

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24098

研究課題名(和文)病的活性化破骨細胞に発現する膜表面分子を標的とした病的骨破壊特異的制御法の開発

研究課題名(英文) Regulation of pathological bone destruction targeting membrane molecules expressed in pathologically activated osteoclasts

研究代表者

久本 由香里 (Kyumoto-Nakamura, Yukari)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40729026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はこれまでにIL-1 が破骨細胞において骨吸収を亢進し、正常の破骨細胞とは異なる膜表面分子の発現を誘導することを見出している。IL-1 が発現誘導する分子を探索した結果、Transferrin receptor 1(TfR1)が示された。さらにIL-1 刺激によりTfR1を介して細胞内への鉄取り込みが著明に亢進することが明らかとなった。従って、IL-1 による骨吸収亢進は細胞内鉄の増加が一因であると考えられるが、TfR1の発現制御や骨吸収亢進に關与する既知の経路にはIL-1 による影響が認められなかったためまだ明らかになっていない新たな経路を介して制御されている可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行により、病的骨破壊を制御する候補分子としてTfR1を示すことができた。正常な破骨細胞にも発現しているTfR1がIL-1 刺激によりさらに発現が上昇し、骨吸収が亢進するという申請者が得た知見はこれまでに報告はなく、まだ不明な点が多い破骨細胞における病的機能亢進のメカニズム解明につながる可能性を秘めた重要な結果である。また本研究結果は、通常の生理的機能には影響を与えずに病的骨吸収のみを標的としたより副作用の少ない安全な新しい骨破壊疾患治療薬の開発への足掛かりになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have previously showed that osteoclasts formed in the presence of IL-1 enhanced bone resorption and induced the expression of cell surface protein different from normal osteoclasts. IL-1 stimulation induced expression of Transferrin receptor 1 (TfR1) in osteoclasts and enhanced iron uptake into cells through TfR1. However, known pathways involved in regulation of TfR1 expression and enhancement of bone resorption was not significantly affect by IL-1 stimulation in osteoclasts. Therefore, IL-1 enhances bone resorption by increasing intracellular iron through up-regulation of TfR1 expression, but the mechanism is not yet clear.

研究分野：分子口腔解剖学

キーワード：破骨細胞 骨吸収 IL-1

## 1. 研究開始当初の背景

破骨細胞の病的な骨吸収亢進は、骨粗鬆症での骨量減少や関節リウマチ・歯周病における炎症性骨破壊の主因である。これに対し、正常な破骨細胞は骨リモデリングだけでなく血管誘導や造血維持等の生体に必要不可欠な機能を有している。しかしながら、現在治療に用いられている破骨細胞を標的とした骨吸収抑制剤は正常な破骨細胞の機能までも阻害してしまうため、副作用が懸念されている。この問題を解決するためには、病的に活性化された破骨細胞だけを標的にする必要はある。

Interleukin-1 (IL-1) は、炎症性サイトカインであるが、免疫や炎症だけでなく関節リウマチや歯周病等の炎症を伴う骨破壊においてもその病態制御に重要な役割を担うことが報告されている。申請者はこれまでに、IL-1 存在下で形成された破骨細胞が異常に高い酸分泌能と骨吸収能を有し、正常の破骨細胞とは異なる膜表面分子の発現が誘導されるという結果を得ている (Shiratori T., **Kyamoto-Nakamura Y.** et al. *J. Immunol.* 2018)。この結果は、IL-1 存在下で形成される破骨細胞が基本的な「骨リモデリング」に必須の正常破骨細胞とは異なる病的な細胞集団である可能性を示しており、IL-1 を標的とすることで破骨細胞の病的活性化を抑制できるのではないかと考えた。しかしながら、最近の報告で IL-1 が膵細胞を介して食後の血糖調節を行っていることが明らかとなり、IL-1 を標的とすることで正常な糖代謝制御にも影響を与えてしまう可能性が考えられる。そこで、申請者は IL-1 により発現誘導される膜表面分子に注目し、この分子を同定して機能解析を進めることにより、通常の生理的機能には影響を与えない、病的骨吸収のみを標的とした骨破壊疾患の新規予防法・治療法の開発が可能になるのではないかと考えた。

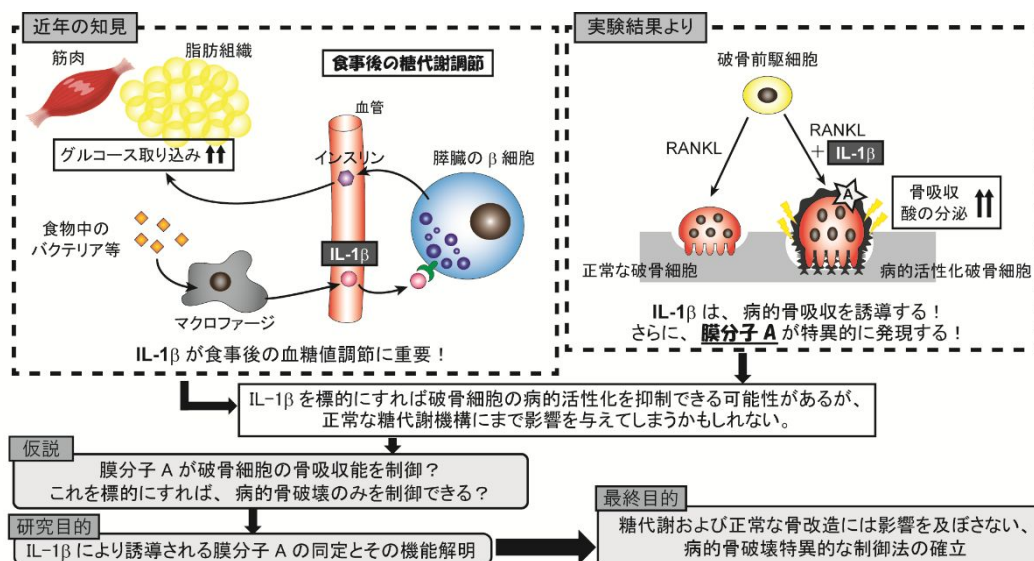


図 1. 本研究の背景および研究目的

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、IL-1 により病的活性化破骨細胞に特異的に発現誘導される膜分子の同定とその機能解明である。最終的に、糖代謝や正常の骨リモデリングには影響を及ぼさない、病的活性化破骨細胞のみを標的とした新たな骨破壊制御法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス骨髄由来破骨細胞 (mBMMs) の培養

5 週齢の雄性 ddY マウスの大腿骨および脛骨を摘出し、骨端両部を切断後、骨髄を MEM 中に回収した。これを 1500 rpm、5 分間遠心後、沈査を 10 ng/mL M-CSF 含む 10% FBS- MEM に懸濁後プレートに播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間インキュベートした。その後、浮遊細胞を回収し、20 ng/mL M-CSF 含む 10% FBS- MEM でさらに 72 時間インキュベートした。接着細胞を PBS で十分に洗浄後、トリプシン処理により細胞を回収し、遠心後、20 ng/mL M-CSF、50 ng/mL RANKL を含む 10% FBS- MEM に懸濁した細胞を 3 × 10<sup>4</sup> cells/well になるように 96well プレートに播種した。IL-1 を曝露する際はこのタイミングで添加し、濃度は 0.5 ng/mL とした。この時点を経営 0 日目とし、成熟破骨細胞が得られるまで最大 4 日間培養した。

## (2) マイクロアレイ解析

mBMMs に RANKL を曝露した細胞をコントロール群、RANKL と同時に 0.5 ng/mL の IL-1 を曝露した細胞を IL-1 曝露群として 48 時間培養した細胞から Total RNA を回収し、マイクロアレイ解析に用いた。

## (3) Real-time PCR

各日数培養した細胞から Total RNA を回収し、逆転写反応により cDNA を合成した。この cDNA を Real-time PCR 解析に用いた。内部標準には *B2m* を用いた。

## (4) 細胞内鉄の測定

RANKL および IL-1 存在下で mBMMs を 3 日間培養し、成熟破骨細胞を得た。この細胞に 1  $\mu$ M の Ferro Orange を添加し、37  $^{\circ}$ C、5 % CO<sub>2</sub> 条件下で 30 分間インキュベーションした。その後すぐに蛍光顕微鏡で撮影を行い、蛍光強度を定量化した。

## 4. 研究成果

### (1) IL-1 刺激により発現が変化する遺伝子の探索

マイクロアレイ解析により、コントロール群と IL-1 曝露群の 2 群間の遺伝子発現変化を網羅的に解析した。その結果、IL-1 刺激により発現が誘導される遺伝子の候補として Transferrin receptor 1 (TfR1) が示された。そこで、各培養日数ごとに Total RNA を回収し *TfR1* の mRNA 発現を確認したところ、RANKL 刺激により *TfR1* 発現は著明に上昇するが、IL-1 存在下ではさらに亢進した (図 2(A))。また、培養 3 日目の成熟破骨細胞においても TfR1 のタンパク質発現が IL-1 曝露により有意に上昇することを確認した (図 2(B))。

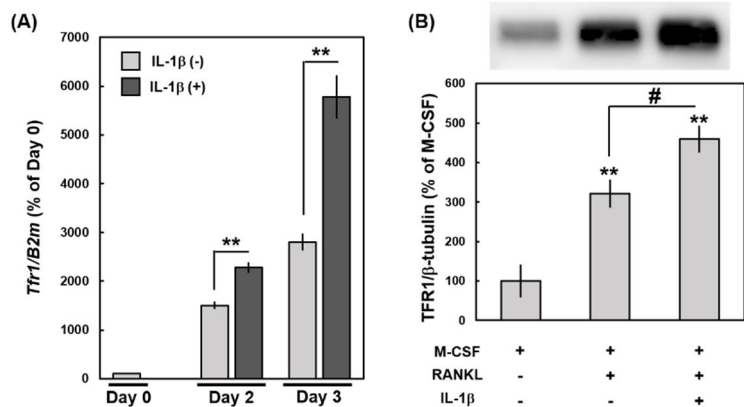


図 2. TfR1 発現に対する IL-1 の影響

### (2) IL-1 による細胞内鉄取り込みへの影響

TfR1 を介してトランスフェリンに結合した鉄が細胞内に取り込まれることから、IL-1 刺激が細胞内の鉄流入に与える影響を蛍光試薬を用いて検討した。その結果、RANKL 刺激により細胞内の鉄は著しく増加するが、IL-1 存在下ではさらに亢進することが明らかとなった (図 3)。

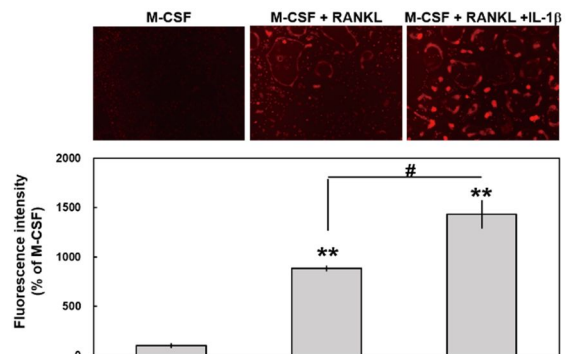


図 3. 細胞内鉄取り込みに対する IL-1 の影響

### (3) IL-1 による TfR1 発現上昇および骨吸収亢進の分子メカニズムの解析

研究成果(1)(2)から、破骨細胞において IL-1 は TfR1 の発現を上昇させ、細胞内への鉄取り込みが亢進することが明らかとなった。細胞内鉄の増加によりミトコンドリアの生合成が活性化し、破骨細胞への分化や骨吸収能を亢進することが報告されていることから、培養 2 日目と成熟破骨細胞となった培養 3 日目の mBMMs からタンパク質を回収し、ミトコンドリアの活性化に関与する PGC-1 の発現および CREB のリン酸化をウエスタンブロットにより解析した。その結果、PGC-1 の発現は RANKL により著しく上昇するが、IL-1 による発現への影響は認められなかった。CREB のリン酸化についても IL-1 による影響はなかった。さらに、骨吸収に必要な酵素であるカテプシン K の発現も IL-1 刺激による変化は認められなかった (図 4)。mRNA レベルではカテプシン K だけでなく他の破骨細胞マーカー遺伝子 (*Trap*、*ATP6v0d2*、*De-stamp*、*Ctr*) も IL-1 による発現変化は観察されなかった。また、TfR1 の発現を制御することが知られ

ている Iron regulatory protein 2 (IRP2)のタンパク発現 (図 4) や他の鉄代謝関連遺伝子 (*Irf1*, *Ftl1*, *Fth1*, *Dmt1*) の mRNA 発現も検討したが、こちらも著明な変化は認められなかった。

研究成果(1)(2)(3)より、IL-1 存在下で形成された破骨細胞では TfR1 の発現が上昇して細胞内への鉄取り込みが増加することで骨吸収能が亢進する可能性が考えられる。しかしながら、TfR1 の発現制御や骨吸収能亢進に關与する既知の経路には IL-1 による影響が認められなかった。したがって、まだ明らかになっていない新たな経路を介してこれらが制御されている可能性が示唆される。この詳細なメカニズムについては今後さらなる検討が必要である。また、当初予定していた糖代謝に与える影響や疾患モデル動物を用いた in vivo 解析も遂行できていないため、今後の重要課題といえる。

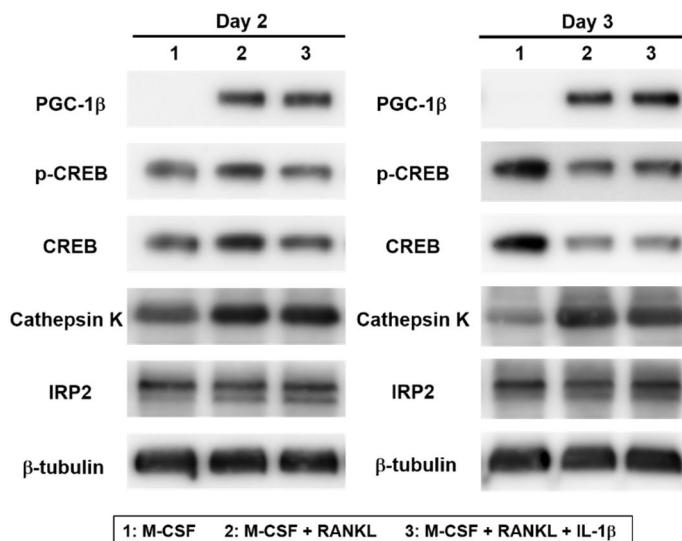


図 4. 骨吸収および鉄代謝調節関連タンパク発現に対する IL-1 の影響

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------