

## 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11日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659427

研究課題名（和文） 骨代謝を制御するカップリング因子の同定と機能解析

研究課題名（英文） Identification of bone coupling factor

研究代表者

中島 友紀（NAKASHIMA TOMOKI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00346959

研究成果の概要（和文）：

骨の再構築は、破骨細胞と骨芽細胞により厳密に維持されていることから、これら骨構成細胞を統括的に制御する機構が存在すると考えられる。骨の細胞間コミュニケーション制御因子を明らかにするために、骨構成細胞の発現遺伝子の網羅的にスクリーニング、機能アッセイ、プロテオーム解析から標的遺伝子を同定し、マウスジェネティクスを用いて骨リモデリングのメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Bone remodeling optimizes bone strength. Regulation of bone remodeling requires a tightly orchestrated interplay among osteoblasts (bone forming cells), osteoclasts (bone resorbing cells) in bone surface and osteocytes, which embedded into bone matrix. To identify the regulation/coupling factor of bone remodeling, we investigated a genome-wide screening, proteome analysis of these bone cells and in vivo analysis of gene targeting mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2200000	0	2200000
2010年度	500000	0	500000
2011年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
総計	3200000	150000	3350000

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：口腔生化学、骨代謝学

## 1. 研究開始当初の背景

生体の基軸である骨組織は、生涯を通じて生まれ変わっている。この再構築は「骨リモデリング」と呼ばれ、健全な骨組織の維持のみならず、生体内カルシウムの貯蔵庫である骨を巧妙に制御している。しかし、何時、どの様に破骨細胞が古い骨を認識し、骨吸収を開始および完了に至るか？さらに

骨吸収終了後、骨芽細胞がどの様に誘導され骨形成を開始、完了していくのか？は、未だに不明な点が多いのが現状である。このリモデリングサイクルにおいて破骨細胞の骨吸収に対し骨芽細胞は損失した骨量補い、一定の骨量を維持することから、これら骨構成細胞を統括的に制御する機構が存在すると考えられる。この制御機構を解明

する糸口として、最近、第3の責任細胞として骨細胞が注目されている。破骨細胞や骨芽細胞が骨表面上で機能する一方で、骨細胞は骨の中に埋め込まれた状態で存在する細胞である。それらは骨内に無数の突起を伸ばしながら網目状のネットワークを形成し、骨細胞同士あるいは骨表面の破骨細胞や骨芽細胞と密接に接触している。このような特殊な環境状態から力学的刺激の感受やシグナリング伝達に関わり、骨リモデリングを制御している可能性が想定されているものの、実体は長い間謎である。つまり、骨表面および骨組織内に存在する3つの責任細胞による骨リモデリングネットワークとカップリング機構を詳細に理解することが当研究領域を飛躍的に発展させるブレイクスルーポイントである。

## 2. 研究の目的

骨細胞、骨芽細胞および破骨細胞の骨リモデリングネットワークを司る制御因子を明らかにする目的で、骨構成細胞(骨細胞、破骨細胞、骨芽細胞)の網羅的な発現遺伝子スクリーニング、機能アッセイ、プロテオーム解析から標的遺伝子を同定し、遺伝子欠損マウスを作成し、候補遺伝子の生体における骨恒常性のメカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

骨細胞において骨組織内を擬似するために新規3次元培養系を確立し、応力反応を含む様々な条件下で遺伝子発現を評価した。さらにマウスジェネティクスを用いて骨細胞の初代培養系を確立した。また破骨細胞はRANKL/M-CSFにて分化誘導し、骨芽細胞は破骨細胞支持および分化状態の遺伝子発現をGeneChipにてゲノムワイドにスクリーニングした。選出された候補遺伝子はレトロウイルスによる遺伝子ノックダウンにより、その機能を評価した。さらに生体レベルでの遺伝子の機能を明らかにするため、遺伝子改変マウスを用いて骨形態の解析を行った。

## 4. 研究成果

骨細胞は骨の中に埋め込まれた状態で存在する細胞である。それらは骨内に無数の突起を伸ばしながら網目状のネットワークを形成し、骨細胞同士あるいは骨表面の破骨細胞や骨芽細胞と密接に接触している。骨組織内を擬似化するため、骨細胞の伸張刺激負荷培養装置を開発した。コラーゲンゲル内で3次元培養した骨細胞(MLY0-4,単離骨細胞)に、生理的範囲から骨基質が破断し骨折を引き起こす程の骨変形量のメカニカルストレスを加えることが可能となった。このメカニカルストレスを与えた細胞のゲノムワイドスクリーニングを実施し、メカ

ニカルストレス応答性の遺伝子発現を解析した。その結果、メカニカルストレス応答性遺伝子であるNos, Ptgs, Vegfaなどが顕著に上昇していることが見出された。さらに興味深いことに破骨細胞分化因子RANKLの発現誘導が見出された。

骨細胞の高純度初代培養系が確立されていなかったため、Cre発現細胞のみでEGFP発現を誘導するCAG-CAT-EGFPマウスとDmp1-Creマウスを交配し、骨細胞特異的なEGFP発現マウスを作成した。この遺伝子改変マウスを用いて、マウスの頭蓋骨または長管骨を酵素処理して得られる細胞集団を、フローサイトメトリーによるセルソーティング法を用いて、骨細胞と骨芽細胞を単離することに成功した。この新規単離法で得られた骨細胞(EGFP陽性細胞)は、Sclerostin, Dmp1, Neuropeptide Y, Reelinなど骨細胞特異的な遺伝子を強力に発現しており、骨芽細胞(EGFP陰性細胞)に特異的に発現するKeratocanやFibromodulinなどは、ほとんど検出されなかった。この結果は、骨細胞と骨芽細胞を明確に分離単離できていることを示している。

次に、生体レベルでの骨細胞が発現するRANKLの機能を明らかにするために、コンディショナルRANKL欠損マウスを作成した。まずb-actin-Creマウスとの交配により、グローバルRANKL欠損マウスを作成したところ、以前に報告されたコンディショナルRANKL欠損マウスの表現型と同様に、重篤な大理石骨病を呈し、成長不全と歯芽萌出の不全も発症した。

RANKLは骨組織において間葉系細胞だけでなく、多くの他の細胞にも発現しており、以前からT細胞が発現するRANKLが、関節リウマチ(RA)の骨破壊に関与すると考えられてきた。また、T細胞特異的なRANKL Tgマウスは、RANKL欠損マウスとの交配により部分的な骨髓腔を出現させられることが報告されている。しかしながら、T細胞特異的にRANKLを破壊したマウスを作成したところ、生理的条件下では、骨組織への影響は見出されなかった。また、造血幹細胞の移植治療を受けたRANKL依存性大理石骨病患者では、大理石骨病は改善されないが、T細胞のRANKLは正常に誘導される。これらの知見を総合すると、通常の破骨細胞の分化には、T細胞上のRANKL発現では不十分で、間葉系細胞が発現するRANKLが生体レベルでの破骨細胞分化に重要であると考えられる。

そこで、骨細胞特異的なRANKL欠損マウスを作成したところ、グローバルRANKL欠損マウスに見られる歯芽萌出や成長の不全など外見上に影響は見られなかった。しかしながら、興味深いことに、生体マウスの

骨髓腔は骨組織で充たされ重篤な大理石骨病を呈していた。この骨細胞特異的なRANKL欠損マウスでは、骨細胞のRANKLだけが破壊されており、骨芽細胞のRANKL発現は維持されていることから、成体において骨細胞が、破骨細胞の分化を支持するもっとも重要な細胞であることが明らかになった。さらに、このマウスに観察される大理石骨病は、生後すぐには発症しておらず、成長に伴いその病状が悪化するという興味深い結果が見出された。これらの結果を総合すると、成体において、骨細胞がRANKLを主に発現し破骨細胞を分化させる指令細胞として、骨リモデリングの開始を司っていると結論づけられる。

#### 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15件)

- 1) Hayashi H, Kohno T, Yasui K, Murota H, Kimura T, Duncan GS, Nakashima T, Yamamoto K, Katayama I, Ma Y, Chua KJ, Suematsu T, Shimokawa I, Akira S, Kubo Y, Mak TW, Matsuyama T. Characterization of dsRNA-induced pancreatitis model reveals the regulatory role of Irf2 in trypsinogen 5 gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108, 18766-71 (2011) (査読有り)
- 2) Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Josef M, Penninger JM and Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17, 1231-4 (2011) (査読有り)
- 3) Idrus E, Nakashima T, Wang L, Hayashi M, Okamoto K, Kodama T, Tanaka N, Taniguchi T and Takayanagi H. The Role of the BH3-only Protein Noxa in Bone Homeostasis *Biochem Biophys Res Commun* 410, 620-5 (2011) (査読有り)
- 4) Nishikawa K, Nakashima T, Takeda S, Isogai M, Hamada M, Kimura A, Kodama T, Yamaguchi A, Owen MJ, Takahashi S, and Takayanagi H. Maf promotes osteoblast differentiation in mice by mediating the age-related switch in mesenchymal cell differentiation.. *J Clin Invest*.

- 120, 3455-65 (2010) (査読有り)
- 5) Hayashi M, Nakashima T, Toyama-Sorimachi, N Takayanagi H. Inhibitory NK receptor, Ly49Q, positively regulates osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 432-438 (2010) (査読有り)
- 6) Nishikawa K, Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kato S, Kodama T, Takahashi S, Calame K, and Takayanagi H. Blimp1-mediated repression of negative regulators is required for osteoclast differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 3117-3122 (2010) (査読有り)
- 7) Kayamori K, Sakamoto K, Nakashima T, Takayanagi H, Morita K, Nguyen ST, Omura K, Miki Y, Akashi T, Ogata E and Yamaguchi A: Roles of IL-6 and PTHrP in osteoclast formation associated with oral cancers: The significance of IL-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells, *Am J Pathol* 176, 968-980 (2010) (査読有り)
- 8) Nakashima T, Takayanagi T: Osteoimmunology: Crosstalk Between the Immune and Bone Systems. *J Clin Immunol* 29, 555-567 (2009) (査読有り)
- 9) Nakashima T, Takayanagi T: Osteoclasts and the immune system. *J Bone Mineral Metab* 27, 519-29 (2009) (査読有り)
- 10) 中島友紀、高柳広：破骨細胞分化と骨免疫学 *CLINICAL CALCIUM* 21, 1843-52 (2011) (査読なし)
- 11) 中島友紀、高柳広：RANKL シグナルと骨免疫学 *CLINICAL CALCIUM* 21, 1131-40 (2011) (査読なし)
- 12) 中島友紀、高柳広：免疫系と破骨細胞 *細胞工学* 30 (3) 250-258 (2011) (査読なし)
- 13) 中島友紀、高柳広：骨免疫学から見た生物学的製剤療法と新展開 *骨粗鬆症治療* 10 (1) 53-59 (2011) (査読なし)
- 14) 中島友紀：RANKL/RANK/OPG と骨疾患 *THE BONE* 23 (4) 37-46 (2009) (査読なし)
- 15) 中島友紀、高柳広：骨破壊制御の新たなアプローチ. *医薬ジャーナル* 45(10) 87-92 (2009) (査読なし)

[学会発表](計13件)

- 1) 中島友紀、高柳広 第5回骨・軟骨フロンティア 東京 骨リモデリングの制御機構の解明 11月19日2011年(招待講演)

- 2) Nakashima T, Takayanagi H. 1st Bio-Rheumatology International Congress (BRIC2011), 8<sup>th</sup> GARN Meeting. Chiba. The crucial role of osteocyte-derived RANKL in bone homeostasis. Nov 15 2011
- 3) 中島友紀、高柳広 第48回日本リハビリテーション医学会 千葉 関節リウマチ骨破壊のメカニズム 11月2日 2011年 (招待講演)
- 4) 中島友紀、高柳広 第55回日本リウマチ学会 神戸 関節リウマチと骨免疫学 7月18日 2011年 (招待講演)
- 5) 中島友紀、高柳広 第31回日本炎症・再生医学会 東京 癌の骨転移における新規創薬ターゲットとしての RANKL 8月6日 2010年 (招待講演)
- 6) Nakashima T, 7th Meeting of Bone Biology Forum. Shizuoka, Regulation of bone remodeling by osteoclastogenesis. Aug 21 2010.
- 7) 中島友紀、林幹人、西川恵三、高柳広 第28回日本骨代謝学会 東京 転写因子による破骨細胞の分化制御機構 7月23日 2010年 (招待講演)
- 8) Hayashi M, Nakashima T, Toyama Sorimachi N, Takayanagi H. 3rd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems, Greece. Ly49Q, an ITIM-bearing NK receptor, positively regulates osteoclast differentiation. June 4-7 2010.
- 9) Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H. Identification of novel genes regulated by NFATc1 in osteoclastogenesis. The 26th Naito Conference on "Osteobiology" 5 Nov 2009, Awaji
- 10) 中島友紀 骨の恒常性を司る骨リモデリングシステムの解明 第22回長崎骨粗鬆症研究会 10月6日 2009年 長崎 (招待講演)
- 11) 中島友紀 Meet the Expert 6 Bone cell biology 第27回日本骨代謝学会 7月25日 2009年 大阪 (教育講演)
- 12) 中島友紀 骨の恒常性を司る骨リモデリングシステムの解明 Skeletal Research Meeting 6月27日 2009年 京都 (招待講演)
- 13) 中島友紀 破骨細胞の分化機構 昭和大学大学院セミナー 2月6日 2009年 東京 (招待講演)

〔その他〕

ホームページ等

<http://homepage.mac.com/osteimmunology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 友紀 (NAKASHIMA TOMOKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00346959

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし