

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007~2008

課題番号：19591773

研究課題名（和文） 成熟破骨細胞の骨吸収機能制御に関する分子疫学的研究

研究課題名（英文） Molecular epidemiological study of the regulation of osteoclastic bone resorption

研究代表者

宮崎 剛（MIYAZAKI TSUYOSHI）

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団 東京都老人総合研究所 研究員

研究者番号：50376480

研究成果の概要：

骨粗鬆症や関節リウマチにおける骨量低下・骨破壊の進展においては、骨吸収を直接担う唯一の細胞と考えられている破骨細胞が重要な役割を果たしている。今回、破骨細胞の骨吸収亢進が引き起こされる環境下において、発現量に変化する遺伝子を網羅的に検索したところ、興味深いことに加齢変化において重要といわれている活性酸素を制御する遺伝子 MnSOD（スーパーオキシドディスムターゼ）が同定された。MnSOD 遺伝子を Cre/loxP システムでノックダウンすると成熟破骨細胞の骨吸収活性が有意に低下することを見いだした。今後、破骨細胞特異的 MnSOD ノックアウトマウスを作製し、解析を行う予定である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：破骨細胞、骨破壊、関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ（RA）は免疫異常を基礎とする全身性の炎症性疾患であるが、その標的臓器は主として関節であり、関節での炎症が慢性に経過した場合、軟骨・骨の吸収さらには線維化に至り、最終的には関節の屈曲、変形、高度の運動障害などが見られるようになる。非ステロイド性抗炎症薬、ステロイド剤および疾患修飾性抗リウマチ薬の進歩により、疼痛や炎症に関してはある程度

までコントロールが可能になってきたが、現在でも RA 治療における最大の課題が、骨軟骨破壊からくる疼痛と関節機能障害のコントロールであることになってきたが、現在でも RA 治療における最大の課題が、骨軟骨破壊からくる疼痛と関節機能障害のコントロールであることには変わりはない。近年、骨破壊を予防できる可能性をもった生物製剤が日本でも使用されるようになってきたが、これら

の製剤が RA 治療の第一選択となるには現在のところ至っていない。

RA における骨破壊の進展においては、骨吸収を直接担う唯一の細胞と考えられている破骨細胞が重要な役割を果たしている。我々は、RA 滑膜において、滑膜マクロファージが滑膜線維芽細胞の支持のもとで破骨細胞に分化することを報告している (Takayanagi et al. *J Clin Invest.* 104:137-46, 1999; *Arthritis Rheum* 43:259-269, 2000)。つまり、滑膜線維芽細胞は、破骨細胞形成に必要な微小環境を整えて破骨細胞形成を促進し、骨破壊に関与していると考えられる。1997 年、破骨細胞分化誘導因子が RANKL (receptor activator of NF- κ B) として同定された。RANKL は TNF リガンドファミリーに属する膜貫通型タンパクであり、その細胞内シグナル伝達は、分子メカニズムの解明と治療標的の同定の両面から解析が進んだ。RANKL 受容体である RANK に会合する因子が精力的に解析され、TNF receptor-associated factor (TRAF) ファミリーのアダプター分子の多くが結合することが明らかになった。その中でも最も重要な分子は、ノックアウトマウスが大理石骨病になる TRAF6 と考えられる。さらに TRAF6 は NF- κ B, JNK, p38, ERK, PI3K-Akt など下流の分子を活性化する。さらに、その下流では c-Fos を介した AP-1 活性化と TRAF6 を介した NF- κ B 活性化による NFATc1 発現上昇が重要であり、これにより破骨細胞分化が誘導される。遺伝子欠損マウスの解析から RANK をはじめ、TRAF6, c-Fos, NF- κ B, FcR γ /DAP12 などが生体内における破骨細胞分化に重要な役割を果たすことがわかっている。破骨細胞分化の解析が爆発的に進行した一方で、成熟破骨細胞の骨吸収メカニズムの解析は置き去りにされている。破骨細胞にアポトーシスを誘導することによって治療効果を上げているビスフォスフォネートの成功、あるいは骨粗鬆症のみならず、悪性腫瘍による高カルシウム血症の治療薬として用いられているカルシトニン製剤の有用性を見ると、成熟破骨細胞の延命・骨吸収機能の解析をすすめることにより、新たな知見・骨破壊制御の治療薬の開発につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、成熟破骨細胞の骨吸収機能のさらなる解明をすべく、骨吸収を制御する遺伝子の検索を行い、その機能を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

これまで我々はアデノウイルスベクターを用いて破骨細胞の延命、骨吸収機能活性化

における ERK 経路と NF- κ B 経路の役割を検討し、ERK の活性化は破骨細胞の延命に必要であり、NF- κ B は破骨細胞の骨吸収機能の活性化に重要であることを報告した (Miyazaki et al., *J. Cell Biol.* 148:333-42, 2000)。今回、我々は、破骨細胞の最も重要な骨を食べるという機能のさらなるメカニズムの解明を試みる。破骨細胞の骨吸収機能の活性化に重要であるとすでに報告している NF- κ B 経路に着目し、NF- κ B 経路を制御するために用いたドミナントネガティブ型 I κ B kinase β [IKK β^{DN}] を組み込んだアデノウイルスを使用することとした。

マウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系を用いて破骨細胞を形成させ、接着能の違いを利用し、コラゲナーゼ・ディスペラーゼ処理により骨芽細胞のみをディッシュから除去し、十分量の均一な成熟破骨細胞を採取する実験系を用いる。NF- κ B 経路をブロックする分子 (ドミナントネガティブ型 I κ B kinase 2) を発現させるアデノウイルス (AxIKK β^{DN}) とコントロールとして EGFP のみを発現するアデノウイルス (AxEGFP) を破骨細胞に感染させる。感染 24 時間後に破骨細胞分化および骨吸収機能を促進させるサイトカインである RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) および NF- κ B の強力な stimulator である IL-1 を作用させ、その 24 時間後に RNA とタンパクを回収し、有意に差のある遺伝子を解析する。

4. 研究成果

骨吸収促進作用を持つ RANK Ligand を作用させた破骨細胞の RNA を抽出し、NF- κ B の下流で作用している分子を DNA チップおよび RT-PCR にて検討したところ、破骨細胞の機能制御を司る分子の候補として、ミトコンドリア内で活性酸素・スーパーオキシドを処理する MnSOD (スーパーオキシドディスムターゼ) や small GTPase である Rab13 などを同定した。Rab13 の活性型や不活型の変異体を作製し、破骨細胞前駆細胞へ導入したが、破骨細胞の分化・形態・サバイバルなどに大きな影響はなかった。MnSOD に関しては、以下の検討を行った。

(1) 破骨細胞における Cre リコンビナーゼ発現による MnSOD ノックダウン

我々はレポーター遺伝子である β -ガラクトシダーゼを組み込んだアデノウイルスベクターを用い、ヒトの骨巨細胞腫より培養した破骨細胞様細胞 (osteoclast-like cells [OCLs]) および in vitro で形成されたマウス OCL にアデノウイルスが

効率よく感染することをすでに報告している。β-ガラクトシダーゼ陽性の OCL の割合は、感染させたアデノウイルスの量に比例し、MOI (multiplicity of infection = 1 細胞あたりの感染粒子数) : 100 で 85% 以上の OCL がβ-ガラクトシダーゼ陽性であった。AxCre を MOI:100 で感染させた OCL において十分量の Cre の発現を確認することができた。この条件下で、MnSOD の発現は、完全な消失まではいたらないものの、コントロールの約 20~30% まで低下した。

(2) MnSOD の発現低下は破骨細胞の生存に影響を及ぼさない

我々は次に MnSOD のノックダウンが OCL の生存に与える影響を調べた。AxGFP または AxCre を MOI:100 で感染させた OCL を 0.1% コラゲナーゼ/0.2% ディスパーゼ処理にて骨芽細胞を除去することにより純化し、さらに 10% FBS を含むαMEM でインキュベートすることにより OCL の生存率を評価した。骨芽細胞除去後、AxGFP を感染させた細胞と AxCre を発現させた細胞では、経時的な生存率に大きな差がなかった (Fig. 1)。12, 18, 24 時間後の生存率に大きな差がないことから、破骨細胞の生存において MnSOD が重要な役割を果たしていないことが示唆された。この結果より、破骨細胞内 ROS 量が破骨細胞のアポトーシスを制御するシグナルに関与していないと考えられた。

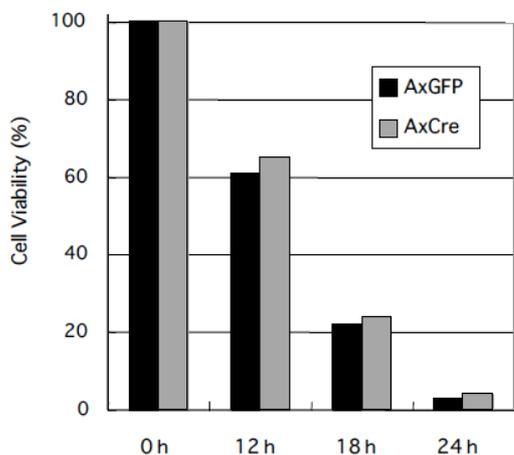


図 1. 破骨細胞における MnSOD 発現抑制は延命に影響しない

(3) MnSOD は破骨細胞の骨吸収機能活性化に重要である

我々は次に MnSOD のノックダウンが破骨細胞の骨吸収機能において重要な役割を果たしているかどうかを検討した。破骨細胞の骨吸収能は象牙切片上に形成された吸収窩の面積を計測することにより定量化した。Fig. 1 より、生存率が MnSOD の発現量に影響

されることが判明しているため、吸収窩アッセイを 24 時間で行い、破骨細胞 1 個当たりの吸収窩面積を算出することにより比較検討した。Fig. 2 に見られるように、OCL の骨吸収機能は、AxCre によりコントロールの 25% ほどに有意に抑制され、破骨細胞内 ROS 量が骨吸収を制御するシグナルに重要な役割を果たしていると考えられた。

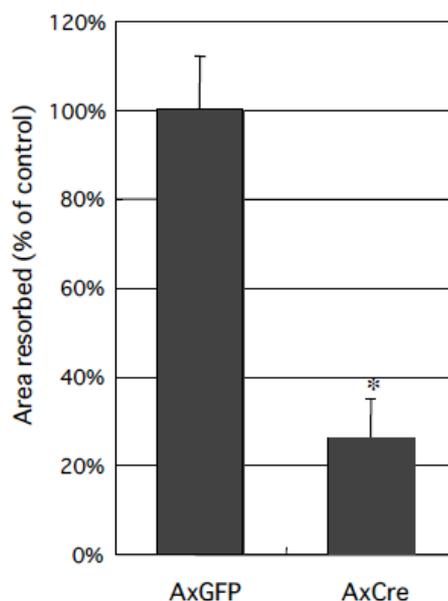


図 2. 破骨細胞における MnSOD 発現抑制は骨吸収機能を低下させる

本実験系において、MnSOD の発現レベルはコントロールに比較して低下しているものの、完全にノックアウトすることはできなかった。ノックアウトは不完全であったが、破骨細胞の骨吸収機能は有意に減少し、MnSOD の骨吸収における重要性が示唆された。MnSOD のノックダウンにより予想されるアポトーシスの亢進はみられなかった。

現在、破骨細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスと MnSOD flox マウスを交配させることにより、破骨細胞特異的 MnSOD ノックアウトマウスを作成し、解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Yamashita T, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Yamaki M, Miura T, Tanaka S, Udagawa N,

Takahashi N. MKK6-p38 MAPK signaling pathway enhances survival but not bone-resorbing activity of osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008, 365:252-257. 査読有

2. Ajima R, Akiyama T, Usui M, Yoneda M, Yoshida Y, Nakamura T, Minowa O, Noda M, **Tanaka S**, Noda T, Yamamoto T. Osteoporotic bone formation in mice lacking tob2; involvement of Tob2 in RANK ligand expression and osteoclasts differentiation. *FEBS Lett.* 2008, 582:1313-1318. 査読有

3. Okuma-Yoshioka C, Seto H, Kadono Y, Hikita A, Oshima Y, Kurosawa H, Nakamura K, **Tanaka S**. Tumor necrosis factor-alpha inhibits chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts through p38 mitogen activating protein kinase pathways. *Mod Rheumatol.* 2008;18(4):366-378. 査読有

4. Oshima Y, Akiyama T, Hikita A, Iwasawa M, Nagase Y, Nakamura M, Wakeyama H, Kawamura N, Ikeda T, Chung UI, Hennighausen L, Kawaguchi H, Nakamura K, **Tanaka S**. Pivotal role of Bcl-2 family proteins in the regulation of chondrocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 2008, 283(39): 26499-26508. 査読有

5. Eun-Ju Chang, Jeongim Ha, Frank Oerlemans, You Jin Lee, Soo Woong Lee, Jiyeon Ryu, Hyung Joon Kim, Youngkyun Lee, Hyun-Man Kim, Je-Yong Choi, Jin Young Kim, Chan Soo Shin, Youngmi Kim Pak, **Sakae Tanaka**, Bé Wieringa, Zang Hee Lee, Hong-Hee Kim. Brain-type creatine kinase has a crucial role in osteoclast-mediated bone resorption. *Nature medicine,* 14:966-972, 2008. 査読有

6. Okuma C, Kaketa T, Hikita A, Matsuda K, Nakamura M, Nagase Y, Oshima Y, Iwasawa M, Nakamura Y, Kurosawa H, Nakamura K, **Tanaka S**. Potential involvement of p53 in ischemia/reperfusion-induced osteonecrosis. *J Bone Miner Metab.* 2008, 26:576-585 査読有

7. **Miyazaki T**, Tanaka S (1 番目): The molecular mechanism of bone and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Future Rheumatology* 2: 61-72, 2007 査読有

8. Ariyoshi D, **Miyazaki T** (他 3 名、ラスト): Subcutaneous tendon rupture of extensor tendons on bilateral wrists associated with calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. *Mod Rheumatol* 17: 348-351, 2007 査読有

9. **Tanaka S**. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the

RANKL/RANK/OPG system. *Am J Nephrol.* 2007;27(5):466-78. 査読有

10. Wakeyama H, **Tanaka S** (他 2 名、ラスト) Posttranslational regulation of Bim by Caspase-3 in the osteoclast. *Ann NY Acad Sci.* 2007 Jun 21; [Epub ahead of print] 査読有

11. Hiramatsu K, **Tanaka S** (他 10 名、9 番目) Overexpression of gamma-glutamyltransferase in transgenic mice accelerates bone resorption and causes osteoporosis. *Endocrinology.* 2007 Jun;148(6):2708-15. 査読有

12. Suematsu A, **Tanaka S** (他 7 名、8 番目) Scientific basis for the efficacy of combined use of antirheumatic drugs against bone destruction in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2007;17(1):17-23. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 土肥透、**宮崎剛**、山本精三、西野仁寿：関節リウマチの骨・関節感染症治療における好中球 CD64 値の有用性。第 35 回日本リウマチ・関節外科学会。東京、2007. 11. 9-10

2. 有吉大、山本精三、久我芳昭、**宮崎剛**：両側伸筋腱断裂を生じた中高年発症のピロリン酸カルシウム結晶沈着症の一例。第 51 回日本リウマチ学会総会。横浜、2007. 4. 26-29

3. 土肥透、**宮崎剛**、山本精三、松井利浩、小宮明子、西野仁寿：結晶性関節炎と感染性関節炎の鑑別における好中球 CD64 値の有用性。第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会。札幌、2008. 4. 20-23

4. 西野仁寿、松井利浩、小宮明子、土肥透、**宮崎剛**、山本精三、松下隆：骨・関節感染症における好中球上 CD64 分子発現量計測の有用性。第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会。札幌、2008. 4. 20-23

5. 岩澤三康、永瀬雄一、**宮崎剛**、門野夕峰、中村耕三、田中栄：破骨細胞特異的ノックアウトマウスを用いた抗アポトーシス分子 Bcl-xL の機能解析。第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会。札幌、2008. 4. 20-23

6. **宮崎剛**、山本精三：関節リウマチ患者の血漿 PAD4 値と抗 PAD4 抗体価の測定日本整形外科学会基礎学術集会。京都、2008. 10. 23-24

[図書] (計 1 件)

宮崎剛、岩澤三康；骨疾患モデル動物実験ガイド。老化・老年病研究のための動物実験ガイド (アドスリー) 245-252, 2008

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 剛 (MIYAZAKI TSUYOSHI)
財団法人東京都高齢者研究・福祉財団
東京都老人総合研究所・研究員
研究者番号：50376480

(2)研究分担者

鈴木 隆雄 (SUZUKI TAKAO)
財団法人東京都高齢者研究・福祉財団
東京都老人総合研究所・副所長
研究者番号：30154545

2007年度のみ (2008年連携研究者)

田中 栄 (TANAKA SAKAE)
東京大学・医学部附属病院・整形外科・
准教授
研究者番号：50282661

(3)連携研究者

2008年度のみ (2007年分担研究者)

田中 栄 (TANAKA SAKAE)
東京大学・医学部附属病院・整形外科・
准教授
研究者番号：50282661

[その他]