

令和元年6月12日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11798

研究課題名(和文) 矯正力負荷は破骨細胞前駆細胞のオートファジーを誘導するか？

研究課題名(英文) Dose orthodontic force induce autophagy of osteoclast precursor ?

研究代表者

荒井 敦 (Arai, Atsushi)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：00532772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞分化におけるAutophagyの役割について解析をおこなった。Autophagy関連遺伝子Beclin 1の発現はRANKL刺激により上昇した。またRANKL刺激によるBeclin 1の発現誘導メカニズムの解析結果、RANKL刺激によりBeclin 1へのubiquitinチェーンの結合が増加した。Beclin 1を破骨細胞特異的にノックアウトしたコンディショナルノックアウトマウス解析では、破骨細胞分化に影響はみられなかったが、皮質骨の肥厚が認められ、海綿骨は減少していた。RANKLにより刺激されたAutophagyの活性化は、破骨細胞の分化誘導因子の一つであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、破骨細胞分化におけるオートファジーの役割について解析をおこなった。その結果、オートファジー関連遺伝子であるBeclin1は破骨細胞分化誘導因子RANKLによって活性化されることが明らかとなった。これらにより、オートファジーの活性化が歯槽骨を含む骨組織のリモデリングに関与することが示唆された。今後、オートファジー制御を利用した新しい歯科矯正治療方法の確立をめざすが、さらに代謝性骨疾患治療でもオートファジー制御が重要であることが示されると期待する。本研究の成果および、継続する研究結果は、歯科と医科の患者に大いなる福音をもたらすと確信する。

研究成果の概要(英文)：Autophagy, an important cellular recycling process is recently shown to play an essential role in bone biology. However, the involvement of autophagy in bone and bone-related cells remains unclear. Beclin1, an autophagy-related (ATG) protein involved in autophagy initiation, plays a pivotal role in osteoclasts. Autophagy was activated during osteoclast differentiation in vitro. Beclin1 was enhanced and required for osteoclast differentiation. In vivo, mice lacking Beclin1 in CstK-expressing cells exhibited increased cortical bone thickness due to impaired osteoclasts' function. Interestingly, these mice also exhibited diminished trabecular bone mass, which was associated with defect in cartilage formation and chondrocyte differentiation. Collectively, our study highlights the functional importance of autophagy in osteoclasts and chondrocytes, and identifies autophagy as a potential therapeutic target for managing bone-related diseases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：破骨細胞 破骨細胞前駆細胞 Autophagy Beclin1 RANKL 矯正力

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞の誘導には、骨芽細胞が発現する RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand) と M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) が重要な役割を担う。破骨細胞前駆細胞は RANKL の受容体 RANK と M-CSF の受容体 Fms を発現しており、RANKL と M-CSF を認識して破骨細胞に分化する。従来、矯正力を負荷した際の圧迫側における破骨細胞の出現は、間葉系細胞が発現する RANKL と OPG (Osteoprotegerin, RANKL のおとり受容体) を中心に説明されてきた。矯正治療時に、圧迫側の歯根膜線維芽細胞は RANKL を発現すること (J Dent Res 80: 887, 2001)、また、機械刺激は、歯根膜線維芽細胞の PGE2 (Prostaglandin E2) 生成を促進し、その結果 RANKL 発現を誘導すること (J Bone Miner Res 17: 210, 2002) などが報告された。このように、矯正力の作用は、歯根膜線維芽細胞において解析されてきたが、破骨細胞前駆細胞にどのように影響するかは不明である。一方、オートファジーは、プロテアソーム系と並ぶ細胞内の主要分解系で、細胞の恒常性維持に重要な役割を担っている (Cell 147: 728, 2011)。心筋細胞や軟骨細胞において、機械的刺激がオートファジーを誘導し細胞機能を調節することが報告されたが (PLOS One 9: e89629, 2014 ; Bone 66: 232, 2014)、矯正力とオートファジーの関連は不明である。我々は、RANK と Fms を発現した単核細胞を破骨細胞前駆細胞として同定した。その前駆細胞は、増殖能を欠落していたが、破骨細胞にのみ分化することができるため、qOP (quiescent osteoclast precursors) と名付けた (J Cell Biol 184: 541, 2009)。qOP は造血組織で形成され血流を介して骨組織に運ばれること (Proc Natl Acad Sci USA 109: 10006, 2012、J Bone Miner Res 26: 2978, 2011)、骨組織に到着した qOP は、RANK の発現をさらに高め RANKL の刺激で速やかに破骨細胞に分化すること (Nature Med 18: 405, 2012)、機械的刺激で誘導される Fos は qOP の RANK 発現誘導に重要であること (J Cell Sci 125: 2910, 2012) を報告した。さらに、RANKL 刺激は qOP のオートファジーを誘導することを見出した [米国骨代謝学会 J Bone Miner Res 30, pS403, 2015]。以上の知見は、矯正力は、qOP の Fos 発現とオートファジーを誘導し、RANKL が誘導する破骨細胞形成をさらに調節する可能性を示唆する。

2. 研究の目的

矯正力が誘導する骨改造において、破骨細胞は中心的役割を担うが、破骨細胞の誘導機構の詳細は不明である。我々は破骨細胞の誘導研究において、破骨細胞への分化が決定した前駆細胞 (quiescent osteoclast precursors, qOP) を同定した (J Cell Biol 184: 541, 2009)。本申請者は、qOP は血流を介して骨に運ばれ、そこで Fos の助けを借りて破骨細胞に分化することを発見した (J Cell Sci 125: 2910, 2012)。さらに qOP から破骨細胞への分化に、オートファジーが深く関わることを見出した [米国骨代謝学会 J Bone Miner Res 30, pS403, 2015]。矯正力は Fos 発現とオートファジーを誘導する。本研究では矯正力によるオートファジー誘導機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では矯正力がオートファジーによる破骨細胞分化誘導に及ぼす影響について解明することを目的として研究計画を作成した。

・ RANKL 誘導によるオートファジー活性化の解析

Bone Marrow Macrophage に RANKL を添加し、Western Blotting にてオートファゴソームの主要成分の一つである LC3B の発現を確認した。

・ RANKL 刺激によるオートファジー誘導因子の解析

Bone Marrow Macrophage に RANKL を添加し、Western Blotting にてオートファジー活性の初期段階に必要なとされる Beclin1 の発現を確認した。

・ RANKL 刺激による Beclin1 の発現誘導メカニズム解析

HA タグを結合した Raw 264.7 cell に RANKL を添加し、Beclin1 とユビキチンチェーンとの結合能を免疫沈降法にて解析した。さらに免疫蛍光染色にて Beclin1 とユビキチンの局在を確認した。

・ 破骨細胞特異的 Beclin1 欠損マウスの解析

Beclin1^{f/f} マウスと Cathepsin K-Cre マウスをクロスブリーディングし破骨細胞特異的に Beclin1 を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作製し、解析を行った。

4. 研究成果

・ RANKL 誘導によるオートファジー活性化の解析

Bone Marrow Macrophage に RANKL を添加し、Western Blotting にてオートファゴソームの主要成分の一つである LC3B の発現を確認したところ、経時的に発現量が増加していた (図 1)。

RANKL 刺激によるAutophagyの変動

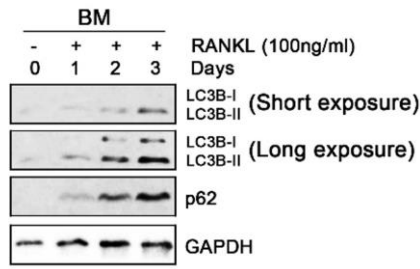


図 1 RANKL刺激により、オートファゴソームの構成因子LC3の発現は上昇

・ RANKL 刺激によるオートファジー誘導因子の解析

Bone Marrow Macrophage に RANKL を添加し、Western Blotting にてオートファジー活性の初期段階に必要とされる Beclin1 の発現について解析した結果、RANKL 刺激によりその発現が上昇していた(図 2)。

RANKL刺激によるAutophagy誘導因子の変動

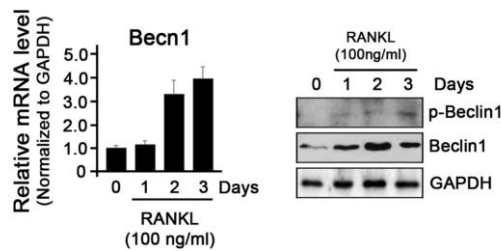


図 2 RANKL刺激によりautophagy誘導因子Beclin 1の発現は上昇

・ RANKL 刺激による Beclin1 の発現誘導メカニズム解析

RANKL 刺激による Beclin 1 の発現上昇のメカニズムについての解析を行なった。LPS-TLR4 シグナルによって、TRAF6 が活性化することで Beclin1 へ Ubiquitin チェーンが結合し Autophagy が活性化されることが報告されていたことから (Shi C et al Science Signaling, 3, 42 2010)、RANK-RANKL シグナルによっても同様な現象が起こる可能性があると考え、RANKL 刺激による Beclin 1 への Ubiquitin チェーンの結合の有無を解析したところ、Raw cell への RANKL 添加により Beclin 1 の Ubiquitin の発現が上昇した。さらに、免疫蛍光染色にて細胞レベルでの確認を行ったところ同様な結果となった(図 3)。

RANKL 刺激による Beclin1の発現誘導メカニズム

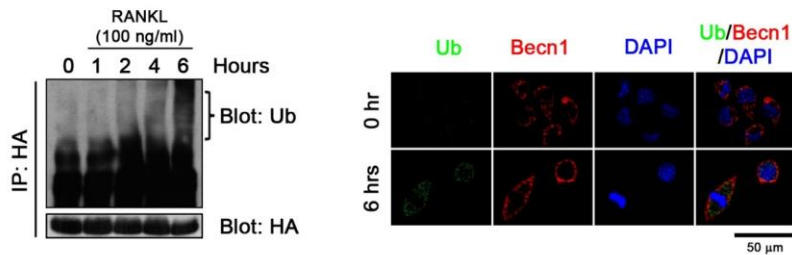


図 3 RANKL刺激によりBeclin 1とユビキチンとの結合量は増加

・破骨細胞特異的 Beclin1 欠損マウスの解析

破骨細胞特異的 Beclin1 欠損マウスの解析の結果、コントロールマウスと比較し、サイズは小さかった。頸骨の uCT 像では、海綿骨量が減少する一方、皮質骨の厚みは増大した (図 4)。さらに組織学的解析では、成長板の軟骨細胞の消失が認められた (J Bone Miner Res. doi: 10.1002/jbmr.3756 2019.)。これらのことより、RANKL により刺激されたオートファジーの活性化は、破骨細胞の分化誘導因子のひとつであり、さらに軟骨細胞分化にも影響していることが示唆された。

破骨細胞特異的 Beclin1 欠損マウスの解析

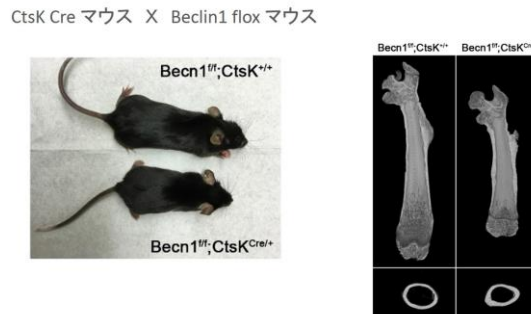


図 4 破骨細胞特異的 Beclin1 欠損マウス

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Beclin1 modulates bone homeostasis by regulating osteoclast and chondrocyte differentiation. Arai A, Kim S, Goldshteyn V, Kim T, Park NH, Wang CY, Kim R. J Bone Miner Res. 2019 May 10. doi: 10.1002/jbmr.3756. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 2017 年 9 月 オートファジーの活性は破骨細胞分化を誘導する 荒井 敦, 山田 一尋, 宇田川信之, 高橋 直之, ワンクンユ, キムリューベン (J. Oral Biosci. Suppl., 2017 p 236)
- ② 第 2 回日本骨免疫学会ウインターセミナー 2017 年 1 月 Autophagy の活性は破骨細胞分化を誘導する: 荒井敦, 山田一尋, 宇田川信之, 高橋直之, Wang Cun-Yu, Kim Reuben: (第 2 回日本骨免疫学会ウインターセミナープログラム集: p27)
- ③ 4th General session of International Association of Dental Research 2016 年 6 月 RANKL Induces Ubiquitination of Autophagy Protein Beclin1, and Mediates Osteoclast Differentiation: A. Arai, S. Kim, T. Kim, C. Lee, C. -Y. Wang, N. -H. Park, R. Kim: (2016. 94th General session of International Association of Dental Research プログラム抄録集: p132)
- ④ 第 75 回日本矯正歯科学会大会 2016 年 11 月矯正力負荷による Autophagy の活性は破骨細胞分化を誘導する: 荒井敦, 宇田川信之, Kim, Reuben, 山田一尋: (第 75 回日本矯正歯科学会大会プログラム抄録集: p192)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小林 泰浩
ローマ字氏名：Kobayashi, Yasuhiro
所属研究機関名：松本歯科大学
部局名：総合歯科医学研究所
職名：教授
研究者番号（8桁）：20264252

研究分担者氏名：溝口 利英
ローマ字氏名：Mizoguchi, Toshihide
所属研究機関名：東京歯科大学
部局名：歯学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：90329475

研究分担者氏名：山田 一尋
ローマ字氏名：Yamada, Kazuhiro
所属研究機関名：松本歯科大学
部局名：歯学部附属病院
職名：教授
研究者番号（8桁）：20264252

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：高橋 直之
ローマ字氏名：Naoyuki Takahashi

研究協力者氏名：Kim Reuben

研究協力者氏名：Wang Cun-Yu

※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。