

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22日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592633

研究課題名（和文） ケモカインレセプター発現パターンを指標とした炎症性骨吸収病態の解明と診断への応用

研究課題名（英文） Application to the elucidation and diagnosis of inflammatory bone resorption using the chemokine receptor expression pattern.

研究代表者

岡松 良昌 (OKAMATSU YOSHIMASA)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：50286845

研究成果の概要（和文）：

破骨細胞が担う骨吸収過程において、破骨細胞前駆細胞の遊走と RANKL による成熟した破骨細胞への分化が必須である。しかし、破骨細胞前駆細胞が骨吸収の場に供給されるメカニズムは未だ不明な点が多い。我々は骨吸収の場に遊走されてくる破骨細胞前駆細胞にはある種のケモカインレセプター発現パターンがあり、その発現パターンによって骨芽細胞周囲へのホーミングが制御されている、という仮説を立て研究を行って来た。

マウス骨髄間質由来細胞株の ST2 細胞を IL-1、VitaminD3 で刺激し、ケモカインの遺伝子発現を検討すると、CCL7 および CCL25 遺伝子発現の上昇が認められた。また、マウスマクロファージ由来細胞株の RAW264.7 細胞を RANKL で刺激すると、CCL7 の受容体である CCR1、CCR2、並びに CCL25 の受容体である CCR9 遺伝子の発現が認められた。CCL7 抗体、CCL25 抗体はそれぞれ RANKL が誘導する破骨細胞の数を有意に減少し、CCL7、CCL25 リコンビナント蛋白は RANKL が誘導する破骨細胞形成を有意に増加した。さらに RANKL で前処理された RAW264.7 細胞は、CCL7 に対し有意な走化性能を示した事から、CCL7 が破骨細胞形成に重要なケモカインと考えられた。また、RANKL によって誘導される破骨細胞形成関連遺伝子の中で、CCL7 によって、RANK、NFATc1 の遺伝子発現が有意に増強した。このメカニズムを解明するため転写因子の活性化を検討したところ、NF- κ B と NFAT の転写活性は CCL7 処理により有意に増加した。

これらの結果から、特に CCL7-CCR2（あるいは CCR1）、さらに NF- κ B と NFAT へ伝わるシグナル伝達経路が破骨細胞形成に強く関与していることが示唆され、CCR1 や CCR2 を発現している破骨細胞前駆細胞が骨吸収の場へホーミングする可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Bone resorption by osteoclast involves initial stages of osteoclasts precursor cells migration, followed by differentiation into mature osteoclasts. Chemokine play essential roles in the chemotaxis to hematopoietic cells. In this grant, we established the effect of relationship chemokines to chemokine receptors on receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-stimulated osteoclast differentiation. CCL7 and CCL25 were induced from IL-1- and VitaminD3-stimulated ST2 cells, as osteoblastic cell line, simultaneously with RANKL production. On the other hand, CCR2 and CCR9, are well known CCL7 receptor and CCL25 receptor respectively, expressed in RAW264.7 cells, as osteoclast precursor cells. Neutralization of CCL7 and CCL25 antibody reduced RANKL-stimulated osteoclast differentiation by 50% approximately. Further, recombinant of CCL7 and CCL25 up-regulated the number of RANKL-induced multinuclear cells. Same results obtained from RANKL-stimulated bone marrow cells. Transwell migration activity in response to CCL7 was observed only when RANKL-treated RAW264.7 cells were used. CCL7 also significantly increased expression of RANK and NFATc1, but not Fra1 and AP1 in RANKL-treated RAW264.7 cells. Further, CCL7 significantly increased luciferase activity of NF- κ B and NFAT reporter.

Taken together, these results suggest that CCL7-CCR2 (or CCR1) may plays an important role in the RANKL-induced osteoclast differentiation, most likely osteoclast precursor cells migration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：ケモカイン、ケモカインレセプター、破骨細胞、走化性

1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞と破骨細胞はそれぞれ骨形成と骨吸収を担い、骨量を制御している。この両細胞による骨形成・骨吸収は様々なホルモンやサイトカインによって、その前駆細胞を供給、分化、活性化することにより制御される。RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand) はTNF (Tumor Nuclear Factor) ファミリーの一員であり、骨芽細胞、軟骨細胞、T細胞に発現し、骨吸収の過程を制御していることが知られている。また、RANKL遺伝子欠損マウスが、大理石急病を呈することから、RANKLは破骨細胞形成・骨吸収に必須な因子の一つだと考えられている。骨粗鬆症のような代謝性骨疾患や関節リウマチ、歯周炎のような炎症性骨疾患を引き起こすと考えられている炎症性サイトカインはRANKL産生を介し、骨吸収を誘導する。しかし、骨吸収部位局所への破骨細胞前駆細胞遊走、RANKLによる破骨細胞形成を増強する因子についてはあまり知られていない。

ケモカインは白血球の活性化や移動を制御する生理活性タンパク質である。ケモカインは炎症に必須なメディエーターであり、ウイルス感染においても重要な役割を担っている。これまでに多くのケモカインが破骨細胞前駆細胞の遊走や破骨細胞分化に関与していることが報告されてきた。しかし、破骨細胞前駆細胞の遊走や破骨細胞分化において、ケモカインと受容体がどれほどの役割を果たしているかはあまり知られていない。

2. 研究の目的

1) 本研究ではマウスおよびヒト由来の骨芽細胞および破骨細胞前駆細胞を用い、破骨細胞形成に関与するケモカイン遺伝子の発現を検索した後、RANKL によって誘導されるケモカインレセプターの抗体によって破骨細胞前駆細胞をネガティブあるいはポジティブに分離し、それぞれの細胞からケモカイン

レセプターの発現パターンによる破骨細胞の機能発現を比較検討する事を目的とする。

2) 上記の研究によって得られたケモカインレセプターの発現パターンを、歯周病病態モデルマウスで検討する事により、実際の歯周炎病態との関連性を探り、またその情報を基礎にケモカインレセプターSNPの歯周炎の診断への応用の可能性を検討する目的で本研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養と破骨細胞形成

マウス骨髄間質由来細胞であるST2細胞は理化学研究所より購入し、 α -MEMにて培養した。マウスマクロファージ系細胞株であるRAW264.7細胞はAmerican Type Culture Collectionより購入し、DMEMにて培養した。破骨細胞形成には α -MEMを用いた。RAW264.7細胞は24穴プレートに 5×10^3 個/穴の条件で播種し、100ng/mlリコンビナントマウスRANKL蛋白 (rmRANKL) の存在下において5日間培養し、破骨細胞数を測定した。一方、骨髄細胞は雄の4-6週齢ddYマウスの大腿骨および脛骨の骨髄より採取した。骨髄細胞は24穴プレートに 2×10^5 個/穴の条件で播種し、100ng/ml rmRANKLおよび30ng/mlリコンビナントマウスM-CSF蛋白 (rmM-CSF) の存在下において7日間培養し、破骨細胞数を測定した。破骨細胞の同定にはTRAP染色を用いた。

(2) オリゴDNAマイクロアレイ分析

ST2細胞は24穴プレートに 1×10^5 個/穴の条件で播種した。培養24時間後、 10^{-8} MビタミンD3 [$1\alpha, 25$ (OH) $2D_3$] あるいは5ng/mlリコンビナントマウスInterleukin-1 β 蛋白 (rmIL-1 β) をそれぞれ添加し、さらに48時間培養した。培養48時間後、細胞を回収し、全RNAを抽出した。精製したRNA (1-1.5 μ g) はTrueLabeling-AMP™2.0 kitを用いて相補鎖

RNA (cRNA) に生成したのち、biotin-16-UTPにて標識した。標識したcRNAは、Cleanup Kitを用いて浄化し、分光光度計にて定量化した。128のケモカインとレセプター遺伝子を含む mouse chemokines and receptors oligo DNA microarray (SuperArray Bioscience) により遺伝子の発現解析を行うために、3mgのcRNAをハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション後、アレイは洗浄、ブロッキングし、アルカリフォスファターゼ結合ストレプトアビジン溶液にてインキュベーションしたのち、最後に化学発光基質を加えて、室温で5分間インキュベーションした。画像はHyperfilm MPを用いて検出した。

(3) RT-PCR

ST2細胞は、24穴プレートに 1×10^5 個/穴の割合で播種した。培養24時間後、 10^{-8M} ビタミンD3あるいは $5ng/ml$ rmlL-1 β を添加し、さらに48時間培養した。培養48時間後、細胞を回収し全RNAを抽出した。RAW264.7細胞は24穴プレートに 5×10^3 個/穴の条件で播種し、 $100ng/ml$ のrmRANKLの存在、非存在下で培養した。培養5日後、細胞を回収し全RNAを抽出した。全RNAからcDNAを合成し、各特異的なプライマーを用い、遺伝子の増幅を行った。PCR生成物は、エチジウムブロマイド含有1.5%アガロースゲルで電気泳動後、紫外線光下で確認し、Quantity Oneにて記録した。

(4) ウェスタンブロット分析

ST2細胞は、6穴プレートに 2×10^5 個/穴の条件で播種した。培養24時間後、 10^{-8M} ビタミンD3あるいは $5ng/ml$ rmlL-1 β を添加し、さらに48時間培養した。培養後、細胞培養上清を回収した。RAW264.7細胞は6穴プレートに 5×10^4 個/穴の条件で播種し、 $100ng/ml$ のrmRANKLの存在、非存在下で培養した。培養5日後、細胞を洗浄し、細胞溶解液にて回収した。細胞溶解液中のタンパク質濃度はBCA protein assay kitを使用して測定した。サンプルは10%SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、PVDFメンブレンに転写、各抗体と反応させた。タンパク質の検出にはECL detection kitを用いた。

(5) ELISA法

10^{-8M} のビタミンD3あるいは $5ng/ml$ のrmlL-1 β で刺激したST2細胞を48時間培養した後、培養上清中に分泌されたケモカイン量を、各ケモカインに対するELISAキットを用い、吸光度を450nmにて測定した。

(6) 走化性分析

ダブルチャンバーを用いて測定した。すなわち、上部チャンバーにRAW264.7細胞を 1×10^6 個/穴の割合で播種し、下部チャンバーに

rmRANKLとケモカインを加え、24時間培養した後、CytoSelect cell migration assay kitにて測定した。

(7) Promoter assay

FuGENE6を用い、RAW264.7細胞にNFATおよびNF-kB-Luciferase reporterをトランスフェクトした。細胞はrmRANKLとケモカインにて48時間刺激した。Luciferase活性はDual-Luciferase Reporter Assay Systemを用い、測定した。

(8) 統計処理

実験結果は全て平均 \pm S.D.で表示した。統計解析はStudent-Newman-Keuls法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) ST2細胞における各種ケモカインの遺伝子発現

骨芽細胞に発現し、骨代謝の制御に関与するケモカイン関連遺伝子を見出すために、マウス骨髄間質由来細胞であるST2細胞を $5ng/ml$ rmlL-1 β 、骨芽細胞活性化因子ビタミンD3 10^{-8M} にて刺激し、マイクロアレイにて網羅的に解析した。この結果、IL-1 β 刺激では24種類、ビタミンD3刺激では23種類の遺伝子発現が確認された。

これらの遺伝子発現の中で、我々は過去に破骨細胞形成に関する報告のほとんどないCCL7とCCL25に着目した。そこで、ST2細胞におけるCCL7とCCL25の遺伝子発現を確認するため、RT-PCRを行った。その結果、無刺激群、IL-1 β 刺激群、ビタミンD3刺激群すべてにおいて遺伝子発現が確認された(図1)。

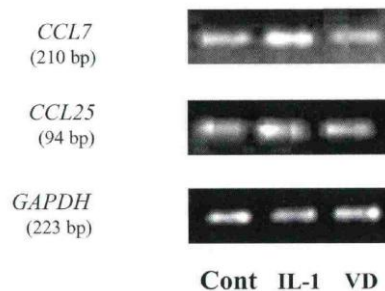


図1 ST2細胞におけるCCL7、CCL25の遺伝子発現

(2) ST2細胞におけるCCL7、CCL25の発現

CCL7およびCCL25のタンパク質発現を確認するために、ELISA法とウェスタンブロット法を行った。

rmlL-1 β 、ビタミンD3刺激したST2細胞培養上清中のCCL7産生量をELISA法にて確認したところ、CCL7の産生が確認された(図2)。

また、同様にST2細胞培養上清中のCCL25発現をウェスタンブロット法にて確認したところ、CCL25の産生が確認された(図3)。

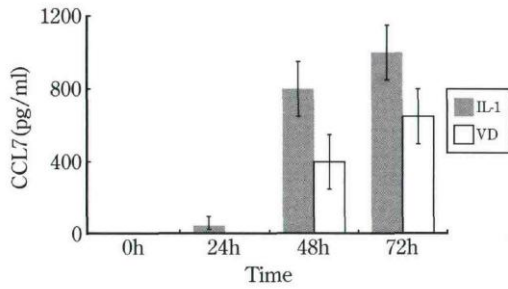


図2 各種刺激下における ST2 細胞培養上清中の CCL7 の発現

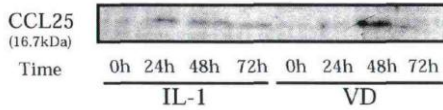


図3 各種刺激下における ST2 細胞培養上清中の CCL25 の発現

(3) RAW264.7 細胞における CCR2、CCR9 の発現

RAW264.7細胞におけるCCL7の受容体CCR2、およびCCL25の受容体CCR9の遺伝子発現を確認した。CCR2のmRNAは培養1日目、5日目ともに発現が認められたが、CCR9のmRNAは培養1日目でのみ発現し、5日目では確認されなかった(図4A)。

同様に、RAW264.7細胞におけるCCR2並びにCCR9のタンパク質発現を確認するためにウェスタンブロット法を行った。その結果、CCR2、CCR9ともに培養5日目でのみタンパク質発現が確認され、培養1日目では発現が確認されなかった(図4B)。

CCR2 mRNAは1日目、5日目それぞれでRANKL刺激により発現が減少した。一方、タンパク質は、1日目では発現が認められなかったが、5日目では発現が認められ、RANKL添加、非添

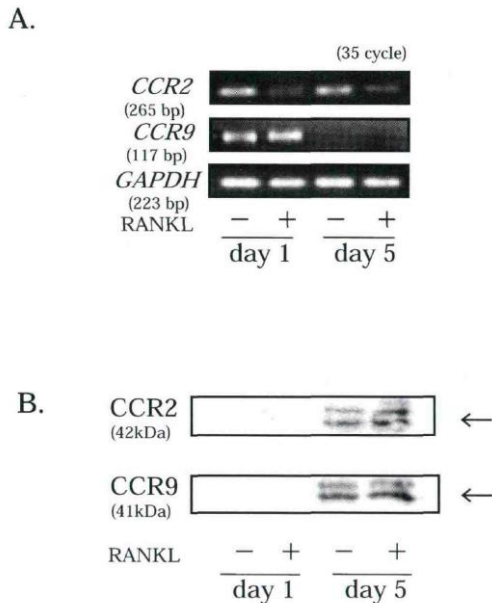


図4 RAW264.7 細胞における CCR2 および CCR9 の発現

加で差が認められなかった(図4A、B)。

CCR9 mRNAは1日目のRANKL刺激群、無刺激群ともに発現していた。しかし、CCR9のタンパク質発現は5日目のみに発現が認められ、RANKL刺激群、無刺激群に差は認められなかった(図4A、B)。

(4) 破骨細胞形成における CCL7 および CCL25 の作用

CCL7およびCCL25が実際にRANKLによる破骨細胞形成にどのような影響を与えるか検討するために、rmRANKL存在下において、RAW264.7細胞をrmCCL7、もしくはrmCCL25を添加して培養した。その結果、rmCCL7、rmCCL25非添加群ではTRAP陽性多核細胞数が75.3±7.4個/穴であったのに対し、rmCCL7、rmCCL25添加群ではそれぞれ124.3±18個/穴、130.0±17.5個/穴と有意に増加した(図5A)。

RAW264.7細胞が産生する内因性のCCL7、CCL25の破骨細胞形成に対する影響を検証するために、rmRANKL存在下において、RAW264.7細胞を抗CCL7抗体、もしくは抗CCL25抗体を添加して培養した。その結果、抗CCL7抗体、抗CCL25抗体非依存下群ではそれぞれTRAP陽性多核細胞数が91.7±16.7個/穴、131.0±11.8個/穴であったのに対し、抗CCL7抗体、抗CCL25抗体存在下群では56.3±9.5個/穴、71.0±7.5個/穴と有意に減少した(図5B、C)。

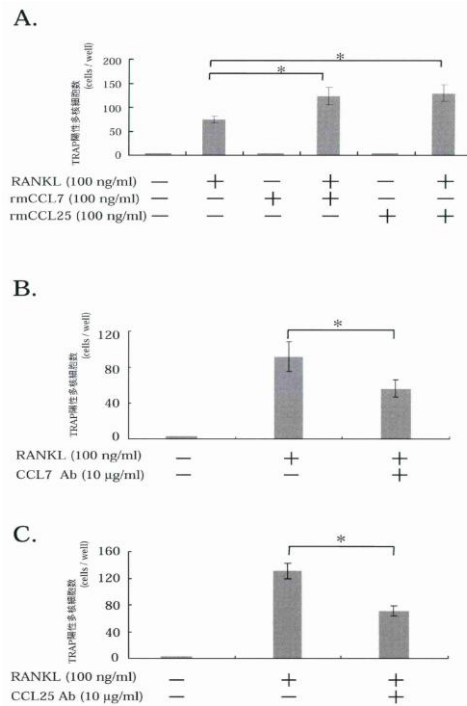


図5 RAW264.7 細胞における CCL7 および CCL25 の影響

また、rmRANKLおよびrmM-CSF存在下で、骨髄細胞をrmCCL7、もしくはrmCCL25を添加して培養した。その結果、rmCCL7、rmCCL25非添加群ではTRAP陽性多核細胞数が121.0±6.0個/穴であったのに対し、rmCCL7、rmCCL25添加

群ではそれぞれ166.0±15.5個/穴、150.3±13.1個/穴と有意に増加した(図6A)。

同様に抗CCL7, 抗CCL25抗体の骨髄細胞における破骨細胞形成阻害効果を検証したところ、抗CCL7, 抗CCL25抗体非存在下群ではTRAP陽性多核細胞数が121.0±6.0個/穴であったのに対し、抗CCL7抗体, 抗CCL25抗体存在下群ではそれぞれ86.0±7.0個/穴、94.0±8.2個/穴と有意に減少した(図6B)。

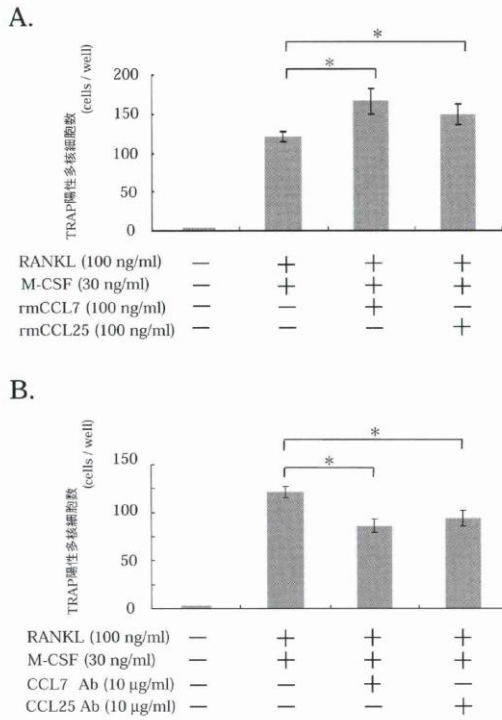


図6 骨髄細胞におけるCCL7およびCCL25の影響

(5) RAW264.7細胞におけるCCL7の走化性能 CCL7のRAW264.7細胞に対する走化性能を測定した。100ng/mlのRANKLはRAW264.7細胞に対し、強い走化性を示したが、CCL7単独では弱い走化性を示すのみであった。しかし、RANKL存在下で、100ng/mlのCCL7を添加すると、RANKL単独と比較してRAW264.7細胞の走化性が有意に増加した(図7)。

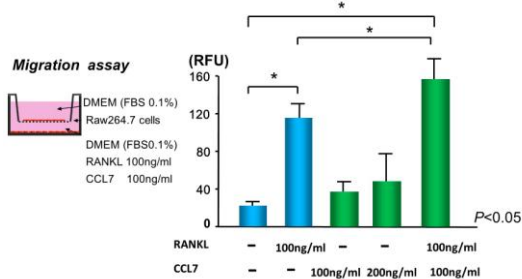


図7 CCL7 promotes RANKL-induced cell migration

(6) RAW264.7細胞におけるCCL7のシグナル伝達経路

まずCCL7の破骨細胞形成関連遺伝子(RANK、AP-1、Fra-1、NFATc1)mRNA発現に対する効果を測定した。RANKL刺激によりこれら破骨細胞形成関連遺伝子は有意に増加した。さらにCCL7により処理すると、RANK、NFATc1の遺伝子発現は有意に増強した。そこでこのメカニズムを解明するためにNF-κBとNFATの転写活性に対するCCL7の影響について検証したところNF-κBとNFATの転写活性はCCL7処理により有意に増加した(図8A、B)。

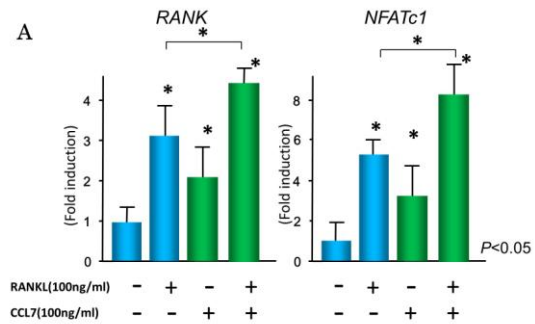


図8-A CCL7 increases the levels of RANK and NFATc1 mRNA expression.

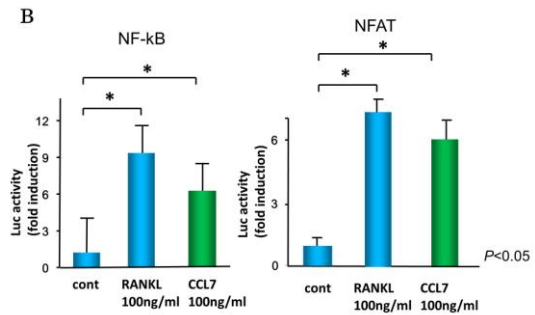


図8-B CCL7 enhances NF-κB and NFAT transactivation

これらの結果から、骨吸収の場に破骨細胞前駆細胞がホーミングしてくるメカニズムとしてCCL7-CCR2(およびCCR1)経路が重要である可能性が示唆された。現在までに各種ケモカインが破骨細胞形成に関わっていることが報告されているが、破骨細胞前駆細胞のホーミングに焦点を当てた報告は国内外でもほとんどなく、インパクトの高い結果が得られたものと考えられる。

今後は本結果のin vivoでの証明とこのメカニズムの生体内での作用の解明と診断への応用の可能性を目指し、更なる検討をしていく予定である。

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1件)

林幸恵, 岡松良昌, 臼井通彦, 山本松男
「CCL7およびCCL25はRANKLによって誘導される破骨細胞形成を促進する」査読有、日本

〔学会発表〕 (計 1 件)

Michihiko Usui, Yukie Hayashi, Ryoichi Fujihara, Yoshimasa Okamatsu, Matsuo Yamamoto. “CCL7 promotes osteoclastogenesis via activation of NF- κ B and NFAT.” 第 96 回アメリカ歯周病学会共催日本歯周病学会 2010 大会、2010 年 10 月 30 日～11 月 2 日、アメリカ (ハワイ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡松 良昌 (OKAMATSU YOSWHIMASA)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号 : 5 0 2 8 6 8 4 5