

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463115

研究課題名(和文) 小児期続発性ステロイド性顎骨骨粗鬆症の破骨細胞分化抑制機構の解明

研究課題名(英文) Molecular differential inhibition mechanism of osteoclastic bone resorption by glucocorticoid-induced osteoporosis in childhood.

研究代表者

牧 憲司 (Maki, Kenshi)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60209400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：4-8週齢の野生型マウス骨髄細胞より分化誘導した破骨細胞に野生型p130CasあるいはSH3ドメイン欠失型p130Casを過剰発現し、免疫沈降と質量分析によりp130CasのSH3ドメインに結合するタンパク質を検索した。Real-time PCR法およびWestern Blot法でBif-1の発現量の変化を検討の結果、破骨細胞分化に伴いBif-1の発現量が増加していた。Bif-1の機能を検討するために破骨細胞前駆細胞RAW細胞においてshRNAを用いてBif-1の発現を抑制の結果、アクチンリングの形成が抑制された。Bif-1遺伝子欠損マウスの大腿骨は野生型マウスに比べ骨密度増加を認めた。

研究成果の概要(英文)：Osteopetrosis due to dysfunction of osteoclasts in p130Cas-deficient mice suggest p130Cas play important roles for osteoclastic bone resorption. we focused Bif-1 which binding p130Cas because of the novelty, primary structure that can be involved in regulation of cytoskeleton. Western blotting and quantitative real-time PCR analysis showed the expression level of Bif-1 increased during osteoclastic differentiation. Bone mineral density of femurs isolated from Bif-1-deficient mice was higher than that of wild-type femurs using μ CT analysis. These results suggest that Bif-1 is one of the candidate proteins to regulate osteoclastic bone resorption as a downstream molecule of p130Cas.

研究分野：小児歯科学会

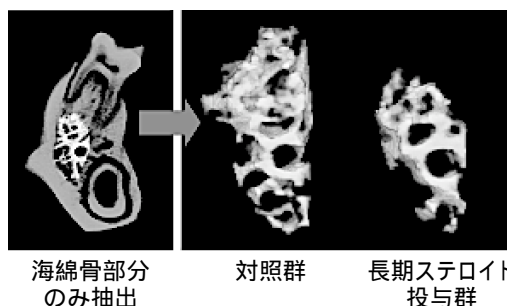
キーワード：osteoclast p130cas Bif-1 PCR Osteoporosis

1. 研究開始当初の背景

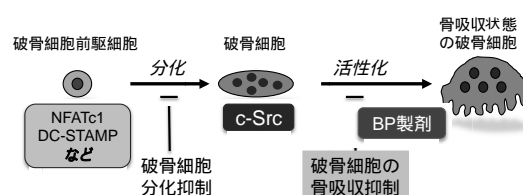
骨は1度形成されたらそのまま固定されてしまいうわけではなく、ほかの細胞と同じように、古くなった骨が破骨細胞によって壊される「骨吸収(骨破壊)」と、新しい骨が骨芽細胞によってつくられる「骨形成」を、常に繰り返している。これが骨の新陳代謝(骨代謝)であり、骨代謝によって、骨は一定の強さとしなやかさを維持し、骨の健康を保っている。破骨細胞は骨を骨吸収する多核巨細胞であり、我々はこれまでに破骨細胞の細胞骨格形成に重要な分子として p130Cas を同定した。喘息などのアレルギー疾患を有する小児にステロイド製剤を長期投与すると、成長障害や骨粗鬆症などを引き起こし、さらに顎骨の発育不全による咀嚼の育成にも悪影響をおよぼす。このことからアレルギー疾患を有する小児の骨吸収を制御することは小児歯科医にとっても重要な課題である。我々は骨吸収に必須な c-Src の下流で機能する p130Cas (Crk-associated substrate) 欠損 (p130Cas^{OCL-}) マウスが骨吸収不全による大理石骨病を呈することを明らかにした。P130Cas の遺伝子欠損マウスは、破骨細胞が存在するにもかかわらず、細胞骨格形成に重要なアクチンリングが形成されないことにより骨吸収機能が落ちるため骨硬化症を呈する。この結果は p130Cas が破骨細胞による骨吸収能に重要なであることを示すが、p130Cas が破骨細胞の骨吸収を制御する分子メカニズムにはいまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

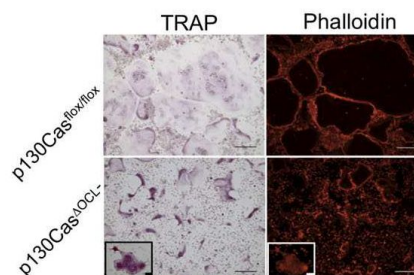
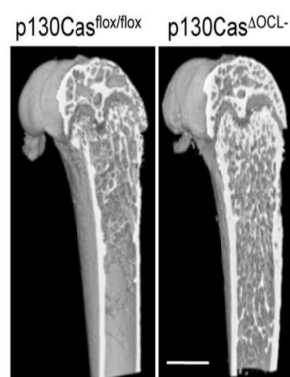
そこで我々は p130Cas と協調して骨吸収に関わる分子を同定する目的で、破骨細胞において p130Cas に結合するタンパク質を質量分析により検索した。



(図1) 長期ステロイド投与によるラット下顎骨骨梁の変化



(図2) 骨吸収を調節する因子と創薬のターゲット

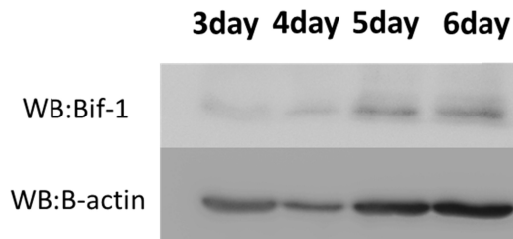


Y Nagai et.al

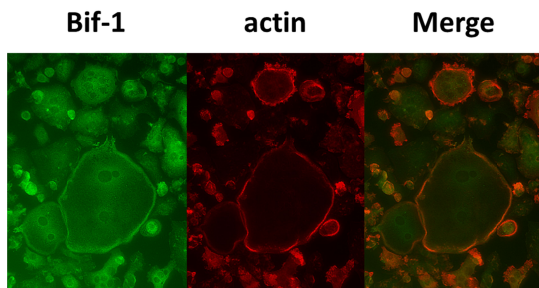
(図 3)野生型マウスと p130Cas 遺伝子欠損マウスの μ CT 像と破骨細胞

3 . 研究の方法、

4 - 8 週齢の野生型マウス骨髓細胞へ RANKL、M-CSF を加え分化誘導した破骨細胞に野生型 p130Cas あるいは SH3 ドメイン欠失型 p130Cas を過剰発現し、免疫沈降および質量分析により p130Cas の SH3 ドメインに結合するタンパク質を検索した。さらに文献的検索によるスクリーニングにより、破骨細胞において機能的未知な分子 Bif-1 に着目した。まず、Real-time PCR 法および Western Blot 法で Bif-1 の発現量の変化を検討した結果、破骨細胞の分化に伴い Bif-1 は mRNA、タンパク発現量がともに増加していることが確認された。



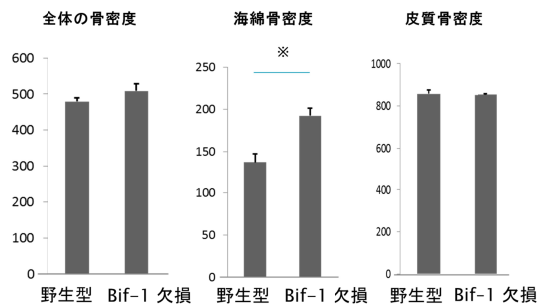
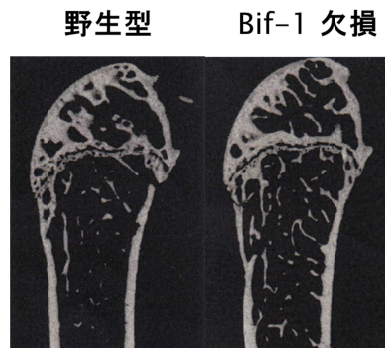
(図 4) 野生型マウスの破骨細胞分化に伴う Bif-1 の発現



(図 5) Bif-1 による破骨細胞の蛍光免疫染色

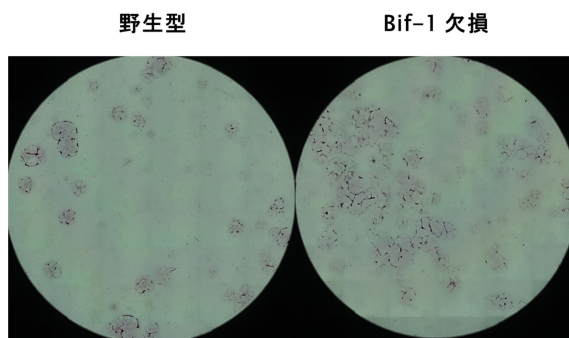
蛍光免疫染色を行い Bif-1 が破骨細胞上のどこに存在するか調べたところ、Bif-1 の局在はアクチンリングと一致した。

次に、破骨細胞における Bif-1 の機能を検討するために破骨細胞前駆細胞 RAW 細胞において shRNA を用いて Bif-1 の発現を抑制したところ、骨吸収に重要な細胞骨格構造であるアクチンリングの形成が抑制された。さらに、in vivo における Bif-1 の役割を検討するために 11 週齢 Bif-1 遺伝子欠損マウスの大腿骨を μ CT および pQCT にて解析した結果、Bif-1 遺伝子欠損マウスの大腿骨は野生型マウスに比べ海綿骨密度が増加していた。



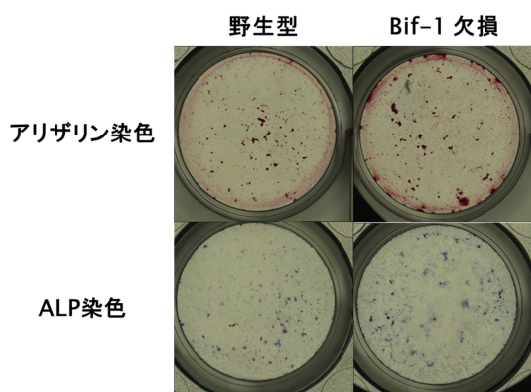
(図 6) 野生型マウスと Bif-1 遺伝子欠損マウスの μ CT 像

Bif-1 遺伝子欠損マウス骨髄細胞から破骨細胞を分化誘導させたところ、その破骨細胞は野生型マウス骨髄細胞から分化誘導させた破骨細胞と比較して数が増加していた。



(図7) 野生型マウスと Bif-1 遺伝子欠損マウスの破骨細胞像

次に Bif-1 遺伝子欠損マウスの骨形成能を調べるため、生後すぐの Bif-1 遺伝子欠損マウスの頭蓋から骨芽細胞系細胞 (POB) を採取し、グリセロールとアスコルビン酸による誘導をかけ、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色とアリザリンレッド染色したところ野生型と比較して ALP 活性、石灰化が亢進していた。



(図8) 野生型マウスと Bif-1 遺伝子欠損マウスの POB 像

4. 研究成果

以上の結果より p130Cas と結合する分子 Bif-1 は RAW 細胞と Bif-1 遺伝子欠損マウス骨髄細胞から分化誘導させた破骨細胞から得られた結果は違うものではあったが、それは in vivo では骨芽細胞による破骨細胞への影響によるものと考えられる。Bif-1 は破骨細胞の骨吸収だけでなく骨芽細胞の骨吸収にも重要な役割を担っていることが示唆された。本研究は、我々が作製した p130Cas^{OCL} マウス由来の破骨細胞を用いて p130Cas の下流で骨吸収に関わる分子を網羅的に解析するという独創的な発想から、新たに Bif-1 を骨吸収分子として同定した。Bif-1 の骨吸収における機能的役割を明らかにしたので、BP 製剤に代わる骨吸収阻害薬の開発につながる可能性もある。

近年歯科の外科処置によって BP 製剤服用患者に顎骨壊死が引き起こされることが問題となっているが、その発生頻度が低いことから医科では歯科ほど問題にされておらず、歯科が積極的に顎骨壊死の防止や治療に関する研究に取り組む必要がある。歯科からの社会への貢献を確実・拡大する為には BP に代わる骨吸収阻害剤の開発は歯科界にとって重要であり、単に基礎医学的な意義だけでなく、歯科界から創薬の開発に繋がると考える。

< 引用文献 >

- Adinoff AD and Hollister JR N Eng J Med 1983, 309:265.
 Nagai Y et al. J Bone Miner Res. 2013, 28:2449.

5. 主な論文発表等

- 〔雑誌論文〕(計0件)
 〔学会発表〕(計1件)

Kenya Touyama, Takuma Matsubara, Shoichiro Kokabu, Chihiro Nakatomi, Kenshi Maki,

Eijiro Jimi. A p130Cas binding protein Bif-1 is involved in osteoclastic bone resorption.

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧 憲司 (MAKI Kenshi)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60209400

(2) 研究分担者

自見 英治郎 (JIMI Eijiro)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：40276598