

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07773

研究課題名(和文) TGF- β によるイヌ破骨細胞形成調節：マウス破骨細胞形成モデルと異なる機構の解明研究課題名(英文) Regulation of canine osteoclastogenesis by TGF- β : a distinct mechanism from murine osteoclastogenesis

研究代表者

村上 賢 (Murakami, Masaru)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：80271360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：イヌ骨髓細胞から再現性良く破骨細胞を分化させることができた。イヌ破骨細胞形成機構は、マウスの機構とオーバーラップする点があるもののTGF- β の役割はマウスとイヌとで異なり、イヌ細胞ではTGF- β は破骨細胞を負に制御した。この理由の一つは、破骨細胞分化促進活性を有するMitf-Eの発現抑制による。本研究の結果は、特定の動物種の破骨細胞形成に影響を及ぼす要因を同定するためには、その動物種の細胞を使って検討する必要性があることを明示する。

研究成果の概要(英文)：We developed a reproducible method to induce osteoclasts from canine bone marrow cells. Mechanism underlying canine osteoclastogenesis partly overlapped to that underlying murine osteoclastogenesis, but role of TGF- β was distinct between canine cells and murine cells-TGF- β negatively regulated differentiation of canine bone marrow cells to osteoclasts, resulting from inhibition of induction of Mitf-E, a tissue-restricted transcription factor to induce osteoclastogenesis. The present research indicates the necessity of the study using cells originated from the species of interest to evaluate factors affecting osteoclast differentiation precisely, because of species-dependent responses.

研究分野：分子生物学

キーワード：発生・分化 破骨細胞分化 TGF- β イヌ

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床獣医学ならびに予防獣医学の目覚ましい発展は、伴侶動物の長寿化を可能にした。その結果、ヒトと同様の加齢に伴う疾病に悩まされるようになってきている。加齢に伴う骨粗鬆症もその一つであり、骨粗鬆症に起因する体幹部の圧迫骨折は結果としてQOL (Quality Of Life)を著しく損なう。実際、イヌの臨床現場で椎体の圧迫骨折や骨塩密度の低下はそう珍しいことではない。

(2) 骨組織を構成する細胞の分化・機能制御の詳細な理解は、骨疾患の根本的解決につながるので長年地道な研究が行われてきた。骨粗鬆症は、破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を上回ることに起因することから、破骨細胞の運命決定ならびに分化に関わる知見は比較的蓄積されている。骨粗鬆症は、とくに閉経後の女性で多発するので、エストロゲン(E2)やカルシウム代謝関連ホルモンである上皮小体ホルモン(PTH)、活性型ビタミンD (VD)、ならびにカルシトニン(CT)の役割に関する研究が進められてきた。また、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) や receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) といった局所因子が破骨細胞の分化や機能に及ぼす影響についても併せて解析されてきた。その結果、これらの液性因子が破骨細胞形成過程で果たす役割については、十分な知見が得られている (Immunol Rev, 231:241.2009; Bonekey Rep, 3:480.2014)もの、不明な点も多い。

(3) 研究代表者らは、全身で発現する局所因子である transforming growth factor- β (TGF- β) は microphthalmia-associated transcription factor (Mitf) と協調して破骨細胞形成を推進することを明らかにした (Cell BiochemFunct, 32:401.2014)。TGF- β は細胞増殖・分化を強力に制御する局所因子である一方、Mitf は破骨細胞を含む限定された細胞においてのみ発現する組織特異的転写因子である。TGF- β は最終的に転写因子である Smad に情報を伝達し、Smad-binding element を介して標的遺伝子の転写を調節するのに対して、Mitf は標的遺伝子の E-box を介して転写調節を行う。マウス Mitf には第一エクソンの異なる少なくとも 9 種類のアイソフォームが知られている (Pigment Cell Res, 16:261.2003)。マウス Raw264.7 細胞を RANKL 処理すると破骨細胞に分化するが、その際、Mitf-E アイソフォームが特異的に発現誘導され、TGF- β には Mitf-E 発現を促進すること、TGF- β には RANKL 誘導性の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(Trap)陽性多核細胞(破骨細胞)形成、ならびに破骨細胞機能を反映する Trap 発現量の亢進機能があることを見出し、TGF- β →Mitf-E→破骨細胞形成促進という経路を解明した (Cell BiochemFunct, 32.401.2014)。同様の結果は、マウス骨髄細胞

を用いた場合にも認められた。

2. 研究の目的

上述のように、長寿化に伴い、イヌの(潜在的)骨疾患は増加傾向にある。破骨細胞は骨吸収の責任細胞なので、破骨細胞の数と機能の制御破綻は骨代謝異常に繋がる。本研究では、イヌ骨髄細胞を破骨細胞に分化させる際に TGF- β が果たす役割、ならびに作用機構を明らかにすること、ならびに、イヌ末梢血単核細胞が破骨細胞に分化する方法の確立を目的とする。これらの解析を通して、イヌ破骨細胞活性化を介した骨疾患惹起に関する基礎的理解が研究全体の目的である。具体的な本研究の目的は以下の5点に収斂する。

- (1) イヌ骨髄細胞から破骨細胞分化法の確立
- (2) イヌ骨髄細胞から破骨細胞形成過程における TGF- β の役割の解明
- (3) イヌ破骨細胞形成過程を促進する Mitf-E と TGF- β の関係の解明
- (4) イヌ末梢血単核細胞から破骨細胞分化法の確立するための第一歩として、比較的多量の末梢血を得やすいウシ末梢血単核細胞からの破骨細胞誘導法の確立
- (5) イヌ末梢血単核細胞から破骨細胞分化法の確立

3. 研究の方法

(1) イヌ骨髄細胞から破骨細胞分化を引き起こす最小条件を見出すために、イヌあるいはマウス骨髄細胞を様々な濃度の M-CSF と RANKL で処理し、破骨細胞形成を Trap 陽性多核細胞数ならびにマーカー遺伝子である、Trap、カテプシン K (Ctsk) ならびに osteoclast-associated receptor (Oscar) の遺伝子発現量により評価した。また、破骨細胞形成を進める転写因子 nuclear factor of activated T-cells (NFAT) c1 の発現量も定量した。Trap 陽性多核細胞数の計測は組織化学的手法により、遺伝子発現量の定量は、定量的 RT-PCR 法により評価した。

(2) (1)の結果、得られた破骨細胞最小条件下において、TGF- β 処理が破骨細胞形成に及ぼす影響を検討した。

(3) イヌ骨髄細胞の入手は困難である。イヌ破骨細胞形成に影響を及ぼす要因の解明のためには、比較的簡便に入手できる材料を出発点にして検討する必要がある。そこで、入手が比較的簡便な末梢血単核細胞からの破骨細胞分化を試みた。多量の末梢血を比較的容易に得られるので、まずは、ウシ末梢血を用いて(1)で確立した骨髄細胞の破骨細胞分化方法に準じた方法で破骨細胞分化を試みた。

(4) (3)の結果、ウシ末梢血単核細胞から破骨細胞誘導が可能になったので、イヌ末梢血単核細胞から破骨細胞分化を試みた。

4. 研究成果

(1) マウス骨髄細胞を用いた破骨細胞形成法に準じて、イヌ骨髄細胞を様々な濃度のM-CSFで3日間培養した。その後、非接着細胞を様々な濃度のRANKL存在下で4日間培養し、Trap染色を行った結果、M-CSFは25 ng/mL以上の濃度で、50 ng/mLの濃度でRANKL処理した時に、再現性良くTrap陽性細胞が出現した。

(2) この条件で培養した場合、破骨細胞分化を中心的に制御している転写因子であるNFATc1や破骨細胞の形質を示すTrap、CtskならびにItgb3発現はRANKL無処理群に比べて高発現した。つまり、イヌ骨髄細胞をM-CSF(25 ng/mL)で3日間処理した後、培養皿に付着しなかった細胞をRANKL(50 ng/mL)処理することで破骨細胞が形成されることが明らかになった。

(3) マウス骨髄細胞を破骨細胞に分化させる際にTGF- β 処理すると破骨細胞分化が促進されることを、研究代表者らのグループは以前明らかにしている(Cell Biochem Funct, 32: 401. 2014)。同様の処理をイヌ骨髄細胞を用いた破骨細胞形成系で調べたところ、TGF- β はTrap陽性多核細胞の形成を抑制すること、RANKLによるNFATc1発現誘導もTGF- β によって抑制されることを見出した。つまり、この結果は、イヌ骨髄細胞系におけるTGF- β の役割は、マウス骨髄細胞系での役割とは異なり、負の制御因子として機能することを明示している。

(4) マウス骨髄細胞の破骨細胞誘導メカニズムの一つに、RANKLによるMitf-Eの発現誘導が明らかにされている(Cell Biochem Funct, 32: 401. 2014)。Mitfは組織特異的転写因子で、破骨細胞形成や色素細胞の機能、マスト細胞形成を強力に推進することが知られている。数種類あるMitfのアイソフォームのうち、マウス骨髄細胞の破骨細胞誘導過程においては、Mitf-Eアイソフォームだけが特異的に誘導され、この誘導が破骨細胞形成に必須であることが示されている(Cell Biochem Funct, 32: 401. 2014)。イヌ骨髄細胞から破骨細胞形成過程におけるMitf-E発現変化を調べたところ、マウス骨髄細胞の系と同様、RANKL処理によりMitf-E発現は、顕著に亢進することを見出した。

(5) マウス骨髄細胞からM-CSF/RANKLによって破骨細胞形成を行った際にTGF- β 処理するとMitf-E発現がさらに上昇した(Cell Biochem Funct, 32: 401. 2014)が、イヌ骨髄細胞

から破骨細胞を誘導した場合、TGF- β はM-CSF/RANKL誘導性のMitf-E発現を抑制した。これらの結果を総合すると、マウスの場合と同様に、イヌの場合もMitf-E誘導を介して破骨細胞形成が促進される一方、マウス細胞とは異なり、イヌ細胞においてTGF- β はMitf-E発現を抑制することにより破骨細胞形成は抑制されると考えられた。この結果は、同一の分子でも動物種ごとに破骨細胞形成で果たす役割は異なる可能性を示唆している。

(6) イヌから末梢血を得ることに比べて、骨髄細胞を入手するのは困難である。末梢血から再現性良く破骨細胞形成を行えたら、破骨細胞形成に及ぼす要因を解明する上で有用であると考え、まずは、多量の末梢血を得やすいウシ末梢血を用いて検討を行った。ウシ末梢血から単核細胞を回収し、マウス・イヌ骨髄細胞から破骨細胞を分化させた方法と同様の方法で処理したところ、Trap陽性多核細胞を再現性良く生み出すことができた。この結果は、破骨細胞形成に必ずしも骨髄細胞は必要ではないこと、末梢血中の単核細胞でも十分なことを示している。

(7) そこで、同様の方法でイヌ末梢血単核細胞から破骨細胞形成を試みたが、再現性良くTrap陽性多核細胞を生み出すことはできなかった。この原因として、イヌ末梢血の量がウシ末梢血に比べて少なかったこと(骨髄細胞に比べて採取が容易なものの、体格的なこともあり、ウシ末梢血ほど多量の末梢血を得ることは困難であった)が一因ではないかと考えている。あるいは、マウス細胞とイヌ細胞のTGF- β に対する応答性の違いと同様に、ウシとイヌの動物種間差が原因かもしれない。

(8) 本研究課題の結果、イヌ破骨細胞形成機構は、マウスの機構とオーバーラップする点があるものの異なる点もあることから、特定の動物種の破骨細胞形成に影響を及ぼす要因を同定するためには、その動物種の細胞を使って検討する必要性が明示された。より詳細な検討を行うためには、より簡便な材料を用いる必要があるが、今回の検討では、末梢血からの再現性良い破骨細胞誘導は達成できなかった。その点については今後の課題である。

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 2 件)

Katakawa Y, Funaba M, Murakami M. Smad8/9 is regulated through the BMP pathway. J Cell Biochem. 2016 117(8):1788-1796. doi:

10.1002/jcb.25478. (査読有)

Asai K, Hisasue M, Shimokawa F, Funaba M, Murakami M.

TGF- β negatively regulates Mitf-E expression and canine osteoclastogenesis.

Biochem Genet. 2018 [Epub ahead of print]

doi: 10.1007/s10528-018-9860-y. (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

Asai K, Hisasue M, Shimokawa F, Funaba M, Murakami M.

Negative Regulation of Canine Osteoclastogenesis and Mitf-E Expression by Transforming Growth Factor- β

ASBMR 2017 Annual Meeting in Denver, Colorado USA., Sep.9,2017.

〔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

村上 賢 (MURAKAMI Masaru)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号: 80271360

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者

舟場 正幸 (FUNABA Masayuki)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 40238655

(4)研究協力者

()