

機関番号：32404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20366

研究課題名(和文) 骨細胞由来の未知の破骨細胞形成抑制液性因子の同定とその作用機構の解明

研究課題名(英文) Identification of unknown osteoclastogenesis inhibitory humoral factor derived from osteocytes

研究代表者

林田 千代美 (HAYASHIDA, chiyomi)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：40710900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨細胞からのタンパク質分離精製を行うため血清(FBS)無しでの株化骨細胞MLO-Y4細胞の培養を検討したが、FBS無しではMLO-Y4細胞が死滅、培養上清の破骨細胞形成抑制効果も低下したため、10%FBSを培養に用いた。この培養上清を、filterで10群にタンパク質を分画して破骨細胞形成系に作用させた。群間の比較で分子量の範囲を特定する結果は得られず、血清の影響が考えられた。そのため、別の方法を検討し、初代骨細胞を骨基質に埋入したまま培養し、そこから回収したRNAに関して、マイクロアレイ解析を行った。解析の結果、本研究目的タンパク質の同定に向けて、検討を進めたい遺伝子が数種類確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

強靱な骨の大部分は骨吸収静止状態にあると考えられ、骨吸収静止状態に制御する機構として、骨格中に張り巡らされた骨細胞ネットワークによる監視・統制つまり骨の内部からの、骨細胞による負の破骨細胞制御機構が考えられる。本研究は、骨細胞由来の未知の破骨細胞形成抑制因子を同定し、その分子による破骨細胞形成抑制機構を明らかにすることを目的としたが、研究期間内には同定まで至らなかった。しかし、本研究での試行錯誤の結果、初代骨細胞を骨基質に埋入したまま培養し、そこから回収したRNAに関してマイクロアレイ解析を行うという、新しいアプローチに着手することができたため、今後の同定と研究発展に希望が持てる結果となった。

研究成果の概要(英文)：In order to perform protein isolation and purification from bone cells, culture of established bone marrow cell MLO-Y4 cells without serum (FBS) was examined, but without FBS, MLO-Y4 cells were killed and osteoclasts in culture supernatant 10% FBS was used for culture since the formation inhibitory effect was also reduced. This culture supernatant was fractionated into 10 groups of proteins by filter and allowed to act on the osteoclast formation system, but the result of specifying the range of molecular weight could not be obtained by comparison among groups, and the effect of serum was considered. It was done. Therefore, another method was examined, and primary bone cells were cultured while being embedded in a bone matrix, and microarray analysis was performed on RNA recovered therefrom. As a result of analysis, several types of genes that we wanted to study were identified for identification of the target protein of this research.

研究分野：歯学

キーワード：骨細胞 破骨細胞形成抑制

## 1. 研究開始当初の背景

骨代謝研究の流れと私の研究テーマの解決の課程において、以下に示すような背景と動機があった。

骨は、脊椎動物の支柱や歯の支持、運動器、脳心肺の保護、骨髄での造血、カルシウムやリンの貯蔵など、生命基盤を支える組織である。これらの役割を維持するため、骨構成細胞（破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞）は細胞間コミュニケーションを図り、古くなったり損傷を受けたりした骨組織の局所的改造（リモデリング）を絶えず行っている。

リモデリングは、骨表面において、破骨細胞が既存の骨基質を溶解・分解する“骨吸収”と、骨芽細胞が新しい骨基質を産生・分泌し骨吸収部位を補填する“骨形成”が均衡をとりつつ行われる。

骨細胞は、骨構成細胞の9割強を占め、唯一、骨基質中に埋め込まれた細胞で、細胞突起を有し、突起を骨基質中に網目状に張り巡らせ、骨細胞同士または骨表面の細胞と接触し細胞間ネットワークを形成する。宇宙の無重力や寝たきりの低荷重状態で骨の粗鬆化が進行するため、リモデリング機構の維持(骨吸収と骨形成の均衡維持)には、力学的負荷が重要とされている。この負荷を感知し、リモデリング全体を調節する司令塔と推測されている細胞こそが、骨細胞である。しかし、骨細胞によるリモデリング制御機構については、破骨細胞と骨芽細胞の分化機構や機能の多くが解明された今日においても、未解明な点が多い。

また、リモデリングは適宜局所で行われ、通常、骨格の大半はリモデリング不要な状態にある。新しく形成されたばかりの部位では、みだりに骨吸収が起こらないよう、破骨細胞形成を抑制する仕組みが働いていると考えられる。それを制御するのはやはり骨細胞であると考えられる。

骨吸収は、血中カルシウム濃度調節と微小損傷部位の修復の開始に重要な機構であり、歯科分野の事象としては歯の萌出や矯正移動の開始にも欠かせない。破骨細胞の分化制御には、骨芽細胞膜上に発現する破骨細胞分化誘導因子 receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) と破骨細胞分化抑制因子 osteoprotegerin (OPG) が重要であると広く理解されてきた。RANKL と破骨細胞前駆細胞が発現する receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) との結合により、破骨細胞前駆細胞は骨吸収能を有する破骨細胞に分化する。また、OPG は RANKL のおとり受容体で、RANKL/RANK 結合を阻害する。

リモデリング研究は長年、骨表面に存在する破骨細胞と骨芽細胞について活発に行われ、主な RANKL 供給細胞といえば“骨芽細胞”であった。しかし、近年、RANKL を骨細胞特異的に欠損させた遺伝子改変マウスを用いた研究から、リモデリング制御に重要な RANKL の主要な供給源は“骨細胞”であることが示唆された (Nakashima T, et al. *Nat Med.* 17:1231-34, 2011, Xiong J, et al. *Nat Med.* 17:1235-41, 2011)。

骨細胞は骨芽細胞から分化した細胞であるため、RANKL を発現している可能性は大いにあったが、骨細胞機能の研究は長年、硬い骨基質の障害に阻まれていた。その障害は、遺伝子改変マウスを用いる手法や、新しい骨細胞の培養法が開発されたことにより、近年急速に打破できつつある。

Nakashima らの研究から、骨細胞による正の破骨細胞形成調節についての重要な知見が得られたが、骨の大部分が平常時にはリモデリング不要の骨吸収静止状態にあるため、骨細胞による負の破骨細胞形成調節機構についての解明が、極めて重要である。

骨細胞由来の破骨細胞形成抑制因子の報告は、2014年以前には OPG と transforming growth factor (TGF)- $\beta$  のみであった。OPG は骨細胞での発現が証明されている (Kramer I, et al. *Mol Cell Biol.* 30:3071-85, 2010)。一方、TGF- $\beta$  の破骨細胞形成抑制作用 (Heino TJ, et al. *J Cell Biochem.* 85:185-97, 2002) には疑問がある。なぜなら、TGF- $\beta$  は破骨細胞前駆細胞に作用し RANKL による破骨細胞形成を促進し (Kaneda T, et al. *J Immunol.* 165:4254-63, 2000) かつ、また、TGF- $\beta$  活性が骨組織で亢進すると骨吸収が促進するからである (Grafe I, et al. *Nat Med.* 20:670-5, 2014)。つまり、OPG のみが骨細胞が産生する破骨細胞形成抑制因子として明らかで、他の分子は不明であった。

そこで私の所属研究グループでは、骨細胞が産生する OPG 以外の分子で、かつ RANKL/RANK シグナルを介さずに作用する破骨細胞形成抑制因子が存在すると考えた。我々が、マウス大腿骨初代骨細胞の新規培養法 (骨表面の細胞を除去し、骨基質に埋め込まれたままの骨細胞を培養する方法) を開発し研究を行った結果、骨細胞は interferon (IFN)- $\gamma$  を産生分泌し、その骨細胞由来 IFN- $\gamma$  が破骨細胞分化を大きく抑制することを見出した (Hayashida C, et al. *J Biol Chem.* 289:11545-55, 2014)。

2002年に遡ると、IFN- $\gamma$  の全身性欠損マウスは骨粗鬆症を呈するため、IFN- $\gamma$  が骨の粗鬆化 (破骨細胞形成の亢進状態) を抑制する因子であること、そして、そのメカニズムとして、RANKL 刺激を受けた破骨細胞前駆細胞が IFN- $\gamma$  を産生しオートクライン・パラクライン的に作用して破骨細胞分化を抑制するというネガティブフィードバック機構が報告されていた (Takayanagi H, et al. *Nature.* 416:744-49, 2002)。しかし、我々の研究から、RANKL 刺激を受けた破骨細胞前駆細胞が産生する量よりもはるかに大量の IFN- $\gamma$  を骨細胞が産生することが明らかとなり、骨細胞由来の IFN- $\gamma$  が破骨細胞形成の負の制御に重要な役割を演じている

ことが明らかになった。

破骨細胞の *in vitro* での分化過程には、二つのステージがある。一つ目は、骨髄細胞の単球/マクロファージ系の細胞から macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) の刺激により破骨細胞前駆細胞 (RANK 発現細胞) に分化する前期。二つ目は、RANKL 刺激により破骨細胞前駆細胞から破骨細胞に分化する後期である。

申請者は、この前期に、骨細胞由来液性因子が作用することでの破骨細胞形成抑制効果を確認している。このことは、RANK 発現前の、RANKL/RANK 経路に関係の無い時期に作用し、破骨細胞形成を抑制する能力を骨細胞由来液性因子が持つということである。我々の上記既報研究では、破骨細胞への分化過程の前期に、骨細胞由来液性因子と抗 IFN- $\gamma$  中和抗体を作用させることによって、骨細胞由来液性因子による破骨細胞形成抑制作用の一部がレスキューされることから、骨細胞由来破骨細胞形成抑制因子の一つが IFN- $\gamma$  であることを明らかにした。しかし、抗 IFN- $\gamma$  中和抗体で中和できない、IFN- $\gamma$  以外の骨細胞由来液性因子による破骨細胞形成抑制作用が存在すると考えられた。

以上のことから、本研究では、骨細胞由来の未知の破骨細胞形成抑制因子を明らかにし、骨細胞による破骨細胞形成の負の制御機構について解明することを課題とした。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨細胞由来の未知の破骨細胞形成抑制因子を同定し、その分子による破骨細胞形成抑制機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

当初、研究方法としては、

株化骨細胞 MLO-Y4 細胞の培養上清を回収し、硫酸沈殿で培養上清中の目的タンパク質粗画分を濃縮する。そして、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等を行う。各種クロマトグラフィーの後に、バイオアッセイを行い、破骨細胞形成抑制効果のあるタンパク質画分を選択し、最終的に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行うことによって目的タンパク質を分離精製する。その後、飛行時間型質量分析装置 (Time Of Flight Mass Spectrometry : TOF/MS) でペプチドの内部アミノ酸配列を解析し、データベースサーチ (MASCOT program) にかけて目的分子を同定する。

同定した分子の siRNA を作製し、株化骨細胞 MLO-Y4 細胞および初代骨細胞に導入し、これらの骨細胞由来の液性因子を破骨細胞形成系に作用させ、通常の骨細胞由来液性因子による破骨細胞形成抑制作用よりも、siRNA 導入後の骨細胞由来液性因子による破骨細胞形成抑制作用が減弱すること、つまり、破骨細胞形成が促進されることを明らかにする。

同定した分子を骨細胞が *in vivo* で実際に産生していることを骨組織切片の免疫染色で確認する。

同定した分子による破骨細胞分化の抑制がどのような機構からもたらされているか探索する。

以上、4 つの研究方法から、骨細胞が産生する未知の破骨細胞形成抑制液性因子を同定し、その分子による破骨細胞形成抑制機構を明らかにするという計画であった。

実際には、以下の方法で行った。

- (1) まず、タンパク質分離精製に用いる株化骨細胞の培養上清を集める作業から行った。培養上清からのタンパク質分離精製を行うには、培養液中の血清の影響を除く必要があると考えた。そのため、株化骨細胞 MLO-Y4 細胞を 2.5% fetal bovine serum (FBS) および 2.5% calf serum を含む  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) 中で 100 mm コラーゲンコート細胞培養皿上でコンフルエントになるまで 3 日間培養後、無血清  $\alpha$ -MEM に液交換し、1 日培養した培養上清を回収する作業を進めた。

- (2) タンパク質分離精製には培養上清が 50 リットル必要と考えていた。随時回収して  $-80^{\circ}\text{C}$  に保管しつつ、全量の回収には時間がかかるため、各種予備実験を行いながら進めた。しかし、予備実験や確認の実験の中で、無血清で 1 日培養後の株化骨細胞 MLO-Y4 細胞に活性の低下や死滅する細胞が認められたため、他の培養条件を検討した。

- (3) 培養条件の検討の結果、MLO-Y4 細胞を 2.5% FBS および 2.5% calf serum を含む  $\alpha$ -MEM 中でコンフルエントになるまで 3 日間培養後、10% FBS  $\alpha$ -MEM に液交換し、1 日培養した培養上清を用いる方法に変更し、回収した培養上清の破骨細胞形成抑制効果を確認する実験を行った。回収した培養上清に、破骨細胞形成抑制作用は認められた。しかし、この培養上清による破骨細胞形成抑制作用がどれくらいの分子量のタンパク質によるものなのかの目安を調べるために、filter で 10 群にタンパク質を分画して破骨細胞形成系に作用させたところ、群間の比較で分子量の範囲を特定する結果が得られなかった。その理由にも、血清の影響が考えられたため、タンパク質分離精製以外の方法で、目的分子を探索するための方法を検討した。検討の途中、本研究代表者の休業により約 1 年間の

研究中断期間が生じた。

- (4) 研究中断と、別の手法を決定するために時間を要したため、研究の進捗状況が遅れていたため、早急に目的を解決する方法を考えた。

目的分子を同定するための別の方法として、初代骨細胞を骨基質に埋入したまま培養し、そこから回収した RNA に関して、マイクロアレイ解析を行い、破骨細胞形成を抑制する可能性のある遺伝子の中から、液性因子として破骨細胞形成抑制性を有する分子を探索するという方法をとることとした。タンパク質精製のために培養上清を大量に回収するためには株化骨細胞を用いた方がよかったが、マイクロアレイ解析では、生体の細胞をはじめから用いる方が良く考え、MLO-Y4 細胞ではなく、初代骨細胞について検討することとした。

以前の研究で開発した、マウス大腿骨表面の細胞を除去し骨基質に埋め込まれたままの骨細胞 (Osteocyte-enriched bone fragments: OEBFs) を調製し、培養に用いた。具体的には、5 週齢の雄 ddy マウスの大腿骨をコラーゲン処理と EDTA 処理することにより調整した「OEBFs」を、HTS トランスウェル 24 システムの上方のインサートウェルのメンブレン上に置き、10%FBS- MEM 中、あるいは、10%FBS- MEM に数種類の作用薬をそれぞれ添加した状態で 3 日間培養後、OEBFs をホモジナイズし、RNA を回収し、マイクロアレイ解析を行った。

マイクロアレイ解析の結果、骨細胞からの発現が、ある条件では亢進しある条件では低下するという遺伝子が認められたため、本研究の目的分子の同定に向けて、検討を進めたい遺伝子が数種類確認できた。

#### 4. 研究成果

本研究は、骨細胞由来の未知の破骨細胞形成抑制因子を同定し、その分子による破骨細胞形成抑制機構を明らかにすることを目的としたが、研究期間内に分子の同定までに至らなかった。期間内に解明できなかったことは遺憾にたえないが、本研究による試行錯誤の結果、初代骨細胞を骨基質に埋入したまま培養し、そこから回収した RNA に関して、マイクロアレイ解析を行うという、新しいアプローチに着手することができた。また、この培養方法により培養した骨細胞から、マイクロアレイ解析による骨細胞の遺伝子の解析が可能であることが初めて分かった。

今回のマイクロアレイ解析の結果、骨細胞からの発現が、ある条件では亢進しある条件では低下するという遺伝子が認められ、検討を進めたい遺伝子が数種類確認できた。従って、今後さらに本研究を発展させることにより、目的分子の同定や、未知の骨細胞機能の発見に希望が持てる結果となったと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hayashida-Abe C, Interferon- produced by osteocytes may negatively regulate osteoclastogenesis, *Journal of Oral Biosciences*, 査読有、58 巻、78-80 ページ、2016  
<https://doi.org/10.1016/j.job.2016.05.002>

〔学会発表〕(計 1 件)

(2016 年の休業以後 2018 年度末までは、出張による発表が困難であった。)

林田 千代美、骨細胞は破骨細胞形成抑制因子としてインターフェロン を産生する、第 57 回歯科基礎医学会学術大会、新潟、2015 年

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究分担者

無し

##### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：佐藤 卓也  
ローマ字氏名：(SATO, takuya)

研究協力者氏名：羽毛田 慈之

ローマ字氏名 : ( HAKEDA, yoshiyuki )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。