

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670793

研究課題名(和文)脾臓-血管-骨の連携を標的とした新規骨疾患治療薬開発のための探索的研究

研究課題名(英文)Exploration of seeds for development of a new drug targeting Bone-Vascular-Spleen axis

研究代表者

宇田川 信之(Udagawa, Nobuyuki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70245801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：(1)脾臓摘出マウスを用いた骨代謝における脾臓の役割の解析を行ったところ、脾臓を摘出するとM-CSF欠損マウスでは完全に破骨細胞および破骨細胞前駆細胞の骨における出現が抑制されたが、野生型マウスにおいてもわずかに抑制された。

(2)IL-34陽性血管内皮細胞とIL-34陰性血管内皮細胞の遺伝子発現プロファイルの比較により、分泌タンパク質または膜タンパク質をコードする遺伝子において発現量の異なるものが複数得られ、機能解析に着手した。

(3)加齢に伴うIL-34の発現上昇に関する分子機構を解析するため、IL-34陽性血管内皮細胞の長期培養を行うと、IL-34の発現が減少した。

研究成果の概要(英文)：(1)To clarify the role of spleen in bone metabolism, M-CSF-deficient mice and wild-type mice were subjected to splenectomy or a sham-operation. Splenectomy completely suppressed osteoclastogenesis in M-CSF-deficient mice. In contrast, splenectomy moderately suppressed osteoclastogenesis in wild-type mice.

(2)Comparing the gene expression profiles of IL-34-positive and IL-34-negative vascular endothelial cells identifies differentially expressed genes. We focused on top-ranked genes which possess leading signal peptide for secretion and membrane-anchoring. We are now addressing functional analyses of these genes.

(3)To elucidate mechanisms underlying the age-associated increase of IL-34 expressions in several tissues, we tried to establish the culture system for IL-34-positive vascular endothelial cells. However, the expression level of IL-34 gradually decreased in long-term culture.

研究分野：口腔生化学

キーワード：破骨細胞 骨芽細胞 マクロファージ 脾臓 RANKL M-CSF IL-34

1. 研究開始当初の背景

我々は、(1)破骨細胞前駆細胞(OCP)は M-CSF と RANKL 非依存的に形成され、血中を循環することを示した(J Cell Biol 184:541, 2009; J Bone Miner Res 26:2978, 2011)。一方、新規因子 IL-34 が、骨外において OCP の形成を促し、血流を介して OCP を骨に供給させる可能性が示唆された。そこで、IL-34 の破骨細胞分化過程における役割の解明について研究を開始した。その結果、IL-34 は骨芽細胞に発現せず、脾臓血管において発現し、脾臓における OCP の形成に関与していることが明らかとなった。また、活性型ビタミン D の投与と加齢は、脾臓と骨の血管における IL-34 の発現を上昇させ、OCP の脾臓から血流への移行と骨への定着を促進していることを報告した (PNAS 109:10006, 2012) (図 1)。さらに、脾臓は OCP のみならず、単球・マクロファージの貯蔵庫としても知られる他、心筋梗塞部位へ脾臓の単球が遊走し、心筋の修復を促進する (Science 325: 612, 2009)。また、肺がんモデルにおいても脾臓のマクロファージが遊走し、腫瘍の成長に関与することが報告された (PNAS 109:2491, 2012)。以上のようにこれまで痕跡器官と考えられていた脾臓の単球・マクロファージ系列細胞が、血中を移動して遠隔臓器の修復や病態の進行を調節している例が近年示されている。申請者は、脾臓のマクロファージと OCP が血流と血管を介して骨折治癒やリウマチなどの様々な骨疾患の病態制御に関与すると予想している。

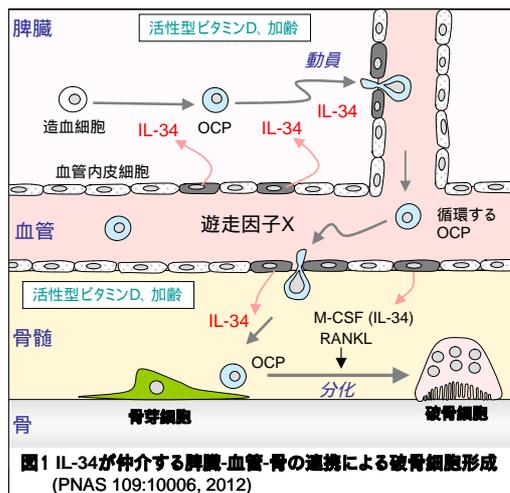


図1 IL-34が仲介する脾臓-血管-骨の連携による破骨細胞形成 (PNAS 109:10006, 2012)

2. 研究の目的

単球・マクロファージから破骨細胞への分化には、骨芽細胞が発現する M-CSF と RANKL が必須であると考えられている。最近、M-CSF 受容体リガンドとして IL-34 が発見された。我々は、IL-34 は脾臓血管と骨の血管の一部で発現していることを見出し、IL-34 と M-CSF の双方が破骨細胞前駆細胞の維持と血流を介する移動に関与することを示した (PNAS 109:10006-11, 2012)。また、脾臓に貯蔵される単球、マクロファージ系列の細胞が心筋

損傷部位へ遊走したり、がん病巣部へ遊走することで、病態の進行を制御することが明らかになっている。本申請研究は、脾臓-血管-骨の多臓器連携を担う IL-34 と遊走因子 X を標的として骨形成と骨形成の調節を試み、新規治療法開発へ挑戦することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脾臓摘出マウスを用いた骨代謝における脾臓の役割の解析

骨代謝における脾臓の役割と IL-34 の役割について解析するために、脾臓摘出後の骨髄における OCP population の変化、骨髄における血管新生、骨代謝回転の変化、IL-34 および M-CSF の発現レベルの変化について解析する。脾臓摘出モデルマウスにリコンビナント IL-34 を投与することで、これらのパラメータが回復するかについて検討する。

(2) 脾臓と骨の IL-34 陽性血管内皮細胞の性状解析および遊走因子 X の探索

脾臓と骨の血管内皮細胞の一部は、IL-34 を発現する。この IL-34 陽性血管内皮細胞の単離を行う。脾臓および骨髄組織をコラゲナーゼ溶液中で分散させた後、抗 IL-34 抗体と抗 PECAM-1 抗体を用いて、セルソーターにより IL-34(+)PECAM-1(+)細胞と IL-34(-)PECAM-1(+)細胞を分取する。それぞれの細胞について、マイクロアレイ解析により遺伝子発現プロファイルを作成する。また脾臓と骨の血管内皮細胞間で発現量に差のあるケモカインに着目し、遊走因子 X の候補を絞る。さらに、それぞれの細胞が有する造血細胞の OCP lineage への運命付け効果、OCP の誘引遊走効果、OCP の生存支持効果、組織浸潤能について比較解析する。

(3) 加齢に伴う IL-34 の発現上昇に関する分子機構

IL-34(+)PECAM-1(+)細胞を用いて、加齢に伴う IL-34 の発現上昇に関する分子機構を解析する。加齢という生命現象は、分子レベルで着目すると多様な側面を持っている。例えば、酸化ストレスによるタンパク質、脂質、核酸の酸化は、加齢の一面であると考えられている。他に、DNA の損傷、オートファジーの低下による不要タンパク質の蓄積がある (Cell 120:437, 2005)。これらの老化を進行させる複数の要因の中から、IL-34 の発現上昇に関連する要因を探し出す。また、老化に伴う IL-34 遺伝子領域の DNA のメチル化の変化や、ヒストン修飾などのエピジェネティックな変化についても併行して解析し、加齢に伴う IL-34 の発現上昇に関する分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

脾臓-血管-骨の多臓器連携を担う IL-34 と遊走因子 X を標的として骨形成と骨吸収の調節を試み、新規治療開発へ挑戦することを目的として実験を行った。

(1) 脾臓摘出マウスを用いた骨代謝にお

る脾臓の役割の解析を行ったところ、脾臓を摘出すると M-CSF 欠損マウスでは完全に破骨細胞および破骨細胞前駆細胞の骨における出現が抑制されたが、野生型マウスにおいてもわずかに抑制された。したがって、脾臓が骨代謝に関与していることが示唆された。

(2) IL-34 陽性血管内皮細胞と IL-34 陰性血管内皮細胞の遺伝子発現プロファイルの比較により、分泌タンパク質または膜タンパク質をコードする遺伝子において発現量の異なるものが複数得られ、機能解析に着手した。

(3) 加齢に伴う IL-34 の発現上昇に関する分子機構を解析するため、IL-34 陽性血管内皮細胞の長期培養を行うと、IL-34 の発現が減少した。

(4) ミクログリアは、アルツハイマー病の原因であるβアミロイドを貪食し病態を改善する役割を担う。IL-34 は、ミクログリアのセゾンや活性化を促進し、アルツハイマー病の病態改善に寄与することが報告されている。

我々は、活性型ビタミン D は in vivo、in vitro の骨や脾臓の細胞において、IL-34 の発現を上昇させることを見いだしていた。活性型ビタミン D 投与による IL-34 の発現上昇の作用点について解析した。

全身的な活性型ビタミン D の投与は、脾臓で最も顕著な発現上昇を認め、骨においても発現上昇が認められたが、脳においてはわずかな発現上昇を認めるのみであった。

一方、皮膚においては反対に IL-34 の発現低下が認められた。脳における IL-34 の発現上昇をもたらす活性型ビタミン D を探したが、そのような誘導体は見出せなかった。

したがって、活性型ビタミン D は脳血液関門により脳内への移行が制限されていると考えられた。

(5) 安全に脳へ活性型ビタミン D をデリバリーするための系の立ち上げに着手した。ラムダ縫合より薬剤入りハミルトンシリンジに連結した針を頭蓋骨に沿わせるように刺すと、くも膜下腔に薬剤が注入され、安全に脳へ薬剤がデリバリーされた。しかし、脳内活性型ビタミン D 投与により明らかな IL-34 の発現上昇は見出せなかった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Takahashi N, Udagawa N and Suda T (2014) Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *Bonekey Rep* 3:495 (査読有)

Yamashita T, Uehara S, Udagawa N, Li F, Kadota S, Esumi H, Kobayashi Y and Takahashi N (2014) Arctigenin inhibits osteoclast differentiation and function by suppressing both calcineurin- dependent and osteoblastic cell-dependent NFATc1 pathways. *PLoS ONE* 9:e85878 (査読有)

Okamoto M, Udagawa N, Uehara S, Maeda K, Yamashita T, Nakamichi Y, Kato H, Saito

N, Minami Y, Takahashi N and Kobayashi Y (2014) Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ -catenin signaling during osteoblastogenesis. *Sci Rep* 4:4493 (査読有)

Nakayama T, Thirukond GJ, Nagasawa S, Kawahara I, Udagawa N, Yagami K, Kawatani M, Osada H, Doi Y, Yoshinari N and Takahashi N (2014) Osteoclasts polarize on dental implant materials as if they were on bone. *J Oral Biosci* 56:136-42 (査読有)

Nakamichi Y, Horibe K, Takahashi N and Udagawa N (2014) Roles of cathelicidins in inflammation and bone loss. *Odontology* 102:137-46 (査読有)

Naruse K, Udagawa N, Garg A, Nakamura M and Nakano K (2014) Vertical ridge augmentation using allograft and synthetic hydroxyapatites after strategic extraction. *Clin Adv Periodontics* 4:81-7 (査読有)

Mochizuki N, Sugino N, Ninomiya T, Yoshinari N, Udagawa N and Taguchi A (2013) Association of cortical shape of te mandible on panoramic radiographs with mandibular trabecular bone structure in Japanese adults : a cone-beam CT-image analysis. *Oral Radiol* : Doi 10.1007/s11282-013-0155-z (査読有)

Udagawa N, Koide M, Nakamura M and Takahashi N (2013) Minocycline to be used a potential anti-bone resorption agents due to the suppression of osteoclastic bone resorption. *Journal of Oral Biosciences* 55, 16-22 (査読有)

Nakamichi Y, Udagawa N and Takahashi N (2013) IL-34 and CSF-1: similarities and differences. *J Bone Miner Metab* 31:486-95 (査読有)

Horibe K, Nakamichi Y, Uehara S, Nakamura M, Koide M, Kobayashi Y, Takahashi N and Udagawa N (2013) Roles of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine osteoclastogenesis. *Immunology* 140:344-51 (査読有)

Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N and Udagawa N (2013) Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: Comparison with RANKL- over expressing transgenic male mice. *Endocrinology* 154:773-82 (査読有)

Furuya Y, Inagaki A, Khan M, Mori K, Penninger JM, Nakamura M, Udagawa N, Aoki K, Ohya K, Uchida K, Yasuda H (2013) Stimulation of bone formation in cortical bone of mice treated with a receptor activator of nuclear factor- B ligand (RANKL)-binding peptide that possesses osteoclastogenesis inhibitory activity. *J*

[学会発表](計13件)

The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2014 Annual Meeting 2014年9月 Arctigenin Inhibits Osteoclastogenesis by Suppressing Both Calcineurin-Dependent and Osteoblastic Cell-Dependent NFATc1 Pathways: Yamashita T, Uehara S, Udagawa N, Li F, Kadota S, Esumi H, Kobayashi Y and Takahashi N (JBMR 29: pS170, SA0262) George R. Brown Convention center (Houston, USA)

The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2014 Annual Meeting 2014年9月 Possible role of RANKL-RANK signal in osteoblast differentiation: Nakamura M, Yamashita T, Nakamichi Y, Furuya Y, Yasuda H and Udagawa N (JBMR 29: pS163, SA0215) George R. Brown Convention center (Houston, USA)

歯科基礎医学会学術大会(第56回)2014年9月 発生過程における骨髄間葉系幹細胞の起源: 溝口利英, 宇田川信之, 高橋直之 (第56回歯科基礎医学会学術大会抄録集: p45, 01-E14) 福岡国際会議場(福岡市博多区)

歯科基礎医学会学術大会(第56回)2014年9月 抗炎症作用を持つアルクチゲニンの破骨細胞抑制メカニズム: 山下照仁, 小林泰浩, 上原俊介, 宇田川信之, 李峰, 門田重利, 江角浩安, 高橋直之 (第56回歯科基礎医学会学術大会抄録集: p181, P1-171) 福岡国際会議場(福岡市博多区)

日本骨免疫会議 第1回 2014年7月 抗炎症作用を持つアルクチゲニンの破骨細胞抑制メカニズム: 山下照仁, 小林泰浩, 上原俊介, 宇田川信之, 李峰, 門田重利, 江角浩安, 高橋直之 (第1回日本骨免疫会議抄録集: p215, 0P1-1) 万国津梁館(名護市)

日本骨免疫会議(第1回)2014年7月 W9 ペプチドのヒト破骨細胞分化抑制作用とヒト骨芽細胞分化促進作用: 中村美どり, 米田統一, 徳田吉彦, 山下照仁, 中道裕子, 古屋優里子, 保田尚孝, 宇田川信之 (第1回日本骨免疫会議抄録集: p215, 0P2-3) 万国津梁館(名護市)

日本骨免疫会議(第1回)2014年7月 硬組織再生におけるヒト歯髄細胞と骨髄間葉細胞の有用性についての比較解析: 中道裕子, 徳田吉彦, 萩原貴寛, 堀部寛治, 中村美どり, 高橋直之, 宇田川信之 (第1回日本骨免疫会議抄録集: p215, 0P2-5) 万国津梁館(名護市)

日本骨免疫会議(第1回)2014年7月 関節炎においてSfrp5の発現低下は骨破壊を増悪する: 小林泰浩, 前田和洋, 中村幸男, 加藤博之, 宇田川信之, 高橋直之 (第1回日本骨免疫会議抄録集: p221, 0P3-7) 万国津梁館(名護市)

日本骨代謝学会学術集会(第32回)2014年7月 RANKL-RANKシグナルの骨芽細胞分化促進作用の可能性: 中村美どり, 山下照仁, 堀部寛治, 古屋優里子, 保田尚孝, 宇田川信之 (第32回日本骨代謝学会プログラム抄録集: p252, P1-04) 大阪国際会議場(大阪市北区)

日本骨代謝学会学術集会(第32回)2014年7月 Wnt5aはLRP5/6の発現を介して古典経路を調節し、骨芽細胞分化を促進する: 岡本正則, 宇田川信之, 上原俊介, 前田和洋, 山下照仁, 中道裕子, 齊藤直人, 高橋直之, 小林泰浩 (第32回日本骨代謝学会プログラム抄録集: p253, P1-05) 大阪国際会議場(大阪市北区)

日本骨代謝学会学術集会(第32回)2014年7月 Wnt5a-Ror2シグナルは、Daam2-Rhoを介して骨吸収機能を促進する: 上原俊介, 山下照仁, 中村貴, 加藤茂明, 宇田川信之, 高橋直之, 小林泰浩 (第32回日本骨代謝学会プログラム抄録集: p256, P1-11) 大阪国際会議場(大阪市北区)

日本小児歯科学会大会(第52回)2014年5月 神経成長因子 Netrin-1のBMPとNogginによる軟骨細胞および骨芽細胞分化における役割: 中村浩志, 八上公利, 定岡直, 中村美どり, 宇田川信之, 大須賀直人 (小児歯科学雑誌52巻2号抄録集: p369, P-2-50) 品川区立総合区民会館(東京都品川区)

日本小児歯科学会大会(第52回)2014年5月 骨形成ペプチドW9の破骨細胞形成抑制とカップルした骨芽細胞分化誘導作用: 中村美どり, 中村浩志, 宇田川信之, 大須賀直人 (小児歯科学雑誌52巻2号抄録集: p370, P-2-51) 品川区立総合区民会館(東京都品川区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇田川 信之 (UDAGAWA, Nobuyuki)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 70245801

(2) 研究分担者

二宮 禎 (NINOMIYA, Tadashi)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号: 00360222

中道 裕子 (NAKAMICHI, Yuko)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号: 20350829

中村 美どり (NAKAMURA, Midori)
松本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 90278177

上原 俊介 (UEHARA, Syunsuke)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 90434480