

平成 22 年 3 月 23 日現在

研究種目：基盤研究 (C) (2)  
 研究期間：平成 19 年度～20 年度  
 課題番号：19592150  
 研究課題名 (和文)  
 活性化破骨細胞の膜表面蛋白質による骨吸収制御とその細胞内シグナル伝達の解析  
 研究課題名 (英文)  
 Analysis of the regulation of bone resorption and signaling by membrane proteins expressed in osteoclasts  
 研究代表者  
 久木田明子 (Kukita Akiko)  
 研究者番号：30153266

## 研究成果の概要 (和文)：

近年、破骨細胞分化因子 RANKL が明らかにされたことからその受容体 RANK を介した破骨細胞分化の細胞内のシグナル因子に関して様々の研究が報告された。しかしながら、RANK 以外の膜表面タンパク質を介した破骨細胞分化や骨吸収の制御機構等についてはまだ不明な点が多い。破骨細胞の膜表面に特異的に発現するタンパク質は、破骨細胞のマーカーとして重要であるだけでなく、リガンドの受容体として骨吸収制御に関わる可能性があると考えられる。本研究は、筆者らが作成したラット破骨細胞特異的なモノクローナル抗体 Kat1 及び iKat1 の抗原を同定しその発現、機能を明らかとすることを目的とした。発現クローニング法により iKat1 抗原のいくつかの候補遺伝子を単離した。Kat1 及び iKat1 モノクローナル抗体を用いて、ラット培養破骨細胞より抗原蛋白質を免疫沈降や親和性カラムを用いて同定を試みた。その結果、現在 1 つの候補として galectin-3 が検出されたが、galectin-3 は Kat1 抗原に会合した分子である可能性もあり、現在さらに解析を進め抗原蛋白質のバンドの特定を行っている。また一方、モノクローナル抗体 Kat1 の抗原の細胞内の局在や発現の特異性、カルシトニン受容体との共局在の可能性について共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。その結果、Kat1 抗原は破骨細胞の膜に特異的に存在し、一部の破骨細胞において Kat1 抗原とカルシトニン受容体これらが共局在していることがわかった。破骨細胞をカルシトニンで処理すると、Kat1 抗原の局在に変化が見られた。また Kat1 陽性細胞の多くは M-CSF の受容体である c-fms 陽性の細胞であることがわかった。一方 FACS により単核の破骨細胞の前駆細胞についても解析した結果、前駆細胞においても Kat1 陽性細胞は c-fms 陽性であることがわかった。このように本研究により、Kat1 抗原は破骨細胞やその前駆細胞を同定し解析する有用なマーカーであること、骨吸収の制御に関わる可能性が示された。

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
20 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：機能系基礎歯科学

キーワード：破骨細胞、膜タンパク質、モノクローナル抗体、

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来に伴い骨粗鬆症、関節リウマチ、歯周病などの疾患の患者が増加している。これらの疾患においては骨量の減少及び骨破壊が問題となっており、骨を吸収する唯一の細胞である破骨細胞の活性状態を測定し機能を制御することは、重要な課題であると考えられる。破骨細胞は、造血の幹細胞に由来したマクロファージ・単球系の前駆細胞が融合することにより形成される多核細胞である。形成された多核細胞は、骨の上でさらにダイナミックな変化を起し極性を持った波状縁を有する骨吸収能のある破骨細胞へと活性化される。このような破骨細胞の分化及び活性化は骨の微小環境下で産生される因子の影響を受けるが、近年、骨芽細胞の膜表面に存在する RANKL が破骨細胞の分化に必須な分子の 1 つであることが明らかにされた。その結果、*in vitro* の系や遺伝子欠損及び過剰発現マウスを用いた研究により、破骨細胞の前駆細胞の膜上の RANKL の受容体 RANK の下流に存在する MAPKs、TRAF6、c-fos、NFATc1 などの多くの細胞内のシグナル因子が破骨細胞の分化に関わることが明らかにされてきた (Takayanagi H ら *Nature Review Immunology*, 2007)。

これに対して、破骨細胞の活性化や骨吸収の制御機構については不明な点が多い。チロシンキナーゼである c-src の遺伝子欠損マウスでは破骨細胞は形成されるが骨吸収能がないため c-src は骨吸収に関わる細胞内因子の一つと考えられている。c-src はインテグリンや RANK の下流にあり刺激により細胞骨格の再構成の変化を引き起こす他に、クロ

ルチャンネルの機能に関する報告もある (Edward JC ら *J. Biol. Chem* 2006)。また、破骨細胞の膜表面には G 蛋白質共役型の受容体であるカルシトニン受容体が存在しており、カルシトニンを加えると細胞の骨格系が変化し波状縁が消失し骨吸収能が抑制される (Ikegame ら *Bone* 2004)。興味深いことに、最近、破骨細胞のカルシトニン受容体と複合体を形成する RAMP という分子やその新しいリガンドの存在も明らかとなっている (Dacquin R ら *J. Cell. Biol.* 2006)。しかしながら、骨吸収制御に関わるその他の膜受容体については不明な点が多い。

筆者らはラット骨髄細胞から *in vitro* で形成された骨吸収能の高い破骨細胞を抗原としてモノクローナル抗体を作成し、その抗原蛋白質の機能について解析してきた。その一つである Kat1 抗体はラット破骨細胞の膜表面を特異的に認識し *in vitro* で破骨細胞の骨吸収を抑制し、カルシトニン受容体の機能制御に関与する抗原を認識する (T.Kukita ら *J. Immunol.* 1994, *Calcif. Tissue Int.* 1998)。形態学的な観察からも Kat1 抗原は活性化した波状縁を有する破骨細胞の骨髄腔側に特異的に局在し (T.Kukita ら *Histochem. Cell. Biol.* 2001) 破骨細胞の骨吸収に関わる重要な膜蛋白質であると考えられている。さらに、筆者らは最近、Kat1 抗体の抗原への結合を阻害する数種類の新しいラット破骨細胞特異的モノクローナル抗体 iKat1 の作成に成功した。そこでこれらの抗体を用いて Kat1 抗原を明らかにし、これらの膜表面蛋白質を介した破骨細胞の骨

吸収制御の機構を明らかにすることは重要な知見をもたらすと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず、大腸菌或いは哺乳動物細胞で発現させた cDNA ライブラリーを用いた抗体を用いた抗原遺伝子の発現クローニング法やアフィニティーカラムや免疫沈降法によって破骨細胞の膜表面蛋白質である Kat1 及び iKat1 モノクローナル抗体の抗原蛋白質を明らかにする。さらに Kat1 抗原の発現や機能に関する解析を行い、このモノクローナル抗体が将来的に破骨細胞の膜表面のマーカーや骨疾患の治療に有用であるか検討するための基礎研究を行う。

## 3. 研究の方法

1) モノクローナル抗体 iKat1 を用いて、筆者らが既に作成した破骨細胞特異的な cDNA ライブラリー (Blood, 1999) から発現クローニングによる遺伝子のスクリーニングを行った。

2) 骨髄細胞から形成した破骨細胞や抗体陽性株細胞のビオチン化した膜蛋白質を用いて Kat1 及び iKat1 抗原の可溶化の条件検討や抗原分子の解析を行った。また、一方免疫沈降の条件検討や抗原蛋白質の解析を行った。また、アフィニティーカラムを用いて抗原タンパク質の精製を試み、LC-MASS による質量分析により抗原蛋白質の同定を行った。

3) Kat 及び iKat1 抗原の破骨細胞内の局在や破骨細胞で発現するカルシトニン受容体などの他の膜蛋白質との共局在及びカルシトニンや RANKL などの添加による局在の変化について共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

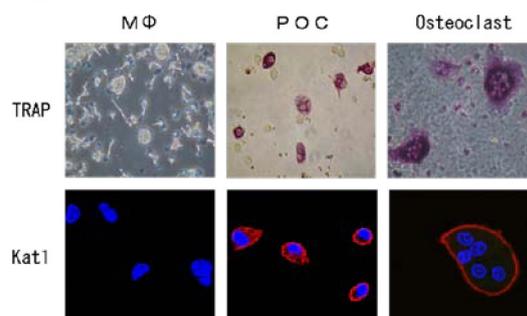
4) Kat 及び iKat1 抗原の破骨細胞の前駆細胞における発現や他の造血系細胞で発現する膜タンパク質との共局在について FACS

を用いて解析を行った。

## 4. 研究成果

- 1) 破骨細胞の cDNA ライブラリーを用いた遺伝子のスクリーニングでひとつの iKat1 抗体を用いた場合に陽性クローンが得られた。陽性クローンの DNA の塩基配列を解析した結果、破骨細胞の膜表面抗原ではなかったが、膜に結合する細胞内シグナル分子であることが明らかとなった。この iKat1 抗体は固定した破骨細胞も認識した。現在その破骨細胞における機能について解析を行っている。
- 2) アフィニティーカラムにより精製したタンパク質の電気泳動のバンドを LC-MASS により解析した結果 galectin-3 が検出された。また、いくつかの細胞株をスクリーニングした結果いくつかの Kat, iKat1 抗体はマウスの細胞も認識することが明らかとなった。さらに免疫沈降の条件を検討し、Kat1, iKat1 抗原特異的なバンドが特定できた。
- 3) Kat1 及び iKat1 抗原の細胞での局在と特異性について、ラットの骨髄細胞から形成されるマクロファージ及び破骨細胞の前駆細胞 POC 及び多核の破骨細胞について調べた。

Fig. 1 Kat 1 免疫染色及び TRAP 染色

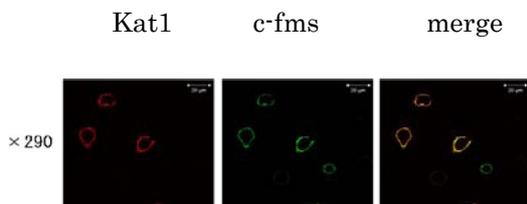


Kat1 抗原はマクロファージには全く発現しておらず、一部の多核の破骨細胞と単核の破骨細胞前駆細胞 POC の膜に局

在していた。他の iKat 抗原も同様の局在を示した。

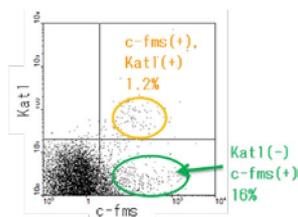
カルシトニン受容体及び RAMP と Kat 抗原との共局在について共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べた。一部の Kat 抗原陽性の細胞はカルシトニン受容体にも陽性であったが、その割合は低かった。また、カルシトニンを細胞に添加すると Kat 抗原の細胞内の局在が変化した。破骨細胞の前駆細胞では M-CSF の受容体 c-fms や RANKL の受容体 RANK が発現することが知られている。細胞を Kat1 抗体及び c-fms 抗体を用いて 2 重染色し共焦点レーザー顕微鏡による解析の結果(Fig.2)では、Kat 陽性細胞の約 80% が c-fms を発現していた。

Fig.2 Kat1 と c-fms の免疫 2 重染色



4) さらに、ラット破骨細胞前駆細胞における Kat1 抗原の発現について FACS を用いて解析した。Kat 陽性 c-fms 陽性の集団を解析した結果骨髄中に Kat1, c-fms 陽性の細胞が存在することが明らかになった。(Fig.3)

Fig.3 骨髄細胞の Kat, c-fms 陽性細胞の解析



関節リウマチ等の骨疾患における炎症性骨破壊を抑制するためには、炎症の場で活性

化された破骨細胞の骨吸収を制御することが望まれている。破骨細胞の膜表面に特異的に発現する膜タンパク質は、破骨細胞を同定するための有用なマーカーとなるばかりでなく、将来的に治療の標的となる骨吸収制御に関わる分子の候補として重要である。

本研究の実験結果から Kat1 抗原の特異性の高さが示されており、破骨細胞のマーカーとして有用であるという証拠が得られた。今後 Kat1 の骨吸収能に関する機能について更に明らかにするとともに、歯周病や骨関連疾患の病態との関連について調べていきたいと考えている。

#### 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 17 件)

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

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. Pharmacolog.* 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- $\alpha$ /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. Shobuike 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., Shobuike 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)

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. Shobuike 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., Shobuike 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

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

久木田 明子

(佐賀大学医学部准教授)

研究者番号：3 0 1 5 3 2 6 6

##### (2) 研究分担者

久木田 敏夫

(九州大学大学院歯学研究院教授)

研究者番号：7 0 1 5 0 4 6 4