

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792103

研究課題名(和文) LDL受容体ファミリーを介したF-spondinの硬組織破壊調節機構の解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism of F-spondin/LDL receptor family for hard tissue destruction

研究代表者

岡 広子(OKA, HIROKO)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・特任助教

研究者番号：60452588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：F-spondinは破骨先駆細胞の遊走および分化を抑制しており、その一部は破骨細胞前駆細胞に発現するLDL受容体ファミリーのLrp8を介していることが明らかとなった。また、破骨細胞前駆細胞のLDL受容体ファミリー自体が外因性のF-spondinの経路とは独立した別の経路で破骨細胞の遊走・分化を調節していることも示唆された。

一方、F-spondin発現細胞は、F-spondin分泌およびそれ以外の機能で硬組織破壊の調節に関わっていることが明らかとなった。また、F-spondinを発現することで発現細胞のLDL受容体ファミリー発現も影響を受けることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that F-spondin downregulated migration and differentiation of precursor osteoclasts partially via one of LDL receptor family, Lrp8. Moreover, our data suggested that LDL receptor family members on precursor osteoclasts, themselves regulated migration and differentiation of precursor osteoclasts independently of F-spondin.

F-spondin-expressed cells maintained osteoclastogenesis by secretory F-spondin and other factors. Also, F-spondin expression on cells affected the expression level of LDL receptor family members on it.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：硬組織破壊 歯周組織 F-spondin LDL受容体ファミリー

1. 研究開始当初の背景

歯周組織において、歯根周囲に特異的に発現する F-spondin は硬組織形成細胞の分化に関与している。その一方、硬組織破壊に及ぼす F-spondin の影響に関する報告はほとんどなかった。歯周組織の炎症性疾患である歯周炎では歯槽骨破壊が認められるが、歯根吸収が生じることは稀である。このことから、歯根周囲の特異的な細胞あるいはタンパク等による特異的な炎症性組織破壊の制御機構の存在が示唆されていた。申請者らは予備実験から、F-spondin が低密度リポタンパク (LDL) 受容体ファミリーを介して破骨細胞による硬組織破壊を調節しているという可能性を見出し、Lrp4 は、歯の形態形成に関与することが報告され、Lrp4 のノックアウトマウスでは過剰歯や癒合歯が出現することが報告されていた。また、Megalin/Lrp2 はビタミン D 結合タンパク受容体としても知られ、活性化ビタミン D の代謝に関与している。己抗体が発現していることが報告されている。このように、F-spondin および LDL 受容体ファミリーが「形成」と「破壊」の両面で硬組織代謝の制御において重要な役割を担っていることが示唆されていた。これらのことから、歯根周囲の細胞が分泌する F-spondin の LDL 受容体ファミリーを介した硬組織破壊制御が歯周組織特異的な炎症性組織破壊に関与している可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究は、LDL 受容体ファミリーに属する各受容体に注目し、下記の点を明らかにして、F-spondin と LDL 受容体を介した硬組織破壊制御の機構を解明することを目的とした。

1. 組織破壊に関与する細胞における F-spondin の結合する LDL 受容体ファミリーの発現の有無
2. 正常歯周組織および炎症刺激を受けた歯周組織における LDL 受容体ファミリーの発現分布
3. 硬組織破壊に関与する細胞に及ぼす F-spondin の影響とその経路

3. 研究の方法

培養細胞を用いて骨芽細胞系細胞の破骨細胞誘導能における F-spondin の役割と F-spondin の LDL 受容体ファミリーを介した破骨細胞系への影響の経路に関して以下の検討を行った。

1. 硬組織破壊に関与する細胞における LDL 受容体ファミリーの発現の有無
F-spondin を構成する TSR ドメインのうち

TSR1-4 は LDL 受容体ファミリーに属する Lrp8, Lrp2/megalin, Lrp4 および VLDL 受容体に結合する。申請者らは歯周組織を構成・維持していると考えられるいくつかの細胞の培養系および破骨細胞前駆細胞において、Lrp8 の発現を確認していた。RT-PCR 法により、硬組織破壊細胞への分化能を有するマウス骨髄由来マクロファージおよび RAW264 細胞における F-spondin との結合が知られているその他の LDL 受容体ファミリー (megalin/Lrp2, Lrp4, VLDL 受容体) の発現 mRNA 発現を検討した。

2. 正常歯周組織および炎症刺激を受けた歯周組織における LDL 受容体ファミリーの発現分布

RT-PCR 法により、マウス骨髄由来マクロファージおよび RAW264 細胞の RANKL 刺激による LDL 受容体ファミリー mRNA 発現変化を検討した。

3. 破骨細胞前駆細胞の遊走・分化に及ぼす F-spondin の影響とその経路 (Lrp8, megalin/Lrp2, Lrp4, VLDL 受容体, その他)

- a. 破骨細胞前駆細胞の遊走能に及ぼす影響:

F-spondin と培養チャンバー法を用い、上層に各 LDL 受容体ファミリー特異的な阻害 (siRNA) を処理した RAW264 細胞を播種し、下層にマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 用いて下層側に移動した細胞数を計測した。

- b. 破骨細胞前駆細胞の分化能に及ぼす影響:

マウス骨髄由来マクロファージおよび RAW264 細胞に、各 LDL 受容体ファミリー特異的な阻害 (siRNA) を処理した後、破骨細胞分化誘導因子として RANKL を用いて破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化に及ぼす F-spondin の作用の経路を検討した。

4. 骨芽細胞の破骨細胞誘導能に及ぼす F-spondin の影響

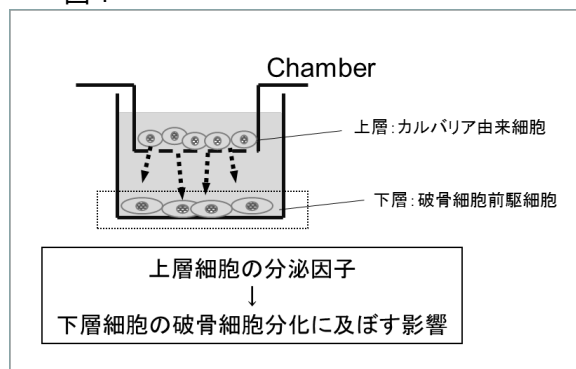
破骨細胞の誘導には骨芽細胞系細胞の発現する RANKL および OPG (オステオプロテジェリン) が大きく関与している。プライマリー細胞あるいは細胞株への遺伝子導入の準備が完結しなかったため、これに代えて F-spondin 過剰発現トランスジェニック (Tg) マウスのカルバリア由来の骨芽細胞系細胞を用いて検討を行った。RT-PCR 法により LDL 受容体ファミリーの発現および LPS 刺激時の RANKL および OPG mRNA の発現を検討した。

5. 破骨細胞誘導と硬組織破壊に及ぼす F-spondin/受容体経路の役割

実験 4 では、F-spondin を過剰に発現する骨芽細胞系細胞自体の破骨細胞分化誘導能

(RANKL および OPG)における F-spondin 発現の影響を明らかにできなかった。そこで、過剰発現細胞の分泌因子に注目し、破骨細胞誘導培養系にチャンバーを応用(図 1)し、F-spondin 過剰発現細胞が分泌する因子の RANKL が誘導する破骨前駆細胞の分化に与える影響と、それに対する F-spondin/受容体経路の影響を検討した。分泌因子の同定には F-spondin の中和抗体を用いた。受容体経路の検討には、事前に受容体の siRNA 処理を行った破骨細胞前駆細胞を用いた。

図 1



4. 研究成果

硬組織破壊に関与する細胞における LDL 受容体ファミリーの発現の有無と発現変化

RT-PCR を用いて、硬組織破壊細胞への分化能を有するマウス骨髄由来マクロファージに VLDLR, Lrp2, Lrp4, Lrp8 の発現を、RAW264 細胞に Lrp2, Lrp4, Lrp8 の発現を認めた。破骨細胞への分化を誘導する RANKL 刺激後、RAW264 細胞における Lrp2, Lrp8 の mRNA 発現はコントロール群に対して有意な差を認めなかった。一方で、Lrp4 mRNA は RANKL 刺激により有意に発現が増強された。また、コントロール群の Lrp2, Lrp8 の mRNA 発現は時間の経過とともに減少した。

破骨細胞前駆細胞の遊走・分化に及ぼす F-spondin の影響とその経路(Lrp8, Lrp2, Lrp4, VLDLR, その他)

RAW264 細胞と Lrp8 siRNA を用いた検討で、F-spondin が Lrp8 を介して M-CSF が引き起こす破骨細胞前駆細胞の遊走に及ぼす影響が明らかとなった。

LDL 受容体ファミリーアンタゴニストは、F-spondin による RANKL 刺激後の破骨細胞分化抑制作用を一部解消した。Lrp8 siRNA を用いた検討で、F-spondin が Lrp8 を介して遊走と同様に RANKL による破骨細胞分化を抑制していることが明らかとなった。この経路には、前駆細胞の c-fos および TRAF6 の経路が関与していた。さらに、LDL 受容体ファミリーアンタゴニスト投与自体が RANKL 刺激後の破骨細胞分化を抑制することも明らかとなった。

各受容体の siRNA を用いた検討においても、各 siRNA 処理自体がコントロール siRNA 処理群と異なる RANKL 誘導性の破骨細胞分化を示していたことから、LDL 受容体ファミリーの一部がそれ自体で F-spondin とは別の経路で破骨細胞分化誘導に関与している可能性が示唆された。

骨芽細胞の破骨細胞誘導能に及ぼす F-spondin の影響

連携研究者らの研究グループにより、F-spondin 過剰発現 Tg マウスが確立された。同マウスのカルバリアから採取した骨芽細胞系細胞で、F-spondin の過剰発現を確認した。また、F-spondin 過剰発現マウスのカルバリア細胞で LDL 受容体ファミリーの mRNA 発現は野生型に比べて増強傾向を示していた。細胞への遺伝子導入実験に代えて、同 Tg マウスの細胞を用いて、F-spondin 過剰発現が破骨細胞分化に及ぼす影響の検討を行った。同細胞に LPS 刺激を行い RANKL および OPG の発現は確認できた。しかし、過剰発現マウスの胎数が少なく、比較実験のための十分なプライマリー細胞が同時期に準備できなかったため、発現変化の検討には至らなかった。また、同細胞を用いて、細胞が分泌する F-spondin とその経路に関する検討を行った。その結果、同細胞が F-spondin を分泌しており、分泌された F-spondin が RANKL による破骨細胞誘導を抑制していること、その経路の一部が Lrp8 を介していること、が明らかとなった。その一方で、F-spondin 過剰発現細胞が F-spondin 以外の因子も分泌しており、その因子も破骨細胞分化誘導機構に影響を及ぼしていることも明らかとなった。

F-spondin 過剰発現マウスを用いた LPS による炎症モデル組織における破骨細胞の出現

F-spondin マウスで炎症モデルを作成したところ、炎症巣における多核巨細胞の発現がコントロールマウスの炎症巣よりも抑制されていることが明らかとなった。今後、このほかの炎症細胞への影響および多核巨細胞の性質・機能に関しては連携研究者とともに解明研究を展開する予定である。

その他

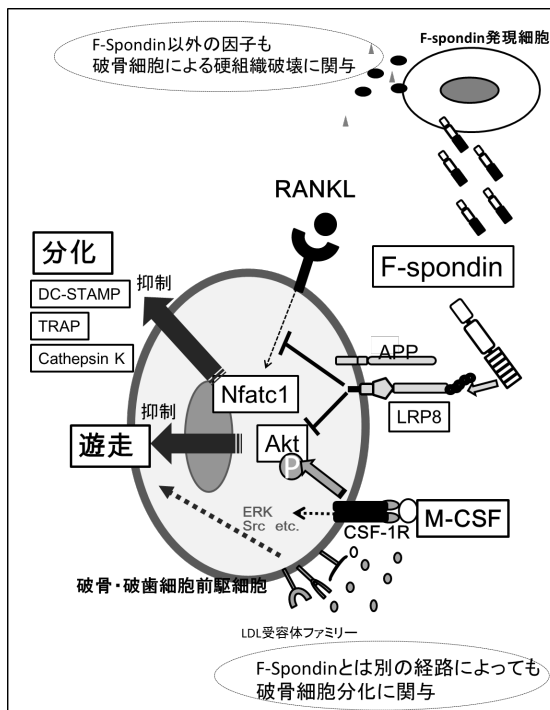
破骨細胞分化に及ぼす F-spondin 経路の検討の中で、RANKL 刺激による破骨細胞前駆細胞の p190 に影響を及ぼしていることを mRNA およびタンパクレベルで検出した。しかしながら、同経路に関わる F-spondin の受容体および下流のシグナル伝達に及ぼす影響は明らかにできなかった。F-spondin の直接的な影響のほか、間接的な影響も考えられ、この経路の詳細を明らかにするためには、さらなる検討が必要と考えられた。

今後の展望

F-spondin 発現細胞は、F-spondin 分泌および

びそれ以外の機能で硬組織破壊の調節に関わっていることが明らかとなった。また、F-spondin とは独立した経路で LDL 受容体自体も破骨細胞分化に影響を及ぼしていることが明らかとなった(図2)。本研究は主に in vitro の実験を展開して検討を行った。本研究結果を元に今後、過剰発現マウス等を用いた in vivo での受容体の発現変化と様々なタイプの炎症状況時の受容体の発現変化の炎症病変検討が、全身におけるメカニズムの多様性の解明に寄与すると考えられる。

図 2



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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 岡広子, 北川雅恵, 高田隆. F-spondin は歯周組織の硬組織破壊を抑制する. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会. 2013 年 9 月 21 日, 岡山コンベンションセンター (岡山).
2. 北川雅恵, 宮内睦美, 岡 広子, 外丸祐介, 高田 隆. セメント芽細胞が発現する F-spondin の抗炎症作用に関する検討. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会. 2013 年 9 月 22 日, 岡山コンベンションセンター (岡山).
3. Hiroko Oka, Masae Kitagawa, Takashi Takata. F-spondin Protects the Root

Surface from Resorption. The 60th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. 2012 年 12 月 15 日, 新潟コンベンションセンター (新潟).

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 広子 (OKA HIROKO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
特任助教

研究者番号: 6 0 4 5 2 5 8 8

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

北川 雅恵 (KITAGAWA MASAE)

広島大学・大学病院・助教

研究者番号: 1 0 4 0 3 6 2 7

高田 隆 (TAKATA TAKASHI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
教授

研究者番号: 1 0 1 5 4 7 8 3