

機関番号：33602

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890274

研究課題名（和文） 静止期破骨細胞前駆細胞(QOP)を用いた歯周病病態の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the periodontal disease using cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors(QOP).

研究代表者

武藤 昭紀 (MUTO AKINORI)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50549433

研究成果の概要（和文）：破骨細胞の分化過程において、増殖することなく破骨細胞に分化する前駆細胞（cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors：QOP）のキャラクターの解析を行った。本研究ではさらに、骨髄のみならず血中にも QOP が存在するか調べるために骨誘導因子（BMP）による異所性骨形成時における QOP の存在様式を解析した。実験の結果、QOP はマクロファージ系マーカーの発現が低い、破骨細胞系マーカーを強く発現していた。また、電子顕微鏡により解析を行ったところ QOP は破骨細胞に近い所見を得た。また異所性骨の周囲に有意 QOP が出現した。以上の解析より、QOP は、破骨細胞に特異性高い前駆細胞である可能性が示唆される。そして、異所性骨に形成される破骨細胞は、既に存在する細胞周期の停止した QOP が破骨細胞形成部位に特異的に遊走し、骨吸収刺激により破骨細胞に分化すると考えられる。本概念は、歯周病などの炎症性骨破壊病変に対して骨吸収因子の抑制という治療法とは異なる概念を打ち出すものであり、新規の骨疾患メカニズムの解明への一助となるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）： In a differentiation process of the osteoclast, We analyzed the character of osteoclast precursor cell (cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors:QOP) which differentiated to osteoclast without cell cycle. In this study, We analyzed an existence style of QOP at the time of the ectopic bone by bone morphogenetic protein-2(BMP) to examine whether QOP existed in blood as well as bone marrow. QOP had a low expression of macrophage marker, but had a high osteoclast marker. In addition, QOP got the views that were near to osteoclast by an electron microscope. Furthermore, QOP appeared around an ectopic bone. Therefore, QOP have a possibility that it is a specific precursor for osteoclast. And QOP which stopped in an existing cell cycle specifically migrates the osteoclast formed to an ectopic bone in the osteoclast formation part, and it is thought that I differentiate to osteoclast by bone resorption stimulation. This concept prints a different concept that decrease of bone resorption factor for inflammatory bone destruction lesions such as periodontal disease and thinks that I make a help to elucidation of new bone disease mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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：歯周病、骨吸収、破骨細胞、ケモカイン、骨粗鬆症

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、バイオフィルム感染症として認識されており、人類史上最も感染者の多い感染症である。生体側は、細菌感染に対して免疫担当細胞（マクロファージ、リンパ球）が産生するサイトカイン（主に IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ ）や他の炎症性メディエーターにより、免疫防御機構を働かせる。その結果、破骨細胞の分化および、その機能の活性化を促す。そして歯槽骨の吸収により歯が失われる病態である。しかしながら、その病態は依然、不明な点が多く、その実態について十分に理解されていないのが現状である。

一方、骨の破壊をつかさどる唯一の細胞である破骨細胞は、骨芽細胞の産生する M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) と RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) の刺激により骨髄マクロファージから、破骨細胞へ分化することが知られている。1998年に RANKL が発見され、in vitro における破骨細胞研究が劇的に発展をし、様々な破骨細胞調整因子の発見がされている。しかしながら歯周病をはじめとする様々な骨破壊病変における生体内での破骨細胞分化過程は未だ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

以前の実験において、M-CSF、RANKL 欠損マウスに対してそれぞれ M-CSF、RANKL を打ち込む実験を行い、破骨細胞が出現する部位はこれらの因子の発現部位ではなく、骨のみに出現できることを明らかにした (Endocrinology 147:3366, 2006)。そこで我々は、骨芽細胞の存在部位に特定の破骨細胞前駆細胞が遊走されると考え、破骨細胞前駆細胞の探索を行った。実験の結果、通常の状態のみならず、RANKL の投与や、低 Ca 食による飼育などの急速に破骨細胞が必要な環境においても形成された破骨細胞は増殖を経ずに破骨細胞に分化することを見出した。我々は、破骨細胞の分化過程におい

て、増殖することなく破骨細胞に分化する前駆細胞 (cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors : QOP) を同定した (J Cell Biol 184:541, 2009)。そこで、歯周病などの炎症部位での破骨細胞の出現にも、QOP の遊走機構が関与していることを想定した。

そこで、QOP の詳細をさらに解析をおこない、さらに骨髄のみならず血中にも QOP が存在するか解析を行い、歯周病変部などの破骨細胞が必要とされる部位に QOP が集積するか解析することにより、歯周病をはじめとする骨破壊病変治療の新たなターゲットの発見に繋がると考え、本研究計画を申請した。

### 3. 研究の方法

QOP の詳細を解析するために、マウスの骨髄より、比重遠心分離法にて単球画分を回収後、RANK 抗体、c-Fms 抗体を用いて、QOP 画分 [RANK<sup>high</sup>, Fms<sup>low</sup>: RANK(+)  
細胞] をセルソーター (FACS Vantage SE : BD Biosciences San Jose, CA) にて回収する。QOP を含まない画分はコントロール画分として回収した。セルソーターによる QOP の分取は、研究協力者である菊池孝信教授 (信州大学・ヒト環境科学研究支援センター・機器分析部門) の御協力の下に行った。

得られた各画分に対して、マイクロアレイ解析を行い、各種遺伝子マーカーを解析した。マイクロアレイ解析計画に関しては、既に安孫子宜光教授 (日本大学松戸歯学部・生化学・分子生物学講座) と検討・討議を行った。

さらに、得られた各画分と、骨髄中に存在する破骨細胞を、電子顕微鏡 (transmission electron microscope: H-7600 80 kV; Hitachi, Tokyo) にて、形態学的に解析した。

さらに、生体内での急激な破骨細胞が必要な状態を再現するために、骨誘導因子 (rh BMP-2 : R and D systems Minneapolis, MN) 含有コラーゲンペレット (BMP-2 ペレット) を RANK 遺伝子欠損マウスの背筋膜下に移植後、2週間飼育した。その後、BMP-2 ペレットを回収し、5% carboxymethyl cellulose (CMC)

gelに包埋し、河本法にて凍結切片を作製し、抗RANK染色にて、QOPの局在を解析を行った。また、BMP-2により形成された破骨細胞が、QOP由来か調べるために、増殖する細胞の核に取り込まれるBromodeoxyuridine(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)を飲料水にて投与を行い、BMP-2ペレットを背筋膜下に移植後、2週間飼育した。その後、BMP-2ペレットを回収し、EDTAにて2週間脱灰を行いパラフィンにて包埋し、5 $\mu$ mの切片を作製した。

#### 4. 研究成果

セルソーターにて回収した各画分をマイクロアレイ解析にて各遺伝子発現を解析した結果、QOP画分[RANK<sup>high</sup>,Fms<sup>low</sup>:RANK(+)細胞]はFms(+)細胞[RANK<sup>low</sup>,Fms<sup>high</sup>]と比較して、Emr1(F4/80)、Itgam(CD11b)などのマクロファージ系マーカーは低い値を示したのに対して、Car II(Carbonic anhydrase II)、Mmp9(matrix metalloproteinase 9)、Acp5(acid phosphatase 5)、Tfrc(transferrin receptor)などの破骨細胞系マーカーは高い値を示した。また、QOPを電子顕微鏡にて形態的に破骨細胞およびF4/80陽性細胞(マクロファージ)と比較したところ、QOPはより破骨細胞に近い所見を示した。以上より、生体内のQOPはマクロファージより破骨細胞に近い細胞と考えられる。さらに各画分の分化能についても検討した。マクロファージは、破骨細胞以外に、樹状細胞への分化能や食食能も有する。一方、QOP画分は破骨細胞への分化能のみを有し、樹状細胞への分化能や食食能は著しく低い細胞であった。この結果より、QOP画分は破骨細胞分化に特化した細胞であることが明らかになった。

次に異所性骨のように骨髄のない部位に急速に破骨細胞が必要な環境におけるに形成される破骨細胞を解析したところ、形成された骨組織はほとんどがBrdU陽性であったが、破骨細胞は、ほとんどがBrdU陰性であった。また、その部位におけるQOPの集積を解析したところ、骨組織周囲に優位に集積が見られた。よって既に存在する細胞周期の停止したQOPが破骨細胞形成部位に特異的に遊走し、骨吸収刺激により破骨細胞に分化すると考えられる。本期間中に研究目標であるQOPの遊走因子の解析までは至らなかった。しかしながら、QOPの性状を詳細に解析し、より破骨細胞に近い細胞であることを明らかにした。よって更なる解析によりQOPの遊走因子を解明することにより、歯周病により誘導されるQOPの遊走因子を同定し、最終的にQOPの分化と遊走をコントロール

した歯周病治療を含む、骨疾患治療指針の確立することができる考える。

本研究は、QOPが破骨細胞形成部位(骨吸収部位)に特異的に遊走し、破骨細胞へ分化するという新たな概念を提唱した。本概念は、歯周病などの炎症性骨破壊病変に対して骨吸収因子の抑制という治療法とは異なる概念を打ち出すものであり、新規の骨疾患メカニズムの解明への一助となるものと考え

#### 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 2件)

- 1) Takahashi N, Muto A, Arai A, Mizoguchi T: Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. Adv Exp Med Biol 658:21-30 2010. (査読有)
- 2) Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Yamashita T, Hosoya A, Ninomiya T, Nakamura H, Yamamoto Y, Kinugawa S, Nakamura M, Nakamichi Y, Kobayashi Y, Nagasawa S, Oda K, Tanaka H, Tagaya M, Penninger JM, Ito M, Takahashi N (2009) Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. J Cell Biol 184: 541-554. (査読有)

[学会発表] (計 5件)

- ① 海瀬 聖仁、武藤昭紀、西田英作、佐藤 哲夫、吉成伸夫：歯周基本治療により改善が見られた薬物性歯肉増殖症の2症例 松本歯学会 2010年12月12日 長野
- ② Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Kobayashi Y, Penninger JM, Takahashi N : Characterization of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors：第26回内藤カンファレンス 2009年11月5日 淡路島
- ③ 破骨細胞分化に特化した前駆細胞は血流を介して破骨細胞形成部位に遊

走する。: 武藤昭紀, 溝口利英, 荒井敦, 小林泰浩, 宇田川信之, 高橋直之, 吉成伸夫 第4回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会 2009年11月6日 長野

④ 武藤昭紀, 溝口利英, 荒井敦, 小林泰浩, 中道裕子, 吉成伸夫, 宇田川信之, 高橋直之: 細胞周期の停止した静止期破骨細胞前駆細胞(QOP)の性状解析-QOPはB細胞マーカーを発現している-: 第27回日本骨代謝学会 2009年7月24日 大阪

⑤ 荒井敦, 溝口利英, 武藤昭紀, 小林泰浩, 川原一郎, 中村美どり, 宇田川信之, 山田一尋, 高橋直之: c-Fos 遺伝子欠損マウスを用いた静止期破骨細胞前駆細胞(QOP)の解析-c-FosはRANKの発現を誘導しQOP分化を制御する-: 第27回日本骨代謝学会 2009年7月24日 大阪

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

武藤 昭紀 (MUTO AKINORI )

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 50549433

