

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11332

研究課題名(和文)骨微小環境における構造変化関連因子の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the structural change-related factor in the bone microenvironment

研究代表者

高岡 一樹 (TAKAOKA, KAZUKI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：60373122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞は造血系幹細胞である単球・マクロファージ系の破骨前駆細胞から分化する。本研究はRAW264.7細胞を用いて骨微小環境における破骨前駆細胞の運動能へのTGF- β 1の影響を検討することを目的とした。TGF- β 1を24時間作用させると細胞運動能は増加したが、72時間作用させると運動能は減少した。破骨細胞分化初期はTGF- β 1の影響下に細胞運動能は増加するが、後期になると運動能は低下することが分かった。破骨前駆細胞は分化によって細胞運動能が変化している可能性があり、分化に伴い徐々に運動能は低下している。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts (OC) are differentiated from monocyte/macrophage-lineage hematopoietic precursor cells which were termed OC precursors (OCPs). The aim of this study was to determine the effects of TGF- β 1 on migration of OCPs in the bone microenvironment using the pre-osteoclastic RAW264.7 cells. Cell migration was significantly increased by treatment of TGF- β 1 on 24 h, but was decreased by 72 h of treatment. These findings suggest that the migration of OCPs was enhanced by TGF- β 1 at early stages of osteoclast differentiation, and at later stages differentiated cells showed low migration. The cell migration change might be caused by osteoclast differentiation. Subsequently, migration gradually decreases following differentiation.

研究分野：口腔外科学

キーワード：骨微小環境 破骨前駆細胞 TGF-

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞分化のメカニズムは明らかになりつつあるが、in vivo での分化メカニズムは未だ不明な点が多い。生体内では単球系破骨前駆細胞が血中から骨へ遊走し、細胞周期の停止した静止期破骨前駆細胞は骨芽細胞により長期間(数週間)支持されている。このような安定した微小環境の状態へ、どのように破骨前駆細胞や骨芽細胞が極性および運動性を変化させていくのかは明らかでない。このような微小環境の極性の変化に伴う細胞運動能の変化は、上皮-間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)に類似していることに着目した。EMT の概念から、この微小環境を変化させるシグナルや変化に伴うマーカーを検索していくことが本研究の目的である。これが解明されれば、骨量減少性疾患や骨破壊性疾患の病態解明やマーカーを用いた診断・治療の進歩に大きくつながると考えている。

2. 研究の目的

破骨細胞は、造血系幹細胞である単球・マクロファージ系の前駆細胞から receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) の刺激で分化する。transforming growth factor-1 (TGF- β 1) はさまざまな細胞において、増殖や分化を制御するサイトカインである。骨組織には TGF- β 1 が大量に存在し、破骨細胞分化において TGF- β 1 が必須な因子であることが明らかになっている。

骨微小環境内において破骨前駆細胞が骨吸収部位へ移動してから分化するのか、先に分化してから移動するのか、または分化しながら移動するのかは明らかでない部分も多い。

本研究では、破骨前駆細胞が骨微小環境内で遊走、定着し分化する過程において、TGF- β 1 および RANKL の影響下に細胞運動能がどのように変化するのかを検討した。

3. 研究の方法

細胞はマクロファージ系破骨前駆細胞 RAW264.7 細胞(以下 RAW 細胞)を、薬剤は TGF- β 1、SB431542 (TGF- β 1 型受容体キナーゼ活性阻害剤) および RANKL を使用し、下記の条件下でそれぞれ培養した。

	Co	T2	T5	T20	T5S	R	RT2	RT5	RT20	RT5S
TGF- β 1(ng/ml)	0	2	5	20	5	0	2	5	20	5
RANKL(50 μ g/ml)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
SB431542(10 μ M)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+

(1) 各種薬剤作用後の細胞増殖能を経日的に検討した。

(2) 各種薬剤作用後の TRAP 活性を測定し破骨細胞様細胞への分化を経日的に検討した。

(3) 各種薬剤 24 時間および 72 時間作用後の細胞運動能の変化を migration assay にて検討した。

(4) western blot を行い、各種薬剤 24 時間および 72 時間作用後の RhoA、Rac1、Cdc42 の

発現を比較検討した。

(5) 各種薬剤 24 時間および 72 時間作用後の細胞接着能の変化を adhesion assay にて検討した。

(6) 各種薬剤 24 時間および 72 時間作用後のピンキュリンとアクチンの発現を免疫蛍光細胞染色にて比較検討した。

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005

4. 研究成果

(1) 細胞増殖能: TGF- β 1、RANKL 作用群はコントロール群と比較すると細胞増殖が抑制され、SB を作用させることにより増殖抑制は回復した(Fig. 1)。

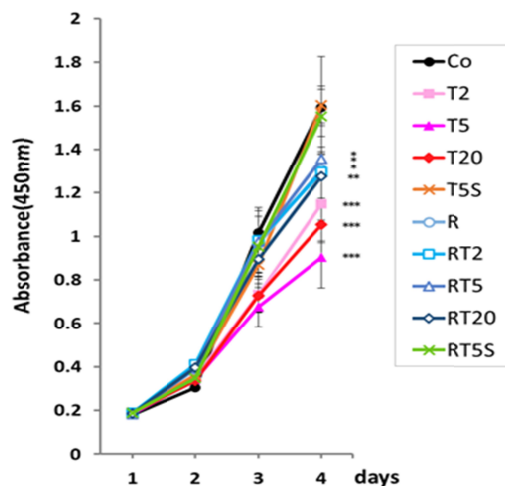


Fig. 1

(2) TRAP activity assay: TGF- β 1 単独作用では TRAP 活性は低く、破骨細胞様細胞への分化は認められなかった。TRAP 活性は TGF- β 1+ RANKL 作用群が最も高く、SB 作用により抑制された(Fig. 2)。

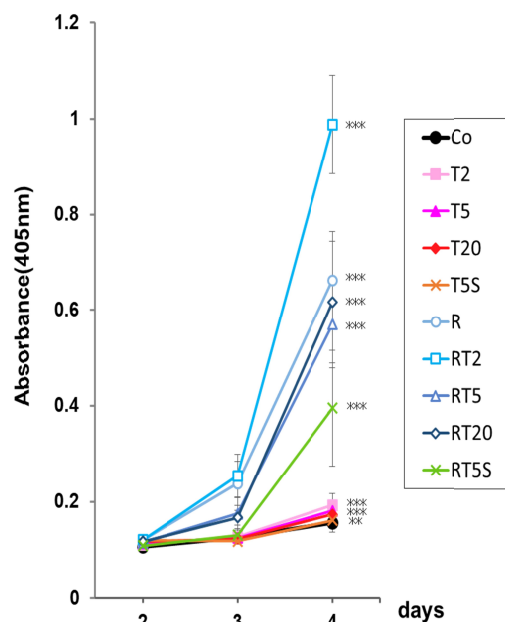


Fig. 2

(3) Migration assay: 24 時間作用後では, TGF- β 1 作用で細胞運動能が亢進し, SB 作用により抑制された。72 時間作用後では TGF- β 1 作用後で細胞運動能が低下し, SB 作用より亢進した(Fig. 3)。

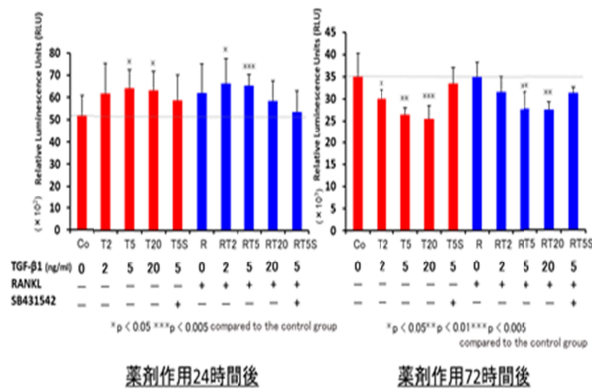


Fig. 3

(4) Western blot: 24 時間作用後では, TGF- β 1 作用により RhoA, Rac1 タンパクの発現が上昇した。72 時間作用後では, TGF- β 1 作用群の RhoA, Rac1, Cdc42 タンパクの発現は減少した(Fig. 4)。

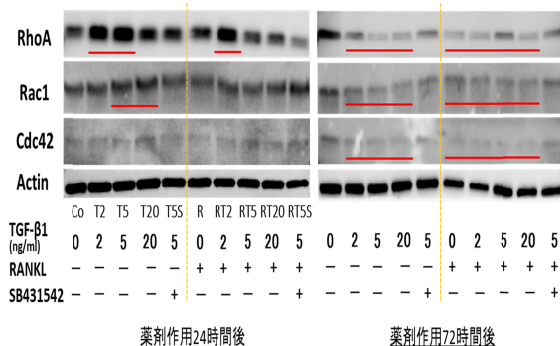


Fig. 4

(5) Adhesion assay: 24 時間作用後では, TGF- β 1 作用群 (T2, T5) は接着能が低下し, その傾向は RANKL を併用作用させても同様であった。72 時間作用後では, TGF- β 1 作用群 (T2, T5) の接着能の低下は回復傾向を示した(Fig. 5)。

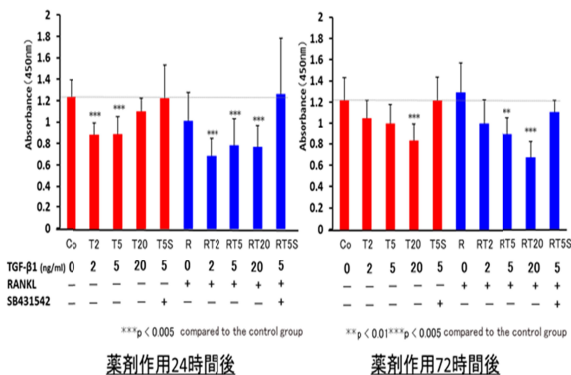


Fig. 5

(6) Immunocytochemical analysis: 24 時間作

用後では, TGF- β 1, RANKL 作用により球形から多角形へと形態変化を示した。TGF- β 1 作用群では, 突起部にアクチンとビンキュリンの発現上昇を認めた。72 時間作用後では, TGF- β 1 作用群の多角形態は消失し, RANKL 作用群は多核細胞へと変化した。TGF- β 1 および RANKL 作用のビンキュリンの発現は, RANKL 単独作用群と比較すると低下傾向を示した(Fig. 6)。

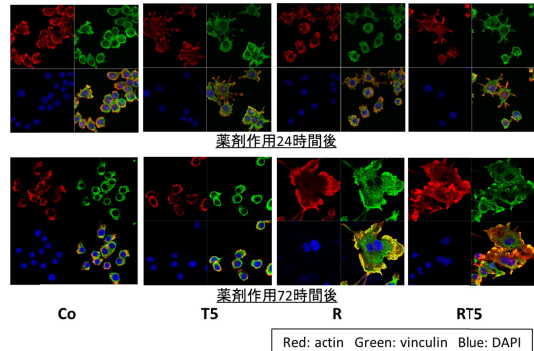


Fig. 6

骨微小環境では, TGF- β 1 の存在により, 破骨前駆細胞の接着能が低下, 運動能が亢進する。その後, 接着能を回復, 運動能を消失しながら, 骨リモデリング開始部に定着し, 骨芽細胞から提供される RANKL の影響を受けて, 破骨細胞へ分化していくと考えられた。

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1件)

高岡一樹、骨代謝に影響する疾患・薬剤とインプラント治療、Osaka Academy of Oral Implantology(査読無) 32, 26-34, 2018

[学会発表](計9件)

Ueta M, Takaoka K, Tamaoka J, Maeda H, Nishida M, Noguchi K, Kishimoto H, Effect of TGF- β 1 on osteoclast precursors in the bone microenvironment, The 2018 AADR/CADR Annual Meeting & Exhibition, 19-22, June, 2018, Fort Lauderdale (USA)

Tamaoka J, Takaoka K, Ueta M, Hattori H, Noguchi K, Kishimoto H, Osteonecrosis induction using bisphosphonate and oxidative stress inducer in mice, The 2018 AADR/CADR Annual Meeting & Exhibition, 19-22, June, 2018, Fort Lauderdale (USA)

上田美帆、高岡一樹、前田華子、野口一馬、岸本裕充、骨微小環境における破骨前駆細胞の分化に伴う細胞運動能の変化、第54回日本口腔組織培養学会総会・学術大会、2017年11月4日、岩手医科大学付属病院循環器医療センター(岩手)

上田 美帆、高岡 一樹、荒木 華子、玉岡 丈二、川邊 睦記、野口 一馬、岸本 裕充、骨微小環境における破骨前駆細胞の分化に伴う細胞運動能の変化、第 71 回日本口腔科学会学術集会、2017 年 4 月 26-28 日、ひめぎんホール（愛媛）

上田 美帆、高岡 一樹、荒木 華子、玉岡 丈二、川邊 睦記、野口 一馬、岸本 裕充、骨微小環境における破骨前駆細胞の遊走、定着機構の解明、第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2016 年 11 月 26 日、幕張メッセ（千葉）

上田 美帆、高岡 一樹、野口 一馬、岸本 裕充、骨微小環境における破骨前駆細胞の分化に伴う細胞運動能の変化、第 53 回日本口腔組織培養学会総会・学術大会、2016 年 11 月 18 日、石川県立美術（石川）
Tamaoka J, Takaoka K, Ueta M, Araki H, Noguchi K, Kishimoto H. The Effect of TGF- 1 on osteoclast precursors in the bone microenvironment. 23rd Congress of the European Association for Cranio Maxillo-Facial Surgery, 13-16 September, 2016, London (UK)

上田 美帆、高岡 一樹、荒木 華子、玉岡 丈二、川邊 睦記、野口 一馬、岸本 裕充、骨微小環境における細胞外物理的環境変化による Hippo シグナルの関与、第 70 回日本口腔科学会学術集会、2016 年 4 月 16-17 日、福岡国際会議場（福岡）
Tamaoka J, Takaoka K, Nishida M, Araki H, Noguchi K, Kishimoto H. Effect of TGF- 1 on osteoclast precursors in the bone microenvironment. IADR ANZ Division 55th Annual Scientific Meeting, 23-26 August, 2015, Dunedin (New Zealand)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高岡 一樹 （TAKAOKA, Kazuki）

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：60373122

(2)研究分担者

浦出 雅裕（URADE, Masahiro）

兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授

研究者番号：70104883