

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10178

研究課題名（和文）TNF-による骨細胞の遺伝子発現の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of osteocyte gene expression induced by TNF-a

研究代表者

小川 紗衣香 (Ogawa, Saika)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：60882397

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、TNF-が骨細胞に作用した際の遺伝子発現を網羅的に解析し、破骨細胞に対する影響を解明することを目的とする。骨細胞が緑色蛍光を発する5-6日齢のDMP1-Topazマウスから、cell sorterを用いて骨細胞の単離を行った。この骨細胞にTNF-を加えて培養しRNAシーケンスを行ったところ、ケモカインであるCxcl10の遺伝子発現の上昇を確認した。CXCL10は破骨細胞形成に影響を与えなかったが、破骨細胞前駆細胞の遊走を促進した。TNF-により骨細胞が発現するCXCL10は、破骨細胞前駆細胞の遊走を促進することで破骨細胞形成を増加させていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TNF-aが骨細胞に作用した際の遺伝子発現を網羅的に調べた報告はなく、特に高純度な骨細胞に対しては、報告は非常に少ない。そのため、炎症性サイトカインであるTNF-aの骨細胞に対する作用を明らかにすることは重要な研究である。また、骨細胞の骨代謝に関する未知の作用が明らかできる可能性やさらに骨代謝だけでなく他の様々な生体反応への作用を明らかにできる可能性があり重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to comprehensively analyze gene expression when TNF-a acts on osteocytes and elucidate its effects on osteoclast formation. Osteocytes were isolated using a cell sorter from 5-6 day old DMP1-Topaz mice whose osteocytes have green fluorescence. When osteocytes were cultured with TNF-a and an increase in gene expression of the chemokine Cxcl10 was found by RNA sequencing. CXCL10 did not affect osteoclast formation but promoted the migration of osteoclast precursor cells. It was suggested that CXCL10, which is expressed by osteocytes due to TNF-a, increases osteoclast formation by promoting the migration of osteoclast precursor cells.

研究分野：矯正歯科

キーワード：骨細胞 TNF 破骨細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、炎症性のサイトカインである TNF- α で破骨細胞が誘導されることがわかってきた。関節リウマチや歯周病などの感染による病的骨吸収は、TNF- α が主に関与しているものだと考えられている。また、申請者らの研究で矯正学的歯の移動においても TNF- α が発現し破骨細胞および骨形成に関与していることがわかっている (J Dent Res, 2008)。特に TNF- α が骨細胞を含む間質系細胞に作用することが重要だと見出している (Plos One, 2020)。一方、生理的な骨吸収に関しては骨細胞が RANKL を発現し、破骨細胞形成を誘導していることが新しくわかった (Nat Med, 2011)。また、申請者らの研究で TNF- α が骨細胞に作用し、RANKL の発現を増強し、破骨細胞形成を誘導することを見出している (Front. Immunol, 2019)。本研究では、TNF- α が骨細胞に作用することでどのような因子が増加し、あるいは減少しているか網羅的に解析することで、さらに TNF- α が骨細胞にどのような影響をあたえているのかそのメカニズムを解明することを目的とする。TNF- α の骨細胞の炎症性破骨細胞形成に対する影響を解明することは、骨免疫学 (Osteoimmunology) の発展だけでなく、骨代謝疾患への治療法の開発、また矯正学的歯の移動のメカニズムの解明にも繋がり、非常に意義のある研究と考えている。

2. 研究の目的

破骨細胞形成を誘導している細胞は長年、骨芽細胞だと考えられてきたが、骨細胞が RANKL を発現し、破骨細胞を誘導するという事が報告され (Nat Med, 2011) 骨細胞の破骨細胞形成に関する研究は、骨代謝の研究の中で非常に注目されている。この研究から、骨細胞がなくなると破骨細胞形成が減少すると考えられている。また、矯正学的歯の移動では歯根膜が圧迫される圧迫側に破骨細胞が出現し、歯槽骨を吸収して歯が移動していく。骨細胞を除去したマウスの歯に矯正力を加え、骨細胞を除去していないマウスと比較したところ骨細胞を除去したマウスは破骨細胞形成と歯の移動距離が減少した (J Dent Res, 2013)。また、申請者のグループでの研究で矯正学的歯の移動には TNF- α が関与していることも TNF レセプター欠損マウス (TNFR-/-) を用いた実験で報告している (J Dent Res, 2008)。また、申請者らのこれまでの研究でどの細胞が、in vivo で TNF- α による破骨細胞形成に重要な働きをしているのか検討した。この目的のために、野生型 (Wild type : WT) および TNF レセプター欠損 (TNFR-/-) マウスの骨髄細胞を致死量のラジエーションを用いて骨髄細胞を取り除いたそれぞれのマウスに骨髄移植を行い、マクロファージは TNFR を持っているが間質系細胞は TNFR を持っていない (WT>TNFR-/-)、逆にマクロファージは TNFR を持っていないが間質系細胞は TNFR を持っている (TNFR-/->WT) キメラマウスを作製した。TNF- α を投与して破骨細胞形成を解析した。その結果、TNF- α が直接的にマクロファージに作用して破骨細胞を誘導すること、また、TNF- α は、骨細胞を含む間質系細胞に作用して RANKL, M-CSF の発現を増加し破骨細胞形成を促進することで破骨細胞形成を増加することを明らかにした (J. Immunol, 2004, J Clin Invest, 2005)。また、申請者は、このキメラマウスを利用して、矯正学的歯の移動を行い、矯正学的歯の移動時に誘導される破骨細胞形成において、どの細胞が TNF- α と反応し重要な役割を演じているか、またそのメカニズムを in vivo で解明する研究を行なった。その結果、TNF- α 反応性の骨細胞を含む間質細胞は、矯正学的歯の移動における破骨細胞形成および骨吸収において重要であることを見出した (Plos One, 2019)。さらにこれは、TNF- α が骨細胞を含めた間質細胞に作用することで RANKL の発現が増加するメカニズムが重要であることを発見した (Plos One, 2019)。さらに、申請者グループでは、骨細胞特異的に蛍光を発する C57BL/6-Tg(Dmp1-Topaz)11kal/J マウスの頭蓋骨から、FACS を使用したほぼ 100% 純粋な骨細胞の単離方法を確立しており、この骨細胞に TNF- α を作用させると RANKL の発現を誘導することを見出している (Front. Immunol, 2019)。しかしながら、骨細胞に TNF- α が作用するとどのようなメカニズムで RANKL が誘導されるのか詳細に分かっていない。本研究では、TNF- α による骨細胞への影響を RNA シークエンスで網羅的に解明する。これにより TNF- α の骨細胞に対する作用が詳細に解明されれば、骨代謝研究の発展だけでなく医療の発展に役に立ち、さらには TNF- α が関与する矯正学的歯の移動のメカニズムの解明につながり、矯正歯科臨床にも役立つと考えている。

3. 研究の方法

(1) TNF- α が骨細胞に作用した際の遺伝子発現の RNA シークエンスによる解析

DMP1 は骨細胞において特異的に発現することが知られている。DMP1 プロモーターの下流に GFP の異型の Topaz を骨細胞が発現し、蛍光する 5-6 日齢の DMP1-Topaz (C57BL/6-Tg(Dmp1-Topaz)11kal/J) マウスの頭蓋骨にコラゲナーゼおよび EDTA を用いて段階的な酵素処理を行い、得られた Fraction2-5 を回収した。10%FBS を含む MEM 培地で 24 時間培養後、付着細胞のみを回収し、cell sorter (FACS Aria) により初代骨細胞として Topaz 陽性骨細胞の単離をおこ

なった。血清の入っていない MEM 培地で 1 日培養後、TNF- α を加え、24 時間培養後、Total RNA を抽出した。その後、RNA シークエンスをおこなった。

(2) RNA シークエンス解析で得られた増加制御および減少制御された破骨細胞関連遺伝子の real time RT-PCR による遺伝子発現の確認

(3) 8 週齢雄性 C57BL6/J マウスから作製した破骨細胞前駆細胞に RANKL、CXCL10 を加えて培養し、破骨細胞形成を TRAP 染色で評価した。

(4) CXCL10 による走化性を解析するため、破骨細胞前駆細胞を Transwell の上部チャンバーに播種し、下部チャンバーに CXCL10、CXCL10 中和抗体を加えて培養した。また、8 週齢雄性 TNF 受容体欠損マウスから作製した破骨細胞前駆細胞を Transwell の上部チャンバーに、骨細胞を下部チャンバーに播種し、TNF- α 、CXCL10 中和抗体を加えて培養した。

(5) 8 週齢雄性 C57BL6/J マウスの頭蓋部に PBS、TNF- α 、CXCL10 中和抗体を 5 日間注射で投与し、頭蓋冠の組織切片を作製して TRAP 染色で破骨細胞形成を評価した。

4. 研究成果

RNA-seq の解析により TNF- α を加えた骨細胞では、IL1A、Tnfsf11、IFNGR1 などの破骨細胞分化関連遺伝子の発現上昇が観察された。このことから、TNF- α 刺激を受けた骨細胞は、RANKL を含む様々な破骨細胞形成を促進する因子を増加すると考えられる。さらに骨細胞に TNF- α を作用させると、走化因子である Cxcl10 の遺伝子発現が増加した。CXCL10 は破骨細胞形成に影響を与えなかったが、破骨細胞前駆細胞の遊走を促進した。頭蓋冠では、CXCL10 中和抗体により破骨細胞数が減少した。TNF- α により骨細胞が発現する CXCL10 は、破骨細胞前駆細胞の遊走を促進することで破骨細胞の動員数を増加させていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ma Jinghan, Kitaura Hideki, Ogawa Saika, Ohori Fumitoshi, Noguchi Takahiro, Marahleh Aseel, Nara Yasuhiko, Pramusita Adya, Kinjo Ria, Kanou Kayoko, Kishikawa Akiko, Ichimura Atsuhiko, Mizoguchi Itaru	4. 巻 13
2. 論文標題 Docosahexaenoic acid inhibits TNF- α -induced osteoclast formation and orthodontic tooth movement through GPR120	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.929690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kinjo Ria, Kitaura Hideki, Ogawa Saika, Ohori Fumitoshi, Noguchi Takahiro, Marahleh Aseel, Nara Yasuhiko, Pramusita Adya, Ma Jinghan, Kanou Kayoko, Mizoguchi Itaru	4. 巻 23
2. 論文標題 Micro-Osteoperforations Induce TNF- α Expression and Accelerate Orthodontic Tooth Movement via TNF- α -Responsive Stromal Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2968 ~ 2968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23062968	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nugraha Alexander, Kitaura Hideki, Ohori Fumitoshi, Pramusita Adya, Ogawa Saika, Noguchi Takahiro, Marahleh Aseel, Nara Yasuhiko, Kinjo Ria, Mizoguchi Itaru	4. 巻 25
2. 論文標題 C-X-C receptor 7 agonist acts as a C-X-C motif chemokine ligand 12 inhibitor to ameliorate osteoclastogenesis and bone resorption	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2022.12594	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	溝口 到 (Mizoguchi Itaru) (20200032)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	北浦 英樹 (Kitaura Hideki) (60295087)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関