

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430094

研究課題名(和文) Notchシグナル活性化による骨代謝制御と骨肉腫発症の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Maintenance of bone homeostasis by DLL1-mediated Notch activation

研究代表者

中山 ゆかり(六車ゆかり)(NAKAYAMA-MUGURUMA, YUKARI)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：80398750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨代謝の恒常性は、リモデリングと呼ばれるプロセスにおける骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスの上に成り立っている。これまでの報告から、Notchシグナルの活性化が骨芽細胞と破骨細胞の分化決定及び成熟と機能の調節に関与し、骨代謝を制御していることが示されていたが、その具体的な分子機構の解析は十分に行われていなかった。本研究では、細胞内におけるNotchの活性そのものを操作する従来の方法と異なり、特定のリガンドを過剰に発現することによって、細胞間相互作用によるリガンド特異的なNotchの活性化が骨代謝制御に果たす役割を解析した。

研究成果の概要(英文)：By using a transgenic approach that modified the expression of delta-like 1 (DLL-1) or Jagged1 in osteoblast-specific manner, we investigated the ligand-specific effects of Notch signaling in bone homeostasis. We demonstrated that the proper regulation of DLL1 expression in osteoblasts was essential for maintenance of bone remodeling. DLL1-Notch signaling promoted proliferation of committed but immature osteoblasts, thus being responsible for the expansion of bone forming cell pool. However, DLL1-Notch signaling inhibited further differentiation of those expanded osteoblasts to become fully mature functional osteoblasts, causing a substantial decrease in bone formation. Although osteoblast-specific expression of DLL1 did not alter intrinsic ability of osteoclasts, deregulation of osteoblast differentiation and maturation impaired maturation and function of osteoclasts due to a failed osteoblast-osteoclast coupling, resulting in severely suppressed bone metabolic turn-over.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：Notchシグナル 骨代謝 骨芽細胞 リガンド特異性

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨形成と Notch シグナル

Notch シグナルは、進化過程において種を越えて保存されているシグナル伝達経路であり、ヒトを含む哺乳類動物では、4つの Notch 受容体 (Notch 1 - 4) と5つのリガンド (Jagged 1, 2, Delta-like ligand (Dll) 1, 3, 4) のいずれかが結合することで細胞内シグナルが活性化される。Notch シグナルの活性化は、発生期においては、器官形成や幹細胞の運命決定における分子制御機構の中心を担っており、成体においては、幹細胞の維持や組織の代謝といった生理機能の調節を司るとともに、癌の発生にも深く関与していると考えられている。

骨は、体を維持し、脳・心臓・造血器といった生命維持に不可欠な臓器を保護する器官であるとともに、骨吸収と骨形成を繰り返す骨代謝によってミネラルの恒常性を維持するという役割も担っている。Notch シグナルは、骨生理においても発生段階初期の骨格形成における体節決定という非常に重要な役割を果たしている。そのため、Notch やそのリガンドの遺伝子に変異や欠損を有するマウスの多くは、骨格を含む器官形成不全により胎生致死となる。ヒトにおいても、胎生初期に Notch シグナル関連分子に変異を生じた場合には、同様の理由で出産にいたるケースが少ないと考えられるが、Dll3 遺伝子変異による脊柱肋骨異骨症 (SCDO) や、Jagged1 遺伝子変異による Alagille 症候群といった先天性異常を伴った出産が知られている。Alagille 症候群は遺伝性胆汁うっ滞疾患として知られているが、椎体の前方弓癒合不全を特徴とする骨格形成不全でもある。これらのヒトおよびマウスの知見から、Notch シグナルが骨形成 (モデリング) の中心を担うシグナル伝達経路であるのは明らかであると言える。

(2) 骨代謝と Notch シグナル

近年の遺伝子操作技術の発達は、目的遺伝子の発現を組織及び時期特異的に操作することを可能とし、Notch シグナル経路の生後の骨代謝における役割が、そうしたモデルマウスの解析によって明らかとなってきた。すなわち、Notch シグナルを間葉系幹細胞 (MSC) や骨芽細胞で強制的に活性化したマウスや、逆にシグナルを遮断したマウスでは骨代謝のバランスが崩壊し、骨量が異常に増減するという論文が相次いで発表されたのである (Zanotti et al. *Endocrinology*, Hilton et al. *Engin et al. Nature Medicine* 2008)。このような研究成果は、Notch シグナルは骨形成 (モデリング) が完成した後の骨再形成 (リモデリング) にも関与していることを示しており、Notch シグナルの骨の生理学における重要性を一層明らかにしたと同時に、大きな疑問を投げかけている。なぜなら、骨芽細胞で Notch シグナルを活性化したときに、骨が増える場合と減る場合があり、さらに、Notch シグナルを活性化あるいは不活性化した場合のいずれにおいても骨量が増加するという矛盾した結果が示されたのである。一方、細胞株を用いた遺伝子導入実験等においても、Notch シグナルが骨芽細胞分化に促進的に働くのか、抑制的に働くのかという基本的な疑問に対して、論文によって異なる結論が導かれている。現時点では、このようなパラドキシカルな現象を、Notch の骨代謝制御における2面性と説明付けて辻褄を合わせるにとどまっている。

(3) リガンドに選択される Notch シグナル活性化の効果

こうしたなか、Notch は細胞外ドメインの糖鎖修飾によって結合するリガンドを分子

的に判別し、いつどこで Notch が活性化されるか選択していることが明らかとなってきた (Yamamoto et al. Science 2012)。さらに、血管新生においては、血管内皮細胞に発現する Notch が Jagged1 と結合するのか、あるいは Dll4 と結合するのかによって、血管内皮細胞の分化と増殖に全く異なる効果をもたらされることが明らかとなっており (Benedito et al. Cell 2009)、骨代謝制御においても Notch がどのリガンドと結合するかが重要な鍵を握っていると考えられる。

2. 研究の目的

骨代謝の恒常性は、MSC 由来の骨芽細胞による骨形成と造血幹細胞 (HSC) 由来の破骨細胞による骨吸収のバランスの上に成り立っており、両細胞の分化異常等に伴う相互作用の破綻は、骨代謝疾患を引き起こすばかりか、ある種の癌の発生や転移の要因となっている。本研究の目的は、リガンド特異的な Notch シグナルの活性化による骨形成と骨代謝の恒常性維持における分子制御機構を明らかにすることで、骨代謝疾患や骨肉腫等の骨のがんの病態を解明し、もって、これらの疾患の治療方法の開発に寄与することである。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子導入実験による骨分化と遺伝子発現の解析

リガンド特異的な Notch シグナルの活性化が骨芽細胞分化に果たす役割を特定する。MSC および骨芽細胞前駆細胞の細胞株 (C3H10T2/1, MC3T3-E1) に Dll1, Jagged1, Notch の細胞内活性化ドメイン (ICN) を遺伝子導入し、リガンド特異的な Notch シグナルの活性化が、Runx2, osterix, Osteocalcin といった骨分化マーカーの発現と最終的な骨芽細胞分化に与える影響を特定する。

上記の結果をもとに、リガンド特異的な Notch シグナルの活性化による、骨代謝制御の分子メカニズムを解明する。

(2) モデルマウスの骨病態の特定

既に作製した Dll1 または Jagged1 を骨芽細胞特異的に発現するモデルマウス (DLL1Tg 及び JAG1Tg マウス) の解析により、Notch シグナルの生後の骨代謝における役割を *in vivo* で特定する。これまですでに、DLL1Tg マウスは、骨大理石病様の骨病変を示すが、JAG1Tg マウスは、皮質骨に骨溶解を示すものの、骨量には変化がないことを確認している。骨形態計測により、モデルマウスの骨病態における骨代謝の変化を明らかにするとともに、骨標本の免疫染色等により、モデルマウスの骨病変の分子病態を同定する。さらに、ノックマウス (Dll1Cre) を用いて、Notch シグナルの骨分化における生理的意義を解析する。

(3) モデルマウス由来の細胞を用いた骨芽細胞と破骨細胞の分化異常の特定

骨芽細胞分化の解析

モデルマウスの MSC を既存の方法により濃縮し (Morikawa et al. JEM 2009)、分化誘導剤を加えて細胞の分化増殖過程を経時的に解析して、骨分化のどの段階の細胞で異常が生じているかを特定する。

破骨細胞分化の解析

モデルマウス由来の HSC が有する破骨細胞分化能力を、サイトカイン (RANKL および M-CSF など) 刺激により確認する。また、申請者が確立したコロニーアッセイ法 (Muguruma et al. Blood 1998) により、骨髄内に存在する破骨細胞前駆細胞を定量し、

個体としての破骨細胞分化能を同定する。

骨芽細胞と破骨細胞の相互作用の解析

骨芽細胞と造血細胞を共培養し、モデルマウス由来の骨芽細胞が有する破骨細胞分化誘導能力を調べる。共培養法は、骨芽細胞を刺激することでサイトカインの産生を促進し、そのサイトカイン刺激により破骨細胞を形成するものであるが、この相互作用に異常があると破骨細胞が誘導できない。上記破骨細胞解析と同時に行うことにより、破骨細胞分化不全の原因が MSC 側にあるのか、それとも HSC 側に存在するのかを特定することができる

4. 研究成果

<DLL1Tg マウスの骨形成>

(1) DLL1Tg マウスでは、骨量が著しく増加しているのに対し、JAG1Tg マウスではほとんど骨量の変化が見られず(図1)、DII1が骨量維持に重要な役割を果たしていることが示された。また、DLL1Tg マウスの骨量増加は骨芽細胞と破骨細胞の両者の機能が低下するという低回転型の骨量増加であることが分かった。次に組織標本で DLL1Tg マウスの骨形態を詳細に解析すると、出生前後から骨髄内で Notch シグナルが活性化した幼弱な骨芽細胞が異常に増殖し、その一方で成熟骨芽細胞が顕著に低下していることが明らかとなった。

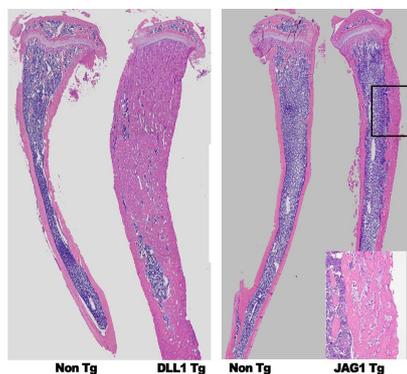


図1 モデルマウスの骨形態

(2) DLL1Tg および DII1Cre マウスの骨髄細胞を用いて、骨芽細胞への分化培養を行い、経時的に分化段階を解析すると、DLL1Tg では未成熟な骨芽細胞の分化は促進しているが、それらの細胞の成熟が抑制されていた。それに対して、DII1Cre では、MSC または骨芽細胞前駆細胞から骨芽細胞への分化が抑制される一方で、骨芽細胞の成熟はわずかに促進されていた。このことから、DII1 を介した Notch シグナルの骨芽細胞における活性化は、osterix 陽性の未熟な骨芽細胞の増殖を促進するが、成熟に関しては抑制的に作用していることが明らかになった。

<DLL1Tg マウスの骨吸収>

(1) 出生前後における破骨細胞の分化を解析すると、出生前では Tg と野生型マウスの間には差は見られなかった。しかし、出生直後、つまり、骨形成優位からリモデリング優位へと移行する時期において、骨髄内に存在する破骨細胞全体の数自体に著しい増減は認められなかったが、骨内膜に局在し骨吸収窩を形成する成熟多核破骨細胞の著しい減少が明らかとなった。

(2) 破骨細胞分化培養実験では、サイトカイン添加培養による HSC から破骨細胞への分化に変化は見られなかったが、骨芽細胞との共培養による破骨細胞分化が低下していた。すなわち、リモデリングに重要な骨芽細胞と破骨細胞の相互作用に異常があるといえる。そしてその原因が、骨のマトリックス中に存在する骨芽細胞による RANKL 産生の減少であることが明らかとなり(図2) 同時に Semaphorin3B の顕著な発現減少も示された。つまり、DII1 を介して骨芽細胞で Notch が継続的に活性化することが、Semaphorin3B の発現と RANKL 産生を抑制していると考えられる。

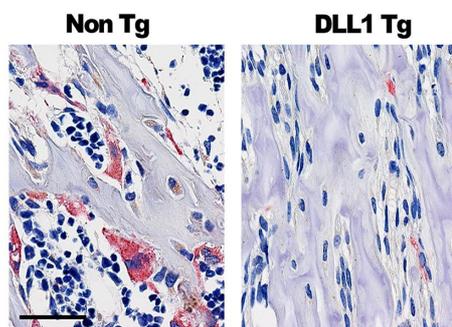


図2 DLL1Tg では、RANKL 陽性（茶色）の骨芽細胞と、TRAP 陽性（赤）の破骨細胞が著しく減少している。

【結語】

以上の実験から、Jagged1 ではなく DLL1 を介した Notch シグナルの活性化が骨代謝制御の中心となっていることが明らかとなった。骨代謝における DLL1 特異的な Notch シグナルの活性化の一義的な役割は、骨芽細胞系に運命決定された細胞の増殖を促すことで骨形成細胞のプールを増大するものであると考える。さらには、骨吸収が過剰となっている状況においては、骨芽細胞を介した破骨細胞の分化と成熟を抑制することで、骨形成と骨吸収のバランスを制御し、骨代謝の恒常性を維持していると思われる。

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2件)

Muguruma Y, Hozumi K, Warita T, Yahata T, Uno T, Ito M, Ando K
Maintenance of Bone Homeostasis by DLL1-Mediated Notch Signaling.
J Cell Physiol. 2016 Oct 13. doi: 10.1002/jcp.25647.

Matsushita H, Yahata T, Sheng Y, Nakamura Y, Muguruma Y, Matsuzawa H, Tanaka M, Hayashi H, Sato T, Damdinsuren A, Onizuka M, Ito M, Miyachi H, Pandolfi PP, Ando K.
Establishment of a humanized APL model via the transplantation of PML-RARA-transduced human common

myeloid progenitors into immunodeficient mice.

PLoS One. 2014 Nov 4;9(11):e111082. doi: 10.1371/journal.pone.0111082.
eCollection 2014

〔学会発表〕(計6件)

Muguruma Y, Hozumi K, Warita T, Yahata T, Uno T, Ito M, Ando K
Jagged1-Notch interaction in the niche is responsible for acquisition of drug-resistance
第78回日本血液学会、2016年10月13日～15日、パシフィコ横浜

Ibrahim AA, Yahata T, Kaneko S, Muguruma Y, Miyata T, Ando K
TGF- β induced intracellular PAI-1 is a critical regulator of HSC localization in the niche
第78回日本血液学会、2016年10月13日～15日、パシフィコ横浜

Yahata T, Ibrahim AA, Muguruma Y, Miyata T, Ando K
Intracellular PAI-1 is a critical regulator of stem cell localization in the niche
Gordon Conference, 2016年2月1日～18日、Four Points Sheraton, California

Muguruma Y, Warita T, Nakamura Y, Yahata T, Ishikawa S, Isagawa T, Ando K
Identification of molecular interactions in MM cell niche in vivo
第77回日本血液学会、2015年10月16日～18日、ホテル日航金沢

Muguruma Y, Hozumi K, Yahata T, Ito M, Ando K
Jagged1-Notch signal supports human myeloma cell survival
第76回日本血液学会、2014年10月31日～11月2日、大阪国際会議場

Matsushita H, Yahata T, Sheng Y, Nakamura Y, Muguruma Y, Matsuzawa H, Tanaka M, Hayashi H, Sato T, Damdinsuren A, Onizuka M, Ito M, Miyachi H, Pandolfi PP, Ando K
In vivo analysis of PML-RARA in a humanized mouse model
America Society of Hematology, 2014年12月4日～9日、San Francisco, California

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.u-tokai.ac.jp/daigakuin/web/saisei.html>

論文紹介（骨代謝学会ホームページ）

http://www.jsbmr.jp/1st_author/232_yumuruma.html

6．研究組織

(1)研究代表者

中山（六車）ゆかり (MUGURUMA, Yukari)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：80398750

(2)研究分担者

安藤 潔 (ANDO, Kiyoshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70176014

八幡 崇 (YAHATA, Takashi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：10398753