

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593039

研究課題名(和文)小児期続発性ステロイド性骨粗鬆症における破骨細胞の骨吸収機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of osteoclastic bone resorption by glucocorticoid-induced osteoporosis in childhood.

研究代表者

牧 憲司(maki, kenshi)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60209400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：p130CasOCL-マウスは、破骨細胞は存在するものの、大理石骨病を呈した。p130CasOCL-マウスの骨髄細胞は野生型マウス同様に破骨細胞へと分化したが、アクチンリング形成と象牙片上での吸収窩形成が障害された。p130CasOCL-マウス由来の破骨細胞は、 $\alpha$ 3インテグリンやc-Srcのリン酸化などは正常であったが、アクチンの再構成に関わるRac1の活性は低下し、その局在も細胞質全体に分散していた。また、p130CasOCL-マウス由来の破骨細胞ではDock5がc-SrcやPyk2と会合できなかった。以上よりp130Casは破骨細胞による骨吸収に深く関与することが考えられた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of p130Cas on osteoclastic bone resorption, we generated osteoclast-specific p130Cas conditional knockout (p130CasOCL-) mice. p130CasOCL- mice exhibit a high bone mass phenotype caused by defect in multinucleation and cytoskeleton organization causing bone resorption deficiency. Bone marrow cells from p130CasOCL- mice were able to differentiate into osteoclasts in vitro. However, osteoclasts from p130CasOCL- mice failed to form actin rings and resorb pits on dentine slices. Although the initial events of osteoclast attachment, such as  $\alpha$ 3 integrin or Src phosphorylation, were intact, the Rac1 activity that organizes the actin cytoskeleton was reduced, and its distribution was disrupted in p130CasOCL- osteoclasts. Dock5, a Rho family guanine nucleotide exchanger, failed to associate with Src or Pyk2 in osteoclasts in the absence of p130Cas. These results strongly indicate that p130Cas plays pivotal roles in osteoclastic bone resorption.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、矯正小児系歯学

キーワード：破骨細胞 c-Src p130Cas アクチン 大理石骨病 ステロイド

## 1. 研究開始当初の背景

小児の成長期では様々なホルモンや局所因子が骨のリモデリングを調節し、顎骨をはじめ骨格の成長を促すことが知られている。近年、喘息などのアレルギー疾患を持つ小児の増加により、ステロイド製剤は必要不可欠となっている。ステロイドは強力な抗炎症作用や免疫抑制作用を有し、喘息やアレルギー疾患などの治療に効果的である一方、小児患者においては成長障害や骨粗鬆症などの副作用が重大な問題となっている。またステロイド使用患者の3~5割が続発性骨粗鬆症を惹起すると言われている。

成人における続発性ステロイド性骨粗鬆症の治療および管理には、破骨細胞をターゲットとしたビスホスホネート(BP)が第一選択薬として用いられている。しかし、BPの長期投与による骨質の低下や、特に近年報告されている顎骨壊死などの副作用が問題視されている。また、小児にBPを長期投与すると成長抑制が報告されており、BP投与の適応症は重篤な骨形成不全症などに限られている。多くの問題を抱えながらもBPのように破骨細胞を特異的にターゲットとした治療は続発性ステロイド性骨粗鬆症治療に有効である。しかし、成長期の小児においては、骨成長を抑制せず、かつリバーシブルな骨吸収抑制剤の開発が望まれている。

骨の成長を抑制せずに、骨吸収を抑制するためには、破骨細胞をターゲットにして骨吸収を自由に制御できることが理想である。つまり、破骨細胞の骨吸収そのものを抑制することが考えられるが、骨のリモデリングサイクルが約3ヶ月であることを考慮すると、破骨細胞の分化を制御するよりも、破骨細胞の骨吸収そのものを制御する方が即効性を期待でき、より効果的であると思われる。このような観点から、破骨細胞の骨吸収の分子機構を解明することが、小児続発性ステロイド性骨粗鬆症の治療に関する重要な手がかりになると考えた。

1991年にSorianoらはc-src欠損マウスでは、破骨細胞が存在するものの骨吸収できないことによる大理石骨病になることを報告した。このことは破骨細胞の骨吸収にc-Srcとc-Srcキナーゼの基質となる分子が必須であることを意味する。しかし、c-Srcの下流に位置し、破骨細胞の活性化に関与する分子は未だ明らかになっていない。Crk-associated substrate(p130Cas)はアクチンの再構成に関与するアダプタータンパク質であり、我々はこれまでにc-Src欠損マウス由来の破骨細胞ではp130Casのチロシン残基がリン酸化されないことから、p130Casがc-Srcの下流分子として破骨細胞による骨吸収に関与する可能性が示唆された。しかし、p130Cas欠損マウスは胎生初期に致死となるため、破骨細胞による骨吸収におけるp130Casの役割については不明であった。そこで我々は破骨細胞特異的にp130Casを欠損した(p130Cas<sup>AOCL</sup>)マウスを作製し、解析した。

## 2. 研究の目的

本研究は、c-Srcの下流分子として働くp130Casの破骨細胞による骨吸収機構を明らかにし、将来有望な小児続発性ステロイド性骨粗鬆症の治療へ展開できる可能性を探索することを目指す。

## 3. 研究の方法

### 1. 破骨細胞特異的 p130Cas ノックアウト p130Cas<sup>AOCL</sup>の作製と表現型の解析

広島大学原爆放射線医学研究所 本田浩章教授との共同研究で p130Cas<sup>flox</sup> マウスを供与頂いた。また東京大学分子生物学研究所加藤 茂明教授からカテプシン K-Cre マウスを供与頂き、これらを交配し、p130Cas<sup>AOCL</sup> マウスを作製した。8週齢オスの p130Cas<sup>flox/flox</sup> (対照) および p130Cas<sup>AOCL</sup> マウスの大腿骨・脛骨を摘出し、軟X線撮影、マイクロCT撮影、pQCTによる骨密度測定および通法に従って、骨形態計測をおこなった。

### 2. p130Cas<sup>AOCL</sup> マウス由来の破骨細胞の p130Cas の発現確認

対照および p130Cas<sup>AOCL</sup> マウスの骨髄細胞より分化した破骨細胞前駆細胞および破骨細胞の全タンパク質を調製した。各細胞における p130Cas および Src 関連分子の発現を各々の抗体を用いてウェスタンブロッティング法で確認した。さらに対照および p130Cas<sup>AOCL</sup> マウス由来の破骨細胞を抗 p130Cas 抗体を用いて免疫染色を行い、p130Cas の発現を検討した。

### 3. p130Cas<sup>AOCL</sup> マウス由来の破骨細胞の骨吸収能の検討

対照および p130Cas<sup>AOCL</sup> マウス由来の破骨細胞を TRAP とファロイジンの二重染色を行った。また、各マウス由来の骨髄細胞、破骨細胞前駆細胞および破骨細胞の全 RNA を調製し、他の骨吸収マーカー (DC-STAMP, MMP9, Cathepsin K) の発現をリアルタイム PCR 法で比較検討した。さらに、各マウス由来の骨髄細胞を調製し、コラーゲンゲル上でマウス初代骨芽細胞と活性型ビタミン D<sub>3</sub> 存在下で培養した。コラーゲナーゼ処理により形成された破骨細胞を回収し、象牙片上で 48 時間培養した。象牙片上で TRAP およびファロイジンの二重染色し、アクチンリングを有する TRAP 陽性多核細胞数を計測した。細胞を剥がした後に、ヘマトキシリン溶液で吸収窩を染色し、吸収窩面積を定量した。

### 4. p130Cas<sup>AOCL</sup> マウス由来の破骨細胞への p130Cas の遺伝子導入

p130Cas<sup>AOCL</sup> マウス由来の骨髄細胞に野生型 p130Cas および p130Cas の SH3 ドメインを欠失したドミナントネガティブ型 p130Cas (CasΔSH<sub>3</sub>) を遺伝子導入後、RANKL で刺激し、破骨細胞を誘導した。形成された破骨細胞を TRAP 染色とファロイジン染色を行い、アクチンリング形成を評価した。また野生型およびドミナ

トネガティブ型 p130Cas の発現は抗 p130Cas 抗体を用いたウェスタンブロットング法で検討した。

#### 4. 研究成果

8週齢オスの p130Cas<sup>AOCL</sup>-マウスでは、同腹の Control マウスと比較して X 線不透過像の亢進、海綿骨・皮質骨の増加、および骨密度の増加が認められた。さらに骨量 (BV/TV)、海綿骨の厚さ (Tb.Th)、海綿骨数 (Tb.N) の増加と海綿骨間隙 (Tb. Sp) の縮小が認められた。

各マウスの脛骨遠位端切片を作製し、TRAP 染色を行ったところ、p130Cas<sup>AOCL</sup>-マウスでは対照マウスと比較して多数の破骨細胞が認められた。また、骨吸収パラメーターの検討においても、p130Cas<sup>AOCL</sup>-マウスでは対照マウスと比較して多核の破骨細胞が多い傾向が見られた。骨量は骨形成と骨吸収のバランスによって制御されているので、骨吸収の低下による骨形成への二次的な影響を検討するために、各マウスにカルセインラベリングを行い、骨形成パラメーターについて検討した。両マウス間において、カルセインのラベル間隔、骨石灰化面 (MS)、骨石灰化の割合 (MS/BS)、骨石灰化速度 (MAR) および骨形成速度 (BFR) に変化はなかった。

対照および p130Cas<sup>AOCL</sup>-マウスの骨髄細胞から分化した破骨細胞前駆細胞および破骨細胞の全タンパク質を調製した。各細胞における p130Cas、Src のリン酸化、p130Cas の上流に存在する Pyk2 のリン酸化、Src の基質の1つと言われている Paxillin のリン酸化、破骨細胞分化のマスターレギュレーターである NFATc1 および破骨細胞の骨吸収に重要な Vav3 の発現を各々の抗体を用いてウェスタンブロットング法で確認した。p130Cas<sup>AOCL</sup>-マウス由来の破骨細胞で p130Cas の発現が有為に低下していたが、他の分子の発現量は両マウス由来の破骨細胞で変化なかった。また、骨髄細胞を RANKL 存在下で培養しても、破骨細胞に分化しない細胞も存在するため、各マウス由来の破骨細胞を抗 p130Cas 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、p130Cas<sup>AOCL</sup>-マウス由来の破骨細胞では、p130Cas の発現が確認できず、ファロジン染色においても、アクチンリングの形成は殆ど認められなかった。対照および p130Cas<sup>AOCL</sup>-マウス由来の破骨細胞を TRAP 染色とファロジン染色の二重染色を行ったところ、p130Cas<sup>AOCL</sup>-マウス由来の破骨細胞は多数形成されたが、対照マウス由来の破骨細胞と比較して小さく、アクチンリングを有する破骨細胞は殆ど存在しなかった。また、各マウス由来の骨髄細胞、破骨細胞前駆細胞および破骨細胞の全 RNA を調製し、破骨細胞の融合に関わる DC-STAMP、破骨細胞の有機質の分解に関与する MMP9 および Cathepsin K の発現をリアルタイム PCR 法で比較検討したが、これらの発現は、両マウス由来の破骨細胞間において変化なかった。しかし、アクチ

ンの再構成に関わる Rac1 の活性は低下し、その局在も細胞質全体に分散していた。また、p130Cas<sup>AOCL</sup>-マウス由来の破骨細胞では Rho ファミリーの活性調節に関わる Dock5 が c-Src や Pyk2 と会合できなかった。

p130Cas<sup>AOCL</sup>-マウス由来の骨髄細胞に野生型 p130Cas および CasΔSH<sub>3</sub> を遺伝子導入後、形成された破骨細胞を TRAP 染色とファロジン染色を行ったところ、野生型 p130Cas 遺伝子を導入すると、アクチンリングを有する破骨細胞が誘導されたが、empty および CasΔSH<sub>3</sub> 発現ベクターでは、アクチンリングを有する破骨細胞は形成されなかった。

#### 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2件)

1. Nagai Y, Osawa K, Fukushima H, Tamura Y, Aoki K, Ohya K, Yasuda H, Hikiji H, Takahashi M, Seta Y, Seo S, Kurokawa M, Kato S, Honda H, Nakamura I, Maki K, Jimi E p130Cas plays important roles in osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2013 28:2449-62.
2. Nakamura H, Aoki K, Masuda W, Alles N, Nagano K, Fukushima H, Osawa K, Yasuda H, Nakamura I, Mikuni-Takagaki Y, Ohya K, Maki K, Jimi E. Disruption of NF-κB1 prevents bone loss caused by mechanical unloading. *J Bone Miner Res.* 2013 28:1457-67.

[学会発表](計23件)

1. 谷口礼、福島秀文、自見英治郎、牧 憲司: RelB による Cot の発現上昇は破骨細胞分化に重要である、第52回一般社団法人日本小児歯科学会大会、平成26年5月16日・17日
2. Taniguchi R, Fukushima H, Maki K, Jimi E : RelB-induced Cot expression rescues RANKL-induced osteoclastogenesis by Cot/IKKα-induced NF-κB2 processing. Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2014, Kyushu Dental University, Kitakyushu, Japan Jan 25th 2014
3. 谷口礼、福島秀文、自見英治郎、牧 憲司: RelB の過剰発現は破骨細胞分化を誘導する、第31回日本小児歯科学会九州地方会大会、福岡歯科医師会館、平成25年10月20日
4. 谷口礼、福島秀文、自見英治郎、牧 憲司: RelB はNF-κB2のプロセッシングを誘導し、*aly/aly*マウスの破骨細胞分化抑制を解除する、第55回歯科基礎医学会学術大会、

- 岡山コンベンションセンター、平成25年9月20日-22日
5. Taniguchi R, Fukushima H, Jimi E, Maki K : Processing of NF- $\kappa$ B2 and the nuclear localization of RelB are required for RANKL induced osteoclast differentiation, The 24th International Congress of IAPD 2013 in Seoul, Korea, Coex convention center, June 12-15, 2013
  6. 谷口礼, 福島秀文, 自見英治郎, 牧 憲司: NF- $\kappa$ B2のプロセッシングとRelBの核移行は破骨細胞分化を誘導する, 第51回一般社団法人日本小児歯科学会大会、長良川国際会議場、平成25年5月23日・24日
  7. 谷口礼, 福島秀文, 牧 憲司, 自見英治郎: RelBの過剰発現は $aly/aly$ マウスの破骨細胞分化抑制を解除する, 第73回九州歯科学会学術大会、九州歯科大学講堂、平成25年5月18日・19日
  8. Taniguchi R, Fukushima H, Maki K, Jimi E : Processing of NF- $\kappa$ B2 and the nuclear localization of RelB are required for osteoclast differentiation, Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2013, Kyushu Dental University, Kitakyushu, Japan Jan 26th 2013
  9. 谷口礼, 福島秀文, 高村伊都子, 自見英治郎, 牧 憲司: 破骨細胞分化にはNF- $\kappa$ B2のプロセッシングとRelBの核移行が関与する, 第30回日本小児歯科学会九州地方大会、長崎大学医学部良順会館医学部記念講堂、平成24年10月28日
  10. 谷口礼, 福島秀文, 牧 憲司, 自見英治郎: 破骨細胞分化にはNF- $\kappa$ B2のプロセッシングとRelBの核移行が関与する, 第54回歯科基礎医学会学術大会、奥羽大学記念講堂、平成24年9月14-16日
  11. 永井香絵, 福島秀文, 大澤賢次, 田村幸彦, 青木和広, 大谷啓一, 中村仁美, 牧 憲司, 自見英治郎: p130Casは破骨細胞の機能発現に重要な役割をもつ, 日本歯科基礎医学会, 奥羽大学, 9月15日 福島
  12. 中村仁美, Alles Neil, 青木和広, 増田涉, 福島秀文, 大谷啓一, 牧 憲司, 自見英治郎: NF- $\kappa$ B 1 の欠損は非荷重による骨量減少を抑制する, 日本歯科基礎医学会, 奥羽大学, 9月15日 福島
  13. 永井香絵, 大澤賢次, 福島秀文, 保田尚孝, 田村幸彦, 青木和広, 大谷啓一, 加藤茂明, 牧 憲司, 仲村一郎, 自見英治郎: p130Casは破骨細胞の機能発現に関与する, 日本骨代謝学会学術大会, 京王プラザホテル, 7月25日 東京
  14. 中村仁美, 永井香絵, 古谷充朗, 福島秀文, 自見英治郎, 牧 憲司: 力学的非荷重による骨量減少におけるNF- $\kappa$ Bの役割, 小児歯科学会, 東京国際フォーラム, 平成24年5月12日, 東京
  15. 永井香絵, 福島秀文, 竹内靖博, 中村仁美, 自見英治郎, 牧 憲司: 破骨細胞による骨吸収におけるp130Casの役割, 小児歯科学会, 東京国際フォーラム, 平成24年5月12日, 東京
  16. 中村仁美, 永井香絵, 牧 憲司, 自見英治郎: 非荷重による骨量減少におけるNF- $\kappa$ Bの役割 平成24年5月18,19日第72回九州歯科学会 北九州
  17. 永井香絵, 大澤賢次, 福島秀文, 増田 涉, 中村仁美, 牧 憲司, 自見英治郎: p130Casは破骨細胞の機能発現に関与する。平成24年5月18,19日第72回九州歯科学会 北九州
  18. 中村仁美, 永井香絵, 福島直樹, 福島秀文, 自見英治郎, 牧 憲司 力学的非荷重による骨量減少におけるNF- $\kappa$ Bの役割 第49回日本小児歯科学会大会、いわて県民情報センター、岩手県 平成23年11月28、29日
  19. 永井香絵, 福島秀文, 中村仁美, 自見英治郎, 牧 憲司 小児統廃性骨粗鬆症の効果的な治療薬の検討 第49回日本小児歯科学会大会、いわて県民情報センター、岩手県 平成23年11月28日、29日
  20. 中村仁美, 永井香絵, 福島秀文, 自見英治郎, 牧 憲司 力学的非荷重による骨量減少におけるNF- $\kappa$ Bの役割 第29回日本小児歯科学会九州地方大会、九州歯科大学、福岡県 平成23年10月9、10日
  21. 永井香絵, 福島秀文, 中村仁美, 自見英治郎, 牧 憲司 小児統廃性骨粗鬆症に対する新しい骨吸収抑制剤の開発 中四国九州地方会・第29回九州地方会、九州歯科大学講堂、福岡県 平成23年10月9日、10日
  22. 中村仁美, 青木和広, 大谷啓一, Alles Neil, 永井香絵, 牧 憲司, 自見英治郎 非荷重による骨量減少におけるNF- $\kappa$ Bの役割 第53回歯科基礎医学会学術大会9月30~10月2日 岐阜
  23. 永井香絵, 福島秀文, 中村仁美, 牧 憲司, 自見英治郎: 破骨細胞による骨吸収におけるp130Casの役割 第53回歯科基礎医学会学術大会9月30~10月2日 岐阜
- 〔図書〕(計0件)
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)
- 名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

牧 憲司 (Kenshi Maki)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：60209400

### (2) 研究分担者

自見 英治郎 (EIJIRO JIMI)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：40276598

福島 秀文 (HIDEFUMI FUKUSHIMA)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
九州歯科大学・歯学部・講師  
福岡歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：70412624

### (3) 連携研究者：