

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293432

研究課題名(和文) 高次再生医療・骨減少症治療への応用を目指した神経 血管 骨ネットワークの分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of nerve-vessel-bone network

研究代表者

佐藤 毅 (SATO, Tsuyoshi)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60406494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Netrin4のin vitroにおける破骨細胞への作用の解析、netrin4が骨粗鬆症の治療に有効かどうかの検討、さらにはSemaphorin 3Aが骨細胞に対する作用の解析を行った。Netrin4は破骨細胞分化を抑制し、骨粗鬆症モデルマウスにおいて予防的効果を有することが明らかとなった。Semaphorin 3AはCdk6の減少を伴い骨細胞の細胞突起を伸長させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Bone is a highly vascularized organ, thus angiogenesis appears a vital process during bone remodeling. However, the role of vascular systems in bone remodeling and the effect of Sema3A on dendritic processes of osteocyte cell line are not well understood. Here we show that netrin-4 inhibits osteoclast differentiation in vitro and in vivo. Co-cultures of bone marrow macrophages with vascular endothelial cells markedly inhibited osteoclast differentiation. Administration of netrin-4 prevented bone loss in an osteoporosis mouse model by decreasing the osteoclast number. We also found that Sema3A regulates dendrites of osteocytes in association with downregulation of Cdk6.

研究分野：口腔外科学

キーワード：netrin-4 semaphorin 3A 骨細胞 血管内皮細胞 破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域における腫瘍・炎症・骨折などによる骨欠損・変形に対する治療法としては再生医療が最も期待される。しかしながら、形態・機能を回復するのが困難な場合も少なくなく、たとえば顔面骨の大部分が欠損すると審美性や咀嚼機能の低下、さらには感覚神経麻痺が引き起こされる。とりわけ下顎骨は骨内部を太い知覚神経・血管が伴走するという特徴を持ち、単なる骨組織の再生をするだけでは機能の回復は極めて困難といえる。また骨粗鬆症や歯周病など骨減少を呈する疾患に対しても神経と血管の再生は重要な課題である。生体には各臓器間のネットワークシステムが存在し、内分泌系・神経系がそれを担っており、生体反応を制御している。近年の研究から、骨組織はさまざまな臓器により制御されていることが明らかとなりつつあり(Karsenty, *Nature* 2012)、生体ネットワークの中でいかに骨を再生させるかを考えなければならない。血管・神経ネットワークは、このシステムを構築するのに重要であり、血管・神経ネットワークの解明は生体の有機的応答を理解するために必要である。近年の再生医療では1つの器官の再生を目指す研究が主であるが、生体では1つの器官が独立して存在するわけではなく、器官を支配する血管・神経系のネットワークも考慮しなければならず、臓器と血管そして臓器と神経の相互作用の理解も必要である。近年、自律神経系が骨代謝を制御していることが明らかになり(Takeda, *Cell* 2002)、また神経制御因子による骨代謝制御機構の存在も報告されている(Zhao, *Cell Metab* 2006; Negishi, *Nat Med* 2011)。

われわれはこれまでに神経系による骨代謝の制御機構について解析を行ってきた。神経伝達物質であるアセチルコリンが骨芽細胞に作用して増殖を促進し分化を抑制することを見出し(佐藤ら *FEBS Lett* 2010)、骨のみならず様々な臓器においてアセチルコリンが細胞間ネットワークシグナルとしての役割を担っていることを提唱してきた(Sato, *BiolMol Con* 2010)。最近、われわれは感覚神経が海綿骨にまで及び、semaphorin 3Aを介して骨代謝を制御するという骨代謝の新たな調節機構を発見した(Fukuda, Sato, *Nature* 2013)。これらの知見は骨代謝における神経ネットワークの重要性を示している。一方で、神経・血管・骨との関係を考えて場合、骨膜や海綿骨の内部まで神経・血管ネットワークが張り巡らされていることを考慮すると、骨代謝制御には神経系のみならず血管系による調節機構も存在すると考えられる。臓器間ネットワークにおいては、各々の細胞間のコミュニケーションが重要で、例えば破骨細胞の分化に骨芽細胞との接触が必要であるなど、細胞間の相互作用の理解が必須である。しかしながら、血管内皮細胞と骨関連細胞との相互作用、神経細胞と骨関連細胞との相互作用については、お互いの分化に影響を与え

るのかどうか、あるいはどのような分子がお互いの分化調節に関与しているか、など不明な点が多い。

われわれは本研究を開始するにあたり血管内皮細胞と破骨細胞、神経細胞と骨関連細胞との組み合わせを検討した。血管内皮細胞と破骨細胞との非接触型共存培養を行ったところ、破骨細胞の分化が抑制された。この分化抑制が抗 netrin-4(Ntn4)抗体で解除されたことから、これを担う分子が血管内皮細胞より産生される Ntn4 である可能性を見出した。また、神経細胞と骨芽細胞との接触型共存培養を行い、神経細胞の分化マーカーを免疫染色で調べたところ骨芽細胞の分化マーカーの発現が上昇していた。神経細胞は骨髄腔内にまで進入していることから骨細胞との作用があるとも考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では次の事を明らかにすることを目的とした。まず Ntn4 の in vitro における機能の解析および Ntn4 の骨減少症および骨再生医療への応用できるかどうか、検討することである。次に、semaphorin 3A(SEMA 3A)が骨細胞に対してどのような作用を示すのか、検討することである。

## 3. 研究の方法

(1) Ntn4 の in vitro および in vivo における解析

### 試薬・抗体

組み換え型マウス Ntn4 を用いた。中和抗体による実験は、抗 Ntn4 抗体 (AF1132)、Normal goat IgG を用いた。Western Blot 分析では抗 Ntn4 抗体(sc-365280) およびβ-actin (sc-47778)を用いた。

### 細胞培養および TRAP 染色

マウス破骨細胞は、in vitro における培養プロトコルに従い分化させた。8~10 週齢の雌の C57BL/6 マウスの脛骨から採取した骨髄細胞を 10% FBS 1% penicillin/streptomycin (P/S)を添加した MEMα培地で 16~20 時間培養した。培養後、上清に含まれた非接着細胞を  $1 \times 10^5/\text{cm}^2$  で播種し、10 ng/ml の M-CSF を添加し、48 時間培養した。培養後の接着細胞を骨髄マクロファージ (BMMs) として使用し、10 ng/ml の M-CSF と 100 ng/ml の RANKL を加えて培養した。組み換え型マウス Ntn4 は RANKL を添加した際に同時に添加した。5 日間の培養後、10% ホルマリンで 5 分間固定し、エタノールおよびアセトン (容量 50:50) にて 1 分間再固定した。破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) を検出するために、naphthol AS-MX phosphate と fast red violet LB salt を添加した 50mM の酒石酸含有緩衝液にて室温で染色 (TRAP 染色) した。3 核以上の TRAP 陽性細胞を破骨細胞として計算した。

マウス血管内皮細胞系の UV♀ 2 (UV2: RCB1994) は、10% FBS 1% P/S を添加した MEMα培地で培養した。実験は、細胞間非接

触型共培養のトランスウェルシステムを採用した。下段にBMMsを $300 \times 10^4$  cell/wellで、上段にUV2を $3 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>で播種し、10ng/mlのM-CSFと100 ng/mlのRANKLの存在下で培養し、TRAP染色した。すべての細胞培養は、2~3日毎に培地交換を行い、二酸化炭素濃度5%、37℃の環境下で培養を行った。

#### 細胞増殖試験

細胞を96 well plateに $5 \times 10^3$ 個/wellで播種し、リコンビナントマウスSEMA 3A (15, 31, 62, 125, 250, 500, 1000 ng/ml)あるいはPBSと共に48時間血清存在下で培養した。Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assayを用いて、各wellにCell Titer 96 Aqueous One Solutionを添加してから3時間後にマイクロプレートリーダーにて490 nmの吸光度測定を行った(N=6にて定量)。データは相対比で示した。

#### 実験動物

実験に用いたすべてのマウスはC57BL/6で、東京実験動物株式会社より購入し、埼玉医科大学口腔外科学教室の環境的に制御された研究室の部屋で飼育した。また、実験は埼玉医科大学動物実験委員会による動物実験規程に従った(No.1165)。

#### 定量PCR

細胞を氷冷PBSで洗浄しISOGENを1 ml加えてスクレイパーで回収し、プロトコールに従って全RNAを抽出し、THUNDERBIRD SYBR qPCR MixによりSYBR法で定量PCRを行った。定量PCRの分析に関して、比較Ct法を用いてβ-actinを内部標準とした。

#### Ntn4濃度測定

RANKLを添加したBMMs細胞の培養上清、UV2細胞の培養上清、UV2細胞とM-CSFおよびRANKLを添加したBMMs細胞との共存培養の培養上清、それぞれのNtn4濃度をNtn4 ELISA kitで測定した。

#### Western Blot 分析

細胞を氷冷PBSで洗浄し lysis バッファー (1% Triton-X 100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 μg/ml aprotinin, 0.1 M NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF)にて溶解した。サンプルは20分間氷上に置き、5分間4℃で $15,000 \times g$ にて遠心した。抽出したタンパク質を8-16%のMini-Protean Gel TGXにSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離後、30分間200Vでトランスブロット転写システムにてミニポリリッ化ビニリデン転写膜へ転写した。非特異的結合を防ぐため膜を5%のスキムミルクに浸した後、それぞれの抗体を用いて検出した。化学発光検出試薬としてClarity Western ECL Substrateを使用し、Chemi-Doc XRS Systemにて検出した。

#### RNA 干渉

siRNAとしてStealth Select RNAi siRNA for murine Ntn4 (MSS226595, MSS226596, MSS226597)、Stealth RNAi Negative Control Duplex (si-CTL)を用いて、細胞への導入は

Lipofectamine RNAi MAXで行った。

RANKL 誘導性骨粗鬆症モデルマウスの作製

7週齢の雄のマウスに可溶性RANKL (sRANKL, 1mg/kg)を24時間毎に、3日間腹腔内注射を行った。対照実験として、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いた。リコンビナント Ntn4 (1mg/kg)は24時間毎のsRANKLやPBSの前に3日間腹腔内注射を行い、最後の腹腔内注射の90分後に安楽死させた。

#### 骨形態計測による解析

マウスは安楽死させる5日前と2日前にカルセイン(25mg/kg)を腹腔内注射し、腰椎の非脱灰切片を作製し、フォンコッサ染色、トレイジブルー染色およびTRAP染色を行った。形態計測分析はOsteoMeasure Analysis Systemを用いて分析した。測定項目として、BV/TV(%), BFR/BS(μm<sup>3</sup> mm<sup>-1</sup> yr<sup>-1</sup>), MAR;(mm yr<sup>-1</sup>), Ob.S/BS(%), N.Oc/B.Pm(per 100mm)を計測した。

#### 統計学的解析

結果間の比較はOne-Way Analysis of VarianceあるいはBonferroni/Dunn methodsを用いて、平均値および平均値の標準誤差(SEM)にて解析した(#p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001)。

(2)SEMA 3Aの骨細胞に対する作用の解析  
細胞培養・試薬

マウス前骨細胞株MLO-Y4細胞(Missouri大学Lynda F. Bonewald博士より分与)をコーゲン(rat tail collagen type I; 0.15 mg/ml)でコーティングしたdishにて、2.5%のFBSウシ胎児血清と2.5%のCS子ウシ血清と抗生物質を含有したα-Modified Eagle's培地で培養した。細胞は10cm dishに $160 \times 10^4$ 個/dishで播種した。無血清下実験については、10cm dishに細胞を播種し24時間培養後、18時間無血清状態で培養した。リコンビナントマウスSEMA 3AはR&D Companyから購入した。飢餓状態の細胞は、Western Blottingを行うためにリコンビナントマウスSEMA 3A (500 ng/ml)で処理後、1, 3, 6時間でタンパク質を回収した。

#### クリスタルバイオレット染色

細胞は血清存在下、24 well plateに $12 \times 10^4$ 個/wellで播種し、SEMA 3A (500 ng/ml)で処理して24時間培養後、5分間10%ホルマリンで固定して、0.05%クリスタルバイオレットで染色した。MLO-Y4細胞の細胞突起の形態観察のため、倒立顕微鏡で写真撮影を行なった。

#### 細胞増殖試験

細胞を96 well plateに $5 \times 10^3$ 個/wellで播種し、リコンビナントマウスSEMA 3A (15, 31, 62, 125, 250, 500, 1000 ng/ml)あるいはPBSと共に48時間血清存在下で培養した。Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assayを用いて、各wellにCell Titer 96 Aqueous One Solutionを添加してから3時間後にマイクロプレートリーダーにて490 nm

の吸光度測定を行った (N=6 にて定量)。データは相対比で示した。

#### 細胞突起の伸長の定量分析

細胞は 8mm のスライドチャンパーに  $5 \times 10^3$  個/well で播種し、24 時間リコンビナントマウス SEMA 3A (500 ng/ml) あるいは PBS で培養後、2 回 PBS で洗い、常温にて 10 分間 4% パラホルムアルデヒドで固定した。細胞は 5 分間プロテアーゼ阻害剤含有の RIPA バッファで処理し、1% ウシ血清アルブミンにて 1 時間ブロッキングを行なった。細胞を Alexa-488-conjugated phalloidin で染色し、DAPI 含有 Vectashield Mounting Medium にて対比染色を行なった。細胞突起の平均伸長 ( $\mu\text{m}$ ) と合計伸長 ( $\mu\text{m}$ ) について Cellomics ArrayScan VTI high content imaging system にて付属ソフトの標準的アルゴリズムを用いて解析を行った。

#### 定量 PCR

細胞を氷冷 PBS で洗浄し ISOGEN を 1 ml 加えてスクレイパーで回収し、プロトコールに従って全 RNA を抽出し、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix により SYBR 法で定量 PCR を行った。使用したプライマーは表 1 の通りである。定量 PCR の分析に関して、比較 Ct 法を用いて  $\beta$ -actin を内部標準とした。

#### Western Blot 分析

細胞を氷冷 PBS で洗浄し lysis バッファ (1% Triton-X 100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 0.1 M NaF, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSF) にて溶解した。サンプルは 20 分間氷上に置き、5 分間  $4^\circ\text{C}$  で 15,000 $\times g$  にて遠心した。抽出したタンパク質を 8-16% の Mini-Protean Gel TGX に SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離後、30 分間 200V でトランスブロット転写システムにてミニポリフッ化ビニリデン転写膜へ転写した。非特異的結合を防ぐため膜を 5% のスキムミルクに浸した後、それぞれの抗体を用いて検出した。化学発光検出試薬として Clarity Western ECL Substrate を使用し、Chemi-Doc XRS System にて検出した。1 次抗体としてヤギポリクローナル抗 E11 抗体、マウスモノクローナル抗 CDK6 抗体 [DCS-83]、ラビットポリクローナル抗 CDK4 抗体 [C-22] を使用した。また、2 次抗体として、抗ヤギ IgG horseradish peroxidase (HRP) 標識抗体 (sc-2020)、抗ラビット IgG HRP 標識抗体、抗マウス IgG HRP 標識抗体を使用した。内部標準としてマウスモノクローナル抗  $\beta$ -actin 抗体を使用した。

#### 統計学的解析

結果間の比較は Student's t-test を用い、平均値および平均値の標準誤差 (SEM) にて解析した (# $p < 0.05$ )。

## 4. 研究成果

### (1) Ntn4 の in vitro および in vivo における解析

破骨細胞分化抑制は骨髄細胞と血管内皮

### 細胞の非接触培養により起こる

血管内皮細胞と RANKL 存在下骨髄細胞の非接触型共存培養で破骨細胞分化を抑制するかどうか検討したところ、分化抑制が起こることがわかった (図 1A,B)。つぎに血管内皮細胞の産生する Ntn4 に着目した。UV2 細胞は Ntn4 を強く発現しており (図 1C) UV2 細胞の培養上清、UV2 細胞と M-CSF および RANKL を添加した BMMs 細胞との共存培養の培養上清において Ntn4 濃度は対照群より有意に高かった (図 1D)。

### Ntn4 は破骨細胞分化を抑制する

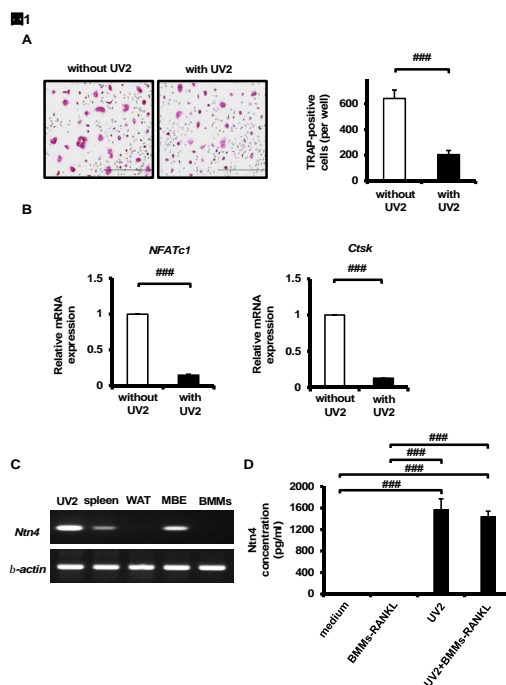
Ntn4 が破骨細胞分化を引き起こすかどうか検討したところ、濃度依存性に分化を抑制した (図 2A-C)。

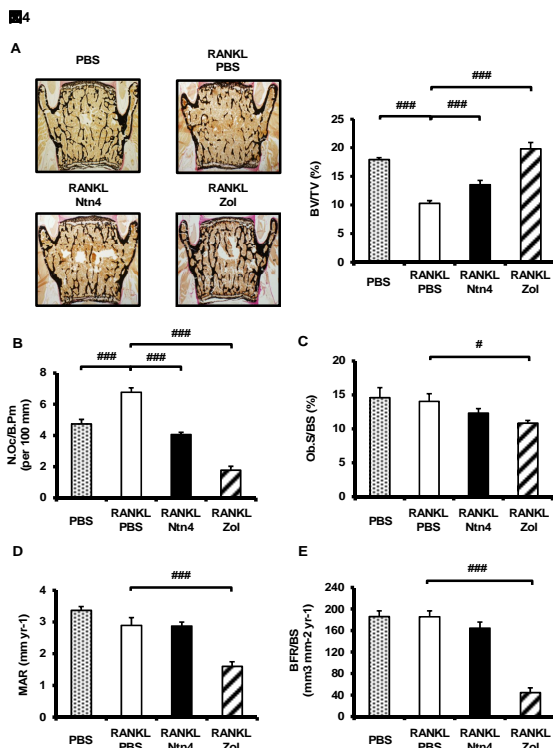
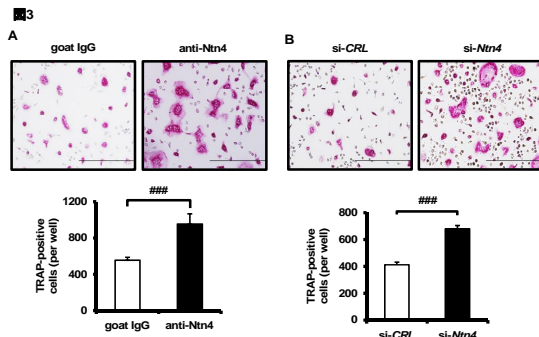
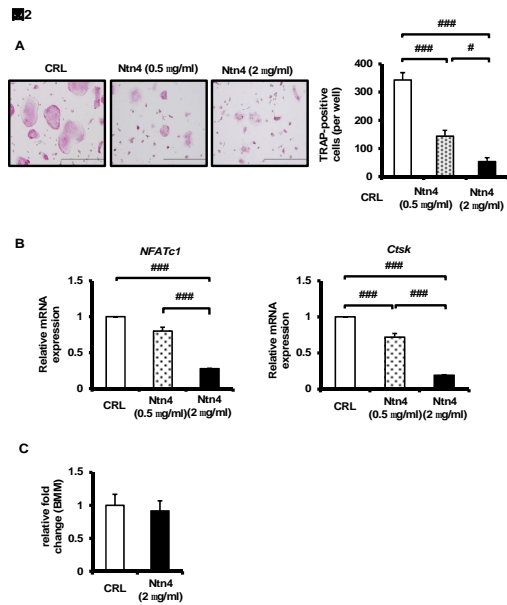
血管内皮細胞から産生される Ntn4 が破骨細胞分化を抑制する

血管内皮細胞から産生される Ntn4 が破骨細胞分化を抑制するかどうか検討したところ、Ntn4 の中和抗体実験と RNA 干渉実験から抑制することが明らかとなった (図 3A,B)。

Ntn4 は RANKL 投与による骨粗鬆症モデルマウスの骨吸収を抑制する

RANKL 誘導性骨粗鬆症モデルマウスにあらかじめ Ntn4 を投与すると、RANKL による骨破壊が起こらなかった (図 4A-E)。





(2) SEMA 3A の骨細胞に対する作用の解析

SEMA 3A は MLO-Y4 細胞の細胞突起を伸長させる

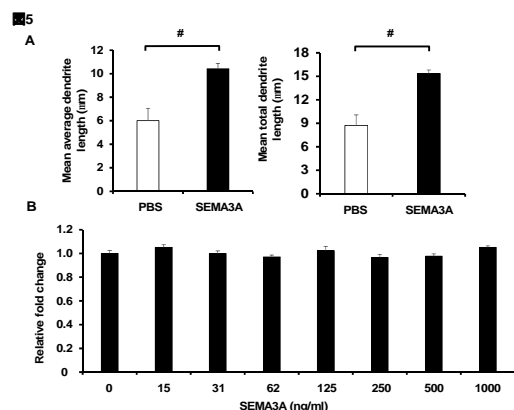
まず、SEMA 3A が骨細胞に対して形態変化を引き起こすかどうかを調べた。リコンビナントマウス SEMA 3A を MLO-Y4 細胞の培地に加え、クリスタルバイオレットで染色し、24 時間後に形態を観察したところ細胞突起が伸長していた。次に骨細胞突起の伸長を定量するために神経細胞突起の伸長の定量で使用されている Cellomics Array Scan VTI を用いた。SEMA 3A で刺激した細胞では合計の長さが 15.35  $\mu\text{m}$ 、平均の長さが 10.43  $\mu\text{m}$  であり、対照群では合計の長さが 8.73  $\mu\text{m}$ 、平均の長さが 6.01  $\mu\text{m}$  であった(図 5A)。この結果から、合計の長さおよび平均の長さは SEMA 3A で刺激した細胞の方が有意に長いことが明らかとなった。さらに、SEMA 3A により細胞数が増加して細胞突起のパラメーターが増大しているかどうかを検討するため、SEMA 3A の MLO-Y4 細胞に対する細胞増殖試験を行った。その結果、SEMA 3A は MLO-Y4 細胞の増殖に影響を与えなかった(図 5B)。

MLO-Y4 細胞の E11 タンパク質は SEMA 3A 刺激で増加する

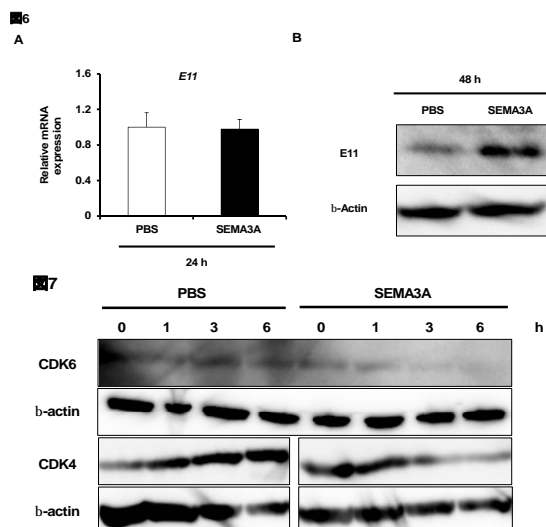
前骨細胞ではメカニカルストレスによる細胞突起伸長の際に E11 発現が上昇することから、MLO-Y4 細胞において SEMA 3A が E11 の mRNA レベル及びタンパク質レベルで影響を与えるかどうかを調べた。リコンビナントマウス SEMA 3A (500 ng/ml) で刺激した MLO-Y4 細胞において E11 の mRNA 発現に変化はなかったが(図 6A)、E11 タンパク量は増加した(図 6B)。

無血清培地下の MLO-Y4 細胞において SEMA 3A 刺激により CDK6 は減少する

骨芽細胞の分化過程において CDK 6 の減少が認められることが報告されている。そこで、骨芽細胞に由来する骨細胞の分化においても CDK6 の減少が関与するかどうかを検討した。Ogasawara らのプロトコルを参考に、細胞は血清を除去した培地で培養を行った。MLO-Y4 細胞を 18 時間無血清培地で培養した後、リコンビナントマウス SEMA 3A あるいは PBS で処理した。SEMA 3A で刺激した MLO-Y4 細胞において CDK6 は時間依存的に減少した(図 7)。一方で、G1 期の細胞周期促進タンパクである CDK4 のレベルも時間依存的に減少した。







## 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2件)

Niimura M, Sato T, Enoki Y, Okubo M, Kokabu S, Takeda S, Yoda T. Semaphorin 3A promotes dendrite elongation of osteocytes in association with downregulation of cdk6. In Vivo 2016 May-June 30(3):231-6. 査読有

Enoki Y, Sato T, Tanaka S, Iwata T, Usui M, Takeda S, Kokabu S, Matsumoto M, Okubo M, Nakashima K, Yamato M, Okano T, Fukuda T, Chida D, Imai Y, Yasuda H, Nishihara T, Akita M, Oda H, Okazaki Y, Suda T, Yoda T. Netrin-4 derived from murine vascular endothelial cells inhibits osteoclast differentiation in vitro and prevents bone loss in vivo. FEBS Lett 2014 Jun;588:2262-2269.

DOI: 10.1016/j.febslet.2014.05.009. 査読有

[学会発表](計2件)

塘田健人, 佐藤毅, 大久保正彦, 榎木祐一郎, 古株彰一郎, 依田哲也: 骨芽細胞と神経芽細胞は相互に分化を促進させる. 第70回日本口腔科学会, 福岡, 2016年4月17日

榎木祐一郎, 佐藤毅, 林直樹, 北村智久, 大久保正彦, 古株彰一郎, 福島洋介, 新村昌弘, 依田哲也: Netrin4 を介した血管内皮細胞による新たな骨代謝調節機構と骨粗鬆症に対する臨床応用. 第68回日本口腔科学会, 東京, 2014年5月9日

[図書](計1件)

Enoki Y, Sato T, Yumoto M, Ikami E, Kitamura T, Hayashi N, Nakanoka C, Okubo M, Sano Y, Fukushima Y, Kokabu S, Yoda T. Vascular endothelial cells inhibit osteoclast differentiation via not osteoprotegerin but netrin-4. Oral science in Japan, 31-33, 2014

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤 毅 (SATO, Tsuyoshi)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 60406494

### (2)研究分担者

臼井 通彦 (USUI, Michihiko)  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 10453630

水野 洋介 (MIZUNO, Yosuke)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 30406532

松本 征仁 (MATSUMOTO, Masahito)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90321819

古株 彰一郎 (KOKABU, Shoichiro)  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 30448899

### (3)連携研究者

岡崎 康司 (OKAZAKI, Yasushi)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 80280733

須田 立雄 (SUDA, Tatsuo)  
埼玉医科大学・医学部・客員教授  
研究者番号: 90014034

西原 達次 (NISHIHARA, Tatsuji)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 80192251

依田 哲也 (YODA, Testuya)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 60242210