

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792455

研究課題名（和文） 矯正力負荷によりコントロールされる破骨細胞分化機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of osteoclastogenesis regulated by orthodontic force

研究代表者

荒井 敦 (Atsushi Arai)

松本歯科大学 歯学部 助教

研究者番号：00532772

研究成果の概要（和文）：本研究では破骨細胞形成不全マウスを用いた解析により、破骨細胞前駆細胞の分化には c-Fos による RANK の発現上昇が破骨細胞分化に必須であると考え、c-Fos による RANK 発現上昇機構の解明を行った。野生型マクロファージに対する M-CSF 刺激は c-Fos と RANK の発現を上昇させたが、c-Fos 欠損マウス由来マクロファージでは M-CSF による RANK 発現上昇は認められなかった。c-Fos 欠損マウス由来マクロファージへの c-Fos 過剰発現は RANK の発現を上昇させた。これらのことより、破骨細胞前駆細胞において c-Fos は M-CSF/c-fms シグナルの下流で RANK の発現上昇に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that osteoclast precursors were detected as RANK-positive cells in bone tissues. RANK-positive cells were observed in bone tissues in RANKL^{-/-} mice, but not in c-Fos^{-/-} mice. c-Fos, but not RANKL, is required for the up-regulation of RANK in osteoclast precursors. Then, we analyzed the mechanism of c-Fos-mediated up-regulation of RANK in osteoclast precursors. Our results suggest that c-Fos plays essential roles not only in RANKL-induced formation of osteoclasts but also in M-CSF-induced formation of osteoclast precursors.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・歯学 細目：矯正・小児系歯学

キーワード：破骨細胞，破骨細胞前駆細胞，RANK，RANKL，c-Fos，M-CSF，c-fms
マクロファージ，矯正力，歯の移動

1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞が発現するRANKLは、破骨細胞前駆細胞が発現するRANKに作用することにより、破骨細胞分化を誘導する。これまで矯正治療時に出現する破骨細胞の出現機構は、間葉系細胞が発現するRANKL、OPG(RANKLのおとり受容体)を中心として説明がなされてきた。Kanzakiらは、歯根膜線維芽細胞がRANKLを発現し、破骨細胞分化を支持するこ

とを示し(J Dent Res 80: 887, 2001)、さらに、メカニカルストレスが、歯根膜線維芽細胞のPGE2産生を誘導し、その結果、PGE2のオートクライン作用によりRANKLの発現が上昇することを報告した(J Bone Miner Res 17: 210, 2002)。以前我々はメカニカルストレスが破骨細胞前駆細胞のRANK発現上昇を惹起する可能性を見出したことから、破骨細胞前駆細胞のRANKの発現上昇が圧迫側での破骨細胞の出現を促進する中心

的な役割を担うことを想定している。このメカニズムの解明が歯科矯正治療に貢献することを確信し本研究を行った。

これまでの報告から破骨細胞分化に必須なRANKLおよび転写因子c-Fosの遺伝子欠損マウスの骨組織には破骨細胞が存在しない。そこで、それぞれ遺伝子欠損マウスの骨表面のRANK陽性の破骨細胞前駆細胞の局在を解析した。RANKL欠損マウスの脛骨ではRANK陽性細胞が存在するが、c-Fos欠損マウスではRANK陽性細胞が認められなかった。c-Fosは破骨細胞の分化過程において必須の因子である事が知られていたが(Science 266 : 443-48, 1994.), これまでの結果から、c-Fosが破骨細胞前駆細胞におけるRANKの発現上昇、および骨組織への局在に必要であることが示唆されたことからメカニカルストレスによる破骨細胞分化においてもc-FosによるRANK発現上昇が重要であるという着想に至った。

2. 研究の目的

我々は、破骨細胞への分化がコミットした破骨細胞前駆細胞を同定した(Mizoguchi et al. J Cell Biol 184: 541-54, 2009)。破骨細胞は矯正力負荷時に多数出現し、骨改造の中心的役割を担うが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。破骨細胞分化機構の解明は効率的な矯正治療の開発に繋がることが予想される。近年、メカニカルストレスにより破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が惹起される可能性を示す所見を得た。そこで、矯正力によりコントロールされる破骨細胞形成機構における破骨細胞前駆細胞の分化メカニズムの解明を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では破骨細胞前駆細胞の分化機構解明を目的として研究計画を作成した。研究目的達成のために学術的背景でも述べたc-FosによるRANK発現上昇のメカニズム解明を最優先課題とした。

・ M-CSF 受容体(c-fms) 陽性細胞の局在

RANKL 欠損マウスならびに c-Fos 欠損マウスの脛骨の凍結切片を作成し、抗 c-fms 抗体にて免疫染色をおこなった。

・ c-Fos 発現誘導因子の同定

c-Fos 欠損マウスおよび野生型マウス脾臓由来マクロファージに M-CSF を添加し、Real time PCR 法および Westernblotting 法にて RANK, c-Fos の発現変動の解析をおこなった。

・ c-Fos, RANK の過剰発現による c-Fos, RANK の発現変動

c-Fos 欠損マウスおよび野生型マウス脾臓由来マクロファージに c-Fos あるいは RANK をそれぞれ過剰発現させ、c-Fos, RANK の発現変動を Westernblotting 法にて解析をおこなった。

4. 研究成果

・ M-CSF 受容体(c-fms) 陽性細胞の局在

RANKL 欠損マウスならびに c-Fos 欠損マウスの骨表面の M-CSF 受容体陽性細胞の局在を解析した。これまでの研究結果より、RANK 陽性細胞は RANKL 欠損マウスの骨表面にのみ存在し、c-Fos 欠損マウスでは認められなかった。M-CSF 受容体(c-fms)陽性細胞は、RANKL 欠損マウスおよび c-Fos 欠損マウスの骨組織の両方に認められた(図1)。

脛骨におけるRANK陽性細胞ならびにfms陽性細胞の局在

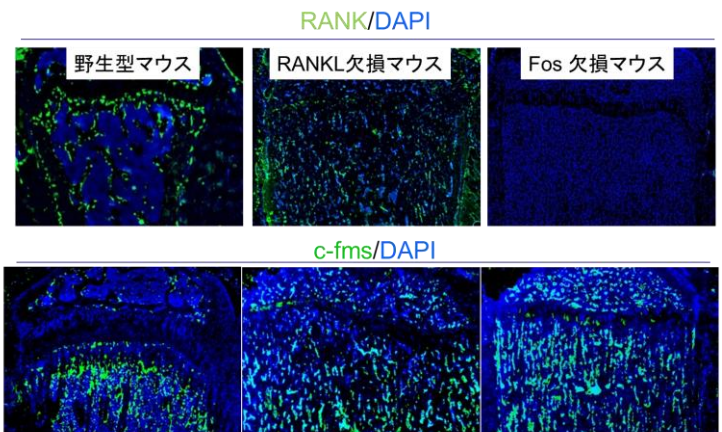


図1 抗RANK抗体(上段) 抗c-fms抗体(下段)による免疫染色像

・ c-Fos 発現誘導因子の同定

野生型マウス由来マクロファージに対する M-CSF 刺激は、c-Fos と RANK の発現を上昇させた。一方、c-Fos 欠損マウス由来マクロファージでは M-CSF 刺激による RANK の発現上昇は認められなかった(図2)。

M-CSFはc-Fosを介してRANKの発現を上昇させる

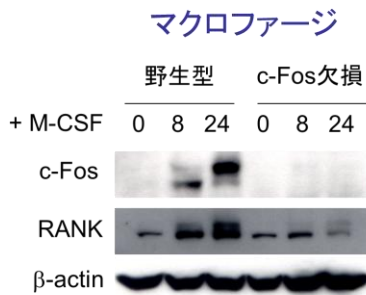


図2 M-CSF刺激によるc-Fos発現誘導因子の同定

・c-Fos、RANK の過剰発現による c-Fos、RANK の発現変動

c-Fos 欠損マウス由来マクロファージへの c-Fos の過剰発現は、RANK の発現を上昇させた (図 3)。しかし、c-Fos 欠損マウス由来マクロファージへの RANK の過剰発現は、RANKL 誘導性の破骨細胞分化をレスキューできなかった (図 4)。

c-Fosの過剰発現はRANKの発現を上昇させる

c-Fos欠損マウス由来マクロファージ

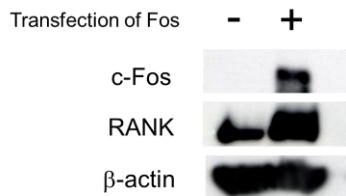


図3 c-Fos過剰発現によるRANKの発現変動

c-Fos欠損マウス由来マクロファージでの RANKの過剰発現は破骨細胞分化を誘導しない

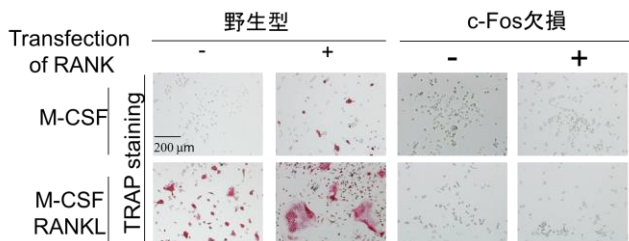


図4 RANK過剰発現による破骨細胞分化への影響

これまで c-Fos は、RANKL/RANK シグナルの下流でのみ破骨細胞分化に寄与すると考えられてきた。今回の結果より、破骨細胞前駆

細胞において c-Fos は、M-CSF/c-Fms シグナルの下流で RANK の発現上昇にも必要であることが明らかになった。骨表面における骨芽細胞由来の M-CSF は、破骨細胞前駆細胞の RANK の発現を上昇させることにより、効率的に破骨細胞分化を誘導することが示唆された。

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. Nakamichi Y, Mizoguchi T, Arai A, Kobayashi Y, Sato M, Penninger JM, Yasuda Y, Kato S, DeLuca HF, Suda T, Udagawa N, Takahashi N: (2012) Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through vitamin D-induced IL 34 expression in osteopetrotic op/op mice. PNAS. Jun;19(109)10006-10011. (査読有) 10.1073/pnas.1207361109
2. Arai A, Mizoguchi T, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Yasuda H, Penninger JM, Yamada K, Udagawa N, Takahashi N: (2012) Fos plays an essential role in the upregulation of RANK expression in osteoclast precursors within the bone microenvironment. J Cell Sci. Feb;12(125):2910-17. (査読有) 10.1242/jcs.099986
3. Muto A, Mizoguchi T, Udagawa N, Ito S, Kawahara I, Abiko Y, Arai A, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Penninger JM, Noguchi T, Takahashi N: (2011) Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. J Bone Miner Res. Dec;26(12):2978-90. (査読有) 10.1002/jbmr.490

[学会発表] (計 6 件)

1. 2012 the American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting 2012 年 10月 c-Fos plays an essential role in up-regulation of RANK expression in osteoclast precursors A. Arai, T. Mizoguchi, Y. Kobayashi, T. Yamashita, K. Yamada, J. M. Penninger, N. Udagawa,

- N. Takahashi : (Journal of Bone and Mineral Research 23, suppl 1: S179, 2012)
2. IOF Regionals 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting ANZBMS Annual Scientific Meeting, with JSBMR 2011年 9月 BMP-induced ectopic bone formation in c-Fos-deficient mice M. Nakamura, T. Ninomiya, T. Mizoguchi, A. Arai, N. Takahashi, N. Udagawa: (第2回アジア太平洋骨粗鬆症学会プログラム抄録集 : p640, 2011)
 3. IOF Regionals 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting ANZBMS Annual Scientific Meeting, with JSBMR 2011年 9月 c-Fos plays an essential role in up-regulation of RANK expression in osteoclast precursors A. Arai, T. Mizoguchi, Y. Kobayashi, T. Yamashita, K. Yamada, J. M. Penninger, N. Udagawa, N. Takahashi : (第2回アジア太平洋骨粗鬆症学会プログラム抄録集 : p538, 2011)
 4. 松本歯科大学学会 2011年 7月
in vivoにおける破骨細胞分化機構の解析 -M-CSFはc-Fosを介し前駆細胞のRANKを上昇する: 荒井敦, 溝口利英, 小林泰浩, 山下照仁, 山田一尋, 宇田川信之, 高橋直之
 5. 第29回日本骨代謝学会 2011年 7月
生体内における破骨細胞分化機構の解析 -M-CSFはc-Fosを介して破骨細胞前駆細胞のRANK発現を上昇する-: 荒井敦, 溝口利英, 原田卓, 武藤昭紀, 小林泰浩, 山下照仁, 保田尚孝, 山田一尋, 宇田川信之, 高橋直之: 第29回日本骨代謝学会プログラム抄録集 : p186, 2011)
 6. 第29回日本骨代謝学会 2011年 7月
c-Fos遺伝子欠損マウスを用いたBMP誘導性異所性骨形成に関する解析中村みどり, 二宮 禎, 溝口利英, 荒井敦, 高橋直之, 宇田川信之: 第29回日本骨代謝学会プログラム抄録集 : p212, 2011)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒井 敦 (Atsushi Arai)
松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号 : 00532772