

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09532

研究課題名(和文)炎症性疾患におけるCX3CL1を介した破骨細胞前駆細胞の骨芽細胞層通過機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of CX3CL1-mediated invasion of osteoclast progenitor cells through the osteoblast layer in inflammatory diseases.

研究代表者

立川 敬子 (Tachikawa, Noriko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：70236537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞とOPCの接触により破骨細胞分化因子であるRANKLとその受容体RANKの結合について検出する試みを行なった。RANKL、RANKそれぞれにnanoBiT(ルシフェラーゼ活性を持つ)のN末側とC末側を融合タンパクとして別々の細胞に発現させ、それらの細胞を共培養し基質を添加したところ発光が検出できた。本実験系にRANKLに対する中和抗体を添加したところ、著明な発光抑制が見られた。このことからRANK-RANKLの特異的な結合が検出できたと判断した。本結果は生細胞でのRANK-RANKL結合の検出を可能とし、骨粗しょう症に対する薬剤のスクリーニングに応用できる重要な発見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎口腔外科領域において顎骨壊死や癌細胞の骨転移は診療を行う上で最も解決しなければならない問題である。これらに関わっているのがRANK-RANKL結合から始まる細胞内情報伝達機構である。本研究において、生細胞におけるRANK-RANKL結合を世界で初めて示すことができた。さらに、本実験系を薬剤のスクリーニング系に応用することで新規な低分子の骨粗鬆症薬や癌転移抑制剤の開発につなげたい。

研究成果の概要(英文)：We tried to detect the RANK-RANKL interaction using split luciferase fusion proteins. RANK and RANKL coding regions were fused with LgBiT and SmBiT of the luciferase respectively. The LgBiT-RANK expressing HeLa cells were co-cultured with the RANKL-SmBiT expressing HeLa cells in the presence of luciferase substrate. This co-culture experiment showed the RANK-RANKL interaction between HeLa cells, which was canceled in the presence of an anti-RANKL neutral antibody. This is an important finding that will enable the detection of RANK-RANKL binding in living cells and can be applied to the screening of drugs for osteoporosis.

研究分野：口腔外科学

キーワード：CX3CL1 破骨細胞前駆細胞 細胞内カルシウム濃度 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

本研究の当初の目的は CX3CL1 による OCP の細胞通過機構 (Transcellular migration) を分子レベルで明らかにすることにより、骨代謝回転の新たな制御方法を見出し、炎症性骨疾患の予防法および治療法を提案することであった。蛍光タンパクでタグ付けした CX3CL1 や Actin の骨芽細胞系細胞への発現を試みたが、それら発現量が検出限界以下であった。そこで本研究は新たに OCP の細胞通過に伴って活性化される RANKL-RANK 結合を可視化定量可能な実験系を樹立し、破骨細胞の分化を制御することを目指した。

2. 研究の目的

近年、タンパク質相互作用 (PPI) の検出に興味深い実験系が登場している。申請者はルシフェラーゼタンパクを 2 つの部位に分けてそれぞれを PPI 関係にあるタンパク質に融合タンパクとして発現させ、ルシフェラーゼ活性を指標に PPI を定量する方法である NanoBiT PPI 法を用いた。まず LgBiT-RANK、RANKL-SmBiT をそれぞれ HeLa 細胞に発現させ、これら細胞の共培養における発光を調べたところ、共培養で強い発光が認められ、RANKL の中和抗体でその発光は阻害された。さらに、MC3T3E1 細胞に RANKL-SmBiT、RAW264.7 細胞に LgBiT-RANK を発現させ、共培養を行ったところ発光および破骨細胞分化が認められた。このことは RANK-RANKL 結合を PPI の系で検出できていることを強く支持すると共に、本実験系が RANK-RANKL 結合阻害剤のスクリーニングに使用できる可能性を提示した。

3. 研究の方法

LgBiT-RANK、RANKL-SmBiT 発現ベクターは RT-PCR 法および In-Fusion 法を用いて作製した。それらはレトロウイルス法にて HeLa 細胞、MC3T3E1 細胞、RAW264.7 細胞に安定発現させた。発光は NanoBiT Protein-Protein Interaction System (Promega) を用いて Arvo MX1420 (PerkinElmer) にて検出定量した。また、発光顕微鏡は LuminoView (Olympus) を使用した。

4. 研究成果

1、Hela (LgBiT-RANK) と HeLa (RANKL-SmBiT) による発光の検出 (図 1)

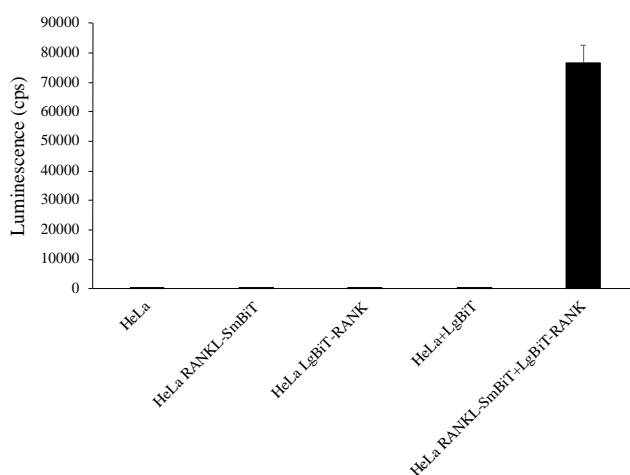


図 1) HeLa, HeLa RANKL-SmBiT, HeLa LgBiT-RANK それぞれ単独培養、HeLa と HeLa LgBiT-RANK, HeLa RANKL-SmBiT と HeLa LgBiT-RANK の共培養下におけるルシフェラーゼ活性を表す。

図 1 が示すように HeLa 細胞間で RANK-RANKL 結合が発光により検出された。

2、HeLa 細胞間 RANK-RANKL 結合の RANKL 中和抗体による阻害 (図2)

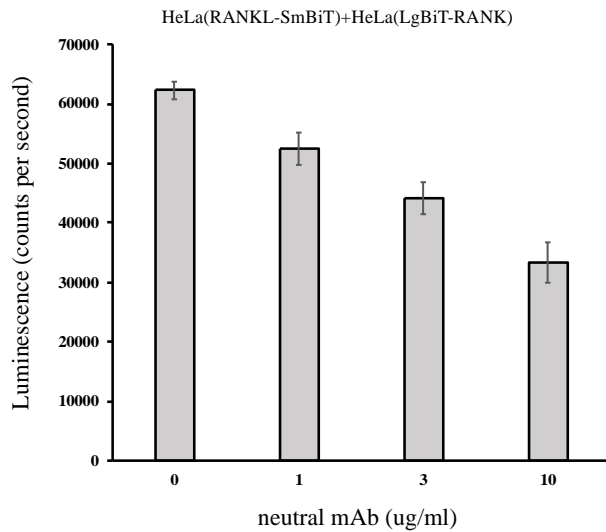


図2) HeLa 細胞間の RANK-RANKL 結合による発光は RANKL に対する中和抗体の効果

図2が示すように RANKL 中和抗体は容量依存的に RANK-RANKL 結合を阻害しており、発光が RANK-RANKL 結合に特異的であることが示された。

3、MC3T3E1 (RANKL-SmBiT)と RAW (LgBiT-RANK、DsR)の共培養による発光および破骨細胞分化 (図3)

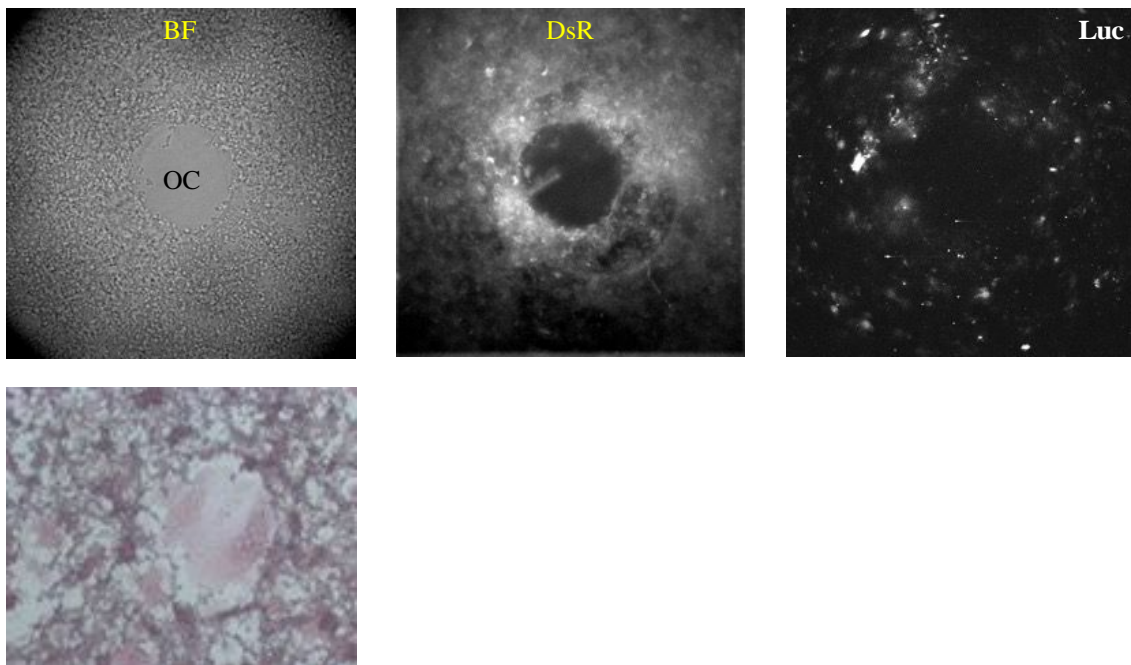


図3) 明視野像 (上段左)、DsR 蛍光像 (上段中)、発光像 (上段右)、TRAP 染色像 (破骨細胞、下段左)

図3に示されるように MC3T3 に発現させた RANKL-SmBiT は RAW 細胞の破骨細胞分化を支持した。また、破骨細胞の周囲に RANK-RANKL 結合による発光が認められている。

本研究において、世界で初めて破骨細胞分化に必須である RANK-RANKL 結合が可視化、定量されたことは骨リモデリングを研究する上で非常に重要な発見である。本実験系は発光の定量化による RANK-RANKL 結合阻害剤のスクリーニングを可能にするだけでなく、実際の RANK-RANKL 結合が起こっている場所の特定を可能視する

ものである。

近年、従来より提唱されてきた骨芽細胞系の細胞に発現する RANKL が重要であるとの認識が覆されつつあり、骨髄中の脂肪細胞系譜の細胞に発現する RANKL が病態においては非常に重要な役割をすることが報告されてきている。そこで、申請者は RANKL-SmBiT と LgBiT-RANK を発現するマウスの開発を始めている。今後は RANK-RANKL 結合阻害剤のスクリーニングを始めると共に、マウスを用いた *in vivo* の実験系を確立することにより、骨代謝に関連する細胞群の特定を行い、新たな治療剤について提案したい。

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〕

〔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	中浜 健一 (Nakahama Kenichi) (60281515)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関