

令和 2 年 4 月 17 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05505

研究課題名(和文)炎症性骨疾患へのLOX-1の寄与とその分子機構の全容解明そして創薬へのアプローチ

研究課題名(英文) Elucidation of Involvement of LOX-1 in inflammatory bone destruction and the molecular mechanism for the LOX-1 actions, and an approach to develop the new drug for bone diseases.

研究代表者

羽毛田 慈之 (HAKEDA, Yoshiyuki)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：90164772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：LDLR KOマウスおよびLDLR/LOX-1 double KO (dKO) マウスにおいて、破骨細胞(OCLs)の細胞融合が阻害された。これらの遺伝子型 pre-OCLsは、LDLの取り込みが低下し、細胞表面コレステロール量も著しく減少した。さらに、細胞融合に関与する細胞表面ホスファチジルエタノールアミン(PE)量も、これらの遺伝子型pre-OCLsで減少した。また、PEを細胞表面移動させるABCG1トランスポーターを欠損させると、PEの細胞表面移動が減少し、それに伴って細胞融合が減少した。以上より、本研究はOCLsの多核化に新たなカスケードが関与していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

破骨細胞の過剰な活性化がもたらす骨粗鬆症や炎症性骨破壊の発症機構に関連して、従来考えられてきた破骨細胞の細胞融合機構とは異なって、本研究は、破骨細胞融合には細胞膜上のリン脂質、特にホスファチジルエタノールアミン(PE)の細胞膜内葉から外葉への分布転換が重要であり、その分布転換にはLDL受容体を介したLDLの細胞内への取り込みに依存したABCG1トランスポーターの発現が大きく関与することを示した。このことは、骨疾患に対する新しい観点からの治療につながる研究で学術的意義および社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that like low-density lipoprotein receptor (LDLR) single KO (sKO), LDLR/lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) double KO (dKO) impaired osteoclast cell-cell fusion. LDLR/LOX-1 dKO and LDLR sKO preosteoclasts decreased uptake of LDL. The cell surface cholesterol levels of both genotypic osteoclasts were lower than the levels of wild-type osteoclasts. Additionally, the amount of phosphatidylethanolamine (PE) on the cell surface was attenuated in LDLR/LOX-1 dKO and LDLR sKO preosteoclasts, while the PE distribution in wild-type osteoclasts was concentrated on the filopodia in contact with neighboring cells. Abrogation of ATP binding cassette G1 (ABCG1) transporter, which transfers PE to the cell surface, caused decreased PE translocation to the cell surface and subsequent cell-cell fusion. The findings of this study indicate the involvement of a novel cascade (LDLR ~ ABCG1 ~ PE translocation to cell surface ~ cell-cell fusion) in osteoclast multinucleation.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：破骨細胞 細胞融合 LDL受容体 LOX-1 細胞膜外葉 phosphatidylethanolamine ABCG1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた現在、様々な疾患が国民の健康および国の医療費を脅かしている。その中で、メタボリックシンドロームに関連した脂質異常症は心筋梗塞や動脈硬化の原因因子となっている。さらに、脂質異常症は単に血管系の疾患だけの risk factor ではなく、骨粗鬆症との関連が疫学的調査から近年明らかになりつつある。

我々は、破骨細胞の分化過程で RANKL が誘導する未知遺伝子探索プロジェクトから、cholesterol を多く含む細胞膜のマイクロドメイン lipid rafts/caveolae の構成タンパク質 caveolin-1 が RANKL によって発現誘導されることを発見し、細胞外 LDL を除去することによって、もしくは、細胞膜から cholesterol を除去することによって破骨細胞分化シグナルが変調をきたし、破骨細胞形成が抑制されることを見いだした (*Bone*, 50:226-236, 2012)。さらに、我々は、cholesterol の供給元である LDL を認識し、LDL を internalization させる LDL receptor (LDLR) を欠損した global LDLR KO マウスを用い、LDLR 欠損によって、破骨細胞形成が野性型と比較して減少し、それに伴って、LDLR KO マウスの大腿骨と脛骨の海綿骨量が増加することを見いだした (*J Biol Chem*, 287: 19229-19241, 2012)。これらの結果は、破骨細胞分化が強く細胞外の LDL に依存することを示すものである。しかし、もう一つ重要な点が未解決のまま残されていた。それが、酸化脂質と骨吸収の関係である。

慢性関節リウマチ (RA) といった自己免疫骨疾患や、歯科領域では歯周病や歯科矯正治療での歯牙移動などは、局所で炎症が発症し、その部位の骨吸収が増大する。そして、生体内の炎症部位では、炎症性サイトカインの産生誘導ばかりでなく、LDL の酸化をはじめとする様々な脂質の修飾がおこり、多くの細胞が脂質酸化ストレスに曝される。すなわち、骨吸収の増大を伴う炎症性骨疾患では、骨組織を構成する骨吸収系と骨形成系の細胞が脂質酸化ストレスを受けることになる。そこで、我々は、酸化脂質と骨代謝との関連を解明することを目的とし、酸化 LDL (ox-LDL) 受容体である lectin-like ox-LDL receptor-1 (LOX-1) に着目し、global LOX-1 KO マウスを用いて、以下のことを明らかにした (*Bone*, 75:170-182, 2015)。

生理状態において、破骨細胞前駆細胞および前破骨細胞に発現する LOX-1 は、LDLR とは正反対に、前破骨細胞同士の細胞融合を負に調節する受容体である。しかし、破骨細胞分化に伴って、前破骨細胞の LOX-1 発現は減少し、LOX-1 による細胞融合阻害から解放され、破骨細胞の多核化が進行する。一方、破骨細胞前駆細胞同様に、RANKL 産生細胞である骨芽細胞も炎症性サイトカインである IL-1 β や PGE₂ に依存して LOX-1 を発現する。骨が炎症に曝された時、骨芽細胞の IL-1 β と PGE₂ の産生および LOX-1 発現は誘導される。この過程で、LOX-1 を欠損することによって、RANKL 発現は減少する。すなわち、炎症に呼応した RANKL 発現は強く LOX-1 に依存している。そして、炎症部位において、発現誘導された RANKL は破骨細胞分化を促進し、それに伴って、前破骨細胞の LOX-1 発現が減少し、LOX-1 による細胞融合抑制が解除され、大きく破骨細胞形成が促進し骨破壊を招く。しかし、LOX-1 欠損マウスでは、炎症によって誘導される LOX-1 依存性の RANKL 発現が十分に行われず、RANKL 不足による破骨細胞形成不全に陥る。その結果として、LOX-1 欠損マウスは炎症性骨破壊に抵抗性を示すことが示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、種々の炎症性骨疾患に対する LOX-1 の関与、そして、その作用の分子機構を適切かつ多くの遺伝子改変マウス [破骨細胞 (OC) 特異的 LOX-1 conditional KO (cKO)、骨芽細胞 (OB) 特異的 LOX-1 cKO、LOX-1/LDLR double KO (dKO) マウス] を用いて下記の項目を明らかにし、最終的に LOX-1 を標的分子として新しい骨疾患治療法の確立を目指す。これらを解決することによって、今までの我々の研究とあわせ、酸化脂質を含めた脂質代謝と破骨細胞による骨吸収との関係の全容が明確になると同時に、破骨細胞形成の新しい制御機構を *in vivo* および *in vitro* から提唱することが可能となる。

- (1) OC もしくは OB 特異的 LOX-1 cKO を用いて、炎症性骨疾患の二大疾患である慢性関節リウマチ (RA) と歯周病による骨破壊に対する LOX-1 の役割を明らかにするとともに、原因細胞における LOX-1 作用の全容を *in vivo* と *in vitro* から特定する。
- (2) 破骨細胞細胞融合に対する LOX-1 および LDLR の作用の分子機構を LOX-1/LDLR dKO および single KO マウスを用い、dynamin を含む種々の細胞融合関連タンパク質の相互作用の観点から探る。
- (3) 骨芽細胞の RANKL 発現に対する LOX-1 の役割を、LPS 受容体および炎症性サイトカイン受容体との LOX-1 の相互作用という観点から解明する。
- (4) 最終的に、LOX-1 のデコイ受容体である soluble LOX-1 (sLOX-1) を primary compound にして、様々な合成ペプチドおよび LOX-1 結合性分子を探索し、炎症性骨疾患を始め種々の骨疾患に対する有効な治療法を探る。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウス

LDLR KO マウスは LDLR 遺伝子の exon 4 中に *neomycin* 耐性遺伝子を挿入することによって LDLR を欠損させたマウスである。LOX-1 KO マウスは LOX-1 遺伝子の exon 6 と exon 8 の間の部分を *neomycin* 耐性遺伝子に置き換えることによって LOX-1 遺伝子を欠損させたマウスである。また、LDLR KO マウスおよび LOX-1 KO マウスは、C57BL/6J マウスを遺伝的背景に持つ。なお、

本研究は明海大学歯学部動物実験倫理委員会によって承認された(承認番号:A1804)。実験動物の取り扱い、明海大学歯学部動物実験倫理委員会規定を遵守した。

Genotyping は、生後 2 週齢のマウスの尻尾 5 mm もしくは後肢指を切り取り、DNA を抽出した。それら DNA 抽出液と LDLR primers および LOX-1 primers を用いて genotyping を行なった。

LDLR/LOX-1 double KO (dKO) マウス作成は、まず、LDLR single KO (sKO) マウスを LOX-1 sKO マウスと交配させ、それぞれの遺伝子のヘテロ接合体を作製し、そのヘテロ接合体と LDLR sKO を交配させ LDLR^{-/-} LOX-1^{-/-} マウスを得た。そして、LDL^{-/-} LOX-1^{-/-} マウス同士を交配させ、最終的に、LDLR^{-/-} LOX-1^{-/-} を得、系統化した。

(2) 骨髄細胞からの *in vitro* の破骨細胞形成系

In vitro における破骨細胞形成は、4~8 週齢のオスの野生型 (WT) C57BL/6 マウスおよび LDLR sKO、LOX-1 sKO、LDLR/LOX-1 dKO マウスの大腿骨および脛骨を無菌的に取り出し、得た骨髄細胞を M-CSF (100 ng/ml) 存在下で 3 日間培養した。培養後、非付着細胞の間質細胞を除去し、得られた M-CSF 依存性モノサイト・マクロファージを破骨細胞の前駆細胞とし、以下の実験に供した。回収した破骨細胞前駆細胞を M-CSF (20 ng/ml)、sRANKL (10 ng/ml) を含む α -MEM/10% FBS もしくは α -MEM/10% FBS 培地で培養した。培養終了後に、細胞を固定し、破骨細胞のマーカー酵素である TRAP 活性を染色した。その後、3 核以上の TRAP 陽性の多核細胞 (MNCs) を破骨細胞と見なし、その数を顕微鏡下で測定した。また、TRAP 陽性 MNCs の面積と最大幅径を画像測定した。さらに、TRAP 陽性 MNCs の 1 細胞中に含まれる核数 (fusion index) を計測した。

(3) 破骨細胞系細胞の細胞外 LDL の取り込み量の測定

破骨細胞系細胞の細胞外 LDL の取り込み量は、pHrode™ Red LDL uptake kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

(4) 破骨細胞系細胞の Oil Red O 染色

それぞれの遺伝子型の破骨細胞前駆細胞を上記の通り、M-CSF/sRANKL 存在化で培養した後、細胞を 10% formalin/PBS で 15 分間室温固定した。そして、2 回 PBS で洗浄後、Oil Red O 染色液で 15 分間染色した。

(5) 破骨細胞の細胞表面の cholesterol 染色

Cholesterol を特異的に認識し結合する -toxin-derived domain 4 (D4) を用いた細胞表面 cholesterol 染色は以下の通り行った。まず、pET28/His6-mCherry-D4 plasmid を用いて *E. coli* 中で D4 を発現させた。その D4 タンパク質を TALON® metal affinity resins および butyl-agarose カラムで精製し、His-tag-mCherry-D4 を得た。

破骨細胞前駆細胞を polylysine-coated glass-bottom 上に播種し、M-CSF/sRANKL を含む α -MEM/10% FBS で任意時間培養した。次に、細胞を His-tag-mCherry-D4 (10 μ g/ml) を含む 0.1% BSA (fatty acid-free)/20 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)/ α -MEM で 30 分間インキュベートした。その後、速やかに 1 回 PBS で洗浄し、室温で 4% paraformaldehyde/PBS を用い 15 分間固定した。さらに PBS で洗浄後、DAPI 溶液を加え、核染色を行なった。

蛍光観察は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、405 nm および 580 nm の 2 波長の励起光から行なった。細胞膜表面の PE 量は、ランダムに選択した細胞の周囲を囲み、その中の DAPI の蛍光強度に対する mCherry-D4 の蛍光強度 (D4/DAPI) を測定し、その比率から定量化した。

(6) 細胞膜外葉 phosphatidylethanolamine (PE) 染色

PE を特異的に認識し結合する Ro09-0198 (Ro) を用いた細胞表面 PE 染色は以下の通り行った。まず、Biotin と結合した Ro (Bio-Ro; 京都大学大学院工学研究科 梅田真郷教授より供与) と streptavidin (SA) が結合した SA-Bio-Ro を作製した。

破骨細胞前駆細胞を polylysine-coated glass-bottom 上に播種し、M-CSF/sRANKL を含む α -MEM/10% FBS で 37 °C、5%CO₂ 存在下で 1~4 日間培養した。細胞を 37 °C の 0.1% BSA (fatty acid-free)/20 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)/ α -MEM で 1 回洗浄後、SA-Bio-Ro (5 μ g/ml) を含む 0.1% BSA/20 mM HEPES-NaOH/ α -MEM を加え、室温で 30 分インキュベートした。その後、0.1% BSA/20 mM HEPES-NaOH/ α -MEM で 1 回洗浄したのち、3% paraformaldehyde/PBS で固定した。洗浄後、0.1% TritonX-100/PBS で 5 分間処理し、続いて、3% BSA/PBS でブロッキングを行なった。その後、FITC-conjugated anti-SA-antibody を加え、室温で 30 分インキュベートした。インキュベーション終了後、DAPI 溶液を加え核染色を行なった。

蛍光観察は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、405 nm および 488 nm の 2 波長の励起光から行なった。細胞膜表面の PE 量は、ランダムに選択した細胞の周囲を囲み、その中の DAPI の蛍光強度に対する SA-Bio-Ro の蛍光強度 (SA-Bio-Ro/DAPI) を測定し、その比率から定量化した。

(7) 定量性 real-time PCR

様々な条件下で培養した破骨細胞系細胞を RLT (Qiagen) で溶解後、QuiaTube (Qiagen) を用いて total RNA を分離した。それら total RNA から cDNA を合成した。それら cDNA 中の標的 mRNA 量は、TaqMan probe/primer mixture と Ssoadvanced™ Universal Probe Supermix (BioRad) を

用い、CFX Connect Real-Time PCR Detection Systemsにて測定した。内因性コントロールとしてマウス 18S rRNA を用いた。

(8) LPS 投与による頭蓋骨炎症性骨破壊モデルの作製

LPS 投与による頭蓋骨炎症性骨破壊モデルの作製は、8 週齢雄性の野生型マウス (C57BL6/J) をソムノペンチルで麻酔し剃髪後、頭頂部骨膜下に 1 mg/ml の大腸菌 (O55:B5) 由来 LPS を 100 μ l、1 日 1 回 5 日間連続投与した。最終投与の 24 時間後に頸椎脱臼により屍殺し、頭蓋骨を摘出した。6 日目に摘出した頭頂骨をエタノールによって固定後、3 次元 μ CT を用いて骨破壊部位の骨形態解析を行った。残りの骨片は Buffer RLT Plus (Qiagen) 中でポリトロン PT3100 によって破碎し、上清中の total RNA を RNeasy Mini plus kit (Qiagen) を用いて抽出した。

4. 研究成果

当初の目的であった破骨細胞および骨芽細胞特異的 *LOX-1* cKO マウスを用いての炎症性骨破壊に対する *LOX-1* の役割の解明に関して、研究期間中はその解明が間に合わなかった。しかし、*LRLR/LOX-1* dKO マウスの作成は成功し、なおかつ、WT, *LDLR* sKO, *LOX-1* sKO および *LRLR/LOX-1* dKO マウス、さらには、*ATP binding cassette G1 (ABCG1) transporter* sKO マウスを用いて、*LDLR* を介した LDL の細胞内への取り込みが、*ABCG1* で触媒される phosphatidylethanolamine (PE) の細胞膜外葉への局在転換を促し、それによって、破骨細胞の細胞融合が促進するといった分子レベルでの新規機構を見いだすことができ、*J. Cell Sci.* に受理された (受理日 2020 年 3 月 25 日)。また、炎症性骨破壊への新しい治療薬の開発に関しては、*LOX-1* 分子をベースにした開発はできなかったが、スダチの果皮から抽出された polymethoxy flavonoid である Sudachitin が炎症性骨破壊の抑制に有効であることを見出した (*PLoS One*. 2018, 13(1):e0191192. doi: 10.1371/journal.pone.0191192)。したがって、本課題研究の成果として、(1) “Cholesterol の細胞内への取り込みに依存した ATP-binding cassette transporter G1 による phosphatidylethanolamine の細胞膜外葉への局在変換は破骨細胞の融合過程に関与する”、(2) “ポリメトキシフラボノイド sudachitin の破骨細胞形成および炎症性骨吸収に対する作用とその作用機序” の 2 課題の成果を報告する。

(1) Cholesterol の細胞内への取り込みに依存した ATP-binding cassette transporter G1 による phosphatidylethanolamine の細胞膜外葉への局在変換は破骨細胞の融合過程に関与する

LDLR/LOX-1 dKO マウスの *in vitro* での破骨細胞形成

LDLR/LOX-1 dKO マウスの骨髄細胞からの *in vitro* での破骨細胞形成は、形成された破骨細胞数は WT マウスと同等であったが、形成された破骨細胞のサイズおよび 1 つの破骨細胞に含まれる核数で表される fusion index が大幅に減少した。これらから、dKO は *LDLR* sKO と同様に、破骨細胞の細胞融合が減少していた。一方、*LOX-1* sKO での破骨細胞形成は、既報通り、細胞融合の促進により増加していた。これらのことは、dKO において、*LDLR* 欠損が *LOX-1* 欠損の表原型を上回っていることを示している。

破骨細胞前駆細胞の LDL 取り込み量、細胞内中性脂肪 (cholesterol を含む) の蓄積、および細胞膜表面の cholesterol 分布

細胞外 LDL の細胞内への取り込み量は、*LDLR/LOX-1* dKO および *LDLR* sKO で大幅に減少し、cholesterol を含んだ細胞内中性脂肪の蓄積も見られず、細胞膜表面の cholesterol も大きく減少した。

破骨細胞系細胞の細胞膜外葉の phosphatidylethanolamine (PE) の分布

細胞膜内葉に多く分布する PE の外葉への分布転換が破骨細胞の細胞融合に密接に関連することが、最近、明らかになった。そこで、WT, dKO, *LDLR* sKO および *LOX-1* sKO 破骨細胞の細胞膜表面の PE 分布を見ると、WT および *LOX-1* sKO 破骨細胞では隣の細胞と接触する filopodia 上に多くの PE 分布が観察されたが、dKO および *LDLR* sKO 破骨細胞では細胞膜外葉への分布転換が大きく減少していた。

破骨細胞の分化過程での *ABCG1* の発現

PE をはじめとするリン脂質の細胞膜内葉と外葉との移動には多くの ABC transporters が関与する。それら ABC transporters の中で、破骨細胞の細胞融合および PE の細胞膜外葉への分布転換と一致した発現を示したのが *ABCG1* であった。WT 破骨細胞では RANKL 刺激でわずかな減少を示したが、その後はその発現量が維持されていた。一方、dKO および *LDLR* sKO では *ABCG1* mRNA 量が 1% 以下まで著しく減少した。

ABCG1 KO および knockdown が破骨細胞形成に及ぼす影響

そこで、*ABCG1* の破骨細胞の細胞融合への関与をより明確にするため、*ABCG1* siRNA による mRNA knockdown および *ABCG1* sKO マウスを用いて検討した。その結果、*ABCG1* mRNA knockdown および *ABCG1* sKO マウスにおいて、破骨細胞形成および PE の細胞膜外葉への分布転換が抑制された。

ABCG1 mRNA 発現は cholesterol に由来する細胞内 oxysterol によって活性化する転写因子 nuclear liver X receptor (LXR) によって促進される。そこで最後に、破骨細胞形成に対する LXR の関与を LXR agonist および antagonist を用いて検討した。その結果、LXR

agonist GW 3965 は LDLR sKO の破骨細胞形成の減少および ANCG1 mRNA 発現減少を回復させ、逆に、LXR antagonist GSK 2033 は WT まうすの破骨細胞形成および ABCG1 mRNA 発現を減少させた。

以上の結果から、本研究は破骨細胞形成において、LDLR による細胞外 LDL の取り込み LXR の活性化 ABCG1 の発現 ABCG1 による PE の細胞膜外葉への分布転換 細胞融合という新しいカスケードを突き止めることができた。

(2) ポリメトキシフラボノイド sudachitin の破骨細胞形成および炎症性骨吸収に対する作用とその作用機序

本研究では、抗炎症・抗酸化作用を有する sudachitin の骨代謝、とりわけ炎症性骨吸収と破骨細胞形成に対する作用機序を明らかにすることを目的とした。

マウス頭頂骨骨膜下に 1 日 1 回、lipopolysaccharide (LPS) を 5 日間連続投与し炎症性骨吸収を誘発する *in vivo* 炎症性骨破壊モデルに、LPS と同時に sudachitin を投与すると、LPS 投与で増大した破骨細胞の機能タンパク質である TRAP および cathepsin K の mRNA 発現上昇の減少とともに、炎症性骨吸収が抑制された。

そこで、破骨細胞前駆細胞に M-CSF と sRANKL を作用させ破骨細胞を形成させる *in vitro* の破骨細胞形成系を用いて、sudachitin の破骨細胞分化に対する直接的な作用を検討した。その結果、10 μ M 以下の濃度で sudachitin は濃度依存的に破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞分化を抑制することが明らかとなった、10 μ M 以下の sudachitin は破骨細胞前駆細胞の増殖および生存率に対して影響を及ぼさないことから、sudachitin の破骨細胞形成抑制作用は、破骨細胞前駆細胞に直接作用して成熟破骨細胞への分化を抑制することに起因することが示された。

次に、sudachitin の破骨細胞前駆細胞に対する抗酸化作用および破骨細胞分化に関する情報伝達経路への作用を検討した。破骨細胞前駆細胞内の ROS は sRANKL によって産生誘導された。そして、sudachitin は破骨細胞形成を抑制する同じ濃度域で sRANKL による ROS 産生誘導を減少させた。また、破骨細胞前駆細胞を sudachitin で前処理すると、sRANKL による extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Erk1/2) の活性化を抑制された。

最後に、sudachitin の破骨細胞関連タンパク質の発現に対する作用を検討した。その結果、破骨細胞の分化に必須である転写因子 c-fos および NFATc1、破骨細胞の機能タンパク質である TRAP および cathepsin K、破骨細胞の細胞融合タンパク質の DS-STAMP、OC-STAMP および Atp6v0d2 の sRANKL で誘導される mRNA 発現上昇を sudachitin はいずれも減少させた。

以上の結果から、ポリメトキシフラボノイド sudachitin は破骨細胞分化を直接抑制することが明らかとなった。これらのことより、sudachitin は炎症性骨吸収の予防および治療に有効な天然由来抗酸化物の 1 つであることが示唆された。

< 引用文献 >

Hada N, Okayasu M, Ito J, Nakayachi M, Hayashida C, Kaneda T, Uchida N, Muramatsu T, Koike C, Masuhara M, Sato T, Hakeda Y. : Receptor activator of NF- κ B ligand-dependent expression of caveolin-1 in osteoclast precursors, and high dependency of osteoclastogenesis on exogenous lipoprotein. *Bone*, 50: 226-236, 2012.

Okayasu M, Nakayachi M, Hayashida C, Ito J, Kaneda T, Masuhara M, Suda N, Sato T, Hakeda Y. : Low-density Lipoprotein Receptor Deficiency Causes Impaired Osteoclastogenesis and Increased Bone Mass in Mice because of Defect in Osteoclastic Cell-Cell Fusion. *J Biol Chem*. 287(23):19229-192241, 2012.

Nakayachi M, Ito J, Hayashida C, Ohyama Y, Kakino A, Okayasu M, Sato T, Ogasawara T, Kaneda T, Suda N, Sawamura T, Hakeda Y. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 abrogation causes resistance to inflammatory bone destruction in mice, despite promoting osteoclastogenesis in the steady state. *Bone*, 75:170-182, 2015. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.025.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 95.Ohyama Y, Ito J, Kitano VJ, Shimada J, Hakeda Y.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 The polymethoxy flavonoid sudachitin suppresses inflammatory bone destruction by directly inhibiting osteoclastogenesis due to reduced ROS production and MAPK activation in osteoclast precursors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0191192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0191192.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitano VJ, Ohyama Y, Hayashida C, Ito J, Okayasu M, Sato T, Ogasawara T, Tsujita M, Kakino A, Shimada J, Sawamura T, and Hakeda Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 LDL uptake-dependent phosphatidylethanolamine translocation to the cell surface promotes fusion of osteoclast-like cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.243840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊東順太、大山洋子、林田千代美、佐藤卓也、羽毛田慈之
2. 発表標題 スダチ果皮特有ポリメトキシフラボノイドsudachitinは破骨細胞形成およびLPS誘導炎症性骨破壊を抑制する
3. 学会等名 第34回日本骨代謝学会学術集会・第3回アジア太平洋骨代謝学会議
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ohyama Y., Ito J., Hakeda Y., Shimada J.
2. 発表標題 Sudachitin, a polymethoxyflavone derived from Citrus sudachi, suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory bone resorption because of inhibiting osteoclast formation in mice
3. 学会等名 98th Annual Meeting of American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 羽毛田慈之、Victor Jose Flores Kitano, 大山洋子、林田千代美、佐藤卓也、嶋田淳.
2. 発表標題 Low-density lipoproteinの細胞内への取り込みに依存したホスファチジルエタノールアミンの細胞膜外葉への局在変換は破骨細胞の融合過程に關与する
3. 学会等名 第61回齒科基礎医学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	沢村 達也 (Tatsuya Sawamura) (30243033)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	
研究分担者	伊東 順太 (Junta Ito) (40609096)	城西大学・薬学部・助教 (32403)	
研究分担者	岡安 麻里 (Mari Okayasu) (10610941)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	小笠原 徹 (Toru Ogasawara) (20359623)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	
研究分担者	森 芳史 (Yoshifumi Mori) (60757954)	明海大学・歯学部・助教 (32404)	