

平成 22 年 3 月 19 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007 ~ 2008
 課題番号： 19592116
 研究課題名 (和文)
 骨吸収制御を担う新規膜表面複合体の分子免疫学的解析と形態学的動態解析
 研究課題名 (英文)
 Molecular Immunological and Morphological Analysis of Novel Cell-surface
 Molecules Regulating Bone Resorption
 研究代表者 久木田 敏夫 (KUKITA TOSHIO)
 九州大学・歯学研究院・教授
 研究者番号： 70150464

研究成果の概要：破骨細胞は造血幹細胞に由来し、骨微小環境下に形成された単核の破骨前駆細胞同士が融合することにより大型で多核の破骨細胞が形成される。更に骨芽細胞や骨基質から提供される刺激を受け、骨吸収機能に必須の形態学的超構造であるruffled border (刷子縁) が形成される (しばしば「活性化」という言葉で表現される) と、破骨細胞の活発な骨吸収が始まる。破骨細胞分化因子RANKLとその受容体であるRANKの発見により、分化シグナルに関する知見は急速に集積されつつあるが大規模な形態学的変化を伴う破骨細胞の「活性化」とその制御機構に関しては不明の点が多い。本研究では、破骨細胞の活性化に伴う特異的膜タンパク質の同定と破骨細胞の機能発現に伴う形態学的な動態解析を行い破骨細胞活性化の制御機構の一端を解明することを目的とする。破骨細胞を認識するモノクローナル抗体の1つを用いた免疫アフィニティークロマトグラフィーにより抗原の精製を行いSDS電気泳動後、LC-MASSを用いた質量分析を行った。候補蛋白質の1つとしてガレクチン3が検出されたが、ガレクチン3が抗原そのものであるのか、あるいは抗原に会合した分子であるのか、に関しては特定できなかった。ところで、ガレクチン3はMac 2 抗原として破骨細胞が発現することが報告されているが、その機能は分かっていなかった。特異的siRNAによりガレクチン3の遺伝子発現阻止を行い分化における機能を解析したが、破骨細胞分化への関与は認められなかった。そこでリコンビナントガレクチン3をRANKLに依存した破骨細胞分化系に添加したところ、破骨細胞の形成が顕著に阻害された。アジュバント関節炎ラットの系でも関節腔にガレクチン3を投与すると破骨細胞の形成が抑制され骨吸収が軽減されることがわかった。本研究より、ガレクチン3が破骨細胞の活性化を制御する重要な制御因子であることが強く示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学
科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学
キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）

1. 研究開始当初の背景

未曾有の高齢化社会を迎えている我国に於いて、高齢者のQuality of Life (QOL)を確保することが社会的な重要課題となっている。骨粗鬆症等による骨の脆弱化は高齢者のQOLを著しく低下させる要因となる。大腿骨頸部の骨折や腰椎の圧迫骨折などの場合、生涯、寝たきりになるケースも多い。歯科領域に於いては歯周病に伴う歯槽骨破壊により歯を喪失するケースが多く、また、骨粗鬆症による歯槽骨の脆弱化により入歯の装着やインプラント療法に支障をきたすなど、骨の脆弱化が高齢者のQOLを著しく低下させている。このような骨の脆弱化の主たる要因となる細胞が骨吸収細胞である破骨細胞である。また、この細胞は骨の新陳代謝即ち「骨改造」に於いても鍵となる細胞であり (Martin T.J.& Sim N.A. *TRENDS in Mol. Biol.* 11:76- 81, 2005)、この細胞の活性をどのように制御するかが骨の健康状態の保持にとり重要なポイントとなる。破骨細胞は造血幹細胞に由来し、骨微小環境下に形成された単核の破骨前駆細胞どうしが融合することにより大型で多核の破骨細胞が形成される。更に骨芽細胞や骨基質から提供される刺激を受け、骨吸収機能に必須の形態学的超構造であるruffled border (刷子縁)が形成されると、破骨細胞の活発な骨吸収が始まる (この段階はしばしば「活性化」という言葉で表現される)。破骨細胞分化因子RANKLとその受容体であるRANKの発見により、分化シグナルに関する知見は急速に集積されつつあるが (Koga T. & Takayanagi H. 実

験医学シリーズ「骨研究がわかる」羊土社 WJ26:49-57, 2005)、大規模な形態学的変化を伴う破骨細胞の「活性化」とその制御機構に関しては不明の点が多い。申請者らは活発に骨吸収を営む破骨細胞が膜表面上に高発現する分子 (「活性化抗原 Kat1抗原」)を見出した。Kat1抗原は破骨細胞特異的膜表面蛋白質であり、その発現量は破骨細胞の活性 (骨吸収能)と正の相関性を示し、吸収活性を喪失した破骨細胞の膜表面ではKat1抗原は全く検出されない。また、骨吸収アッセイに於いて抗Kat1抗原モノクローナル抗体は骨吸収を阻害する。このようにKat1抗原は骨吸収制御能を有するユニークな膜蛋白質である (Kukita T. et al. *J. Immunol.* 153:5265-5273, 1994, Kukita T. et al. *Calcif. Tissue Int.* 63:148-153, 1998)。最近、申請者らは、活性化された破骨細胞に対する新たなモノクローナル抗体の作成を行ない、ビオチン標識した抗Kat1抗原モノクローナル抗体の活性化破骨細胞膜表面への結合を阻害する一連のモノクローナル抗体シリーズの作成に成功した。一連の抗体の中にはKat1抗原を認識するものの他に、異なる分子量の抗原を認識するものがいくつか得られると予想した。骨吸収制御能を有するKat1抗原は複数の膜分子と破骨細胞膜表面で複合体を形成している可能性がある。申請者らは以前にKat1抗原が破骨細胞機能を負に調節するホルモン・カルシトニンの受容体と相互作用することを見出している。活性化された破骨細胞の膜表面にはKat1抗原を中核とする「骨吸収制御膜

表面分子（BRRM）複合体」が存在することが推定される。

2. 研究の目的

本研究では、破骨細胞が発現する「BRRM複合体」を構成する膜蛋白質を分子免疫学的に同定することにより実体解明を行うとともに、破骨細胞の活性化に伴う「BRRM複合体」形成過程の形態学的な動態解析を行う。本研究により、破骨細胞活性化の制御機構が解明されることとなる。具体的には次の事柄を行う。新規モノクローナル抗体シリーズが認識するそれぞれの抗原分子（iKat1 抗原）について、免疫学的な純化を行った後、質量分析を用いた同定を行う。抗原分子のアミノ酸配列情報を基に全長 cDNA を単離する。得られた cDNA を発現ベクターに組み込み哺乳動物細胞に発現させ、RANK あるいはカルシトニン受容体との相互作用を調べる。申請者が既に得ている抗 Kat1 抗原モノクローナル抗体及び新規シリーズモノクローナル抗体を異なる色の蛍光色素で標識する。破骨細胞の活性化及び機能喪失過程に於ける BRRM 複合体構成要素の破骨細胞膜表面に於ける形態学的動態を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析する。新生仔ラットや卵巣摘出ラット等の破骨細胞機能が亢進された状態の動物における BRRM 複合体構成要素の発現パターンを解析し、骨形態計測に於ける活性化破骨細胞の新指標としての応用を検討する。新生仔ラットにモノクローナル抗体 iKat1 シリーズを投与することにより、歯の萌出への影響を検討する。代謝性骨疾患のモデルとして卵巣摘出ラット（骨粗鬆症ラット）を、また炎症性骨破壊のモデルとしてアジュバント関節炎ラット（慢性関節リウマチのモデル）を用い、新規モノクローナル抗体シリーズを投与することによる骨破壊抑

制効果を病理組織学的に解析する。本研究により活性化破骨細胞が発現する BRRM 複合体の全貌が解明され、活性化破骨細胞を標的とする骨代謝制御が可能になるものと思われる。

3. 研究の方法

ラット骨髄細胞培養系で形成された活性の高い破骨細胞膜表面を蛍光標識し、穏和な条件下で可溶化する。申請者が既に得ているシリーズモノクローナル抗体による免疫沈降を各々の抗体について行う。SDS-PAGEにより分離後、抗原のバンドを切り出し、トリプシン消化を行いペプチド断片を調製する。LC-MASSによる質量分析を行い抗原蛋白質の同定を行う。免疫沈降法がうまくいかない場合、方法を切り替え、イムノアフィニティークロマトグラフィーによる抗原の純化を行う。

4. 研究成果

本研究では、破骨細胞の活性化に伴う特異的膜タンパク質の同定と破骨細胞の機能発現に伴う形態学的な動態解析を行い破骨細胞活性化の制御機構の一端を解明することを目的とした。破骨細胞を認識するモノクローナル抗体の1つを用いた免疫アフィニティークロマトグラフィーにより抗原の精製を試みた。TFAにより溶出後SDS電気泳動により分離し、銀染色を行った。複数のバンドが得られたが、強染するバンドのみを切り出した後、通法によりトリプシン消化によりペプチド断片を得た。LC-MASS を用いた質量分析を行った結果、候補蛋白質の1つとしてガレクチン3が検出された。ガレクチン3が抗原そのものであるのか、あるいは抗原に会合した分子であるのかについては期間中に特定できず、更なる研究が必要である。ところで、

ガレクチン3はMac2抗原として破骨細胞が発現することが報告されているもののその機能は分かっていなかった。特異的siRNAによりガレクチン3遺伝子発現阻止を行い分化における機能を解析したが破骨細胞分化への関与は認められなかった。一方、ウェスタンブロッティング及び免疫組織学的解析により、アジュバント関節炎の骨破壊部位に浸潤した多数の炎症細胞がガレクチン3を高発現することを見出した。炎症領域におけるガレクチン3の役割を検討する為にリコンビナントガレクチン3を破骨細胞分化系に添加したところ、破骨細胞の形成が顕著に阻害された(右図A, B, C)。MTTアッセイではガレクチン3は細胞増殖に影響を与えなかったため、ガレクチン3により破骨細胞の分化が特異的に抑制されることが判明した。更にガレクチン3の生体内投与実験でその機能を確認した。実験的関節炎発症系であるアジュバント関節炎ラットを用いて、関節腔にガレクチン3を投与すると破骨細胞の形成が顕著に抑制され関節炎に伴う骨破壊が軽減されることがわかった。本研究は、ガレクチン3が破骨細胞の活性化を制御する重要な制御因子である可能性を強く示唆するものである。今後、ガレクチン3そのものの「BRRM複合体」への関与についても検討を進めていく必要がある。

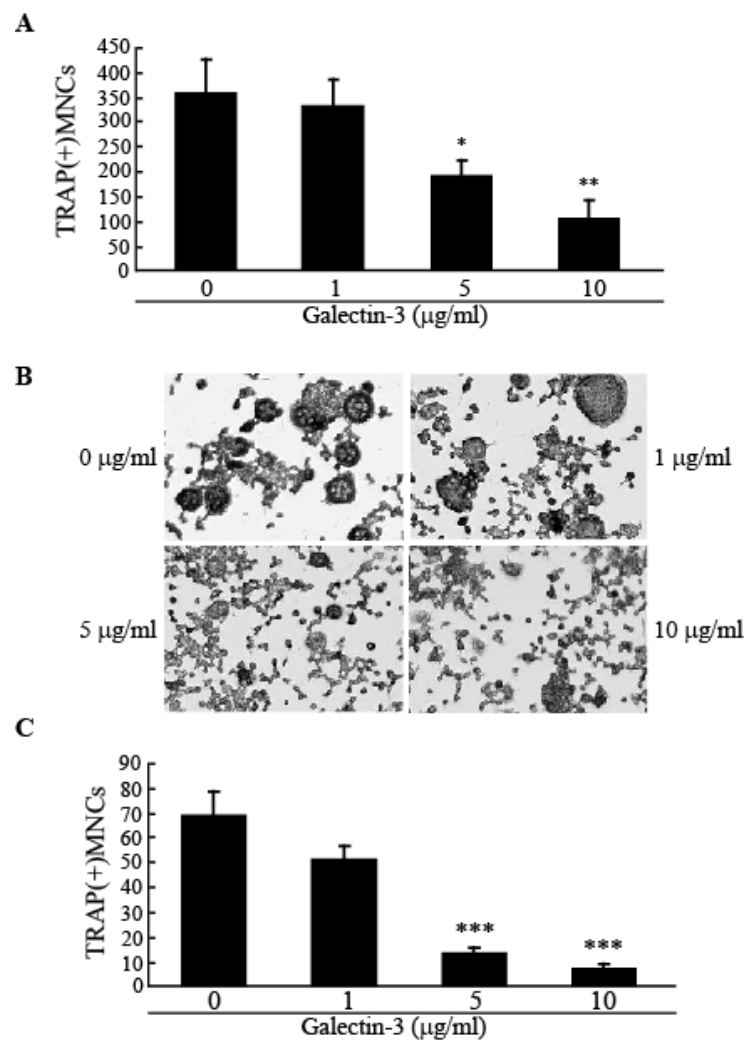


図 ガレクチン3は破骨細胞形成を抑制する

A及びB：RAW-D細胞を用いた破骨細胞形成系

C：ストローマ細胞を除去した骨髄細胞を用いた破骨細胞形成系

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 12 件)

久木田 敏夫

1. Liu J., Shiono J., Shimizu K., Kukita A., Kukita T., Kondo R.
Ganoderic acid DM: anti-androgenic osteoclastogenesis inhibitor
Bioorg.Med.Chem.Lett.
19:2154-2157,2009.
2. Miyamoto I., Liu J., Shimizu K., Sato M., Kukita A., Kukita T., Kondo R.
Regulation of osteoclastogenesis by ganoderic acid DM isolated from *Ganoderma lucidum*. *Eur. J. Pharmacol.* 602:1-7,2009.
3. Li Y-J., Kukita A., Teramachi J., Nagata K., Wu Z., Akamine A., Kukita T. A possible suppressive role of galectin-3 in up-regulated osteoclastogenesis accompanying adjuvant-induced arthritis in rats. *Lab.Invest.* 89:26-37,2009.
4. Ogino Y., Ayukawa Y., Kukita T., Atsuta I., Koyano K. Platelet-rich plasma suppresses osteoclastogenesis by promoting the secretion of osteoprotegerin. *J.Periodontal Res.* 44:217-224,2008.
5. Tang Q-Y., Yang W., Jia Z., Wang W., Jiang C., Yang Y., Zhang Y., Kukita T. The inhibitory effect of sweet potato extracts on formation and differentiation of osteoclasts. *J.Modern Stomatol.* 22(1):44-47,2008.
6. Yamaguchi N., Kukita T., Li Y-J, Kamio N., Fukumoto S., Nonaka K., Ninomiya Y., Hanazawa S., Yamashita Y. Adiponectin inhibits induction of TNF- α /RANKL-stimulated NFATc1 via the AMPK signaling. *FEBS Letters* 582:451-456,2008.
7. Adiponectin inhibits osteoclast formation stimulated by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Yamaguchi N, Kukita T. Li YJ, Martinez Argueta JG, Saito T, Hanazawa S, Yamashita Y. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 49(1) :28-34, 2007
8. Expression of OCZF directed by the cathepsin K promoter affects bone mass and osteoclast formation in transgenic mice. Shobuie T., Kukita T., Nagata K., Teramachi J., Asagiri M., Takayanagi H., *Kukita A. *J. Bone Miner. Res.* 22(s1):s84, 2007

9. A possible suppressive role of galectin-3 in osteoclastic bone destruction accompanying adjuvant-induced arthritis in rats. Li Y., Teramachi J., Nagata K., Wu Z., Kukita A., Akamine A., *Kukita T. *J. Bone Miner. Res.* 22(s1):s154, 2007
10. The POZ-Zn transcriptional regulator OCZF/LRF is induced by RANKL and increases c-Fos expression in osteoclastogenesis. Kukita A., Shobuie T., Asagiri M., Takayanagi H., Pessler F., Matsuo K., *Kukita T. *J. Bone Miner. Res.* 22(s1):s379, 2007

久木田 明子

1. Liu J., Shiono J., Shimizu K., Kukita A., Kukita T., Kondo R.
Ganoderic acid DM: anti-androgenic osteoclastogenesis inhibitor
Bioorg.Med.Chem.Lett.
19:2154-2157,2009.
2. Miyamoto I., Liu J., Shimizu K., Sato M., Kukita A., Kukita T., Kondo R.
Regulation of osteoclastogenesis by ganoderic acid DM isolated from *Ganoderma lucidum*. *Eur. J. Pharmacol.* 602:1-7,2009.
3. Li Y-J., Kukita A., Teramachi J., Nagata K., Wu Z., Akamine A., Kukita T. A possible suppressive role of galectin-3 in up-regulated osteoclastogenesis accompanying adjuvant-induced arthritis in rats. *Lab.Invest.* 89:26-37,2009.
4. Mature osteoclasts involved in joint destruction are present in the synovium from patients with rapidly destructive coxarthrosis. *Ogawa K., Mawatari M., Komine M., M. Shigematsu M., Kitajima M., Kukita A. Hotokebuchi T *J Bone Miner Metab.* 25:354-360, 2007.
5. Expression of OCZF directed by the cathepsin K promoter affects bone mass and osteoclast formation in transgenic mice. Shobuie T., Kukita T., Nagata K., Teramachi J., Asagiri M., Takayanagi H., *Kukita A. *J. Bone Miner. Res.* 22(s1): s84, 2007
6. A possible suppressive role of galectin-3 in osteoclastic bone destruction accompanying adjuvant-induced arthritis in rats. Li Y., Teramachi J., Nagata K., Wu Z., Kukita A., Akamine A., *Kukita T. *J. Bone Miner. Res.* 22(s1):s154, 2007
7. The POZ-Zn transcriptional regulator OCZF/LRF is induced by RANKL and increases c-Fos expression in osteoclastogenesis. Kukita A., Shobuie T.,

Asagiri M., Takayanagi H., Pessler F., Matsuo K., *Kukita T. *J. Bone Miner. Res.* 22(s1):s379, 2007

〔学会発表〕(計 11 件)

学会発表

1. 李銀姫、久木田明子、久木田敏夫
Nordihydroguaiaretic acid による破骨細胞分化と機能の抑制。第 51 回歯科基礎医学会 平成 21 年 9 月 新潟市
2. 堤康史郎、松田美穂、久木田敏夫、平田正人
PRIP の骨代謝における機能解析。平成 21 年 9 月 新潟市
3. 李銀姫、久木田明子、久木田敏夫
Nordihydroguaiaretic acid は破骨細胞の形成と骨吸収を抑制する。第 27 回日本骨代謝学会 平成 21 年 7 月 大阪市
4. 寺町順平、久木田明子、李銀姫、和田尚久、永田健吾、中村誠司、久木田敏夫
アデノシンは葉酸拮抗剤による破骨細胞形成阻害を骨芽細胞を介して解除する。第 26 回日本骨代謝学会 平成 20 年 10 月 大阪市
5. 寺町順平、久木田明子、李銀姫、和田尚久、永田健吾、中村誠司、久木田敏夫
アデノシンは葉酸拮抗剤による破骨細胞形成阻害を解除する。第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会 平成 20 年 9 月 東京都
6. 寺町順平、久木田明子、李銀姫、和田尚久、永田健吾、中村誠司、久木田敏夫
葉酸拮抗剤による破骨細胞形成阻害～アデノシンによる調節～
第 8 回 西日本骨・関節関連疾患懇話会 平成 20 年 7 月 福岡市
7. 李銀姫、寺町順平、久木田明子、永田健吾、久木田敏夫
ガレクチン 3 はアジュバント関節炎において破骨細胞形成を抑制する。
第 8 回 西日本骨・関節関連疾患懇話会 平成 20 年 7 月 福岡市

国際学会

1. Expression of OCZF directed by the cathepsin K promoter affects bone mass and osteoclast formation in transgenic mice. Shobuie T., Kukita T., Nagata K., Teramachi J., Asagiri M., Takayanagi H., *Kukita A. *J. Bone Miner. Res.* 22(s1):s84, 2007
2. A possible suppressive role of galectin-3 in osteoclastic bone destruction accompanying adjuvant-induced arthritis in rats. Li Y.,

Teramachi J., Nagata K., Wu Z., Kukita A., Akamine A., *Kukita T. *J. Bone Miner. Res.* 22(s1):s154, 2007

3. The POZ-Zn transcriptional regulator OCZF/LRF is induced by RANKL and increases c-Fos expression in osteoclastogenesis. Kukita A., Shobuie T., Asagiri M., Takayanagi H., Pessler F., Matsuo K., *Kukita T. *J. Bone Miner. Res.* 22(s1):s379, 2007

国際シンポジウム

Li Y-J., Teramachi J., Kukita A., Nagata K., Wu Z., Akamine A., Kukita T. A possible suppressive role of galectin-3 in osteoclastic bone destruction accompanying adjuvant-induced arthritis in rats. The Joint Meeting of the 3rd Symposium on "Oral Health Science" and "Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration" Page 20.
(合同ミーティング・第 3 回「口腔健康科学」シンポジウムならびに 第 3 回「口腔組織の再生・再建医療研究」シンポジウム 平成 20 年福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久木田 敏夫
(九州大学大学院歯学研究院教授)
研究者番号：70150464

(2) 研究分担者

久木田 明子
(佐賀大学医学部准教授)
研究者番号：30153266