

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390359

研究課題名(和文)破骨・骨芽細胞制御による骨恒常性制御

研究課題名(英文)Regulation of bone homeostasis by controlling osteoclasts and osteoblasts

研究代表者

宮本 健史 (Miyamoto, Takeshi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70383768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はBlimp1がアダルトにおける破骨細胞分化と骨量制御に必須の機能を有すること、アダルトにおけるBlimp1の抑制により強力な破骨細胞形成の抑制と骨量増加を認めることを見出した。我々はさらにOC-STAMPが破骨細胞の細胞融合に必須であり、OC-STAMP欠損マウスの樹立により破骨細胞の細胞融合が完全に阻害されることを見出した。また、骨芽細胞においてはBcl6がStat1の発現抑制を介して分化を制御していること、Bcl6欠損マウスに見られる骨芽細胞形成不全は、Bcl6/Stat1二重欠損マウスにおいて回復することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Bone homeostasis is regulated in a delicate balance between bone resorbing osteoclasts and bone forming osteoblasts. In this study, we found that B lymphocyte induced maturation protein 1 (Blimp1) plays a crucial role in regulating osteoclastogenesis and bone mass at an adult stage, and targeting Blimp1 in adult mice resulted in significant inhibition of osteoclast formation followed by increased bone mass. We also found that osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP) is required for osteoclast cell-cell fusion, and OC-STAMP-deficient mice exhibited complete abrogation of osteoclast cell-cell fusion. We further found that B cell lymphoma 6 (Bcl6) plays a role in regulating osteoblastogenesis via suppressing expression of signal transducer and activator of transcription 1 (Stat1), and Bcl6-deficient osteoblasts showed altered differentiation owing to Stat1 elevation. Bcl6/Stat1 doubly deficient mice exhibited reversed osteoblastogenesis compared with Bcl6-deficient mice.

研究分野：整形外科

キーワード：骨代謝 破骨細胞 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

骨代謝の恒常性は、骨吸収能を担う破骨細胞と、骨形成能を有する骨芽細胞との絶妙なバランスの上に成り立っている。破骨細胞あるいは骨芽細胞の制御によっては、骨量変化に直結する。申請者は、破骨細胞特異的な転写抑制因子 B lymphocyte induced maturation protein 1 (Blimp1) 欠損マウスでは破骨細胞形成の抑制から骨量増加を示すことを、また osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP) が破骨細胞分化に伴い発現が著しく上昇すること、転写抑制因子 B cell lymphoma 6 (Bcl6) 欠損マウスでは骨芽細胞の機能抑制と骨量減少を示すことを見出していた。

2. 研究の目的

本研究課題では、破骨細胞ならびに骨芽細胞に発現する機能分子の制御により、骨量を制御するための分子機構を解明することを目的とした。このことにより、骨粗鬆症などの骨量減少性疾患に対する治療標的を同定することを試みることにした。

3. 研究の方法

破骨細胞については、アダルトにおいて全身的に Blimp1 を欠損する Mx Cre/Blimp1 flox マウスを作製し、*in vivo* では破骨細胞形成等を骨形態計測で、また骨密度を DEXA 法にて計測する。また *in vitro* においても、破骨細胞分化能を評価する。OC-STAMP については、OC-STAMP 欠損マウスの解析を進めるとともに、OC-STAMP 過剰発現マウスを作製し、OC-STAMP 欠損マウスと交配させることで、OC-STAMP 欠損マウスの表現型が回復するかを解析することとした。Bcl6 については、転写抑制因子である Bcl6 の転写抑制標的を同定し、当該遺伝子欠損マウスと Bcl6 欠損マウスとの二重欠損マウスを作製し、骨代謝状態の評価を行う予定とした。

4. 研究成果

Mx Cre/Blimp1 flox マウスに対して PolyI/PolyC 投与によりアダルトにて全身的な Blimp1 欠損を誘導すると、強力な破骨細胞抑制による著しい骨密度の上昇を認めた (J Biol Chem 2012)。 *In vitro* においても同様に、Blimp1 抑制により著しく破骨細胞分化が抑制されることを見出した。Blimp1 欠損マウスは胎生致死であるが、アダルトにおいて Blimp1 を全身的に恒常的に抑制しても致死的な影響は見られず、Blimp1 は発生期に必須の役割を担うものの、アダルトにおいては主に破骨細胞分化制御から骨量制御の役割を担うことが明らかになった (J Biol Chem 2012)。

OC-STAMP については、まず OC-STAMP 欠損マウスにおいて *in vivo* ならびに *in vitro* ともに破骨細胞の細胞融合が完全に抑制されるという、驚くべき表現型を見出した。

OC-STAMP 欠損マウス由来の破骨細胞は、単核の破骨細胞までの分化は抑制されていないことから、OC-STAMP は破骨細胞の分化ではなく、細胞融合に特異的に機能する分子であることが明らかとなった (J Bone Miner Res 2012)。 また、OC-STAMP 欠損マウスと OC-STAMP Tg マウスとの交配により、OC-STAMP 欠損マウスにみられた破骨細胞の細胞融合障害は完全に回復することを確認している。 また、破骨細胞の細胞融合は骨吸収には必須ではなく、単核の破骨細胞も骨吸収が可能であるという dendritic cell specific transmembrane protein (DC-STAMP) 欠損マウスで見出した表現型と全く同様の表現型を OC-STAMP 欠損マウスにおいても確認した (J Bone Miner Res 2012)。

Bcl6 については、まず Bcl6 欠損マウスでは骨芽細胞機能不全による骨量減少を見出した。 Bcl6 の consensus binding site 検索から、転写抑制標的因子として signal transducer and activator of transcription 1 (Stat1) を同定した。 Bcl6 欠損マウス由来の骨芽細胞では Stat1 の発現が mRNA ならびに蛋白レベルで増加することを見出した (Biochem Biophys Res Commun. 2015)。 そこで、Stat1 欠損マウスと Bcl6 欠損マウスとを交配し二重欠損マウスを作製したところ、Bcl6 欠損マウスに見られた骨芽細胞機能抑制ならびに骨量減少は部分的にはあるものの有意に回復した。 *In vitro* においても同様に、有意に低下した骨芽細胞分化は二重欠損マウスにおいて、やはり部分的ではあるものの有意に回復することを見出した。 Stat1 は骨量減少性疾患において、骨芽細胞を活性化させ、骨量を増加させるための治療標的であることが示された (Biochem Biophys Res Commun. 2015)。

以上の解析から、破骨細胞および骨芽細胞それぞれにおいて、特徴的な機能分子の同定と、骨量を増加させるための方向性が示された。これらの成果は国内外からも高く評価され、論文としての報告の他、多くの招待講演の機会を得た。今後はこれらの成果を基に、臨床応用への方法論を検討していく必要があると考えられた。

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 21 件)

*corresponding

1. Fujie A, Funayama A, Miyauchi Y, Sato Y, Kobayashi T, Kanagawa H, Katsuyama E, Hao W, Tando T, Watanabe R, Morita M, Miyamoto K, Kanaji A, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y and *Miyamoto T. Bcl6 promotes osteoblastogenesis through Stat1 inhibition. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Feb 13;457(3):451-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.012. 査読あり

- り
2. Kanagawa H, Niki Y, Kobayashi T, Sato Y, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Miyamoto K, Tando T, Watanabe R, Morita M, *Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T. Mycobacterium tuberculosis promotes arthritis development through toll-like receptor 2. *J Bone Miner Metab*. 2015 Mar;33(2):135-41. doi: 10.1007/s00774-014-0575-9. 査読あり
 3. Katsuyama E, Miyamoto H, Kobayashi T, Sato Y, Hao W, Kanagawa H, Fujie A, Tando T, Watanabe R, Morita M, Miyamoto K, Niki Y, *Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T. Interleukin-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK4) promotes inflammatory osteolysis by activating osteoclasts and inhibiting formation of foreign body giant cells. *J Biol Chem*. 2015 Jan 9;290(2):716-26. doi: 10.1074/jbc.M114.568360. 査読あり
 4. Okabe K, Kobayashi S, Yamada T, Kurihara T, Tai-Nagara I, Miyamoto T, Mukoyama YS, Sato TN, Suda T, Ema M, Kubota Y. Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. *Cell*. 2014 Oct 23;159(3):584-96. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.025. 査読あり
 5. Sato Y, Miyauchi Y, Yoshida S, Morita M, Kobayashi T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Tando T, Watanabe R, Miyamoto K, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, *Miyamoto T. The Vitamin D Analogue ED71 but Not 1,25(OH)2D3 Targets HIF1 α Protein in Osteoclasts. *PLoS One*. 2014 Nov 6;9(11):e111845. doi: 10.1371/journal.pone.0111845. eCollection 2014. 査読あり
 6. Fujita N, Hirose Y, Tran CM, Chiba K, Miyamoto T, Toyama Y, Shapiro IM, Risbud MV. HIF-1-PHD2 axis controls expression of syndecan 4 in nucleus pulposus cells. *FASEB J*. 2014 Jun;28(6):2455-65. doi: 10.1096/fj.13-243741. 査読あり
 7. Mori T, Sato Y, Miyamoto K, Kobayashi T, Shimizu T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Tando T, Iwasaki R, Kawana H, Morioka H, Matsumoto M, Saya H, Toyama Y, *Miyamoto T. TNF α promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state. *Oncogene*. 2014 Aug 14;33(33):4236-41. doi: 10.1038/onc.2013.545. 査読あり
 8. Odagiri H, Kadomatsu T, Endo M, Masuda T, Morioka MS, Fukuhara S, Miyamoto T, Kobayashi E, Miyata K, Aoi J, Horiguchi H, Nishimura N, Terada K, Yakushiji T, Manabe I, Mochizuki N, Mizuta H, Oike Y. The Secreted Protein ANGPTL2 Promotes Metastasis of Osteosarcoma Cells Through Integrin α 5 β 1, p38 MAPK, and Matrix Metalloproteinases. *Sci Signal*. 2014 Jan 21;7(309):ra7. doi: 10.1126/scisignal.2004612. 査読あり
 9. *Miyamoto T. Role of osteoclasts in regulating hematopoietic stem and progenitor cells. *World J Orthop*. 2013 Oct 18;4(4):198-206. doi: 10.5312/wjo.v4.i4.198. 査読あり
 10. Nakayama M, Niki Y, Kawasaki T, Takeda Y, Ikegami H, Toyama Y, Miyamoto T. IL-32-PAR2 axis is an innate immunity sensor providing alternative signaling for LPS-TRIF axis. *Sci Rep*. 2013 Oct 16;3:2960. doi: 10.1038/srep02960. 査読あり
 11. *Miyamoto T. STATs and macrophage fusion. *JAKSTAT*. 2013 Jul 1;2(3):e24777. doi: 10.4161/jkst.24777. 査読あり
 12. Miyauchi Y, Sato Y, Kobayashi T, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Miyamoto K, Tando T, Morioka H, Matsumoto M, Chambon P, Johnson RS, Kato S, Toyama Y, *Miyamoto T. HIF1 α is required for osteoclast activation by estrogen deficiency in postmenopausal osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 8;110(41):16568-73. doi: 10.1073/pnas.1308755110. 査読あり
 13. *Miyamoto T. Identification and characterization of osteoclast precursor cells. *BoneKEy*. 2013 May 15; 10: Article number:346. 査読あり
 14. Ishikawa T, Shimizu T, Ueki A, Yamaguchi SI, Onishi N, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Morioka H, Nakayama R, Kobayashi E, Toyama Y, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Yamaguchi R, Miyano S, Saya H. Twist2 functions as a tumor suppressor in murine osteosarcoma cells. *Cancer Sci*. 2013 Jul;104(7):880-8. doi: 10.1111/cas.12163. 査読あり
 15. Miyamoto H, Katsuyama E, Miyauchi Y, Hoshi H, Miyamoto K, Sato Y, Kobayashi T, Iwasaki R, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Fujie A, Hao W, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, *Miyamoto T. An essential role for STAT6-STAT1 protein signaling in promoting macrophage cell-cell fusion. *J Biol Chem*. 2012 Sep 21;287(39):32479-84. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22865856>, 査読あり
 16. Miyauchi Y, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Hoshi H, Miyamoto K, Sato Y, Kobayashi T, Akiyama H, Morioka H,

- Matsumoto M, Toyama Y, *Miyamoto T. Conditional inactivation of Blimp1 in adult mice promotes increased bone mass. *J Biol Chem*. 2012 Aug 17;287(34):28508-17. doi: 10.1074/jbc.M112.356634. 査読あり
17. Niki Y, Takeuchi T, Nakayama M, Nagasawa H, Kurasawa T, Yamada H, Toyama Y, Miyamoto T. Clinical Significance of Cartilage Biomarkers for Monitoring Structural Joint Damage in Rheumatoid Arthritis Patients Treated with Anti-TNF Therapy. *PLoS One*. 2012;7(5):e37447. doi: 10.1371/journal.pone.0037447. 査読あり
 18. Nakayama M, Niki Y, Kawasaki T, Takeda Y, Horiuchi K, Sasaki A, Okada Y, Umezawa K, Ikegami H, Toyama Y, Miyamoto T. Enhanced susceptibility to lipopolysaccharide-induced arthritis and endotoxin shock in interleukin-32 alpha transgenic mice through induction of tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Res Ther*. 2012 May 21;14(3):R120. doi: 10.1186/ar3850. 査読あり
 19. Yoshida S, Iwasaki R, Kawana H, Miyauchi Y, Hoshi H, Miyamoto H, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Nakagawa T, *Miyamoto T. PDGFBB promotes PDGFR α -positive cell migration into artificial bone in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 May 18;421(4):785-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.084. 査読あり
 20. Hoshi H, Hao W, Fujita Y, Funayama A, Miyauchi Y, Hashimoto K, Miyamoto K, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Kitagawa K, Nakayama KI, Kawamoto T, Sano M, Fukuda K, Ohsawa I, Ohta S, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, *Miyamoto T. Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. *J Bone Miner Res*. 2012 Sep;27(9):2015-23. doi: 10.1002/jbmr.1634. 査読あり
 21. Miyamoto H, Suzuki T, Miyauchi Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Hoshi H, Hashimoto K, Yoshida S, Hao W, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Takeya M, Toyama Y, *Miyamoto T. Osteoclast stimulatory transmembrane protein and dendritic cell-specific transmembrane protein cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells. *J Bone Miner Res*. 2012 Jun;27(6):1289-97. doi: 10.1002/jbmr.1575. 査読あり
- 〔学会発表〕(計 20 件)
1. 宮本健史, 破骨細胞と関節破壊、第 4 2 回日本関節病学会 シンポジウム関節リウマチの病因病態、平成 2 6 年 1 1 月 6-7 日、虎ノ門ヒルズ(東京都港区)
 2. Takeshi Miyamoto, TNF α and IL-1 promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state、Cold Spring Harbor, Asia Bone and Cartilage: from Development to Human Diseases、November 3-7 2014、Suzhou, China
 3. 宮本健史, 骨代謝の理解と骨粗鬆症治療、第 1 6 回日本骨粗鬆症学会 イブニングセミナー 2、平成 2 6 年 1 0 月 2 3-2 5 日、京王プラザ(東京都新宿区)
 4. 宮本健史, 臨床応用を見据えた骨代謝研究、第 2 9 回日本整形外科学会基礎学術総会 パネルディスカッション 6 骨代謝研究維新-臨床への架け橋、平成 2 6 年 1 0 月 8-1 0 日、城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)
 5. Takeshi Miyamoto, Osteo-Oncology: A Mechanism of Bone Tumor Development、11th Bone Biology Forum, August 22-23 2014, Shizuoka
 6. 宮本健史, 骨粗鬆症の基礎から最新の治療まで、第 4 2 回日本口腔外科学会教育研修会 ランチョンセミナー、平成 2 6 年 7 月 2 7 日、大阪歯科大学楠葉学舎講堂(大阪府枚方市)
 7. 宮本健史, 破骨細胞による HSC 制御、第 1 回日本骨免疫会議、平成 2 6 年 7 月 4-6 日、プセナテラス(沖縄県名護市)
 8. Takeshi Miyamoto, Transcriptional Regulation of Osteoclastogenesis、5th International Conference on Osteoimmunology、June 15-18 2014、Kos, Greece
 9. 宮本健史, RANKL を標的とした新しい骨粗鬆症治療~骨代謝の理解に基づく骨粗鬆症治療~、第 8 7 回日本整形外科学会学術集会、平成 2 6 年 5 月 2 2-2 5 日、ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
 10. 宮本健史, 血中 25(OH)D 低値と intact PTH 高値は比較的若年女性にもみられる、第 8 7 回日本整形外科学会学術集会 ランチョンセミナー、平成 2 6 年 5 月 2 2-2 5 日、ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
 11. 宮本健史, 骨粗鬆症をめぐる最新の基礎研究、第 5 8 回日本リウマチ学会総会・学術集会 Symposium 15: 骨粗鬆症の新しい治療戦略、平成 2 6 年 4 月 2 4-2 6 日、グランドプリンスホテル新高輪

- (東京都港区)
12. 宮本健史、骨粗鬆症の基礎から最新の治療まで、第41回日本口腔外科学会教育研修会 ランチョンセミナー、平成26年2月23日、日本大学会館(東京都千代田区)
 13. Takeshi Miyamoto、 Regulation of haematopoietic stem cells and progenitors by osteoclasts、 Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2013 Symposium 15 Osteoimmunology、 December 11-13 2013、 Chiba
 14. 宮本健史、骨代謝と骨粗鬆症～骨：その基礎と臨床～、第28回日本整形外科学会基礎学術集会 ランチョンセミナー、平成25年10月17-18日、幕張メッセ(千葉県千葉市)
 15. 宮本健史、骨恒常性制御の分子機序、第31回日本骨代謝学会学術総会 ワークショップ1「骨・軟骨の発生・再生」、平成25年5月30日、ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
 16. 宮本健史、新しい骨転移治療：破骨細胞による骨代謝制御、第101回日本泌尿器科学会総会 サテライトセミナー1、平成25年4月25日、札幌プリンスホテル国際館パミール(北海道札幌)
 17. 宮本健史、分子生物学から臨床まで：破骨細胞の分化機構、第57回日本リウマチ学会総会・学術集会 Symposium 8：骨代謝、平成25年4月18-20日、国立京都国際会館(京都府京都市)
 18. Takeshi Miyamoto、 Regulation of osteoclastogenesis and bone homeostasis、 国際代謝シンポジウム、平成24年9月27-28日、東京大学弥生講堂(東京都文京区)
 19. 宮本健史、破骨細胞と骨恒常性制御、第12回抗加齢医学会総会 シンポジウム：ベーシックサイエンス・骨免疫と骨粗鬆症、平成24年6月22-24日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
 20. 宮本健史、RANKL による新しい破骨細胞の分子機能評価、第85回日本整形外科学会 スペシャルティデイ骨粗鬆症パネルディスカッション21：骨代謝からみた運動器疾患の病態評価、平成24年5月17-20日、グランドプリンスホテル京都(京都府京都市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 1件)

名称：骨粗鬆症治療剤及び治療剤のスクリーニング法

発明者：宮本健史

権利者：宮本健史・学校法人慶應義塾

種類：PCT

番号：特願2012-286024

出願年月日：2012年12月27日

国内外の別：国内

取得状況(計 0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮本 健史(Miyamoto Takeshi)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：19791044