

令和元年6月13日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21326

研究課題名(和文)破骨細胞の分化と成熟化シグナルのクロストークを探る

研究課題名(英文) Explore the crosstalk of osteoclast differentiation and maturation signals

研究代表者

長谷川 紘也 (HASEGAWA, hiroya)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：00635899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨代謝において骨吸収を担う破骨細胞に対し、Syk阻害剤の作用について細胞融合に与える影響を検討した。その結果、破骨前駆細胞様細胞RAW264.7細胞に対し、分化の後期においては細胞融合が促進される所見を得た。このような効果はSyk阻害剤に広く認められた。しかし、リアルタイムPCRの結果から破骨細胞関連因子には影響がなく、細胞融合はシーリングゾーンの構造の変化によるもの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

私たちの体は毎日の骨代謝により作り変えられている。このバランスが崩れると骨粗鬆症のように日常生活に大きな影響を及ぼすことになる。骨代謝は骨芽細胞と破骨細胞により制御されている。今回、破骨細胞の細胞融合のメカニズムにおいて、Syk阻害剤は細胞周囲を取り巻くシーリングゾーンの構造を変化させることで細胞融合を促進させる可能性が示唆されました。今後はさらに破骨細胞を制御するメカニズムについて研究をすすめ、骨代謝疾患の治療に役立てたいと思っています。

研究成果の概要(英文)：In this study, examined the effect of Syk inhibitor on cell fusion on osteoclasts responsible for bone resorption in bone metabolism. As a result, it was found that cell fusion was promoted in the late stage of differentiation of Osteoclast precursor cell-like cells 'RAW264.7 cells'. Such an effect was widely discernible in Syk inhibitors. However, the results of real-time PCR indicated that osteoclast-related factors were not affected, and that cell fusion was due to changes in the structure of the sealing zone.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 破骨細胞 Syk

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

## 1. 研究開始当初の背景

骨代謝において、骨吸収を担う破骨細胞の過度な活性化や分化は骨粗鬆症やリウマチ等の疾患を悪化させる。近年、骨代謝疾患に対する薬剤の開発は多方面からなされている。

これまでに、私は臍臓より精製クローニングされた分子量約 28kDa のプロテアーゼで、血清カルシウム降下作用をもつカルデクリンが、破骨細胞の分化と成熟破骨細胞の骨吸収を抑制することを報告(Hasegawa H, et al. J Biol Chem, 2010, Tomomura M, Hasegawa H, et al. J Biol Chem, 2012)してきた。

カルデクリンは破骨細胞分化および成熟破骨細胞の機能亢進を右図に示すような RANKL 刺激から生じるシグナル伝達の一部を阻害することで抑制し、カルデクリンが長期的に骨吸収を抑制する可能性が示唆されている。

平成 25 年に採択された「科学研究費 若手研究 (B) 課題番号 25870674」の課題で IRF-8 による破骨細胞の分化抑制機構を種々の阻害剤を用いて調べる中で、RANKL から生じるシグナル伝達を Syk 阻害剤で阻害すると、破骨細胞の細胞融合が進み巨大な破骨細胞が生じるという興味深い現象が確認された。

Syk とは血球系細胞に発現し、多くの受容体刺激により活性化し、細胞内では Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) シグナル伝達の key 分子として働き、マスト細胞の活性化やマクロファージの貪食、B 細胞の活性化と分化など、免疫細胞の活動に重要な役割を果たしていることが推察されている。さらに血小板の凝集、破骨細胞の活性化、乳癌や急性前骨髄性白血病に対する抑制作用、ウイルス感染や真菌感染に対する抑制作用にも関わっているとされている。現在までに様々な Syk 阻害剤が開発されており 1994 年に報告されたピセタノール (Piceatannol) を始め、ER-27319、オキシンドール (Oxindoles)、BAY61-3606、ナフチリジン (Naphthyridines)、ピリミジン-5-カルボキサミド誘導体、ニトロスチレン化合物などが知られている。リウマチでは Syk が関節滑膜、特に内層細胞に発現し、リン酸化が亢進することで、TNF $\alpha$  によるサイトカイン産生や MMP の発現に、重要な役割を果たしていることが報告されている。

研究を進める中で発見した破骨細胞融合時に Syk 阻害剤を添加すると巨大な破骨細胞が形成される現象は、PLC や Src などの RANKL から生じるシグナル伝達に関する他の分子を対象とした阻害剤では生じない現象であった。

そこで、私は Syk 阻害剤によって Syk が阻害されることで、別のシグナル経路が相対的に活性化され細胞融合が進むのではないかと仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

これまでに破骨細胞融合時の融合促進を確認した Syk 阻害剤は ER-27319 のみであった。しかし、Syk 阻害剤には BAY61-3606、R406、R788 (Fostamatinib)、PRT06267 と数多くの薬剤が存在する。また、各薬剤の構造には多少の違いがみられることから、それぞれの薬剤により破骨細胞の細胞融合促進効果にどのような違いがみられるかを検証する。

また、Syk は関節リウマチにおいて関節滑膜に発現し、症状に対する関りも大きく重要な役割を担っていることから、関節リウマチの治療に役立つ知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Syk 阻害剤による破骨細胞融合時の融合への影響について

Syk 阻害剤として、ER-27319、BAY61-3606、R406 を用いて破骨細胞の細胞融合がどの Syk 阻害剤でも促進されるかを検証した。破骨細胞として RAW264.7 細胞を用いて実験を行った。細胞をデッシュに播種して RANKL を添加し、培養後 48 ~ 72 時間後に Syk 阻害剤を添加し、固定後 TRAP 染色で破骨細胞の融合具合を確認した。

### (2) Syk 阻害剤による破骨細胞関連因子への影響について

(1)と同様に Syk 阻害剤として、ER-27319、BAY61-3606、R406 を用いて培養した際に、破骨細胞の融合が促進されるのであれば、破骨細胞関連因子に影響はあるのではないかと考え、リアルタイム PCR で検討した。

さらに、HDAC6 の mRNA 量に変化が認められたため免疫染色をおこなった。また、HDAC6 阻害剤の tubacin を添加して培養を行い、比較検討した。

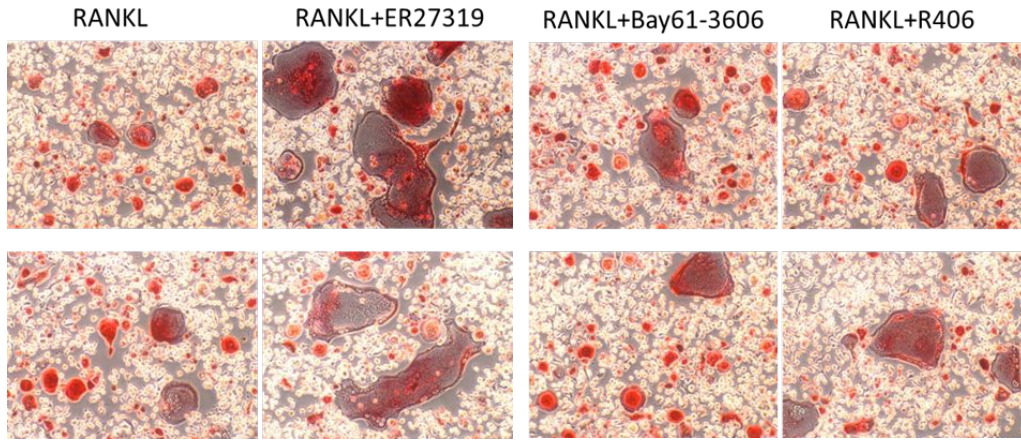
### (3) 関節リウマチに対するカルデクリンの影響について

これまでに研究を続けてきたカルデクリンは破骨細胞の分化と成熟化を抑制する。これまでにカルデクリンは RANKL からの Src-Syk シグナルよりも上流でシグナルの阻害をしていることが示唆されている。そこで、関節リウマチモデルマウスにカルデクリンを投与し、その影響を検討した。

## 4. 研究成果

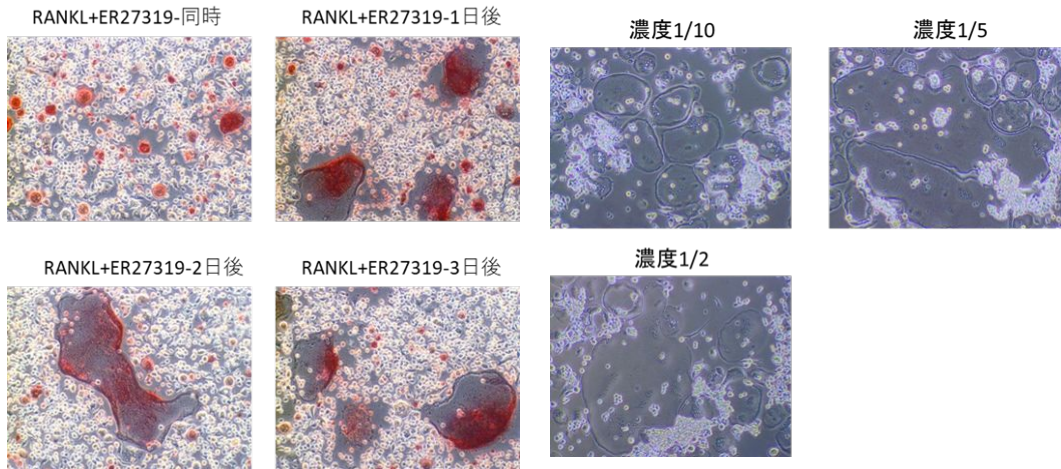
### (1) Syk 阻害剤による破骨細胞融合時の融合への影響について

今回、ER-27319、BAY61-3606、R406 の 3 種類の Syk 阻害剤を用いたが、Syk 阻害剤による差はほとんどなく、Syk 阻害剤の添加によって破骨細胞の細胞融合が促進された。



一方、これまでに様々な論文で報告されているように、細胞をデッシュに播種して RANKL と同時に Syk 阻害剤を添加すると破骨細胞分化が抑制された。そのため、Syk 阻害剤による阻害がある時期においては分化促進につながっている可能性が示唆された。

次に、ER-27319 を低濃度で使用し、その影響を検討したところ、使用濃度が 1/5 ~ 1/2 程度では、顕微鏡の明視野で破骨細胞の融合が進行している所見が確認された。このことから、Syk 阻害剤は低濃度でも破骨細胞の細胞融合に作用することが示唆された。



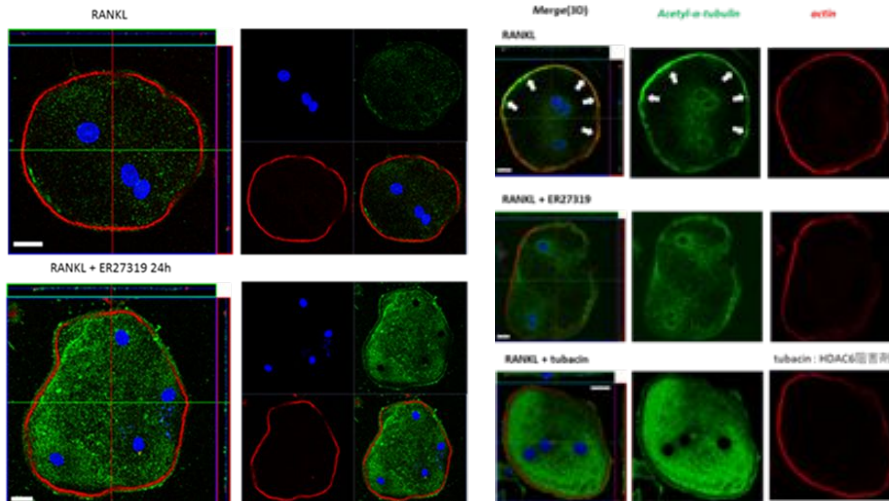
## (2) Syk 阻害剤による破骨細胞関連因子への影響について

(1)と同様に Syk 阻害剤として ER-27319、BAY61-3606、R406 を用いて培養し、破骨細胞関連因子について mRNA 発現量をリアルタイム PCR で検討したが、破骨細胞関連因子に大きな変化は認められなかった。わずかに HDAC6 は発現量が増加傾向にあったが、増加幅は 2 倍未満であり、Syk 阻害剤は分化シグナルに影響している可能性は低いことが示唆された。

しかし、HDAC6 の mRNA 量に変化があったため、免疫染色を行った。下図に示す画像では緑色に染色された部分が HDAC6 を示す。画像からも Syk 阻害剤を添加して培養すると、HDAC6 は増加することが分かった。

そこで、HDAC6 の阻害剤である tubacin を添加して培養し免疫染色を行い比較した。

免疫染色の結果から、Syk 阻害剤は HDAC6 阻害剤を添加した場合と同様な所見を示した。すなわち、アセチル化されたチューブリンがアクチンリング周囲に集積することを阻害し、細胞質中に局在させることが分かった。また、HDAC6 阻害剤の tubacin を 24 時間添加して培養すると骨吸収が



すなわち、アセチル化されたチューブリンがアクチンリング周囲に集積することを阻害し、細胞質中に局在させることが分かった。また、HDAC6 阻害剤の tubacin を 24 時間添加して培養すると骨吸収が

抑制された。Tubacin を添加してもアクチンリングは一定の形状を保持しており、アクチンリング周囲に集積していたアセチル化チューブリンの集積を阻害することで骨吸収が阻害された可能性がある。つまりシーリングゾーンの構造が変化し、十分な骨表面への接着が出来なくなっていると考えられる。

このように Syk 阻害剤は細胞融合時においてアクチンリング周囲のアセチル化チューブリンの集積を阻害することで、シーリングゾーンの構造が変化し、細胞融合が進みやすくなるのではないかと考えられた。

### (3)関節リウマチに対するカルデクリンの影響について

Syk 阻害剤の細胞融合における影響は、分化の後期においてのみの効果であり、分化の初期では Syk 阻害剤は分化に対し阻害的に作用した。また in vitro の結果が、in vivo で起こるのかが不明である。使用した Syk 阻害剤はこれまでに関節リウマチの治験においていくつかの有害事象を認めることが報告されており、in vitro の結果も考慮すると、使用した Syk 阻害剤が関節リウマチの治療薬にはなりえないことが予想される。

そこで、これまでの研究で破骨細胞に対して抑制効果を有したカルデクリンを用いて、この問題を解決できないかと考えた。

カルデクリンはタンパク質であり、生体に投与しても生体内での半減期が短いことが予想される。そこで、カルデクリンを遺伝子導入により発現させることでカルデクリンの影響を検討した。遺伝子発現は、安全性を考慮し非ウイルス性ベクターのプラスミドベクターを使用した。関節リウマチモデルマウスにカルデクリンプラスミド DNA を投与しカルデクリンを発現させたところ、脚の指の腫脹は軽減した。

このような作用は、関節リウマチの第一選択薬として用いられているメトトレキサートを投与した場合と同じであったことから、カルデクリンプラスミド DNA の投与により関節炎の症状が緩和する可能性が示唆された。また、トルイジンブルー染色による切片像からはカルデクリンプラスミド DNA の投与により骨端線が偽手術のコントロールマウスと同程度まで回復していた。

以上から、カルデクリンプラスミド DNA は、関節炎だけでなく、関節リウマチによって生じた骨障害に対し、再生させる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

品川令, 藤本舞, 長谷川紘也, 土屋隆子, 土肥洋介, ダシドンドグオトゴントヤ, 豊田亜希子, 真野樹子, 須田直人. 明海大学病院における口唇裂・口蓋裂患者の過剰歯に関する臨床統計調査. 日本口蓋裂学会雑誌, 査読有, 43, 20-25, 2018

長谷川紘也, 真野樹子, 品川令, 藤本舞, 須田直人. 術前顎矯正治療における光学印象の試み(第二報) 裂隙形態の影響. 日本口蓋裂学会雑誌, 査読有, 43, 12-19, 2018

長谷川紘也, 真野樹子, 土屋隆子, 土肥洋介, DASHDONDOG Otogontoya, 豊田亜希子, 品川令, 藤本舞, 須田直人. 術前顎矯正治療における光学印象の試み(第一報) 撮像時の湿潤と動きの影響. 日本口蓋裂学会雑誌, 査読有, 42, 208-214, 2017

権田秋華, 真野樹子, 長谷川紘也, 須田直人. ニッケルアレルギーに配慮し上顎歯列の狭窄と骨格性開咬に対し SARME と上下顎同時移動術を施行した1例. Orthodontic Waves, 査読有, 76, 39-45, 2017

### 〔学会発表〕(計9件)

長谷川紘也. エピソーマルベクターを用いた局所遺伝子導入法の確立. 明海歯科医学会第35回学術大会. 2018年6月7日, 坂戸市

真野樹子, 時岡一幸, 長谷川紘也, 藤本舞, 品川令, 須田直人. 歯肉骨膜形成術(GPP)施行例と非施行例における顎発育の短期成績の比較. 第42回日本口蓋裂学会総会, 2018年5月24-25日, 大阪市

藤本舞, 真野樹子, 時岡一幸, 品川令, 長谷川紘也, 奥結香, 坂下英明, 須田直人. 術前顎矯正による上顎歯槽形態の改善に関与する因子の検討. 第42回日本口蓋裂学会総会, 2018年5月24-25日, 大阪市

長谷川紘也, 真野樹子, 浅香幸子, 藤本舞, 品川令, 須田直人. 唇顎口蓋裂児の光学印象における裂隙形態の影響. 第76回日本矯正歯科学会. 2017年10月18-20日, 札幌市

品川令, 真野樹子, 長谷川紘也, 藤本舞, 須田直人. 当科における口唇裂・口蓋裂患者の過剰歯に関する臨床統計学的検討. 第76回日本矯正歯科学会. 2017年10月18-20日, 札幌市

長谷川紘也. NF- $\kappa$ B デコイオリゴ核酸による破骨細胞分化への影響について. 明海歯科医学会第32回学術大会. 2017年6月1日, 坂戸市

長谷川紘也, 真野樹子, 土屋隆子, 土肥洋介, 品川令, 藤本舞, 須田直人. 唇顎口蓋裂児への光学印象の試み—第1報:湿潤と体動の影響—. 第41回日本口蓋裂学会総会, 2017年5月18-19日, 東京

品川令, 藤本舞, 長谷川紘也, 真野樹子, 須田直人. 唇顎口蓋裂患者の過剰歯に関する臨床

統計調査：第41回日本口蓋裂学会総会，2017年5月18-19日，東京  
長谷川紘也．メカニカルストレスによる破骨細胞の分化促進機構について．明海歯科医学  
会第29回学術大会．2016年6月2日，坂戸市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。