

令和元年6月26日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20609

研究課題名(和文)骨組織維持機構の解明による新規骨粗鬆症治療戦略の構築

研究課題名(英文) Exploring a novel strategy for osteoporosis treatment through osteoclast-osteoblast interaction.

研究代表者

小宮山 雄介 (Komiya, Yusuke)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：90586471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、破骨細胞への分化の最中に骨芽細胞分化に重要な役割を果たしているインディアンヘッジホッグが関与する可能性を見出した。分化した破骨細胞では分化以前の前駆細胞に比較してIhh発現量が増加することを明らかにした。RANK-CreとIhh-floxマウスにより破骨細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスを作製し、P0日齢の大腿骨での骨組織形成を観察したところ、コンディショナルノックアウトマウスでの骨組織の低形成が観察された。Ihhが破骨細胞から分泌され、骨芽細胞へのシグナル伝達を担うカップリングファクターとして機能している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨組織維持機構の一端として骨リモデリング現象が起こることが知られており、骨芽細胞から破骨細胞へのシグナル伝達メカニズムについては解析が盛んに進められてきた。カップリングファクターとして様々な分子の存在が示唆されているが、破骨細胞から骨芽細胞へのシグナル伝達の方法は明らかにされていなかった。今回の発見では破骨細胞から始まる一連の骨リモデリングが開始されるメカニズムの一端を見出したに過ぎないが、より効率的な骨再生療法や骨粗鬆症の病態理解、および治療法開発に重要な知見となると考えている。

研究成果の概要(英文)： Bone remodeling is a part of bone metabolism and osteoblast to osteoclast signal transduction has been study intensively. Various kinds of factors had been suggested as coupling factor for this phenomenon. However osteoclast to osteoblast type of signal transduction has yet to be elucidate. We discovered that Indian hedgehog, a protein that has an important role in osteoblast differentiation, is upregulated during osteoclast differentiation. And the secrete protein can lead osteoblast differentiation in vitro. We generated a conditional knockout mouse by crossing RANK-Cre and Ihh-flox mouse in order to confirm whether osteoclastic Ihh would influence bone formation in vivo. In P0 littermates, less bone formation has been observed comparing to control mouse. These results suggests that Ihh is a candidate of osteoclast to osteoblast type of coupling factore. We are now under investigating the osteoclastic Ihh effect on adult mice.

研究分野：口腔外科学

キーワード：カップリングファクター Ihh 破骨細胞 コンディショナルノックアウトマウス

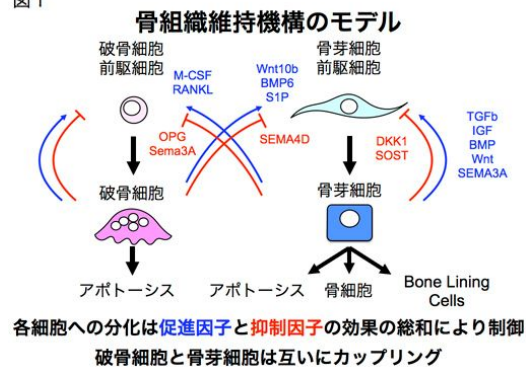
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨組織は破骨細胞と骨芽細胞との協調的な連関により維持されている。長幹骨の成長と維持は成長板という軟骨組織により制御されている (Kronenberg HM et.al. Nature. 2003;423(6937):332-6.)。ヒトをはじめとして、ある種の生物では思春期を迎えると成長板は骨組織へと置換され、いわゆる「成長板の閉鎖」を迎える。しかしながら、ヒトを含む成体では成長板の閉鎖以降も骨組織の恒常性が維持されている。このことは、成長板以外にも骨の成長・維持を支える機構が存在することを示唆する。骨組織維持機構の一端を担うメカニズムとして骨リモデリング現象がある。これまでに多くの研究により骨芽細胞、破骨細胞の骨リモデリング現象での役割が解明されてきた。なかでも、RANKL-OPG-RANK システムによる骨芽細胞の破骨細胞分化制御機構やセマフォリンによる骨芽細胞-破骨細胞双方の連関が関与することが明らかにされてきた(図1、Lacey DL et.al. Nat Rev Drug Discov. 2012;11(5):401-19., Negishi-Koga T et.al. Bonekyd Rep 2012;1:183.)。しかしながら、破骨細胞から骨芽細胞への分化制御・機能制御メカニズムについては不明である。

破骨細胞へ分化しうる単球系細胞株である RAW264.7 細胞と骨芽細胞へ分化しうる間葉系細胞である C3H10T1/2 を、破骨細胞、骨芽細胞への分化刺激因子を添加せずに共存培養すると、RAW264.7 細胞はコロニーを形成して TRAP 陽性を呈し、またコロニー周囲の C3H10T1/2 細胞は ALP 陽性を呈し、それぞれ破骨細胞、骨芽細胞へと分化しうることが観察された。この結果は、それぞれの細胞が分化制御因子を介して互いに分化誘導したと考えられる。骨芽細胞では、破骨細胞分化を制御する因子として RANKL-OPG-RANK システムによる細胞-細胞間シグナル伝達が重要であることが知られている。破骨細胞では、骨芽細胞分化を制御する因子として Wnt, BMP, S1P, Hh などのシグナルが重要となる可能性が示唆されているが、詳細は明らかにされていない。そこで、性成熟を迎えた 12 週齢の成体マウス大腿骨成長板直下の一次海面骨の領域で In situ hybridization 法により各種の遺伝子発現を検討したところ、Ihh の発現が一次海面骨の領域で認められた。

図1



Ihh は先行研究において前肥大軟骨細胞から産生され、長幹骨の発生・成長に重要であることが知られている。さらにマウスでは、成長板から放出される Ihh が一次海面骨の形成と維持に重要な役割を持つことも明らかにされた (Razzaque MS et.al. J Pathol. 2005;207(4):453-61., Maeda Y et.al. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(15):6382-7.)。また、Ihh が初期の骨芽細胞分化に必要であることが示され、間葉系幹細胞から骨芽細胞へと傾倒するためのスイッチ機構として働くことが明らかにされた (Kanke K et.al. Stem Cell Reports. 2014;2(6):751-60.)。このように Ihh が骨芽細胞分化に重要であることが示されてきた。しかし、ヒトをはじめとする成長板の閉鎖する動物で成長板閉鎖以降の成体で、Ihh が骨組織維持に関与するかは不明であった。

2. 研究の目的

研究者は骨形成における Hh-Gli シグナルの役割を解明する研究に従事しており、その過程で骨形成と骨吸収のカップリング現象について観察してきた。長幹骨では成長板から放出される Indian hedgehog (Ihh) が骨の発生・成長に重要であるが、成長板閉鎖後に骨組織の成長を維持するメカニズムは不明である。本研究では、現在までにその詳細が解明されていない成長板閉鎖後の骨組織維持機構を破骨細胞と骨芽細胞とのカップリング現象をふまえて明らかにする。さらに、この知見をもとに、従来型の破骨細胞機能抑制とは異なる、新たな視点による骨粗鬆症や腫瘍性骨破壊の治療に対するアプローチを模索することが目

的である。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞での骨芽細胞分化誘導因子の発現検討

*in vitro*で破骨細胞または破骨細胞前駆細胞が因子を発現するかを検討する。具体的には、未分化細胞から産生細胞へと分化刺激を与え、リアルタイム RT-PCR で発現を観察する。

(2) 破骨細胞特異的 *Ihh* ノックアウトマウスにおける骨形成状況の観察

破骨細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する RANK-Cre マウスないし CstK-Cre マウスと *Ihh*-flox マウスを交配する。表現型の観察には軟エックス線画像ないしマイクロ CT 画像およびその 3 次元再構成像を用い、さらに骨形態計測による各種パラメータを比較検討する。

(3) 骨芽細胞分化促進因子の機能検証

産生細胞と骨芽細胞前駆細胞との共存培養を行い、その機能を検証する。具体的には前駆細胞として間葉系幹細胞ないし C3H10T1/2、C17 細胞を用い、産生細胞と直接接触させるか、非接触させた状態で共存培養を行い、ALP 染色、リアルタイム RT-PCR による骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を観察する。このとき、C3H10T1/2 と C17 細胞は骨芽細胞分化誘導刺激に対するバイオセンサーとして用いる。分化マーカー遺伝子として、ALP、BSP、Oc、Runx2、Osx などを用いる。さらに、同定された分化誘導因子を培養中で阻害することで骨芽細胞分化誘導を抑制しうるかを検討する。具体的には、1) で用いた flox マウスより産生細胞を採取し、*in vitro* で Cre 発現アデノウイルスを用いて任意の時期に分化促進因子を欠失させる。あるいは、分化誘導因子に対する阻害剤を培養に添加し、骨芽細胞分化誘導に対する抑制効果を検討する。阻害剤として、Noggin、DKK1、Sost、Cyclopamine、抗ヘッジホッグ抗体の 5E1 などを用いる。上述の方法で産生細胞による前駆細胞の骨芽細胞分化誘導を検証できない場合は、産生細胞の訓化培地で前駆細胞の培養を行い、同様の方法で評価を行う。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞での骨芽細胞分化誘導因子の発現検討

破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞に M-CSF および RANKL の暴露により破骨細胞へと分化を行った。その結果破骨細胞分化とともに *Ihh* の発現増加が認められた。しかし、破骨細胞自体は *Ihh* シグナル伝達後に発現が増強される *Gli1* の発現が認められなかった。

(2) 破骨細胞特異的 *Ihh* ノックアウトマウスにおける骨形成状況の観察

破骨細胞特異的ノックアウトマウスを作製する上で、RANK-Cre、CstK-Cre の 2 種類の Cre マウスを候補としてあげた。RANK-Cre マウスでは RANK と *Ihh* が同一染色体上に位置するという問題点があり、目的とする RANK-Cre/+; *Ihh* fl/fl マウスの出生頻度が低かった。そのため解析は限定的とならざるをえなかった。P0 および P4.5 日齢での大腿骨を比較するとコントロールとした *Ihh* fl/fl マウスと比較して RANK-Cre/+; *Ihh* fl/fl マウスでは大腿骨長が短い傾向にあった。また、体長も短い傾向にあった。P4.5 マウス大腿骨の組織標本作製し、HE 染色を行ったところ、骨幹部の石灰化による骨組織形成は認めるものの骨髄内容が少なく、海綿骨の低形成が認められた。

染色体上の位置から影響を受けにくい CstK-Cre マウスを用いたコンディショナルノックアウトマウスについては現在も作製中である。しかし、CstK の発現パターンとして近年、精巣や卵巣に発現があることが指摘されており (PLoS ONE 2012.7(7): e42005) 発生段階の初期の時点から *Ihh* が欠失してしまう恐れがあることを検討しなくてはならない。

(3) 骨芽細胞分化促進因子の機能検証

先行実験では骨芽細胞前駆細胞として C3H10T1/2、破骨細胞前駆細胞として RAW264.7 を用い、両者を共培養した時に C3H10T1/2 細胞が骨芽細胞分化を起こすことを確認した。両者の細胞が接触していない状況でも骨芽細胞分化を起こすことができるかを知るためにセ

ルカルチャーインサートをもちいて破骨細胞培養と骨芽細胞培養を物理的に遮断し、ただし、溶液を通して物質交換ができるようにした。破骨細胞分化刺激を与え、分化したのちに C3H10T1/2 培養にセルカルチャーインサートを移動し、共培養を行った。その結果、破骨細胞との共存培養により C3H10T1/2 での ALP 活性が認められた。この効果は Ihh に対する抗体を培養に添加することで抑制された。これらのこと破骨細胞が分泌する Ihh が細胞の接触がなくともパラクライン作用により骨芽細胞分化を誘導しうることが示された。

Ihh が C3H10T1/2 細胞で骨芽細胞分化誘導を起こすことを検証するために、Ihh を培養細胞に暴露したところ培養 7 日目で ALP 活性の上昇を培養細胞の ALP 染色により確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大庭 伸介

ローマ字氏名：Shinsuke Ohba

研究協力者氏名：山川 晃
ローマ字氏名：Akira Yamakawa

研究協力者氏名：鄭 雄一
ローマ字氏名：Ung-il Chung/Yuichi Tei

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。