

令和元年6月18日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12720

研究課題名(和文) 母乳中ケモカインCCL25が有する新生児期の骨形成促進効果のメカニズム

研究課題名(英文) The effects of CCL25 on bone formation in new born mouse

研究代表者

雪田 聡 (Yukita, Akira)

静岡大学・教育学部・准教授

研究者番号：80401214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腸管免疫に関わることが知られているCCL25が母乳中に含まれることが先行研究より明らかになっていた。そこで、人工哺育実験系においてCCL25投与群と非投与群のマウスを比較すると、乳汁中のCCL25が骨形成と骨吸収を活発にし、乳幼児期マウスの長軸方向への骨成長を促進する可能性が示唆された。一方で人工哺育期間の延長を試みたが大変困難であり、10日間以上の哺育期間の延長はできなかった。そこで、CCL25遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。その結果、10日齢、10週齢マウスともに骨格異常および長管骨の長さには大きな差は認められなかったものの、10週齢マウスにおいては骨量の増加が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は腸管免疫に関わるタンパク質であるCCL25が骨の形成にも関わることを初めて示した。特に成獣期において、体内のCCL25が減少すると骨形成が活発になり骨量が増えることから、過剰なCCL25は骨形成の不全や骨量の低下の原因となる可能性が考えらる。さらなる研究が必要ではあるが、CCL25の体内量の調節を介して、全く新しい骨疾患の治療薬が開発できるのではないかと期待している。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have shown that CCL25, which is known to be involved in intestinal immunity, is contained in breast milk. By the artificial lactation experiment we established before, we found that CCL25 in artificial milk can activate bone formation and bone resorption, and promote bone growth in the longitudinal direction of infant mice. On the other hand, although we attempted to extend the period of artificial nursing, it was very difficult to extend the period of 10 days or more. Therefore, we investigated the role of CCL25 in bone tissue using a CCL25 gene-deficient mouse. As a result, although there was no significant difference in skeletal abnormalities and long bone length in both 10-day-old and 10-week-old mice, increase in bone mass was observed in 10-week-old mice.

研究分野：組織学、細胞学、分子生物学

キーワード：CCL25 母乳 骨形成 骨代謝 ケモカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

母乳に含まれる成分が新生児の発育に果たす役割として免疫系への寄与がよく知られている (Andreas et al., Early Hum. Dev., 2015)。事実、研究代表者らのグループは、ケモカインの一つである CCL25 が母乳に含まれ、サイトカイン非含有の人工乳と比較し、CCL25 を含む人工乳の投与が胸腺および脾臓の発達を有意かつ顕著に促進することを明らかにしている。CCL25 は胸腺および腸管に強く発現が認められ、腸管免疫に重要であることが知られているが (Vicari et al., Immunity, 1997; Svensson et al., J. Clin. Invest., 2002)、我々の知見は、母乳中の CCL25 が新生仔マウスの免疫系の正常な発達に必須のサイトカインでもあることを示している。さらに驚くべきことに、CCL25 投与により胸腺等の発達に加え、約 10% の体重増加と長管骨の成長促進を認めた。このことは母乳中の CCL25 が免疫系の発達のみならず骨の成長を含む全身の成育に重要な役割を果たすことを示している。近年の骨免疫学の発展により明らかになりつつある「免疫系細胞による骨代謝制御 (Takayanagi et al., Nat. Rev. Immunol., 2007)」を考えると、母乳中の CCL25 が免疫器官の発達を介して骨形成にも重要であることが予想される。これまでに CCL25 およびその受容体である CCR9 が成獣マウスの破骨細胞に発現していることは報告されているが (Lean et al., J. Cell Biochem., 2002)、その役割については不明なままであり、免疫機能が未熟で、且つ急激な成長がみられる新生仔マウスの骨組織におけるそれらの発現および機能についても全く検討されていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、母乳中の CCL25 が新生仔マウスの骨組織形成に与える影響とその作用メカニズムを明らかにするため、(1)人工哺育系を用いた CCL25 投与が骨代謝に及ぼす作用の解明、(2) CCL25 遺伝子欠損マウス骨組織の組織学的解析、(3)骨芽細胞および破骨細胞の分化と機能に CCL25 が与える影響の解明、の 3 点を目的とした。

3. 研究の方法

1) 人工哺育によるマウスへの CCL25 投与

矢島らの方法 (Yajima et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007) により作成したマウス人工乳を用いて、新生仔マウスの人工哺育技術により ddY マウスを出生後 3 日目から 7 日間人工哺育した。

2) CCL25 投与が骨組織に与える影響の検討

1) で得たマウスから脛骨および大腿骨を採取し、軟組織を除去後にノギスにて骨頂を測定した。さらに、マイクロ CT による骨形態計測を行い、骨密度、骨量、骨梁数、骨梁幅を CCL25 投与群と非投与群間で比較した。また、採取した脛骨をパラフィン包埋し薄切切片を作製した。薄切切片に対しヘマトキシリン-エオシン染色により全般的な組織像を、アルシアンブルー染色により軟骨基質を、アルカリホスファターゼ (ALP) 染色により骨芽細胞を、TRAP 染色により破骨細胞を観察した。組織学的な観察から、骨成長に重要な成長軟骨、骨芽細胞および破骨細胞の局在や数などについて比較した。

3) CCL25 遺伝子欠損マウスの骨組織解析

CRISPR/Cas9 法により全身の細胞で CCL25 遺伝子を欠損したマウス (CCL25KO マウス) について、10 日齢および 10 週齢での骨組織を 2) と同様の方法を用いて検討した。さらに、同数の新生児野生型マウスを CCL25KO マウスまたは野生型マウスのメスに 10 日齢まで哺育させ、骨組織の成長に差異があるか同様に検討した。2) と同様の方法の他、骨形成マーカー、骨吸収マーカーとして知られるタンパク質の局在について免疫組織学的に検討した。さらに、骨形成マーカーとして知られるタンパク質について血中濃度を ELISA 法により見積もった。

4) 細胞レベルで CCL25 遺伝子が骨形成および骨吸収に与える影響の解明

出生直後の野生型または CCL25KO マウスの頭蓋骨から骨芽細胞を採取して 10% 血清含有の α -MEM 培地中で培養した。その後 ALP 染色およびアリザリンレッド (AR) 染色を行い、それぞれ分化能と石灰化能を検討した。さらに、新生児から脾臓細胞を採取して同様に培養し、M-CSF と RANKL を添加して破骨細胞へと分化誘導を行った。

4. 研究成果

1) 人工哺育において CCL25 投与が骨組織に与える影響

人工哺育後 10 日齢に達した CCL25 投与群と非投与群のマウスから大腿骨および脛骨を採取した脛骨および大腿骨の長さを計測した結果、CCL25 投与群で有意に重量および長さが増加していた (図 1)。このことから、乳汁中の CCL25

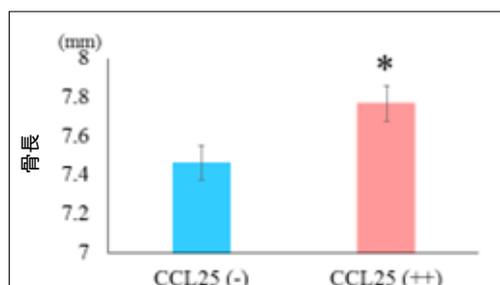


図1 人工哺育によるCCL25非投与および投与群の大腿骨長の比較。100 ng/mlのCCL25含有の人工乳を投与した群(CCL25(++))において非投与群と比較して有意に大腿骨長が増加した。n=7, *: p<0.05

が乳幼児期マウスの長軸方向への骨成長を促進する可能性が示唆された。脛骨について形態計測を行ったが、個体差が大きく、CCL25 投与群と非投与群間で骨量、骨密度、骨梁数に差異は認められなかった(データ非掲載)。さらに、遺伝子発現を検討した結果、CCL25 投与により骨芽細胞マーカーおよび破骨細胞マーカーの発現がともに上昇していた(図 2)。また、組織学的に単位面積当たりの骨芽細胞数および破骨細胞数を計測した結果、骨芽細胞、破骨細胞ともに細胞数の増加が認められた(図 3)。以上のことから、CCL25 の投与は骨量や骨密度を維持したまま骨形成および骨吸収の両方を活性化し、長軸方向への成長を促進すると考えられた。

2) CCL25KO マウスによる哺育が乳幼児マウスの骨組織に与える影響

人工哺育実験系は個体差が大きく、哺育期間の延長が難しいという問題点があった。そこで、雌の CCL25KO マウスに野生型の新生児マウスを哺育させ、CCL25 を含まない母乳による哺育が乳幼児マウスの骨組織に与える影響を検討した。人工哺育実験の結果から、CCL25 を含まない母乳で哺育されたマウスは対照群と比較して骨成長が低下し、骨芽細胞数と破骨細胞数の数も減少することが予想された。しかし予想に反して、CCL25KO マウスにより哺育されたマウスは野生型と比較して骨組織形成に大きな差異は認められなかった(データ非掲載)。このことから、CCL25 には乳幼児期の骨形成を促進させる働きがあるが、母乳中には CCL25 以外の物質にも同様の作用を持つ物質も含まれるため、CCL25 のみの欠損では大きな影響が観察されなかったと考えられた。

3) CCL25 遺伝子欠損が成獣期の骨組織に与える影響

CCL25 が骨組織に与える影響をさらに明らかにするため、CCL25KO マウスの骨組織に着目して研究を進めた。10 日齢マウスでは骨格異常等は認められず、大腿骨および脛骨の長さにも大きな差は認められなかった。さらに組織学的な検討を行ったが、野生型と比較して明確な差異は認められなかった(データ非掲載)。一方で、10 週齢マウスにおいては骨格異常および長管骨の長さには大きな差は認められなかったものの、マイクロ CT を用いた骨形態計測を行った結果、10 週齢の遺伝子欠損マウスでは骨密度、骨梁数、骨梁幅の有意な増加と骨梁間隙の有意な減少が観察された(図 4)。すなわち、CCL25 遺伝子は成獣期においては骨量を抑制的に調節することが示唆された。

CCL25 欠損の骨形成に対する影響を知るため、骨芽細胞マーカーである Osterix のタンパク局在を免疫組織学的に検討した結果、陽性の骨芽細胞数は野生型と大きな差はなかった一方で、アルカリホスファターゼ陽性領域は大きく拡大していた(図 5)。また、骨形成マーカーである Gla 型オステオカルシンの血中濃度を ELISA 法により検討すると、野生型と比較して増加傾向を認めた(図 6)。以上の結果から、CCL25 遺伝子の欠損は骨芽細胞分化には大きな影響を与えないが、骨形成能を亢進している可能性が示唆された。

骨吸収についても評価するため、TRAP 染色による骨吸収領域を比較した結果、野生型と明確な差は見られなかったことから(図 7)。骨吸収能は野生型と比べ変化はないと考えられた。

4) 培養細胞レベルで CCL25 遺伝子が骨芽細胞および破骨細胞に与える影響

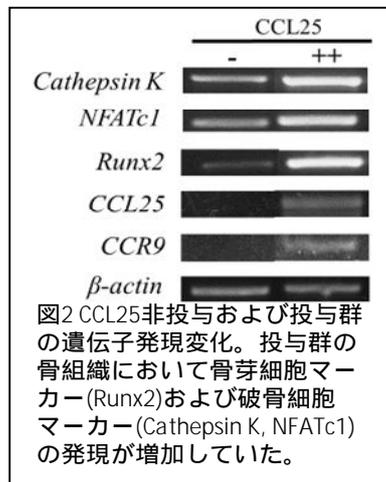


図2 CCL25非投与および投与群の遺伝子発現変化。投与群の骨組織において骨芽細胞マーカー(Runx2)および破骨細胞マーカー(Cathepsin K, NFATc1)の発現が増加していた。

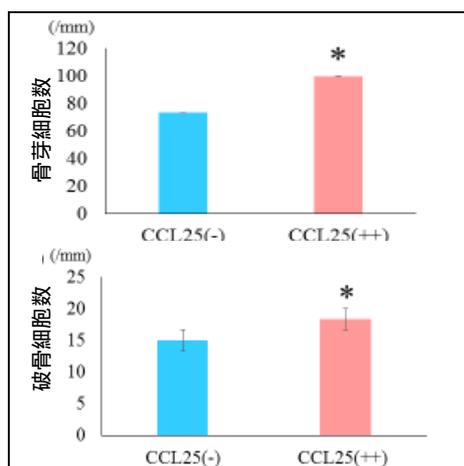


図3 CCL25非投与および投与群の骨組織比較。骨組織観察を行い、骨表面あたりの骨芽細胞数および破骨細胞数を計測した。投与群の骨組織において骨芽細胞数および破骨細胞数の有意な増加を認めた。n=3, *: p<0.05

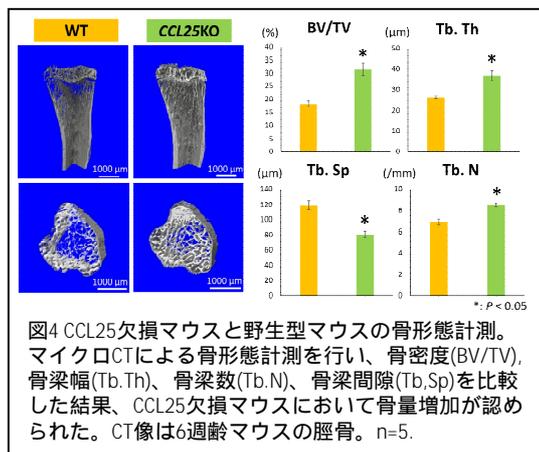


図4 CCL25欠損マウスと野生型マウスの骨形態計測。マイクロCTによる骨形態計測を行い、骨密度(BV/TV)、骨梁幅(Tb.Th)、骨梁数(Tb.N)、骨梁間隙(Tb.Sp)を比較した結果、CCL25欠損マウスにおいて骨量増加が認められた。CT像は6週齢マウスの脛骨。n=5.

出生直後の野生型または CCL25KO マウスの頭蓋骨から骨芽細胞を採取して培養後、ALP 活性を検討したが、骨形成タンパク質(BMP)2 添加の有無にかかわらず、骨芽細胞への分化能に大きな影響は見られなかった。一方で AR 染色により石灰化能を検討した結果、CCL25KO マウス由来の骨芽細胞は石灰化能が亢進していた(図 8)。さらに、新生児から脾臓細胞を採取して同様に培養し、M-CSF と RANKL を添加して破骨細胞へと分化誘導を行った結果、野生型と比較して CCL25KO マウス由来の脾臓細胞は破骨細胞への分化能が低い傾向が認められ、現在再現性を確認中である。

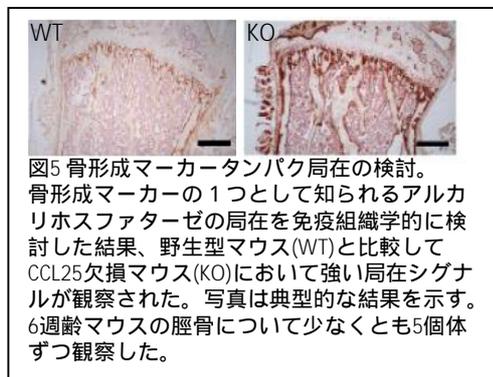


図5 骨形成マーカータンパク局在の検討。骨形成マーカーの1つとして知られるアルカリホスファターゼの局在を免疫組織学的に検討した結果、野生型マウス(WT)と比較してCCL25欠損マウス(KO)において強い局在シグナルが観察された。写真は典型的な結果を示す。6週齢マウスの脛骨について少なくとも5個体ずつ観察した。

5) 本研究課題全体の成果

以上の研究成果より、ケモカイン CCL25 は 母乳中に含まれ乳幼児期マウスの骨成長を促進する、成獣期マウスにおいて骨形成を抑制することにより骨量を調整する、という 2 つの作用をもつことが示唆された。これまで、CCL25 は腸管免疫および胸腺での T 細胞の分化成熟に関わることが知られているが、本研究により、乳幼児期の骨成長と成獣期の骨代謝の両方に関与する可能性が考えられた。一方で、CCL25KO マウスによる授乳でも骨成長に明確な差がみられない点や、成獣期の骨量の調節での分子機序など、未解明な点が多く残された。CCL25 はヒトにおいても母乳に含まれることが知られている。今後、残された課題を解明することにより、母乳により近い機能性の高い粉ミルクの開発や、骨粗鬆症などの骨疾患の新たな創薬開発につながることを強く期待している。

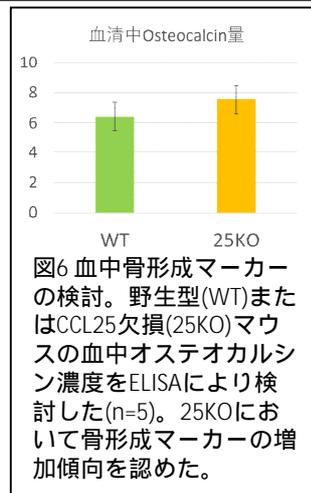


図6 血中骨形成マーカーの検討。野生型(WT)またはCCL25欠損(25KO)マウスの血中オステオカルシン濃度をELISAにより検討した(n=5)。25KOにおいて骨形成マーカーの増加傾向を認めた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Relationship between localization of proteoglycans and induction of neurotrophic factors in mouse dental pulp. Journal of Oral Biosciences. (2017) 59. pp.31-37. A. Yukita, M. Hara, A. Hosoya, H. Nakamura. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1)骨芽細胞が分泌するケモカイン CCL25 が骨代謝に与える影響. 第 41 回日本分子生物学会年会. (2018 年 11 月) 高橋拓実、岩本莉奈、前田久留実、茶山和敏、雪田聡

2) CCL25 遺伝子欠損マウスの骨組織解析. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会・総会. (2018 年 11 月) 前田久留実、二宮禎、細矢明宏、中村浩彰、雪田聡.

3)ケモカイン CCL25 投与が乳幼児期マウス骨形成に与える影響. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会・総会. (2017 年 9 月) 雪田聡、二宮禎、細矢明宏、中村浩彰.

4) 免疫誘因ケモカイン CCL25 投与による骨組織への影響. 第 12 回日本食品免疫学会学術大会. (2016 年 1 1 月) 深澤宏文、茶山和敏、雪田聡

〔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:

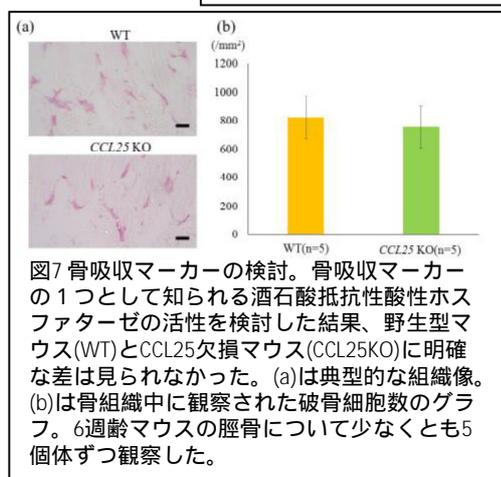


図7 骨吸収マーカーの検討。骨吸収マーカーの1つとして知られる酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの活性を検討した結果、野生型マウス(WT)とCCL25欠損マウス(CCL25KO)に明確な差は見られなかった。(a)は典型的な組織像。(b)は骨組織中に観察された破骨細胞数のグラフ。6週齢マウスの脛骨について少なくとも5個体ずつ観察した。



図8 頭蓋骨由来骨芽細胞の石灰化能。野生型(WT)マウスおよびCCL25遺伝子欠損マウス(25KO)の頭蓋骨から骨芽細胞を単離して石灰化誘導培地にて培養後、アリザリンレッド染色によって石灰化能を比較した。CCL25欠損マウス由来の骨芽細胞は野生型と比較して石灰化能が高かった。n=3.

番号：
出願年：
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：
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：茶山 和敏
ローマ字氏名：SAYAMA Kazutoshi
所属研究機関名：静岡大学
部局名：農学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：30260582

研究分担者氏名：中村 浩彰
ローマ字氏名：NAKAMURA Hiroaki
所属研究機関名：松本歯科大学
部局名：歯学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：50227930

研究分担者氏名：二宮 禎
ローマ字氏名：NINOMIYA Tadashi
所属研究機関名：日本大学
部局名：歯学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：00360222

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。