

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390425

研究課題名（和文） 破骨細胞・骨芽細胞・骨細胞の連関による骨リモデリング解明

研究課題名（英文） Tripartite relationship between osteoclasts, osteoblasts and osteocytes in bone remodeling

研究代表者 松尾 光一 (MATSUO KOICHI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40229422

## 研究成果の概要（和文）：

骨リモデリングは、破骨細胞による骨吸収と、骨芽細胞/骨細胞による骨形成からなる一連のプロセスである。本研究では、EphA2 ノックアウトマウスと EphA2 阻害剤などを利用し、ephrinA2 がカップリングインヒビターとして働くこと、さらに骨の石灰化制御因子であることが明らかになってきた。またリモデリング異常により骨基質が増加する Fra1 トランスジェニックマウスでは、肺線維症を発症することを見出した。

## 研究成果の概要（英文）：

Bone remodeling is a process in which osteoclastic bone resorption is followed by bone formation by osteoblasts/osteocytes. In this study, we found that ephrinA2 produced by osteoclasts is a coupling inhibitor, which suppresses bone mineralization. Furthermore, Fra-1 transgenic mice, which show overproduction of bone matrix due to impaired bone remodeling exhibit pulmonary fibrosis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

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、骨芽細胞、骨細胞、骨リモデリング、骨吸収、ephrin、Eph

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) ephrin-Eph と骨リモデリング

B型の ephrinB2 リガンドは成熟破骨細胞に発現している。その受容体は破骨細胞には存在しない。骨芽細胞は EphB4 に代表される ephrinB2 の受容体を発現する。われわれは、破骨細胞と骨芽細胞の細胞間相互作用により、骨吸収は抑制され、骨形成が促進することを示し、ephrinB2 がカップリングファクターと

して働くことを提唱した(Zhao et al, 2006)。

(2) Fra-1 トランスジェニックマウスでは骨芽細胞による骨形成が過剰になるというリモデリング異常により、骨髄が埋まるほどの骨形成が進行性に起こるが(Jochum et al, 2000)、そのメカニズムは不明であった。われわれは、骨芽細胞の培養細胞系で、骨形成亢進のメカニズムを解析しようとしたが、単

離された骨芽細胞の分化やカルシウム沈着は、Fra-1 の強制発現によって亢進しなかった。そこで、異なる細胞間の相互作用が重要であると考えられ、Fra-1 トランスジェニック個体を解析する必要に迫られた。

(3) 骨細胞による骨融解がリモデリングに寄与しているという仮説は長い間議論されてきたが、骨切片を用いた2次元的な解析による骨小腔の体積測定が行われるようになった。われわれは、放射光によるX線顕微鏡による3次元計測によってこそ、授乳期における骨小腔体積の増大を証明できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、破骨細胞、骨芽細胞、さらに骨基質に埋まっている骨細胞の細胞間相互作用に係る分子群を対象に、以下の作業仮説に従い骨リモデリング機構を解明することを目的とした。

【作業仮説1】 膜タンパクである ephrinA2 と、その受容体である EphA2 あるいは EphA4 との相互作用が骨リモデリングを制御する。

【作業仮説2】 授乳期に母乳にカルシウムを動員するにあたり、骨表面の破骨細胞と骨細胞との相互作用が起き、骨細胞による骨融解がおこる。

さらに、様々な条件下で、転写因子 Fra-1, RANKL のデコイ受容体である osteoprotegerin (OPG) など、骨リモデリングに関わる分子の挙動解析を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) EphA2 ノックアウトマウスと EphA2 阻害剤などを利用し、A 型 ephrin の生体内における機能を解析した。特に EphA2 のノックアウトマウスから摘出した長管骨の解析で、サンプル数を統計解析に十分な数まで増やしてマイクロ CT と骨形態計測を行った。EphA2 の低分子インヒビターに加えて、ペプチドインヒビターを用いた実験を行い、骨器官培養系を構築した。また、骨芽細胞の産生する基質小胞を電子顕微鏡やFACSを用いて解析した。

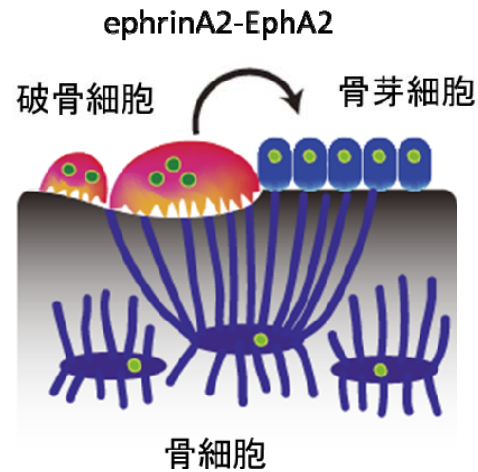
(2) 骨硬化症を発症する Fra-1 トランスジェニックマウス (Jochum et al, 2000) を様々な条件下 (リポ多糖体投与、抗がん剤投与) で、骨や肺などの臓器の遺伝子発現を定量PCRで、組織像を組織学的方法で解析した。Fra-1 コンディショナルノックアウトマウスもスペイン国立がん研究所との共同研究で活用した。

(3) 放射光施設 Spring-8 で得られたX線顕微鏡像を解析し、骨小腔体積の定量化を試みた。非交配の対照マウス群と授乳マウス群の腓骨を摘出し、70%エタノール固定後に風

乾したものをサンプルとして計測に用いた。

## 4. 研究成果

(1) ephrinA2 の受容体として働く EphA2 を欠損する遺伝子改変マウスから摘出した長管骨の解析で、マイクロ CT と骨形態計測を行い、石灰化の亢進 (類骨面の増加) を見出した。さらに、EphA2 の低分子インヒビターに加えて、ペプチドインヒビターを用いた実験を行い、骨器官培養においても 72 時間以内に石灰化が亢進することを見出した。このことは、ephrinA2-EphA2 の相互作用が骨石灰化を抑制していることを示唆する (図)。骨石灰化の抑制は、リン酸カルシウムを含有する基質小胞 (Matrix vesicle) の産生制御にあるものと考えられた (米国骨代謝学会招待講演。論文再投稿中)。



Matsuo, K. IBMS BoneKEy 9, Article number: 39 を改変。

(2) Fra1 トランスジェニックマウスでは、間質性肺炎と肺線維症を発症することが分かった。このことは、骨基質だけでなく、肺における細胞外基質産生も亢進していることを示唆する。さらにリポ多糖体 (LPS) を腹腔投与すると、Fra-1 の転写が誘導され、Fra-1 が転写因子として MCP-1 などのケモカインの産生を上昇させて肺へのマクロファージの動員を促進すること、しかも Fra1 が存在しないマウスでは、この現象が起こらないことを示した (Takada et al, 2011)。Fra-1 の発現誘導は、イレッサによる副作用として間質性肺炎が起こる作用機序そのものであると考えられ、イレッサ以外のいくつかの EGF 受容体阻害剤では認められない生物活性であったことから、イレッサに特異的なオプターゲット効果であると考えられた (論文投稿中)。

Fra-1 トランスジェニックマウスでは、炎症性サイトカインの発現が軒並み低下しており、このような免疫系の環境が、破骨細胞に

よる骨吸収の低下と、骨芽細胞による骨形成の促進の土台となっているものとも考えられる。Fra-1 の骨細胞における機能は現在までのところ不明である。

肺と骨の両方で、間葉系細胞（肺線維芽細胞と骨芽細胞）の増生と活性化が認められたことから、共通の分子機構でこれらの細胞が制御されている可能性がある。

(3) 高輝度放射光施設 SPring-8 (兵庫) で X 線微分位相顕微鏡を用いた 3 次元再構築データを引き続き解析し、学会発表を行った(論文準備中)。Spring-8 における解析は、時間がきわめて限られており、統計学的処理に必要なサンプル数を得るのが容易ではない。そこで、実験室レベルで使用できるナノ CT を活用して、さらに解析を進めることとした。

#### 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 Koichi Matsuo (2012) Osteocytes Communicate with Osteoclast Lineage Cells via RANKL. IBMS BoneKEy 9, Article number: 39 doi:10.1038/bonekey.2012.36 査読有
- ② Yasunari Takada, Lionel Gresh, Aline Bozec, Eiji Ikeda, Kazunori Kamiya, Masazumi Watanabe, Koichi Kobayashi, Koichiro Asano, Yoshiaki Toyama, Erwin F. Wagner, Koichi Matsuo. (2011) Interstitial lung disease induced by gefitinib and Toll-like receptor ligands is mediated by Fra-1. *Oncogene* 30, 3821-3832. 査読有
- ③ 松尾光一、骨の破壊と再生、臨床検査、査読無、55 巻、2011、1497-1502

[学会発表] (計 14 件)

- ① Nango, N., Kubota, S., Yashiro, W., Momose, A., Takada Y., Matsuo, K. The osteocyte canaliculi are the basis of mineral metabolism in cortical bone studied by a multi-scan method of X-ray microscope. (Poster) International Workshop on X-ray and Neutron Phase Imaging with Gratings (XNPIG), March 5-7, 2012, Tokyo, Japan
- ② Oikawa, T., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Uehara, S., Udagawa, N., Saya, H., and Matsuo, K. (Poster) Tks5-dependent

formation of circumferential podosomes mediates cell-cell fusion, Podosomes, Invadopodia and Focal Adhesions in Physiology and Pathology, September 18-21, 2011, Madrid, Spain.

- ③ Matsuo, K. (招待講演) Coupling factors: Lessons from Ephs and Ephrins. 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 16-20, 2011, San Diego, USA.
- ④ Nango, N., Kubota, S., Yashiro, W., Momose, A., Takada, Y., Matsuo, K. Osteoclast-dependent canalicular formation in cortical bone that mediates bone remodeling. (Oral) 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 16-20, 2011, San Diego, USA.
- ⑤ Takada, Y., Matsuo, K. Osteoprotegerin prevents infection-induced bone loss. (Poster) 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 16-20, 2011, San Diego, USA.
- ⑥ Takeda, Y., Takada, Y., Omote, K., Matsuo, K. 3D visualization of osteocyte lacunae in the entire long bone. (Poster) 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 16-20, 2011, San Diego, USA.
- ⑦ Valverde-Franco, G., Kapoor, M., Hum, D., Matsuo, K. Lussier, B. Pelletier, J.-P., Martel-Pelletier, J. In vivo effect of bone-specific ephB4 overexpression in mice on subchondral bone and cartilage during osteoarthritis. (Oral) 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 16-20, 2011, San Diego, USA.
- ⑧ 松尾光一 (講演) 骨細胞による骨溶解について第 29 回日本骨代謝学会学術集会. 2011 年 7 月 28-30 日 (大阪)
- ⑨ 高田康成、松尾光一 (口演) Osteoprotegerin による感染性骨破壊の抑制第 29 回日本骨代謝学会学術集会. 2011 年 7 月 28-30 日 (大阪)

- ⑩ 南郷脩史、久保田省吾、矢代航、百生敦、松尾光一（ポスター）破骨細胞は骨細管形成に関与し、骨細管は皮質骨リモデリングへ関与する  
第 29 回日本骨代謝学会学術集会。2011 年 7 月 28-30 日（大阪）
- ⑪ 及川司、尾山大明、秦裕子、佐谷秀行、松尾光一（ポスター）  
Tks5 によるポドソーム形成と破骨細胞融合メカニズム  
第 29 回日本骨代謝学会学術集会。2011 年 7 月 28-30 日（大阪）
- ⑫ 及川司、尾山弘明、羽田裕子、佐谷秀行、松尾光一（ポスター）  
Tks5-dependent formation of circumferential podosome mediates cell-cell fusion.  
第 63 回日本細胞生物学会大会。2011 年 6 月 27-29 日（札幌）
- ⑬ Kanzaki, S., Takada, Y., Ogawa, K., Matsuo, K. (Oral) Osteoclasts affect hearing function and auditory ossicles. 10th international symposium: Recent Advances in Otitis Media, June 5-9, 2011, New Orleans, USA.
- ⑭ Valverde-Franco, G., Kapoor, M., Hum, D., Matsuo, K., Lussier, B., Pelletier, J.-P., Martel-Pelletier, J. In vivo protective effect of EphB4 receptor overexpression on the pathophysiology of osteoarthritis. EULAR - the European league against rheumatism-2011, May 25-28, 2011, London, UK.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.matsuo-lab.com>,

<http://www.gcoe-stemcell.keio.ac.jp/member/matsuo.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松尾 光一 (MATSUO KOICHI)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：40229422

### (2) 研究分担者

高田 康成 (Takada Yasunari)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：40407086