

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790371

研究課題名(和文)破骨細胞由来骨カップリング因子の探索と機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of osteoclast-derived coupling factor

研究代表者

松岡 和彦 (Matsuoka, Kazuhiko)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・運動器疾患研究部・流動研究員

研究者番号：00581365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成により、常に壊されては造られることで骨の量と強度が保持される。骨吸収は骨形成へとカップリングすることが知られており、カップリング因子の存在が示唆されていたが、その実体は長らく明らかにされていなかった。

骨芽細胞マーカーであるALP活性を指標として、破骨細胞の培養上清から活性成分を精製、C3を同定し、その分解産物であるC3aが活性因子として骨芽細胞のC3a受容体を介して分化を促進することを明らかにした。さらに卵巣摘出による骨粗鬆症モデルマウスを用いた実験から、C3aが骨吸収から骨形成へのリレーに重要な新たな骨カップリング因子として働くことを実証した。

研究成果の概要(英文)：Bone remodeling is regulated by a coupling of resorption to subsequent formation, however, the "coupling factor" and underlying mechanism are not fully understood. I purified osteoblast-stimulating activity, as determined by ALP activity, from osteoclast CM through successive chromatography by monitoring the ALP activity, and identified complement component 3 (C3). The activity present in osteoclast CM was inhibited by a specific C3a receptor antagonist, SB290157. C3 gene expression in bone was increased in the high bone turnover states of ovariectomy (OVX) or a RANKL injection, and blocking the action of C3a with the daily administration of SB290157 resulted in the attenuation of bone formation elevated by OVX, and the exacerbation of bone loss. These results suggest that osteoclast-derived C3a functions in the relay from bone resorption to formation and may be a candidate for a coupling factor.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：骨芽細胞 破骨細胞 カップリング 骨リモデリング 細胞分解

## 1. 研究開始当初の背景

骨は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成により常に壊されては造られるサイクルがバランス良く営まれることにより、骨の強度が保持されると共にカルシウムの貯蔵器官として機能している。カルシウムは、血液凝固系、神経系における刺激の伝達、筋肉の興奮・収縮、内分泌細胞の興奮など様々な生理機能に重要な働きをすることが知られているが、これらカルシウムの恒常性を厳密に制御するためにも、骨における骨吸収と骨形成は重要な役割を果たす。

破骨細胞の分化および成熟化には、M-CSF および RANKL による刺激が必須であり、これらの因子は骨芽細胞をはじめとする様々な細胞から分泌され、局所における破骨細胞の活性化を調節している。加齢や閉経による性ホルモンの産生低下や、ステロイドの副作用により、骨吸収と骨形成のバランスが崩れ、骨粗鬆症をはじめとする様々な代謝性骨疾患を発症することが知られているが、詳細なメカニズムについては不明な点が多い。これまでの動物モデルを用いた研究から、生理的条件下において骨吸収と骨形成は連鎖的に起こることが分かっており、吸収から形成へのカップリング因子の存在が示唆されているが、その実体は明らかになっていない。

一方、カップリング機構に破骨細胞の骨吸収活性が必要かどうかについては議論の余地のあるところだが、骨基質に多く含まれる TGF- $\beta$  や IGF、破骨細胞による Sphingosine 1-phosphate、破骨 骨芽細

胞間の Ephrin-B2-Epheb4 signaling など がカップリングを促進する因子として報告されているが、血清中に豊富に存在していたり、分泌性でないなど、カップリング機構を説明するためには十分でない。これまでの研究から、カップリングには吸収局所への骨芽細胞の誘因が必須であること、骨芽細胞は吸収窩特異的に骨基質を産生することなどから、破骨細胞が分泌し骨芽細胞の分化を促すあるいは誘因する分泌性カップリング因子の存在が想定される。当研究室では、マクロファージの段階では産生されず、破骨細胞分化に伴って産生される因子が、骨芽細胞の分化マーカーである Alkaline phosphatase (ALP) の活性を増大させ、石灰化を促進する活性画分を複数見出していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、吸収と形成をつなぐ因子 (カップリング因子) として破骨細胞から分泌される分子を同定し、その機能を解析することにより、カップリング機構の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

破骨細胞由来のカップリング因子を精製しその機能を解析するため、破骨細胞の培養上清をマウス骨芽細胞に添加し、ALP 活性を指標として種々のカラムクロマトグラフィーにより活性画分を分離・濃縮した。次に、質量分析を用いて因子の同定を行い、機能解析を行った。

#### 4 . 研究成果

補体成分 C3 を同定し、C3 の分解産物である C3a が活性因子として骨芽細胞の C3a 受容体を介して分化を促進することを明らかにした。さらに卵巣摘出による骨粗鬆症モデルマウスを用いた実験から、C3a が骨吸収から骨形成へのリレーに重要な新たな骨カップリング因子として働くことを実証した。

#### 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 1 件)

Matsuoka K, Park KA, Ito M, Ikeda K, Takeshita S. Osteoclast-Derived Complement Component 3a Stimulates Osteoblast Differentiation. *J Bone Miner Res*. 2014;Jan 28. doi: 10.1002/jbmr.2187. [Epub ahead of print]

[学会発表](計 3 件)

国際会議

Osteoclast-secreted Complement Component 3a Stimulates Osteoblast Differentiation. Matsuoka K, Ito M, Ikeda K, and Takeshita S. The American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting. Baltimore, USA. October 2013.

国内会議

Kazuhiko Matsuoka.

Osteoclast-secreted Complement Component 3a Stimulates Osteoblast Differentiation. 第 8 会 Bone Research

Seminar. 東京 2014 年 2 月

Kazuhiko Matsuoka, Kyoji Ikeda, and Sunao Takeshita. Purification of a secretory product of osteoclasts that promotes osteoblast differentiation. 第 85 回 日本生化学会大会合同大会, 福岡 2012 年 12 月.

[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

松岡 和彦 (Matsuoka Kazuhiko)

独立行政法人国立長寿医療研究センタ

－ 運動器疾患研究部 流動研究員

研究者番号 : 00581365