

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861853

研究課題名(和文) 骨芽細胞による膜ナノチューブを介した破骨細胞分化制御

研究課題名(英文) Osteoblast regulates osteoclastogenesis via membrane nanotube

研究代表者

高橋 良 (TAKAHASHI, AKIRA)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60637924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新生児マウス頭蓋骨より採取した骨芽細胞と破骨細胞を共培養したところ骨芽細胞と破骨細胞間にナノチューブが形成されることを確認し、ナノチューブを介して骨芽細胞の細胞膜リン脂質が破骨細胞へと移動することを明らかにした。骨芽細胞は間葉系幹細胞(MSC)より分化することが知られているため、MSC間でのナノチューブを介した分子移動についても検討を行ったところMSCの細胞培養においても細胞間のナノチューブの形成を確認し、細胞質内のミトコンドリアがナノチューブを介して別のMSCに移動している所見を得た。またMSCの細胞の状態によってもミトコンドリアの交換率に差があることを明らかにした。

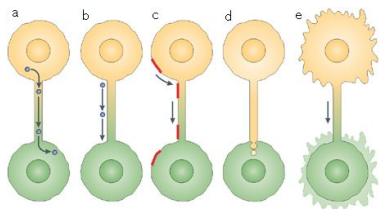
研究成果の概要(英文)：In this study, We confirmed that nanotubes are formed between osteoblast and osteoclast and membrane phospholipids of osteoblast are transferred to osteoclast through nanotubes. We also observed nanotube formation among osteoblast. As it is known that osteoblast is derived from mesenchymal stem cell (MSC), we focused on nanotube formed between MSCs. We observed that mitochondria in cytoplasm are transported from one MSC to another MSC via nanotubes. Transference rate of mitochondria of MCS harvested from mice that has inflammation systemically differ from those of WT mice. Our result provided the possibility that osteoblast send the information to osteoclast directly via naotubes.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：ナノチューブ 破骨細胞 骨芽細胞 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

歯科領域においては、特に歯周病に起因する骨破壊によって歯を失ったり、歯槽骨が過度に吸収し義歯やインプラントの治療時に不利な条件となることが多い。これらの病態においては骨吸収細胞である破骨細胞が中心的な役割を演じている。破骨細胞はマクロファージ系の単核の前駆細胞が融合して形成される骨吸収能を持った多核巨細胞である。前駆細胞同士の融合過程や破骨細胞活性化の制御機構に関しては未だに不明な点が多い。破骨細胞の分化融合因子として以下の報告がある。近年、免疫系の細胞が相互作用する際、「膜ナノチューブ」という非常に径の小さなチューブ状(径50~300nmで、長さ10~100 μ mあるいはそれ以上)の細胞間橋が重要であることが明らかにされつつある(Hase et al., 2009)。この細い管が細胞間の情報伝達に使われる。これまで我々は破骨細胞の分化融合過程における「膜ナノチューブ」の関与に注目して研究を行い、破骨細胞形成にナノチューブを介した情報伝達が重要な役割を果たしていることを明らかにした。



2. 研究の目的

骨芽細胞が破骨細胞分化を制御するメカニズムとして、従来 RANK-RANKL 系の関与が報告されているが、近年免疫系の細胞において報告されている膜ナノチューブと呼ばれる細い細胞間橋を用いた細胞間情報伝達が骨芽細胞による直接的な破骨細胞分化制御においても関与する可能性がディスカッションされているため、本研究ではこの点について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

骨芽細胞が破骨細胞分化を制御する際にナノチューブが関与する可能性についての検討、骨芽細胞が破骨細胞の分化を制御するメカニズムについての検討、骨芽細胞から破骨前駆細胞にどのような分子が移動するかの検討、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用についての検討の4点を大きな目的として計画した。

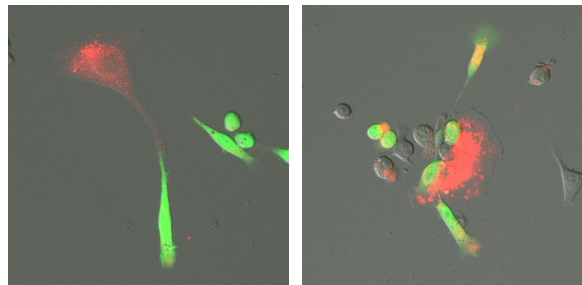
4. 研究成果

まず始めに破骨細胞と骨芽細胞間にナノチューブが形成されることと、ナノチューブを介した分子移動が起こっていることを確認

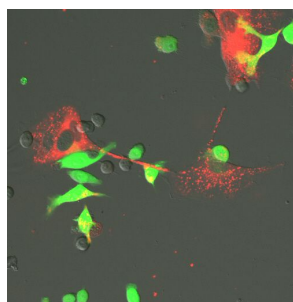
するために新生児マウスの頭蓋骨を採取し、酵素処理により骨芽細胞を抽出した。抽出した骨芽細胞は細胞膜リン脂質標識色素 DiI で赤色蛍光標識した。一方、破骨細胞前駆細胞株 RAW-D cell には GFP 発現ベクターを遺伝子導入し、緑色蛍光で標識した。

骨芽細胞と破骨細胞を共培養し1日後、2日後、3日後に共焦点レーザー顕微鏡下で観察を行った。その結果、培養1日目より骨芽細胞-破骨細胞間にナノチューブの形成が認められ、培養2、3日目になると骨芽細胞の赤色標識された細胞膜リン脂質が破骨細胞へと移動した所見を得た。一方で骨芽細胞には破骨細胞に発現した GFP は取り込まれていなかった。

赤色:骨芽細胞 緑色:破骨細胞



次に骨芽細胞により破骨細胞分化が促進されるかどうかを確認するためにマウス新生児頭蓋骨より採取した骨芽細胞とマウス大腿骨より採取した骨髄マクロファージを共培養し、RANKL, M-CSF を添加し共培養下で破骨細胞へと分化誘導した。培養3,4日目に TRAP 染色し破骨細胞系について確認したところ破骨細胞形成に有意差は認められなかった。播種する細胞は1wellあたり cell で骨芽細胞と破骨細胞の割合を変えて同様の実験を行ったが破骨細胞形成に有意差は認められなかった。



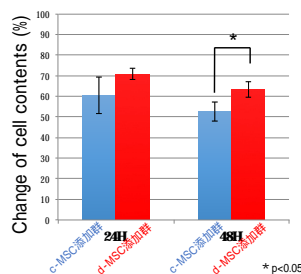
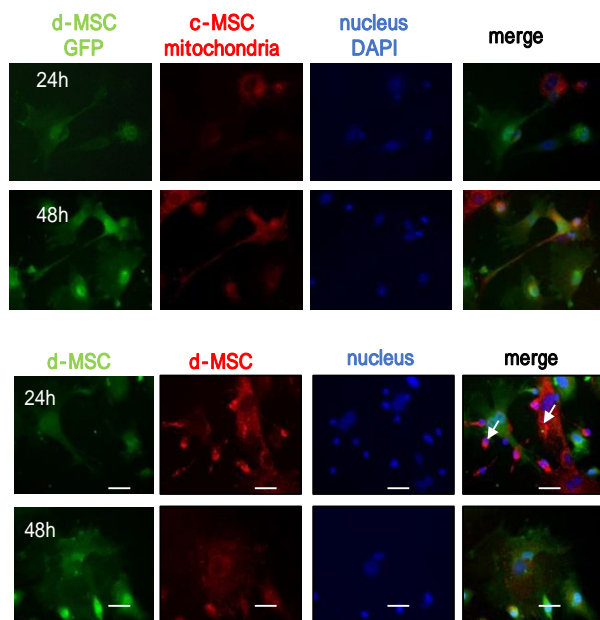
骨芽細胞間に形成されたナノチューブ(赤色蛍光)

先の実験より骨芽細胞-破骨細胞間に認められたナノチューブ以外にも骨芽細胞-骨芽細胞間においてもナノチューブの形成を認めた。そのため破骨細胞以外にも骨芽細胞間でナノチューブを介した情報伝達機構が存在するかの検討を行うために以下の実験を行

った。マウス骨髄細胞より間葉系幹細胞 (MSC: Mesenchymal Stem Cell) を採取し、ミトコンドリア標識試薬で赤色に染色した。一方で GFP 発現マウスの骨髄細胞より同様に MSC を採取し、2 種の細胞の共培養を行った。その結果培養 24 時間後では細胞間にナノチューブの形成を認め、さらに赤色標識されたミトコンドリアがもう一方の GFP 発現 MSC に移動している所見を認めた。



さらにナノチューブの機能について検討するため以下の実験を行った。Zoledronate (静注) (2 回/週) 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と Dexamethasone (腹注) (2 回/週) 10 mg/kg を投与し全身的に炎症を惹起させた GFP マウスより採取した d-MSC (緑色蛍光) と control マウスより採取した c-MSC (赤色蛍光: ミトコンドリアを赤色標識) を共培養した。一方で GFP マウスより採取した d-MSC (緑色蛍光) と Zoledronate (静注) (2 回/週) 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と Dexamethasone (腹注) (2 回/週) 10 mg/kg を投与した C57 BL/6N マウスより採取した d-MSC (赤色蛍光: ミトコンドリアを赤色標識) を共培養し両者で細胞内容物の移動量について検討を行ったところ、共培養 48 時間後では細胞内容物の交換率が d-MSC を共培養したときの方が有意に高くなった。



今回の研究により骨芽細胞はナノチューブを介して破骨細胞に細胞膜リン脂質を移動させていることが分かった。細胞膜リン脂質には脂質ラフトと呼ばれる膜を介したシグナル伝達や細胞内小胞輸送に関わる膜タンパクの集積構造があることが知られており、細胞膜のリン脂質の移動が起こることで骨芽細胞-破骨細胞間で何らかのシグナルなどの情報伝達が行われている可能性が考えられる。また、骨芽細胞に分化する MSC においても MSC 間でナノチューブが形成され、細胞の状態によってその細胞内容物の交換率に差があることが分かった。今後は骨芽細胞-破骨細胞間においてナノチューブを介した具体的な分子の移動、細胞の状態による細胞内容物などの交換について実験を進め、どのような分子が直接的に破骨細胞分化に関与しているか検討していきたいと考えている。

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 1 件)

Toshio Kukita, Akira Takahashi, Jing-Qi Zhang, Akiko Kukita, Membrane Nanotube Formation in Osteoclastogenesis, *Methods of Molecular Biology (in press)*, 2014. 11.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) Atsuta I, Ayukawa Y, Kondo R, Matsuura Y, Furuhashi A, Takahashi A, Koyano K. Mesenchymal stem cells promote soft tissue sealing around titanium implants. 86th Annual Meeting of the American Prothodontic Society. 2014 年 2 月 20 日. Chicago

(2) 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. 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. 第 55 回歯科基礎医学会. 2013 年 9 月 22 日 岡山

(3) 松浦由梨, 熱田生, 鮎川保則, 高橋良, 近藤綾介, 古谷野潔. 病態の異なる host MSC の

相互作用について ~BRONJモデルマウスを用いて~ . 病態の異なるhost MSCの相互作用について ~BRONJモデルマウスを用いて~
2014年 8月26日 徳島

〔その他〕
ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 良(TAKAHASHI AKIRA)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：60637924

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし