

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460488

研究課題名(和文) 骨髄内・外からの破骨細胞分化制御機構と骨粗鬆症治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of osteoclastogenesis by intra- and extra-medullary regulation to prevent osteoporosis

研究代表者

林 眞一 (Hayashi, Shin-ichi)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：50208617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症の予防法を骨吸収細胞である破骨細胞の分化調節に求めてきた。その結果、破骨細胞分化には骨髄内のT細胞と腹腔細胞による調節機構が存在し、後者は再生能がないことを見出した。雌雄ともに骨髄細胞のM-CSFとRANKL添加による破骨細胞への分化効率は腹腔低張処理で半減し、一方、骨中の成熟破骨細胞は倍増していた。よって、腹腔細胞から骨髄T細胞へ破骨細胞分化抑制機構の存在を示唆している。さらに低張処置マウスの症状は骨粗鬆症モデルの卵巣摘出マウスと類似しており、共通した骨量制御機構の存在を示唆している。これらの反応を司る細胞群を決定すれば、新しい骨粗鬆症治療の開発へと向かうと思われる。

研究成果の概要(英文)：To prevent post-menopausal osteoporosis, persistent and reliable therapy is required. For this purpose, I am studying the regulation mechanisms of development of osteoclasts which resorb bone. I detected the osteoclastogenesis in both male and female mice is controlled by intra- and extra-medullary regulation. Cells for latter regulation are present in peritoneal cavities, and once lost, are not to be recovered. The flow cytometric analysis of bone marrow T cells did not show any significant difference with or without hypotonic treatment for removing peritoneal cells; however, the response to peritoneal cells is dependent on bone marrow T cells. The phenotype in these treated mice resembles the ovariectomized one carrying osteoporosis, suggesting the presence of common pathway in both conditions. The decision of the regulatory cells in the peritoneal cavity will result in the development of novel therapy for osteoporosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：炎症 破骨細胞 骨髄細胞 腹腔細胞 自然リンパ球 骨吸収 免疫学

1. 研究開始当初の背景

長寿大国となった我が国は、莫大な老人医療費、Quality of Lifeなど様々な問題を抱えている。その中で、もし閉経後の女性に頻発する骨粗鬆症の予防法ができれば、影響は極めて大きい。その予防法を一般化するために、1、単純で安価なこと、2、確実な効果があり、3、一度の処置で効果が持続でき、さらに、4、副作用を伴わない非侵襲性のものが望まれる。現在、対症療法的なものは進歩してきたが、まだ、恒常的制御システムを標的にした治療法は見出されていない。

2. 研究の目的

本研究は、基礎研究から破骨細胞分化効率を恒久的に低下させる機構を理解し、骨粗鬆症治療へと応用するために標的とする細胞系譜を特定し、骨粗鬆症の発症を阻止し、本研究成果を社会へ還元することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 実験動物：

C57BL/6マウスを低張処理、卵巣摘出(OVX)などに用いた。各種免疫不全マウス (BALB/c-*Foxn1*^{nu/nu}、B6-*Rag1*-KO、BALB/c-D011.10-T細胞抗原受容体トランスジェニックマウス(TCR-Tg)、B6-OT-I、-OT-II-TCR-Tg)、CBA/Nマウスを鳥取大学実験動物委員会の承認を得て使用。

(2) 腹腔低張処理による腹腔内細胞群の除去：

滅菌 2 留水と等張のPBSをそれぞれ3 mL腹腔注射し、経時的にマウスから大腿骨、頸骨を回収し、骨髓細胞を回収し、M-CSFとRANKLの添加で6日間、破骨細胞分化誘導の培養を行った。破骨細胞数はTRAP染色陽性の3核以上の多核細胞として算出した。

組織切片用に4%パラホルムアルデヒド固定、EDTA溶液による脱灰を経て、組織切片を作成し、TRAP染色後、陽性の面積をImage Jソフトで解析、変化を比較した。

(3) 骨髓中に存在する破骨細胞分化制御細胞群の機能検討：

骨髓細胞中に存在する破骨細胞前駆細胞と制御細胞としてT細胞マーカー (CD4, CD8alpha, CD8beta, CD5, Thy1.2) 陽性細胞を磁気ビーズで除去し、分化誘導で破骨細胞数を算出し、関与について検討した。フローサイトメーターで、各T細胞マーカー陽性画分の分布を検討した。

4. 研究成果

(1) 腹腔低張処理による骨髓破骨細胞の変化：

腹腔低張処理を行い、6週以降の経過したものではありません。等張PBSの処置マウスに比べ破骨細胞誘導数が半減した。この低下は1回の処置で少なくとも1年以上維持された。最長1年6か月のマウスを検討した。骨髓のT細胞中心にフローサイトメーターで解析したが、PBS処置マウスとの間に大きな違いは見いだせなかった。低張処理の効果は、T細胞欠損の*Rag1*-KO並びに*Foxn1*遺伝子欠損マウスではもちろん見出されないが、T細胞抗原受容体のトランスジェニックマウスでも見出されなかった。以上の結果は、この減少にT細胞が関与しており、その抗原特異性は使用したTgマウス(卵白アルブミン)では見出されないものであった。自己抗原などが標的の抗原かもしれない。腹腔低張処理により除去される細胞群は、*Btk*欠損マウスには見出されないことが明らかになった。低張処理マウスの骨切片のTRAP陽性の面積を陰性部分との比率で解析すると、分化誘導して減少していた低張処理マウスの方が増加しているという結果を見出した。

(2) OVX マウスとの比較検討：上記の結果は一見、矛盾しているように思えたので、骨粗鬆症モデルのOVX マウスを作成し比較検討した。その結果、OVX 後4週間は大きな差は見いだせないが、それ以降経過するとOVXの骨髄細胞からの破骨細胞分化がやはり減少していた。骨粗鬆症は進行して骨組織の破骨細胞の面積は増加していると考えられる。このことは、低張処理、OVXともに、処置後5-6週経過すると、骨髄細胞からの破骨細胞分化誘導が減少し、その分、骨組織の成熟破骨細胞が増加しており、分化が成熟の方向へ傾いているように思えた。

以前の結果と本研究の成果を合わせて考えると、以前予想していた骨髄細胞からの分化の減少は分化抑制ではなく、むしろ分化亢進による消費による減少ととらえるべきものと思われる。以前、水をお腹に打って骨粗鬆症を直すという発想はむしろ破骨細胞分化促進をもたらす骨粗鬆症を悪化させる可能性が高い。むしろ積極的にこの腹腔細胞を戻すことで骨粗鬆症の進行を止められると思われる。或いは、この細胞の減少が結果的に老人性の骨粗鬆症を発症させているのかもしれない。そうなれば、この細胞が骨粗鬆症のインジケータ細胞となりうる。さらにこの研究を続けさせていただきたいものだが。

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)

Hikosaka, M., Murata, A., Yoshino, M., and Hayashi, S.I.: Correlation between cell aggregation and antibody production in IgE-producing plasma cells. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10:

224-231 (2017) (査読有)

doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.04.007

Murata, A., and Hayashi, S.I.:

Notch-mediated cell adhesion. *Biology (Basel)*, 5: 5 (2016) (査読有).

doi:10.3390/biology5010005

Murata, A., Yoshino, M., Hikosaka, M., Okuyama, K., Zhou, L., Sakano, S., Yagita, H., and Hayashi, S.I.: An

evolutionary-conserved function of mammalian Notch family members as cell adhesion molecules. *PLoS One*, 9 (9): e108535 (2014) (査読有).

doi:10.1371/journal.pone.0108535

[学会発表](計12件)

Murata, A., Yoshino, M., Hikosaka, M., Hayashi, S.I.: C57BL/6 mice lack the local skin memory formation by contact dermatitis. 3-D-W29-3-0/P 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月7日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

Hikosaka, M., Murata, A., Yoshino, M., Hayashi, S.I.: Enhancement of antibody production in IgE producing cells requires cell aggregation via Fc gamma-receptors. 3-D-W28-4-0/P 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月7日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

Yoshino, M., Murata, A., Hikosaka, M., Suekane, K., Suzuki, A., Honda, N., Hayashi, S.I.: Measurement of altered transport of skin self-antigens in the active state. 1-B-W3-11-P 第45回日本免疫学会学術集会 2016年12月5日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

Murata, A., Yoshino, M., Hikosaka, M., Hayashi, S.I.: Intensity of local skin memory response varying with the type of locally persisting T cell subsets.

International Congress of Immunology 2016. (#2430). 8/26/2016. Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia

Yoshino, M., Murata, A., Hikosaka, M., Suda, T., Hayashi, S.I.: Analysis of the steady-state transport of skin self-antigens in *Pynod-Ccr7*-double knockout mice. 第24回マクロファージ分子細胞生物国際シンポジウム. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2016). 6/4-5/2016. ソラシティカンファレンスセンター (東京都千代田区)

Hikosaka, M., Murata, A., Shimoda, Y., Yoshino, M., Hayashi, S.I.: Antigen-mediated cell aggregation in IgE producing cells. 3-I-W47-12-P 第44回日本免疫学会学術集会 2015年11月20日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

Yoshino, M., Murata, A., Hikosaka, M., Suda, T., Hayashi, S.I.: Analysis of the transport of skin self antigens in *Pynod-Ccr7*-double knockout mice. 3-C-W36-10-P 第44回日本免疫学会学術集会 2015年11月20日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

Akihiko, M., Yoshino, M., Hikosaka, M., Hayashi, S.I.: Mast cells are dispensable for the local skin memory response. 1-C-W3-8-P 第44回日本免疫学会学術集会 2015年11月18日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

Yoshino, M., Murata, A., Hikosaka, M., Suda, T., Hayashi, S.I.: *Pynod* is not essentially required for the transport of skin self-antigens to regional lymph nodes. 国際ランゲルハンス細胞学会 2015年11月5-8日、京都市国際交流会館 (京都府京都市)

Yoshino, M., Imamura, R., Murata, A., Shimoda, Y., Hikosaka, M., Suda, T., and

Hayashi, S.I.: Migration of skin antigen-transporting cells in *PYNOD*-deficient mice. 1-C-W4-2-0/P 第43回日本免疫学会学術集会 2014年12月10日、国立京都国際会館 (京都府京都市)

Murata, A., Yoshino, M., Shimoda, Y., Hikosaka, M., and Hayashi, S.I.: Local increase of mast cells sustains after resolution of chronic contact dermatitis. 1-J-W18-10-P 第43回日本免疫学会学術集会 2014年12月10日、国立京都国際会館 (京都府京都市)

Hikosaka, M., Murata, A., Shimoda, Y., Yoshino, M., and Hayashi, S.I.: Putative regulation of IgE production by antigen-specific cell aggregation. 2-G-W29-11-0/P 第43回日本免疫学会学術集会 2014年12月11日、国立京都国際会館 (京都府京都市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/immunol/5983.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 眞一 (Hayashi Shin-Ichi)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号 : 50208617

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし