

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008～2009

課題番号：20791362

研究課題名（和文） 破骨細胞分化における細胞接着の生理的機能の解明

研究課題名（英文） Cell adhesion signals regulate RANK expression in osteoclast precursors.

研究代表者 望月 文子 (MOCHIZUKI AYAKO)

研究者番号：10453648

研究成果の概要（和文）：

マクロファージ（BMMs）から分化する破骨細胞は RANKL と M-CSF というサイトカインによって分化が厳密に制御されている。この他にも分化に必須な因子が存在すると考えられており、なかでも、細胞接着は骨組織にのみ存在する破骨細胞にとって重要な役割を果たしていると考えられているが、詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では、破骨細胞分化における細胞接着の生理的機能を解明することとした。BMMs の培養条件を浮遊状態から接着状態に、あるいは接着状態から浮遊状態に移すことで、BMMs の RANKL 受容体である RANK の発現がそれぞれ上昇、あるいは低下することがわかった。また、BMMs に RANK を強制させると浮遊状態でも破骨細胞へ分化したことから、細胞接着シグナルは BMMs の RANK の発現を制御していることが示唆される。今後、破骨細胞分化に特異的な接着シグナルを抑制すれば関節リウマチなどの異常に活性化した破骨細胞形成を阻止できると示唆される。

研究成果の概要（英文）：

The cells of monocyte/macrophage lineage differentiated into osteoclasts following the stimulation of cells with RANKL. It has been reported that cell adhesion signals are required for osteoclast differentiation from their precursors. However, details of the mechanism by which cell adhesion signals induce osteoclast differentiation have not been examined yet. In the present study, we investigated that cell adhesion signals participate in RANK expression in osteoclast precursors. Mouse bone marrow-derived macrophages (BMMs) were cultured on the culture dishes (the adherent condition) or on the methylcellulose gel (the non-adherent condition), and then examined osteoclast differentiation, activation of intracellular signals, and changes in gene expression. When BMMs were cultured under adherent condition, almost all BMMs differentiated into osteoclasts in response to RANKL stimulation. However, under non-adherent condition, the efficiency of osteoclast differentiation was markedly reduced even in the presence of RANKL. Although LPS or TNF-alpha activated the NF-kappa B-mediated signaling pathways under both conditions, RANKL failed to activate these pathways under non-adherent condition. We elucidated that mRNA and protein of RANK are highly expressed under adherent condition, and then accelerated by stimulation of RANKL. The inhibition of differentiation under non-adherent condition was recovered by overexpression of RANK or TRAF6. These results suggest that cell adhesion signals play an important role in regulating RANK expression in osteoclast precursors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・機能系基礎歯学

キーワード： 破骨細胞、分化、接着シグナル、RANK、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は免疫応答能を持つマクロファージから分化することが知られている。破骨細胞の分化誘導にはRANKLとM-CSFというサイトカインが必須であるが、この他にも分化に必須な因子が存在することが知られているが、詳細は不明である。マクロファージは骨髄中だけでなく、生体内のあらゆる組織に存在する。しかし破骨細胞が骨組織にのみ存在するのは、骨表面に存在する破骨細胞分化に必須な何らかのシグナルがマクロファージを破骨細胞へ分化させていると推察される。歯周病や関節リウマチなどの病的骨破壊のメカニズムを解明するためには破骨細胞分化のメカニズムを詳細に解明することが急務である。そこで申請者は、「マクロファージは骨表面に接着することで破骨細胞への分化を開始する」という仮説を立て、破骨細胞分化における細胞接着の生理的機能を解明することにした。

2. 研究の目的

これまでに破骨細胞分化と細胞接着に関する研究がいくつか報告されている。

- (1) M-CSFはRANKLの受容体であるRANKの発現に重要である [Arai F et al. *J Exp Med*. 20; 190(12): 1741-1754 (1999)]。
- (2) インテグリンは破骨細胞の骨基質への接着と骨吸収能にとって重要である [McHugh KP et al. *J Clin Invest*. 105(4): 433-440 (2000)]。
- (3) 破骨細胞分化には細胞接着が必須である [Miyamoto T et al. *Blood* 96(13): 4335-4343 (2000)]。

破骨細胞の分化誘導にはRANKLやM-CSFのほか細胞の接着シグナルが重要であることが報告されている。骨表面にのみ存在する破骨細胞の分化にとって、細胞接着シグナル

はなんらかの重要な役割を担っていると考えられているが、不明な点が多く残されている。そこで、破骨細胞分化と細胞接着をより詳細に解析することとした。

3. 研究の方法

マウスの骨髄細胞をM-CSFとTGF-betaで3日間処理し、マクロファージ様の前駆細胞(BMMs)を誘導した。このBMMsを細胞培養用のプラスチックプレート上(接着状態)およびメチルセルロース培地上(非接着状態)でRANKL存在下で培養し、破骨細胞形成効率、細胞内シグナル、RANKを含む各種遺伝子の発現変化をmRNAレベル、タンパクレベルで検討した。さらに、BMMsにRANKを強制発現させ、浮遊状態で培養させたときの破骨細胞形成効率を検討した。

4. 研究成果

BMMsを接着状態で培養するとRANKL刺激によって効率よく破骨細胞に分化した。しかし、非接着状態では破骨細胞への分化効率が著しく低下した。接着状態にあるBMMsをRANKLで刺激すると、NF-kappa B経路が活性化されたが、非接着状態ではそれが起こらなかった。なお、TLR4のリガンドであるLPSで刺激したときは接着、非接着状態に関係なく、細胞内シグナルが活性化され、TNF-alpha mRNAの発現が誘導された。接着状態にあるBMMsは一定レベルのRANK mRNAを発現していたが、非接着状態に移行すると、速やかにその発現レベルが低下した。逆に非接着状態にあったBMMsがプレートに接着するとRANKの発現が急速に回復した。また、接着状態ではRANKLの刺激によってRANK mRNAの発現レベルがさらに上昇し、その後は非接着状態に移行しても分化・融合して球状の破骨細胞を形成した。そこで、BMMsにRANKを強制発現させ、浮遊

状態では破骨細胞へ分化するのかが検討した。RANK を発現している BMMs を浮遊状態で RANKL で刺激すると、多核化した破骨細胞へ分化し、破骨細胞の特徴的機能の1つである、骨吸収能も持っていることがわかった。以上の結果から、接着シグナルは分化前の RANK の発現誘導に必要と思われる。しかし、非接着状態に移行すると RANK の発現が低下し、破骨細胞への分化が困難になると予想される。また、いったん RANK からのシグナルが入ると RANK 自身の発現が誘導されるため、非接着状態でも分化が可能になるのではないかと推察される。

本研究によって得られた実験結果は、破骨細胞分化についての基礎的知見を充実させるだけでなく、今後の骨代謝疾患に対する新薬や治療法の開発に役立つ可能性がある。接着シグナルが破骨細胞分化にとって必須であることから、破骨細胞分化に特異的な接着シグナルを抑制すれば歯周病や関節リウマチなどで異常に増殖した破骨細胞形成を阻止できることが強く示唆される。

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3件)

- (1) 望月文子、中山希世美、中村史朗、井上富雄
三叉神経中脳路核ニューロンに対するオレキシンの作用
口腔組織培養学会誌. 19 (1): 43-44, 2010.
- (2) Gemba-Nishimura A, Inoue T, Nakamura S, Nakayama K, Mochizuki A, Shintani S, Yoshimura S:
Properties of synaptic transmission from the reticular formation dorsal to the facial nucleus to trigeminal motoneurons during early postnatal development in rats.
Neuroscience. 166: 1008-1022, 2010.
- (3) Takami M, Mochizuki A, Yamada A, Tachi K, Zhao B, Miyamoto Y, Anada T, Honda Y, Inoue T, Nakamura M, Suzuki O, Kamiyo R: (T. M. and A. M. contributed equally to this work.)
Osteoclast differentiation induced by synthetic octacalcium phosphate through receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts

Tissue Engineering, Part A. 15: 3991-4000, 2009.

[学会発表] (計7件)

- (1) Matsuo E, Mochizuki A, Nakayama K, Inoue T
Decreased intake of sucrose solutions in orexin knockout mice.
GPCR2010 Symposium, 2010/3/30, Kyoto
- (2) 舘慶太、高見正道、佐藤華、本田義知、宮本阿礼、望月文子、井上富雄、新谷悟、中村雅典、鈴木治、馬場一美、上條竜太郎
TGF- β は BMP2 に誘導された異所性骨形成を促進する
第46回 日本分子生物学会
2009/12/9-12 横浜
- (3) 望月文子、中山希世美、中村史朗、井上富雄
三叉神経中脳路核ニューロンに対するオレキシンの作用
第46回 日本口腔組織培養学会学術大会
2009/12/5 東京
- (4) 舘慶太、高見正道、佐藤華、本田義知、望月文子、井上富雄、新谷悟、中村雅典、鈴木治、上條竜太郎、馬場一美
TGF- β 1 は BMP-2 による異所性骨形成を協力を促進する
第2回 再生補綴医学研究会
2009/11/27 名古屋
- (5) Inoue T, Nakayama K, Mochizuki A, Nakamura S, Shioda S
Effects of orexin on activities of mesencephalic trigeminal sensory neurons in developing rats
Society for Neuroscience 39th annual meeting, 2009/10/17-21, Chicago
- (6) 井上富雄、望月文子、中山希世美
オレキシンの三叉神経中脳路核ニューロン活動に対する影響
第51回 歯科基礎医学会学術大会
2009/9/9-11 新潟
- (7) 舘慶太、高見正道、佐藤華、本田義知、宮本阿礼、望月文子、井上富雄、新谷悟、

中村雅典、鈴木治、馬場一美、上條竜太郎

TGF- β は BMP-2 による異所性骨形成を協力を促進する

第 27 回 日本骨代謝学会学術大会
2009/7/23-25 大阪

[図書] (計 1 件)

Nakayama K, Mochizuki A, Nakamura S, and Inoue T

Orexin modulates neuronal activities of mesencephalic trigeminal sensory neurons in rats.

Transmitters and Modulators in Health and Disease.

I. Homma, S. Shioda and N. Kato (Eds), Tokyo, Springer, pp179-182, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

()

研究者番号 :

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :