

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25年6月1日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390064

研究課題名（和文） 骨代謝における RANKL 遺伝子の機能解明

研究課題名（英文） Physiologic functions of RANKL in bone metabolism

研究代表者

池田 恭治（IKEDA KYOJI）

（独）国立長寿医療研究センター・運動器疾患研究部・部長

研究者番号：00222878

研究成果の概要（和文）：

RANKL の細胞特異的な病態生理機能を明らかにする目的で、RANKL flox マウスを作出し osterix-Cre マウスとの交配により骨芽細胞系列特異的な RANKL 遺伝子の欠損モデルを作製し解析した。エストロゲン欠乏による閉経後骨粗鬆症のモデルである卵巣摘除では、骨芽細胞系列で RANKL を欠損すると骨量減少はほとんど起こらないことが明らかになった。一方、CD4-cre マウスとの交配によって T 細胞において RANKL を欠損したモデルを解析したところ、ベースラインでの骨量はわずかではあるが有意に对照群より多いことが明らかになった。一方、卵巣摘除に対しては、对照群とほぼ同程度の骨量減少が起こったことから、エストロゲン欠乏に対する破骨細胞の活性化には、T 細胞ではなくて骨芽細胞系列が発現する RANKL が主役を果たすことが示唆された。さらに、関節リウマチにおける RANKL の産生源を解析する目的で、導入した KRN-TCR Tg マウスを NOD マウスと交配して K/BxN マウスを作出し血清をプールした。プール血清を野生型 B6 マウスに移入したところ、足関節の腫脹などの炎症所見と関節周囲の骨の変化を観察した。骨芽細胞系列で RANKL を KO したマウスにおいては、炎症所見の軽減はないものの、骨びらんが部分的に緩和している所見が得られた。

研究成果の概要（英文）：

The cytokine RANKL is essential for osteoclast development in bone. The cellular sources of RANKL for support of osteoclast generation under various pathophysiological conditions have remained unclear, however. In this study we have shown that inactivation of *Rankl* specifically in osteoblast lineage cells with the use of an *Osterix-Cre* transgene results in typical osteopetrosis in the trabecular compartment of the tibia, with the phenotype being much less marked in the vertebrae. In contrast to its effects on trabecular bone, osteoblastic deficiency of RANKL resulted in thinning of the femoral cortex in association with suppression of bone formation during the modeling process. Ablation of RANKL specifically in T cells resulted in a moderate but significant increase in tibial trabecular bone. Mice with osteoblastic deficiency of RANKL were protected from bone loss induced by ovariectomy and also from joint destruction associated with arthritis, whereas loss of RANKL in T cells did not confer such protection. Finally, inducible deletion of *Rankl* selectively in the osteoblasts at 6 wk of age resulted in an increase in bone mass in association with reduced bone resorption and formation at 12 wk. Our results thus suggest that RANKL produced by osteoblasts contributes to osteoclast development in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000

2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、病態医化学

キーワード：分子病態学

1. 研究開始当初の背景

骨の代謝は、破骨細胞が骨を吸収したあと、骨芽細胞がほぼ同量の新しい骨を付加することによって営まれる。破骨細胞が形成されるには、血球系の前駆細胞が骨芽細胞あるいはストローマ細胞と接触することが重要であることが1980年代に共存培養の系で明らかになり、これらの支持細胞が分泌あるいは細胞膜上に提示するM-CSFとRANKLが、破骨細胞形成に必須のサイトカインであることが1990年代に解明された。破骨細胞による骨吸収は、正常の骨代謝に必須である一方、機能の過剰は骨粗鬆症や関節リウマチの骨破壊などの中核となる病理像である。

RANKL KO マウスは、破骨細胞が形成されず完全な大理石骨病を呈することから、TNF ファミリーのRANKLは破骨細胞形成に必須のサイトカインである (Cell 1998)。その後、リコンビナントRANKLが作製され、骨髄マクロファージにM-CSFの存在下でRANKLを投与することにより破骨細胞が形成される。

従来破骨細胞の形成には、骨髄あるいは脾臓由来のマクロファージを、骨芽細胞あるいは骨髄ストローマ細胞と共存培養し、これに活性型ビタミンDあるいはプロスタグランジンE₂などで刺激することにより形成されていた。これらのホルモン・サイトカインが、骨芽細胞においてRANKL発現を誘導することにより、共存するマクロファージが破骨細胞へと分化させると理解されている。

このような経緯から、骨芽細胞系が破骨細胞形成のためのRANKLの産生源であると想定されているが、実際にin vivoでこのことを証明した研究はない。さらに、骨芽細胞系列だけではなく、免疫系の細胞、とりわけT細胞や樹状細胞にRANKLが発現することが知られており、RANKL KO マウスがリンパ節を欠如することからも、リンパ節の発生や免疫機能などにも重要な機能を果たしている。一方、T細胞で発現するRANKLの骨代謝における役割、とくに関節リウマチにおける骨破壊の病態への関与についてはまったく検証されて

いない。

2. 研究の目的

RANKL 遺伝子の flox マウスを作成し、細胞特異的 Cre マウスと交配することにより、細胞特異的な RANKL の生理機能を解明するとともに、骨粗鬆症や関節リウマチなどの病態における RANKL 発現細胞の寄与について明らかにする。

3. 研究の方法

破骨細胞の分化に必須のサイトカインである RANKL の flox マウスを作製し、これと細胞特異的 Cre マウスと交配することによって、骨芽細胞や T 細胞で RANKL を発現しないマウスを開発し、破骨細胞の形成過程や骨代謝への影響を解析することで、RANKL の生理環境および病態での意義を明らかにする。RANKL flox マウスを作製し、全身で発現する CAG-Cre マウスとの交配によって、破骨細胞がまったく形成されない大理石骨病になることを確認したことから、デザイン通りにシステムは機能している。

4. 研究成果

作成した RANKL flox マウスを Osx-Cre マウスと交配することにより骨芽細胞系列でのノックアウトマウスを樹立した (Δ OB)。 Δ OB マウスは、脛骨など四肢の長管骨では全身ノックアウトと同様の、典型的な大理石骨病を呈したが、腰椎などの体幹骨では軽度にとどまったことから、骨芽細胞系列の RANKL への依存度は部位によって異なることが明らかとなった。また海綿骨のようなモデリング骨とは対照的に、大腿骨骨幹部の皮質骨のようなモデリング骨においては、 Δ OB マウスでは対照群と比べて菲薄化しており、詳細な骨組織形態計測により、外膜側の骨形成が抑制されている結果であることが示された。また、海綿骨においても、とくに Δ OB ヘテロマウスにおいて、骨吸収の抑制がほとんどないにもかかわらず骨形成の指標が有意に低下していたことから、RANKL は破骨細胞の形成に関わるだけではなく破骨細胞から骨芽細胞へ

の連携にも何らかの機能を果たしている可能性が考えられた。

病態との関連について、 Δ OB マウスを卵巣摘除してエストロゲン欠乏にしても骨量減少はほとんど起こらず、骨芽細胞系列が発現する RANKL は、エストロゲン欠乏による骨吸収の亢進に中核的な役割を果たすことが示された。また、血清移入による関節リウマチモデルにおける解析では、 Δ OB マウスは、炎症指標にはほとんど影響しなかったが、小関節の破壊や関節近傍の骨粗鬆化に関わっていることを示唆する組織所見が得られた。

RANKL flox マウスを CD4-Cre マウスと交配することにより T 細胞で RANKL 遺伝子を欠失したモデルを作成した (Δ T)。 Δ T マウスは軽度であるがベースラインにおいて骨量の有意な増加が認められ、T 細胞由来 RANKL の骨代謝における生理機能が示された。一方、卵巣摘除によるエストロゲン欠乏においても、血清移入による関節リウマチモデルにおいても、 Δ T マウスは対照群と比較して有意な差異を示さなかったことから、これらの病態における T 細胞由来 RANKL の関与は否定的であると考えられた。

最後に、成熟骨における RANKL の生理機能を明らかにする目的で、RANKL flox; Osx-Cre マウスをドキシサイクリンの存在下で 6 週齢まで飼育して Cre の発現を抑えておいた後、Dox 投与を中止した状態で 6 週間飼育し、6-12 週の間のみ RANKL 発現を抑制したモデルを作成した。予想どおり、骨における RANKL の発現は優位に低下していた。マイクロ CT によって測定した骨量は優位に増加し（共同研究者の長崎大学・伊東昌子教授により測定）、血清 CTX 濃度も有意に低下していた。6 週間という比較的短い時間 Cre を発現させた場合、Cre は主に骨芽細胞にのみ発現しており、最近報告されている骨細胞での Cre 発現はほとんどないと考えられる。このような状況で、骨芽細胞でのみ RANKL の発現を抑えても骨吸収が抑制され骨量が増加したことから、骨芽細胞が産生する RANKL も骨代謝動態に貢献していることを示唆する。実際、骨サンプルを、骨芽細胞あるいは骨細胞を選択的に含む 2 つのフラクションに分画してそれぞれにおける RANKL/OPG の発現を定量したところ、RANKL はどの週齢においても骨芽細胞フラクションに多く、OPG は骨細胞フラクションに濃縮しているとの結果が得られた。以上から、RANKL の産生源として骨細胞が大半であるとする最近の報告とは異なり、骨芽細胞由来の RANKL も発現量としては多く、重要な生理機能を担っていると結論された。

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 Fumoto T, Takeshita S, Ito M, Ikeda K: Physiological functions of osteoblast lineage and T cell-derived RANKL in bone homeostasis. J Bone Miner Res 査読有 revise 中
- ② Indo Y, Takeshita S, Ishii K, Hoshii T, Aburatani H, Hirao A, Ikeda K: Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function. J Bone Miner Res 査読有 2013 in press (DOI 10.1002/jbmr.1976)
- ③ Takeshita S, Fumoto T, Matsuoka K, Park K, Aburatani H, Kato S, Ito M, Ikeda K: Osteoclast-secreted Cthrc1 in the coupling of bone resorption to formation. J Clin Invest 査読有 2013 in press

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① 池田恭治: Signaling between osteoclasts and osteoblasts 4th International Conference on Osteoimmunology. 6 月 20 日 Corfu, Greece, 2012
- ② 池田恭治: 骨の代謝と老化 第 54 回日本老年医学会学術集会 若手企画シンポジウム “筋骨格系の老化とその制御について” 6 月 29 日 東京, 2012
- ③ 池田恭治: リモデリングと骨質 シンポジウム “骨質” 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 7 月 19 日 東京, 2012
- ④ 池田恭治: 骨粗鬆症の動物モデル 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会シンポジウム 10 月 27 日 名古屋, 2012
- ⑤ Takeshita S, Fumoto T, Ikeda K: Pre-adipocytes Support Osteoclastogenesis through RANKL Expression. The 34th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 10 月 15 日 Minneapolis, Minnesota, 2012
- ⑥ Fumoto T, Takeshita S, Ito M, Ikeda K: Osteoblast- and T cell-derived RANKL in osteoclastogenesis. International Symposium on genetic and epigenetic control of cell fate, Nov 6, Kyoto, 2012
- ⑦ 池田恭治: Between bone resorption and formation 第 8 回 Bone Biology Forum 8 月 19 日 三島, 2011

〔図書〕(計 2 件)

- ① 伊藤明美, 池田恭治: 図解 わかる骨形態計測～骨のなかをのぞいてみよう～、医薬ジャーナル社、2010 年、大阪
- ② 池田恭治: 破骨細胞分化のメカニズム、“運動器疾患の予防と治療” p127-132, 長寿科学振興財団 2011

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 恭治 (IKEDA KYOJI)
(独) 国立長寿医療研究センター・運動器
疾患研究部・部長
研究者番号：00222878

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

麓 敏雄 (FUMOTO TOSHIO)
(独) 国立長寿医療研究センター・運動器
疾患研究部・研究員
研究者番号：80463206