

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462369

研究課題名(和文)炎症・免疫系シグナルと骨形成の新たな接点の探索

研究課題名(英文) Investigation of the relationship between bone formation and inflammatory signaling

研究代表者

樋口 周久(Higuchi, Chikahisa)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：40432421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症・免疫系シグナルのBruton's tyrosine kinase(Btk)およびC reactive protein(CRP)/FcRシグナル伝達系は、骨芽細胞分化を抑制するシグナルであることが示唆された。また、様々な機能があると思われるMEK5シグナル伝達系も骨芽細胞分化を抑制していることが示唆され、これらシグナル伝達系を抑制する化合物は骨形成促進のための薬剤候補として考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between inflammatory signaling and osteoblasts. Our data demonstrated that Bruton's tyrosine kinase(Btk) and C reactive protein(CRP)/FcR signal pathways suppressed the osteoblastic differentiation. In addition, mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase 5 (MEK5) also suppressed the osteoblastic differentiation. The results in the present study suggested that small molecules to inhibit these signaling pathways might be candidate agents for the treatment of fracture or bone defect to accelerate bone formation.

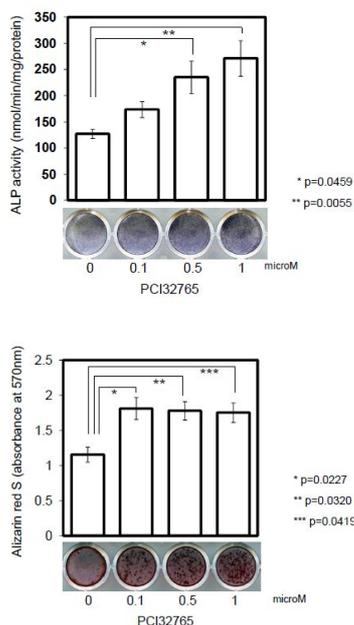
研究分野：整形外科 骨代謝

キーワード：osteoblast Btk CRP MEK5

1. 研究開始当初の背景

我々は、骨代謝関連の研究を継続して行っており、特に骨軟骨分化のメカニズム解明とその制御についての研究を細胞内シグナル伝達系の解析を中心に行ってきた。特に、骨芽細胞分化における MAPK シグナル (Higuchi et al. J Bone Miner Res. 2002)、COX2 シグナル (Kuriyama et al. Biochem Biophys Res Commun. 2002)、FK506 シグナル (Tateishi et al. Osteoarthritis Cartilage. 2007)、PKC シグナル (Nakura et al. Bone 2011) に関しては、すでに報告を行っている。このうち、MAPK シグナルを除く細胞内シグナル伝達系は炎症・免疫関連に大きな影響をもつものであり、本研究を計画する上での基盤となる研究結果であった。

一方、我々は、免疫系組織を構成する B 細胞に重要な役割を果たしている B cell antigen receptor (BCR) シグナル伝達系の構成タンパクである spleen tyrosine kinase (Syk) が、骨芽細胞や間葉系幹細胞様の性質をもつ骨髄間質細胞に発現していることを確認、報告した。同時に Syk が骨芽細胞分化の負の制御因子であることも報告した (Yoshida et al. Biochem Biophys Res Commun. 2011)。この報告ではさらに、骨芽細胞における Syk シグナル伝達系の下流に、以前我々が報告してきた MAPK や PKC が関与している可能性を示した。これらのことから、これまでの我々の一連の研究が更なる免疫系シグナルと骨形成との接点とその広がりを見せると考えられた。また、BCR シグナル伝達系を構成する別のタンパクである Bruton's tyrosine kinase (Btk) も骨芽細胞に発現していることを確認し、このキナーゼの阻害剤を用いた予備実験において、このキナーゼが骨芽細胞分化に影響を及ぼしている可能性を確認していた (図 1)。



(図 1) Btk 阻害剤 PCI32765 のマウス骨芽細胞株

MC3T3-E1 の骨芽細胞分化への作用

(上段が前期骨芽細胞分化マーカー、アルカリフォスファターゼ活性とその定量化)

下段が後期骨芽細胞分化を示す細胞外基質石灰化のアリザリンレッド染色とその定量化)

また、BCR シグナル伝達系上、Btk は Syk の下流に当たるが、Syk の上流には血球系に多く発現するとされている Src tyrosine kinase ファミリーの 1 つである Lyn が存在する。このキナーゼが骨芽細胞系の細胞に発現しているとの報告もあり、このシグナル伝達系が間葉系細胞に備わっており、何らかの機能を果たしている可能性を示唆された (Kaabeche et al. J Biol Chem. 2004)。

加えて、我々はこれまでの予備実験において、免疫複合体を認識し、細胞内のシグナル伝達系を活性化する 1 つの受容体である Fc レセプター (FcR) の各サブクラスが間葉系細胞に発現している事も確認していた。

以上より、骨芽細胞や間葉系細胞には BCR シグナル伝達系などの炎症・免疫系のシグナル伝達系が存在し、これらは骨芽細胞の機能に少なからずの影響を及ぼしていると考えられた。一方で、免疫系シグナルは、骨代謝研究の中では破骨細胞を中心に解析されていたが、骨形成系との関連を示唆する報告はほとんどなかった。また、Syk や Btk などのキナーゼ阻害剤は炎症や免疫系の疾患をターゲットとして創薬されているが、これらの骨代謝への影響もほとんど解析されていない。これらの観点から、あまり視点が向けられていない炎症・免疫系シグナルと間葉系細胞との関係を解析することは基礎研究および臨床的な観点からも有意義な研究であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症・免疫系組織・シグナルと骨軟骨を含む骨格系組織のネットワークを間葉系細胞と骨芽細胞を中心に解析することである。

免疫系組織・シグナルと骨格系組織との関連については、マクロファージ系細胞である破骨細胞を中心とした骨吸収系の骨代謝を中心に解析が進んでいる。しかし、免疫系組織・シグナルの骨芽細胞における骨形成系の骨代謝や筋芽細胞が関与する筋組織への影響などの間葉系細胞との接点は、骨吸収系の骨代謝に比べて、多くは解明されていない。一方、これらの機序の解明は、臨床的に、炎症・免疫疾患による骨格系組織への影響を骨吸収の面だけではなく、骨形成という別の側面から治療を考えることに手がかりを与えるものとなりうる。したがって、炎症・免疫系シグナルと骨形成系骨代謝との接点を解析することを本研究の中心に供え、実験をおこなった。

本研究が研究期間内に明らかにしようとしたことは以下の点である。

- (1) BCRシグナル伝達系を構成するキナーゼのうち Btk などの骨芽細胞分化への作用
- (2) さらに、上記以外の炎症・免疫系シグナル伝達系の間葉系細胞におけるその存在の確認と機能解析 (FcR シグナル・補体系など)
- (3) その他の免疫系に関する細胞内シグナル伝達系の骨芽細胞分化への作用

3. 研究の方法

(1) Btk と骨芽細胞分化に関する解析

1 間葉系細胞株 (マウス骨芽細胞株

MC3T3-E1) における Btk の発現を Western blot 法にて確認

2 マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 の骨芽細胞分化に対する Btk 阻害剤 PCI32765 の作用を解

3 マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 の Btk 発現を RNA 干渉にて減少させ、シグナル伝達を制御することによる骨芽細胞分化の変化を解析

(2) C reactive protein(CRP)/FcR と骨芽細胞分化に関する解析

1 間葉系細胞株 (マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1) における FcR 発現を RT-PCR 法で確認

2 間葉系細胞株 (マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1) における CRP の作用解析

(3) MEK5-Erk5 シグナル伝達系の骨芽細胞における機能の解析

1 マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 における MEK5-Erk5 シグナル伝達系の存在の確認

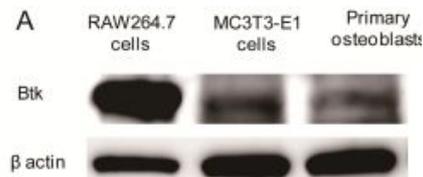
2 MEK5-Erk5 シグナル伝達系の骨芽細胞増殖および分化への作用の解析 (MEK5 阻害剤 BIX02189 による)。

3 マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 において、MEK5 過剰発現および RNA 干渉による発現低下を行い、増殖および分化への作用の解析

4. 研究成果

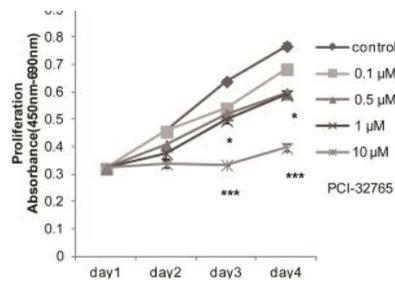
(1) Btk と骨芽細胞分化

マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いて、Btk のタンパク発現を確認した (図 2)。

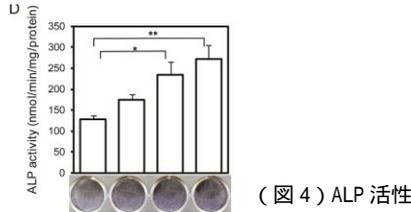


(図 2) Btk タンパクの発現

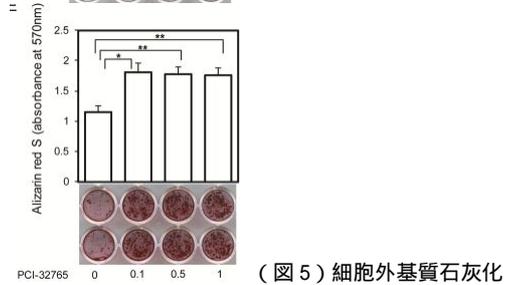
次いで、Btk 阻害剤 PCI32765 による細胞増殖への影響と (図 3) 骨芽細胞分化への作用をアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性 (図 4) と細胞外基質石灰化 (図 5) で確認した。また、PCI32765 による骨芽細胞分化マーカーの変動を real time PCR 法にて確認した (図 6)。



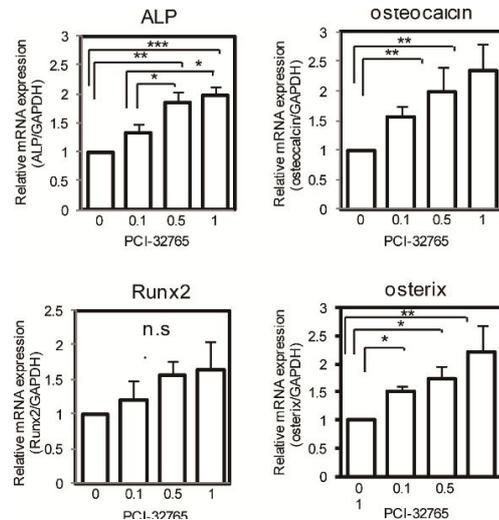
(図 3) PCI32765 により骨芽細胞増殖は抑制されている



(図 4) ALP 活性



(図 5) 細胞外基質石灰化



(図 6) 骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現

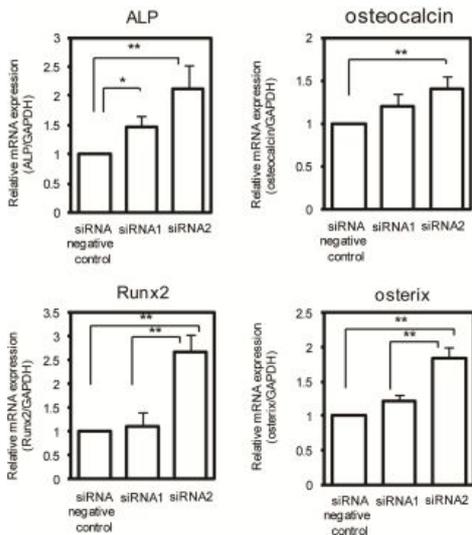
これらの結果から、Btk 阻害剤 PCI32765 は骨芽細胞分化を促進する可能性が示唆された。Btk の骨芽細胞分化への作用をさらに調べるため、RNA 干渉法を用いて、Btk ノックダウンを行い、骨芽細胞分化を見た。まず、2 種類の RNAi にて Btk がノックダウンされていることを確認した (図 7)。



(図 7) Btk はノックダウンされている

このノックダウン状態で、アルカリフォスファターゼを含む骨芽細胞分化マーカーの促

進傾向が認められた (図 8)。

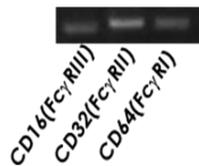


(図 8) Btk ノックダウン状態での骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現

Btk 阻害剤と RNA 干渉の結果から、Btk は骨芽細胞分化を抑制するシグナル伝達系を形成していると推測された。

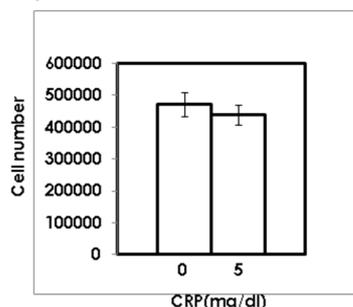
(2) CRP/FcR と骨芽細胞分化

RT-PCR 法にて FcR (CD16/32/64) の発現をしらべたところ、それぞれの発現が確認できた (図 9)



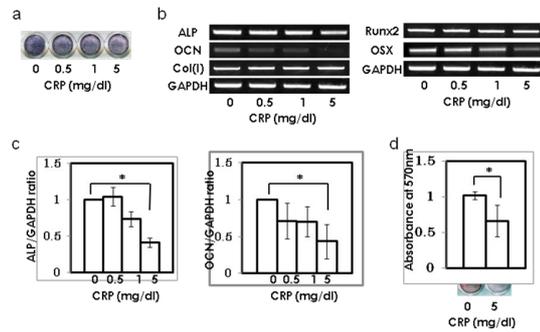
(図 9) FcR の発現を認める

これら受容体のリガンドの 1つと考えられている CRP の骨芽細胞増殖への作用をみたところ、増殖には影響を及ぼさなかった (図 10)。



(図 10) CRP は骨芽細胞増殖には影響しなかった

一方、CRP は ALP、オステオカルシン (OCN)、オステリックス (OSX) などの骨芽細胞分化のマーカーの発現や活性を減少させ (図 11a-c)、細胞外基質石灰化も抑制した (図 11d)。

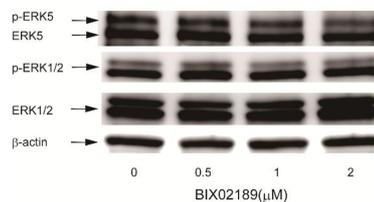


(図 11) CRP の骨芽細胞分化に対する作用

これらの結果から、CRP は骨芽細胞の増殖には影響を及ぼさないが、その分化を抑制することが示唆された。これは、関節リウマチなどの免疫性疾患で CRP が高値となる疾患で骨粗鬆症が多いことの 1つの原因の可能性もある。

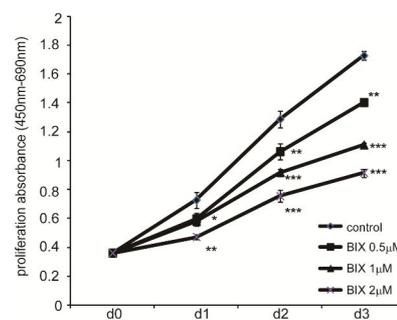
(3) MEK5-Erk5 と骨芽細胞分化

まず最初に MEK5-Erk5 シグナル伝達系が骨芽細胞内に存在し、MEK5 阻害剤 BIX02189 により、同シグナル系が抑制されるかを確認したところ、シグナル系の存在と阻害効果が確認できた (図 12)。



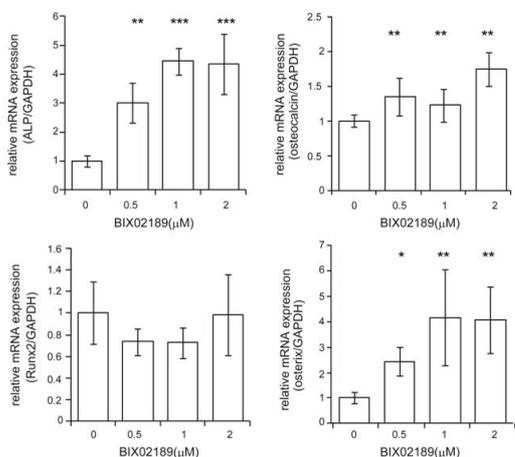
(図 12) BIX02189 により ERK5 リン酸化が阻害されている

この BIX02189 により、シグナル抑制の程度に比例して、骨芽細胞増殖は抑制され (図 13)。

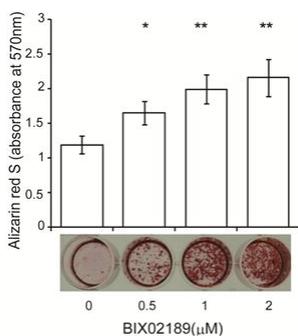


(図 13) BIX02189 濃度に比例して増殖抑制が認められる

一方、骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現は促進された (図 14)。また、細胞外基質石灰化も促進された (図 15)。

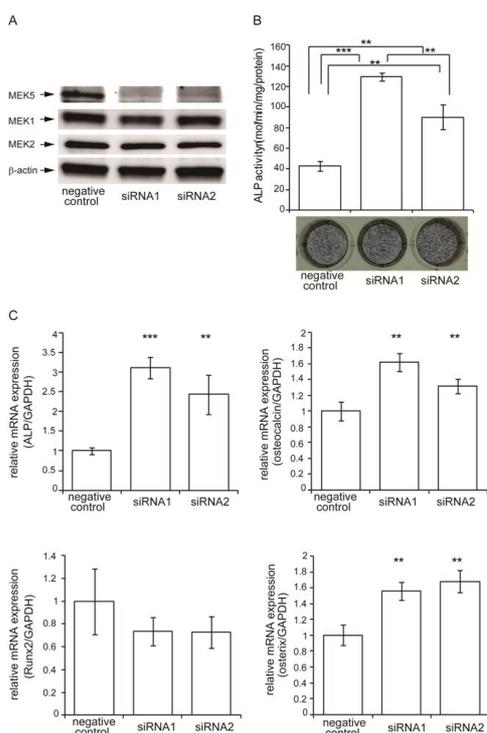


(図14) 骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現



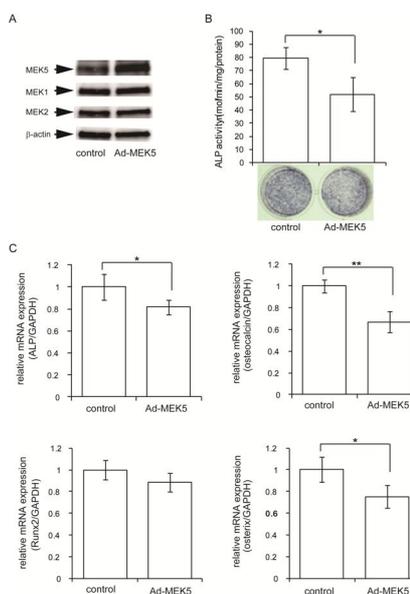
(図15) 細胞外基質石灰化

MEK5 の骨芽細胞分化への作用をさらに確認するために、MEK5 ノックダウンを行ったところ、ノックダウンによって骨芽細胞分化の促進が見られた (図16)。



(図16) 2種類の siRNA による MEK5 ノックダウンにより骨芽細胞分化マーカー促進がみられた

一方、アデノウイルスを用いた MEK5 過剰発現を行ったところ、ノックダウンとは逆に骨芽細胞分化抑制の結果が得られた (図17)。



(図17) アデノウイルスによる MEK5 過剰発現により骨芽細胞分化マーカーの抑制がみられた

これらの結果から、MEK5-Erk5 シグナル伝達系は骨芽細胞の増殖と分化に作用しており、そのシグナルの抑制により、骨芽細胞分化が促進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) IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro.

Kaneshiro S, Ebina K, Shi K, Higuchi C, Hirao M, Okamoto M, Koizumi K, Morimoto T, Yoshikawa H, Hashimoto J.

J Bone Miner Metab. 2014 Jul;32(4):378-92.

(2) Bruton tyrosine kinase (Btk)

suppresses osteoblastic differentiation. Kaneshiro S, Ebina K, Shi K, Yoshida K, Otsuki D, Yoshikawa H, Higuchi C.

J Bone Miner Metab. 2015 Sep;33(5):486-95. doi: 10.1007/s00774-014-0612-8.

(3) MEK5 suppresses osteoblastic differentiation.

Kaneshiro S, Otsuki D, Yoshida K, Yoshikawa H, Higuchi C.

Biochem Biophys Res Commun. 2015
Jul 31;463(3):241-7. doi:
10.1016/j.bbrc.2015.05.035.

〔学会発表〕(計 1件)

(1) Shoichi Kaneshiro, Chikahisa Higuchi, Kosuke Ebina, Kenrin Shi, Hideki Yoshikawa. Bruton's tyrosine kinase suppresses osteoblast differentiation. 第2回国際骨代謝・日本骨代謝学会合同国際会議、2013年5月28-6月1日、神戸

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 周久 (HIGUCHI CHIKAHISA)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号： 40432421

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：