され、TACE活性の抑制によるM-CSF受容体発現誘導に寄与するものと考えられた。本研究により、骨髄間質細胞はTACEを介したM-CSF受容体切断を制御し単球分化を破骨細胞側へとシフトさせ骨吸収と同時に抗炎症効果をもたらし、骨治癒や骨リモデリングに関与すると示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Monocytes can give rise to osteoclasts (OCs), and dendritic cells (DCs), but these differentiation mechanism is unclear. We clarified that BMSCs up-modulate M-CSF receptor on monocytes through TIMP-3 elaborated by BMSCs to facilitate osteoclastogenesis and suppress DC differentiation, and that TIMP-3 expression is induced in OCs by themselves during osteoclastogenesis to further block TACE activity and enhance the surface expression of M-CSF receptor. This study demonstrated that the suppression of TACE-mediated shedding of M-CSF receptor by BMSCs may dysregulate monocyte differentiation towards OCs to cause bone resorption and anti-inflammatory response in bone remodeling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児歯学

キーワード：破骨細胞、樹状細胞、骨折治癒

## 1. 研究開始当初の背景

顎変形症に対する顎骨移動術後は、骨癒合までの治癒期間に咬合支持力を欠き、一時的

な開口や摂食障害などを生じる。そのため顎骨骨切り部の骨癒合までの治癒期間の短縮は、矯正歯科臨床の一助となりうることから、

その基礎的背景を明らかにすることが重要となる。

骨折治癒過程は、炎症期、修復期、リモデリング期から構成され、この一連の治癒過程は炎症に関与する免疫細胞、組織を構成する線維芽細胞や血流の構築を行う血管内皮細胞、骨リモデリングを担う骨芽細胞や破骨細胞等が相互に複雑なネットワークを形成することで成立している。

このような組織修復時における細胞同士の相互作用は、主にサイトカインや成長因子を中心に考えられてきたが、近年、接着分子、酵素等によっても制御されていることが徐々に明らかとなってきた (Blobel et al, Nat Rev Mol Cell Biol. 6(1):32-43, 2005)。中でも、我々は Tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) と呼ばれる酵素に以前より着目している。骨リモデリングにおける骨吸収を担う破骨細胞と、高い抗原提示能を持ち免疫の中心的役割を担う樹状細胞は、同一の前駆細胞から分化する。我々は現在までに破骨細胞と樹状細胞の分化の振り分けが、TACE による M-CSF 受容体の切断を介した M-CSF シグナルの制御によって調節されることを明らかにしてきた。

TACE は膜結合型として合成される TNF  $\alpha$ 、 $\beta$ -アミロイド前駆体蛋白質 ( $\beta$ -APP)、腫瘍化増殖因子 (TGF  $\alpha$ )、L-セレクトリン等を細胞外で切断・遊離する多機能酵素であり、炎症性疾患 (TNF  $\alpha$ )、発癌 (TGF  $\alpha$ )、アルツハイマー病 ( $\beta$ -APP) や白血球のローリング・浸潤 (L-セレクトリン) に関与する可能性が指摘されている。その活性を直接制御する因子については不明のままであったが、近年 Tissue inhibitors of matrix metalloproteinase 3 (TIMP3) が TACE を効果的に抑制する因子としての機能をもつことが見いだされ、炎症をコントロールする中心的な因子として脚光をあびている (Black et al, Nat Genet. 36(9):934-5, 2004)。しかしながら、TIMP3 の骨代謝における役割については未だ不明な点が多く、こと骨折治癒過程における役割についての知見はほぼ皆無である。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨折治癒過程における骨癒合のメカニズムについて分子生物学的手法を用いて解明するとともに、新規骨折治癒促進薬を開発することを目的に、骨折治癒マウスモデルを作製し、TIMP3 が骨折治癒過程においていかなる役割を担うかを明らかにすることとした。

## 3. 研究の方法

(1) In vitro 実験系でのリコンビナント TIMP3 の骨芽細胞分化、破骨細胞分化、

免疫細胞に対する効果の解析

### ① 骨芽細胞分化における TIMP3 の役割の検討

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を用い TIMP3 存在下と非存在下で BMP 2 による石灰化を比較検討した。石灰化の判定には Von Kossa 染色を行い、同時に RNA を回収し骨芽細胞分化マーカーである osterix、Runx2、osteocalcin の発現を real-time PCR 法を用い解析した。

### ② 破骨細胞分化に対する TIMP3 の効果の検討

マウス骨髄よりフラッシュアウトし回収した骨髄細胞を用い、TIMP3 存在下と非存在下で M-CSF と sRANKL 誘導性の破骨細胞分化を比較検討した。破骨細胞分化の判定は TRAP 染色による細胞数カウント、分化マーカーである c-fos、NFATc1 の発現を real-time PCR 法を用い解析した。破骨細胞の活性化に対しては、ウシ骨片上で単離した破骨細胞を培養し pit assay を行い骨吸収面積の定量を顕微鏡下で行った。

### ③ 免疫細胞に対する TIMP3 の影響の検討

マウス骨髄細胞からの GM-CSF と IL-4 による樹状細胞分化が TIMP3 の添加によりどのような変化を示すかをフローサイトメトリーによる表面抗原分子の発現を比較することで解析を行った。発現を検討するマーカーとして CD11b、CD11c、CD80、CD86、MHC class II、F4/80 等を用いた。

### (2) TIMP3 siRNA による発現抑制が骨芽細胞分化、破骨細胞分化、免疫細胞に及ぼす影響

#### ① TIMP3 siRNA の導入効率の検討

骨芽細胞様細胞およびマウス骨髄細胞を用い、TIMP3 に対する発現抑制効果の高い合成 siRNA の配列の決定と、導入効率および効果持続時間を、遺伝子レベルでは RT-PCR 法、蛋白レベルではウエスタンブロット法や ELISA 法を用い評価した。

#### ② TIMP3 siRNA による発現抑制が及ぼす骨芽細胞や破骨細胞の分化、免疫細胞への効果の検討

TIMP3 siRNA による発現抑制をマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞、マウス骨髄細胞に対し行い、前述と同様の実験系にて骨芽細胞分化、破骨細胞分化、免疫細胞への影響について検討した。

### (3) マウス骨折治癒モデルの確立

Maes らの報告 (Maes et al, J Clin

Invest. 116(5):1230-42, 2006) を参考にマウス骨折治癒モデルを確立した。方法として、10 週齢雄性マウスを用い脛骨を露出させ、脛骨近位より 26G 針を骨軸に平行に髓内へ刺入し、髓内釘挿入部を作成し、骨幹部でニッパーを用いて骨切りを行った。その後、直径 0.4mm のステンレススチールワイヤーを 26G 針の内部に挿入し、骨近位より髓内、骨折部を通り遠位骨片髓内へ挿入し、髓内釘として骨折部を固定した。骨折後 3 日、7 日、10 日、20 日目において軟エックス線撮影、マイクロ CT による形態学的観察を行った。

#### (4) TIMP3 ノックアウトマウスを用いた解析

これらの得られた結果をさらに確立するため、前述の方法を用い *in vitro* および *in vivo* での解析を行った。

#### 4. 研究成果

TACE 活性抑制制御因子である TIMP3 の骨折治癒過程における役割を検討するため、*in vitro* で骨リモデリングを担う骨芽細胞、破骨細胞、免疫細胞等との相互作用を検索した。

各臓器および各種細胞での TIMP3 発現パターンを比較した。結果、各臓器においてはほぼ均等な発現パターンを示し、各種細胞については間質細胞での発現が非常に高くおよび破骨細胞での強い TIMP3 発現を認めた。

次に組み替え TIMP3 蛋白添加ならびに、siRNA 導入による破骨細胞分化と骨芽細胞分化についての影響について検討した。

組み替え TIMP3 蛋白添加では、骨芽細胞分化において BMP2 による石灰化結節の形成に特記する変化は認められなかった。骨芽細胞の遺伝子分化マーカーについても TIMP3 蛋白の添加の有無で特記すべき変化は認められなかった。破骨細胞分化系においては、組み替え TIMP3 蛋白添加によって破骨細胞分化の若干の亢進が認められた。また破骨細胞前駆細胞の細胞表面での M-CSF 受容体の発現上昇を TIMP3 蛋白添加下で認めた。しかしながら、TACE 阻害薬で認められたような強力な破骨細胞誘導効果や M-CSF 受容体発現上昇ほどではなかった。樹状細胞分化については TIMP3 添加により軽度の抑制効果を認めたが、やはり TACE 阻害薬添加時ほどの効果は認められず、組み替え蛋白を添加することで、その生細胞への効果を検討することはあまり適していないものと考えられたため TIMP3 の発現が高発現であった骨髄間質細胞と他の細胞との TIMP3 を介した相互作用について検討することとした。

骨髄間質細胞との共培養により破骨細胞分化は強力に誘導された。また樹状細胞分化は

強力に抑制された。さらに破骨細胞と樹状細胞の前駆細胞である単球での M-CSF 受容体発現は強力に誘導された。また培養上清中の可溶性 M-CSF 受容体は濃度低下を示したことから TACE を介した M-CSF 受容体の切断が骨髄間質細胞によって抑制されることが示唆された。

そこで次にこのような骨髄間質細胞による M-CSF 受容体の切断抑制が、骨髄間質細胞の TIMP3 が原因であるかを siRNA 導入による TIMP3 発現抑制系において検証した。TIMP3 siRNA の骨髄間質細胞への導入効率は約 70% であった。結果、骨髄間質細胞への TIMP3 siRNA 導入により、骨髄間質細胞による樹状細胞分化抑制や破骨細胞分化誘導は認められなくなった。また、単球の M-CSF 受容体発現上昇も認められなくなり、培養上清中の M-CSF 受容体の濃度は上昇へと変化した。この結果骨髄間質細胞による樹状細胞分化抑制と破骨細胞分化誘導には、骨髄間質細胞の TIMP3 による単球の M-CSF 受容体切断の制御が関与することが確認された。

また、TIMP3 siRNA の導入を単球へ行ったら、破骨細胞分化を強力に抑制した。そこで破骨細胞分化における各種段階での TIMP3 発現について検索したところ、破骨細胞前駆細胞ではほとんど認められず、破骨細胞に分化するに従いその発現が増強する事を見いだした。この結果、骨髄間質細胞が供給する TIMP3 のみならず、破骨細胞自身においても TIMP3 は TACE 活性の抑制による M-CSF 受容体発現誘導に寄与すると考えられた。

さらに TIMP3 ノックアウトマウスを用いてその骨芽細胞や前駆細胞である間質細胞、破骨細胞、樹状細胞を中心とした免疫細胞等との相互作用を検索した。TIMP3 ノックアウトマウスは、骨組織に対し特記すべき表現系は存在しなかった。

骨芽細胞の前駆細胞である骨髄間質細胞には、豊富に TIMP3 の発現が認められ、骨髄間質細胞と破骨細胞の前駆細胞である単球を共培養すると、単球の細胞膜表面の M-CSFR 発現が著しく亢進した。一方、TIMP3 ノックアウトマウスの間質細胞と単球の共培養で単球の M-CSFR 発現上昇は認められなかった。これは TIMP3 ノックアウトマウスの間質細胞と野生型マウスの単球を共培養した場合でも同様であり、間質細胞の発現する TIMP3 が単球の M-CSFR 発現に対し正に制御することが考えられた。そこで骨髄間質細胞の発現する TIMP3 が単球の破骨細胞と樹状細胞分化にどのような影響を及ぼすかを検討した。TIMP3 ノックアウトマウス単球の GM-CSF と IL-4 の刺激による樹状細胞分化能については野生型と比較し優位な差は認められなかった。しかしながら、野生型マウスの骨髄間質細胞は破骨細胞分化を促進し、樹状細胞分

化を抑制したのに対し、TIMP3 ノックアウトマウスの骨髄間質細胞は樹状細胞分化の抑制が認められず破骨細胞分化の促進も認められなかった。この結果、骨髄間質細胞は骨髄内でTIMP3を豊富に産生することで単球のM-CSFR発現を促進し破骨細胞分化を誘導し、樹状細胞分化を抑制していることが示唆された。

本研究により骨髄内という環境での免疫抑制と骨吸収の調節機構が明らかとなった。現在、骨折治癒モデルを確立したため骨折治癒におけるTIMP3の役割について検討中である。これまでの本研究の成果は現在投稿準備中である。

#### 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1件)

- ① Hiasa M, Abe M, Nakano A, Oda A, Amou H, Kido S, Takeuchi K, Kagawa K, Yata K, Hashimoto T, Ozaki S, Asaoka K, Tanaka E, Moriyama K, Matsumoto T. GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme (TACE). Blood. 114 (20), 4517~4526, 2009, 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① Masahiro Hiasa, Masahiro Abe, et al. Bone marrow stromal cells suppresses TACE-mediated M-CSR and RANK shedding to facilitate osteoclastogenesis and suppress DC differentiation from monocytes. ASBMR. 2010/10/15-19. Toronto.
- ② 日浅雅博、安倍正博ら、骨髄間質細胞は単球のTACE活性を抑制し破骨細胞を形成する、第72回日本血液学会、2010/9/24-26、パシフィコ横浜(横浜市)
- ③ 日浅雅博、安倍正博ら、骨髄間質細胞は単球のTACE活性を抑制し樹状細胞分化を抑制し破骨細胞分化を誘導する、第28回日本骨代謝学会、2010/7/21-23、京王プラザホテル(東京都)
- ④ Masahiro Hiasa, Masahiro Abe, et al. Stroma inhibit DC differentiation through the suppression of M-CSFR shedding, 88th IADR. 2010/6/14-17. Barcelona.
- ⑤ 日浅雅博、ニッケルチタン合金の腐食とその生体為害性、ナノバイオメディカル学会第2回大会、2010/2/22、大阪大学

吹田キャンパス(大阪)

[図書] (計0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

日浅 雅博 (HIASA MASAHIRO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号: 90511337

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: