

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659816

研究課題名(和文)膜修復制御分子による骨吸収制御：前破骨細胞特異的膜融合における膜修復イメージング

研究課題名(英文)Regulation of bone resorption by membrane repairing molecules:  
Live imaging of the specific fusion among osteoclast precursors

研究代表者

久木田 敏夫(KUKITA, TOSHIO)

九州大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70150464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞は前駆細胞どうしの細胞膜融合により形成されるが、基本的な「膜修復分子」による膜修復機構の裏打ちがあつてはじめてスムーズな融合が起るものと考えられる。本研究では膜修復制御分子の破骨細胞分化における動態を蛍光イメージング法を用いて可視化するとともに、破骨細胞分化において発現する膜修復制御分子MG53等を同定し、前駆細胞間の「膜融合」に「膜修復」機構が関与する可能性について検討した。無刺激状態の破骨前駆細胞には本分子の発現が認められたが、RANKL等による分化刺激により本分子の発現は著しく低下ないしは消失した。膜修復分子は破骨細胞分化の進行において負の制御分子であることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：When the muscle cell membrane was subjected to the damage, the membrane was immediately repaired by the action of "membrane repairing molecules". Osteoclasts are formed by fusion of mononuclear osteoclast precursors, and this process is postulated to be guaranteed by the action of "membrane repairing mechanisms". The purpose of this research is to identify MG53 or its analogue and involvement of membrane repairing mechanism during the process of osteoclast differentiation. Unstimulated osteoclast precursors expressed MG53. However, its expression was dramatically suppressed after being stimulated to form osteoclasts. Our data suggested that the "membrane repairing molecule" could act as the negative regulator for osteoclast differentiation.

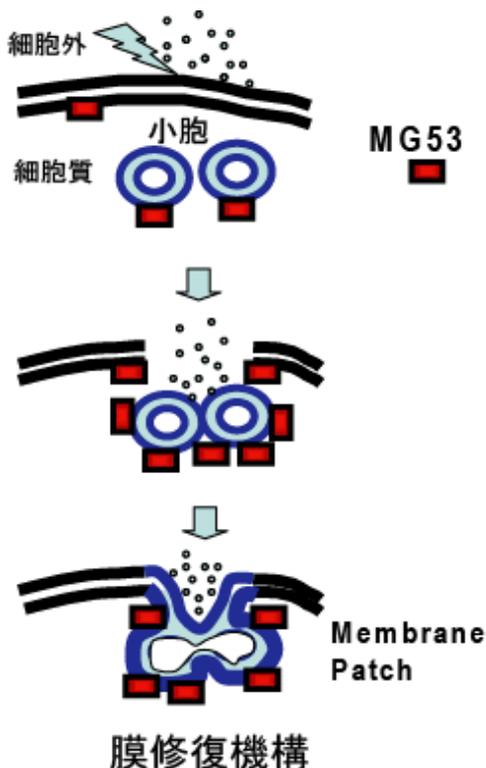
研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：破骨細胞 分化 膜融合 膜修復 MG53 骨吸収制御

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は造血幹細胞に由来する単核の前駆細胞が融合することにより形成される多核細胞である。その融合過程は形態学的に大きな変化を伴うダイナミックなプロセスであることから、以前より多くの研究者によって研究されているが、いまだに不明の点が多い。ところで細胞融合により大型の多核細胞になる細胞として、筋線維・筋管(多核)の元となる筋芽細胞が知られている。また、筋は特有の膜修復機構を持っていることが知られている。筋細胞がダメージを受けると、Mitsugumin 53 (MG53) という蛋白質が小胞状の脂質二重膜を傷害部位に運んでくる(下図上)。細胞膜に小孔が形成されると、細胞質が局所的に酸化状態になり、酸化されたMG53分子どうしが結合することにより物理的に接近した小胞どうしの膜融合が起こり、「Membrane Patch」という構造体の形成を経て(下図中・下)、傷ついた細胞膜が修復されることがわかってきた(Cai C. et al. *Nat. Cell Biol.* 2009)。このMG53は筋芽細胞の融合による筋管形成にも制御的な役割を担っていることも示された(Cai C. et al. *J. Biol. Chem.* 2009)。破骨細胞分化においても融合過程は細胞にとって極めて厳しい環境変化であり細胞膜の障害を伴う可能性が高いと考えられ、「膜修復機構」による補償があって初めてスムーズな融合が進行するものと推定される。



2. 研究の目的

本研究では破骨細胞分化における前駆細胞融合過程に「膜修復分子」が関与することを実証し、前駆細胞融合過程における膜修復分子の動態を蛍光イメージング法等により可視化することを目的とした。更に膜修復分子の発現を抑制することにより炎症性骨破壊の制御を行なうことを目的とした。

3. 研究の方法

蛍光色素を標識した前駆細胞の破骨細胞分化に伴う膜修復の動的解析

膜脂質結合性蛍光色素 DiD (DiI, DiO) を用いて破骨前駆細胞の膜表面を標識し、破骨細胞分化因子を添加後、経時的に観察し、融合が盛んになる培養2日目からタイムラプス解析を行ない、蛍光標識された細胞膜表面及び細胞膜直下に集積した小胞の動態を詳細に観測し、破骨細胞分化に伴う膜修復機構の存在の確認を試みた。

膜融合に伴う膜修復の電子顕微鏡による形態学的解析

上記蛍光色素による解析で膜修復が高頻度で検出された条件下で破骨前駆細胞を培養し、凍結置換法後金粒子によるコーティングを行ないSEMの試料を作成した。また、グルタルアルデヒドによる固定の後、エポキシに包埋しTEMの試料を作成した。

膜修復分子 MG53 蛋白質の破骨細胞分化での発現解析

膜修復分子 MG53 蛋白質の破骨細胞分化に伴う mRNA と蛋白質の発現変動を RT-PCR 法とウエスタンブロッティング法により解析した。破骨細胞分化に伴う発現解析を同様にを行った。

破骨細胞で発現する膜修復分子 MG53 ホモログの検索及び同定

特異的プライマーを用いた PCR クローニングを行なうことにより MG53 ホモログのクローニングを試みた。

膜修復制御分子・蛍光蛋白質融合蛋白質の破骨細胞分化に伴う蛍光イメージング解析

MG53-GFP 或いは MG53 ホモログ-GFP を破

骨前駆細胞株で過剰発現させ、分化刺激後、共焦点レーザー顕微鏡を用いたタイムラプス解析を行なう。破骨細胞分化に伴う MG53 分子及び MG53 ホモログ分子の発現（緑色の蛍光）を蛍光イメージングするとともに、赤色の蛍光で標識した細胞膜から生じる小胞との結合、更には Membrane Patch の形成、そして膜修復、という一連の過程の動画を作成し、膜修復機構の時間空間的なイメージングを試みた。

#### 新生仔マウスの顎骨に於ける正常破骨細胞の分化及び炎症性骨破壊モデルに伴う膜修復制御分子 MG5 の発現解析

膜修復分子 MG53 分子及び MG53 ホモログの正常破骨細胞の分化に於ける発現を解析する。新生仔マウス切歯の唇側面（エナメル質側）に面した下顎骨表面には多数の破骨細胞が観察されるので正常破骨細胞の分化を解析するのに適した組織である。*In situ* ハイブリダイゼーション法により破骨細胞及び前駆細胞における膜修復分子の遺伝子発現解析を行なうこととした。

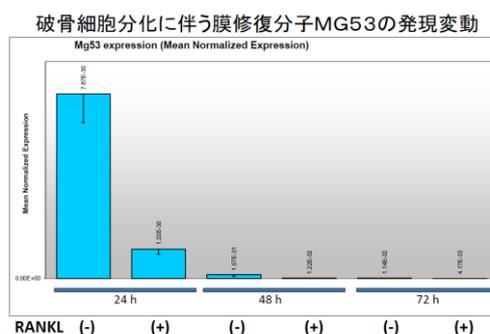
#### 4. 研究成果

本研究では膜修復制御分子の破骨細胞分化における動態を蛍光イメージング法を用いて可視化するとともに、破骨細胞分化において発現する膜修復制御分子MG53のアナログを同定し、前駆細胞間の「膜融合」に「膜修復」制御分子が関わっていることを明らかにすることを目的とした。

リアルタイムPCR法により破骨前駆細胞であるRAW-D細胞を用いて破骨細胞分化に伴うMG53の発現について検討した。RANKL刺激前でもMG53の発現が低レベルではあるが認められた。破骨細胞分化因子であるRANKL, TNF $\alpha$ 等で破骨細胞分化刺激を加えると発現が劇的に低下する傾向が認められた。尚、分化刺激が無い条件下でも培養を続けると発現が低下する傾向があった。少なくともRANKL刺激後24時間後ではRANKL無刺激のRAW-D細胞ではかなりの膜修復分子MG53の発現を認めたがRANKL刺激下ではMG53の著しい発現抑制が認められた。RANKL刺激24時間というのは、破骨細胞分化の初期の段階で単核の破骨前駆細胞が形成され

る段階であるが、融合に先駆けて本膜修復分子の発現が抑制されることが分かった。おそらく、膜融合に必要な分子群の働きをスムーズにする為にMG53蛋白の発現が融合に先立って抑制されるのではないかと考えている。RANKLにより誘導される破骨細胞に特有のアナログ分子が膜修復を制御する可能性があるため、PCRクローニング法によるMG53アナログ分子の検索を行った。しかしながら、MG53の破骨前駆細胞における発現レベルが低いことから、破骨細胞に特有の膜修復分子の同定はできなかった。一方、膜融合に伴う膜修復過程の電子顕微鏡による形態学的解析により、膜ナノチューブを介した前駆細胞間の活発な相互作用が認められた。膜ナノチューブの迅速な形成と消失にも膜修復関連分子が関与するものと考えられる。

研究計画の段階では膜修復分子MG53のアナログ分子を容易に得ることができると予測していたが、上述のように分化刺激により本分子が著しい発現低下を呈した（下図：「破骨細胞分化に伴う膜修復分子MG53の発現変動」を参照）為、実験的に破骨細胞特有のホモログを検出することが困難となったため、新規ホモログを得ることは断念した。そこで、MG53の破骨細胞分化刺激による発現抑制について共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析を行い、経時的に本分子の発現が消失する可能性を形態学的に示唆する結果を得ている。膜修復に関する所見を見出すことはできなかったが、電顕レベルでの解析を継続して検討している。



尚、膜ナノチューブを介する融合関連分子DC-STAMPの細胞間移動に関する重要な所見を得ることができた。膜構造体である膜ナノチューブは構造体の出現・消失に於いて基本

的な膜修復機構と関連していることが推定されるので、膜ナノチューブの形成に必須の分子である M-Sec 蛋白質と膜修復分子 MG53 との相互作用が破骨細胞分化に先立って行われているものと思われる。研究期間が終了した現在でも運営校費等を用いて継続研究を行っているところである。この点に関して少しずつではあるが、興味深い知見が得られつつある。

#### 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 12 件)

- 1) Regulation of osteoclastogenesis through Tim-3: A possible involvement of Tim-3/galectin-9 system in the modulation of inflammatory bone destruction. Moriyama K., Kukita A., Li-Y-J., Uehara N., Zhang J-Q., Takahashi I. and Kukita T. *Lab Invest* (査読有) (in press)
- 2) Mesenchymal stem cell markedly suppress inflammatory bone destruction in rats with adjuvant-induced arthritis. Takano T., Li Y-J., Kukita A., Yamaza T., Ayukawa Y., Moriyama K., Uehara N., Nomiyama H., Koyano K., Kukita T. *Lab Invest* (査読有) 94:286-296, 2014
- 3) Multifunctional properties of RANKL/RANK in cell differentiation, proliferation and metastasis. Kukita A., Kukita T. *Future Oncology* (査読有) 9:1609-1622, 2013.
- 4) Immune therapeutic potential of stem cells from human supernumerary teeth. Makino Y., Yamaza H., Akiyama K., Ma L., Hoshino Y., Terada Y., Kukita T., Shi S., Yamaza T. *J Dent Res* (査読有) 92:609-615, 2013.
- 5) Tunneling nanotube formation is essential for the regulation of osteoclastogenesis. Takahashi A., Kukita A., Li Y-J., Zhang JQ., Nomiyama H., Yamaza T., Ayukawa Y., Koyano K., Kukita T. *J Cell Biochem* (査読有) 114:1238-1247, 2013.
- 6) Adenosine blocks aminopterin-induced suppression of osteoclast differentiation. Teramachi J., Kukita A., Wada H., Kukita T. *J Bone Min Metab.* (査読有) 31:64-67, 2013.
- 7) Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resourced for regenerative medicine. Ma L., Makino Y., Yamaza H., Akiyama K., Hoshino Y., Somg G., Kukita T., Nonaka K., Shi S., Yamaza T. *PLoS One* 7:e51777, 2012.
- 8) Nordihydroguaiaretic acid suppresses osteoclastogenesis by inhibiting NFATc1 and suppresses bone destruction accompanying adjuvant arthritis in rats. Li Y-J., Kukita A., Takano T., Qu P., Sanematsu K., Ninomiya Y., Kukita T. *Lab Invest.* (査読有) 92:1777-1787, 2012.
- 9) Characterization of and identification of subpopulations of mononuclear Preosteoclasts induced by TNF $\alpha$  in combination with TGF $\beta$ . Matsubara R., Kukita T., Ichigi Y., Takigawa I., Qu P., Nonaka K., Kukita A. *PLoSOne* (査読有) (in press) 7:e47930, 2012.
- 10) Infection of RANKL-primed RAW-D macrophages with *Porphyromonas gingivalis* promotes osteoclastogenesis in a TNF $\alpha$ -independent manner. Kukita A., Ichigi Y., Takigawa I., Watanabe T., Kukita T., Miyamoto H. *PLoSOne* (査読有) 7:e38500, 2012.
- 11) Stage-specific function of leukemia/lymphoma-related factor (LRF) in the transcriptional control of osteoclast development. Tsuji-Takeuchi K., Negishi-Koga T., Sumiya E. Kukita A., Kato S., Maeda T., Pandolfi PP. Moriyama K., Takayanagai H. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* (査読有) 109:2561-2566, 2012.
- 12) 破骨細胞分化と機能を制御する転写因子の役割.  
久木田明子、菖蒲池健夫、久木田敏夫  
*化学と生物* 50:488-497, 2012.

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 炎症抑制ガレクチン9の膜表面受容体 Tim3 を介した破骨細胞形成制御  
森山加奈子、久木田明子、張旌旗、上原範久、高橋一郎、久木田敏夫  
第55回歯科基礎医学会  
2013年9月(岡山)
- 2) 膜ナノチューブを介する破骨前駆細胞間融合の走査電顕的解析  
張旌旗、高橋良、久木田明子、成松加奈子、上原範久、山座孝義、城戸瑞穂、久木田敏夫  
第55回歯科基礎医学会  
2013年9月(岡山)
- 3) A Possible Regulation of Osteoclast Differentiation by Galectin-9  
Kanako Moriyama, Akiko Kukita, Ichiro Takahashi, Toshio Kukita  
2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the

Japanese Society for Bone and Mineral  
Research

2013年6月(神戸)

- 4) WT1 アンチセンス RNA の成熟破骨細胞  
に於ける高発現と分化制御機能  
李銀姫、久木田明子、久木田敏夫

第117回日本解剖学会

2012年3月(山梨)

- 5) ノルジヒドログアイアレチン酸  
(NDGA) によるヒト肺癌骨転移制御  
李銀姫、渡辺敏之、高橋良、久木田明子、  
瀧口総一、井口東郎、久木田敏夫

第30回日本骨代謝学会

2012年7月(東京)

- 6) 伝統的秘薬 NDGA による炎症性骨破壊  
制御 李銀姫、久木田明子、渡辺敏之、  
屈鵬飛、久木田敏夫

解剖学会九州地方会

2012年10月(久留米)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

久木田 敏夫 (Kukita Toshio)

研究者番号: 70150464

### (2) 研究分担者

久木田 明子 (Kukita Akiko)

研究者番号: 30153266

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: