

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670814

研究課題名(和文)破骨細胞の形成部位はどのようにして決まるのか？

研究課題名(英文)How is the formation site of osteoclasts determined?

研究代表者

高橋 直之(Takahashi, Naoyuki)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号：90119222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞はなぜ骨だけに出現するのか？「骨芽細胞が破骨細胞分化因子RANKLとM-CSFを発現するから」と考えられてきた。しかし、RANKL欠損マウスにRANKLを投与しても、M-CSF欠損のop/opマウスにM-CSFを投与しても、破骨細胞は骨組織にのみ出現する。この結果は、RANKLとM-CSFの発現部位が破骨細胞の形成部位を決めるのではないことを示す。我々は、受容体RANKを高発現した破骨細胞前駆細胞(RANK-abundant osteoclast precursors, rOP)が骨組織に特異的に出現することを見出した。rOPの局在部位が破骨細胞の形成部位であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Why do osteoclasts formed only in the bone? It has been considered "because osteoblasts express osteoclast differentiation factor RANKL and M-CSF." However, when RANKL and M-CSF are administered intraperitoneally to RANKL-deficient mice and M-CSF-deficient op/op mice, respectively, osteoclasts appear only in bone tissue. This indicates that expression sites of RANKL and M-CSF do not determine the formation site of osteoclasts. In the present study, we showed that osteoclast precursors (OP) which highly express RANK (RANK-abundant OP, rOP) are detected only in the bone tissue. Localization of rOP is shown to determine the formation site of osteoclasts.

研究分野：生化学

キーワード：破骨細胞 骨芽細胞 破骨細胞前駆細胞 RANKL M-CSF

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞の前駆細胞は、骨芽細胞の発現する RANKL と M-CSF を認識し、破骨細胞に分化する。そのため、破骨細胞が骨組織に誘導されるのは、骨芽細胞が M-CSF と RANKL を発現するためと考えられてきた。しかし、RANKL 欠損マウスへ RANKL を投与しても、M-CSF 欠損の *op/op* マウスに M-CSF を投与しても、破骨細胞は骨組織にのみ誘導される。以上の知見は、RANKL や M-CSF 以外の因子が破骨細胞の形成部位を決めることを示す。我々は、細胞周期が停止した細胞 (quiescent Osteoclast Precursors, qOP) が破骨細胞の前駆細胞であることを証明した (J Cell Biol 184:541, 2009)。さらに qOP の体内動態を解析し、qOP は血流を介して骨組織にホーミングすること、骨組織 qOP は RANK を高発現した“RANK-abundant OP”に分化することを見出した。本研究では、(1) qOP の骨組織へのホーミング機構および (2) 骨組織における qOP の RANK 発現機構を解明する。

2. 研究の目的

破骨細胞はなぜ骨だけに出現するのか？従来、「骨芽細胞が破骨細胞分化因子 RANKL と M-CSF を発現するから」と考えられてきた。しかし、RANKL 欠損マウスに RANKL を腹腔投与しても、M-CSF 欠損の *op/op* マウスに M-CSF を腹腔投与しても、破骨細胞は骨組織にのみ出現する。この結果は、RANKL と M-CSF の発現部位が破骨細胞の形成部位を決めるのではないことを示す。本研究では、この破骨細胞前駆細胞の動態を解析し、破骨細胞の形成部位決定機構を明らかにすることを目的とした。さらに、破骨細胞と骨芽細胞の関連を、骨代謝共役の観点から解析した。

3. 研究の方法

(1) qOP ホーミング機構の解明: コラーゲンゲル内に骨芽細胞を包埋し、その周りに qOP、マクロファージ、破骨細胞を置き、骨芽細胞に向けた遊走を解析した。qOP の細胞動態の解析より、

qOP と RANK-abundant QOP (rOP) の数を計測した。また、GFP を発現させた破骨細胞前駆細胞の脾臓における動態を観察した。qOP の脾臓から頭蓋骨への移行をバイオイメージング法で解析した。(2) RANK 発現調節因子の解析: 骨芽細胞の培養上清より RANK 発現誘導因子を検索した。また、RANK 発現を誘導する Wnt5a-Ror2 シグナルを詳細に解析した。(3) Wnt シグナル解析: 破骨細胞と骨芽細胞の Wnt 発現を解析した。さらに、Wnt16、Wnt4 および Wnt3a の RANK-abundant qOP 形成に対する作用を解析した。

4. 研究成果

(1) qOP ホーミング機構の解明

骨芽細胞が分泌する qOP 走化因子の同定を試みたが、走化因子の存在を確認できなかった。一方、qOP は骨組織で、骨芽細胞から分泌される因子により RANK-abundant qOP (rOP) に分化することが確認された。そこで、破骨細胞形成に関する新しい仮説を提起した (図 1)。

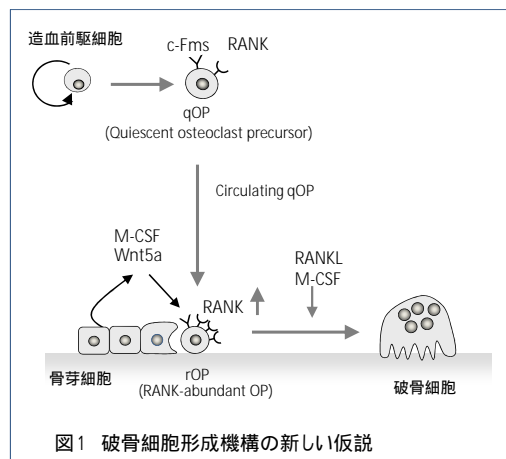
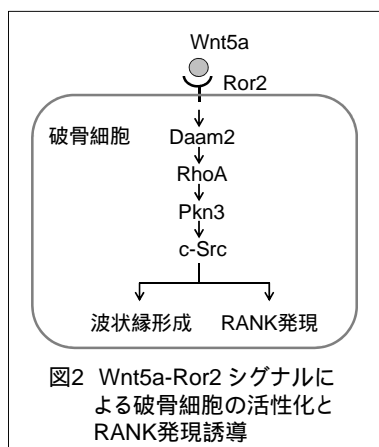


図 1 破骨細胞形成機構の新しい仮説

(2) RANK 発現調節因子の解析

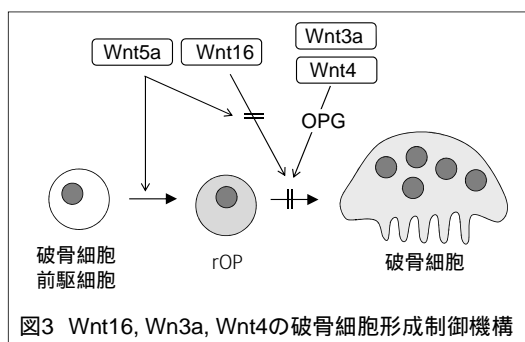
骨芽細胞の培養上清より RANK 発現誘導因子を検索した。その結果、骨芽細胞が分泌する M-CSF と Wnt5a が RANK を誘導することを確認した (図 1)。また、RANK 発現を誘導する Wnt5a-Ror2 シグナルを詳細に解析したところ、Wnt5a → Ror2 → Daam2 → RhoA → Pkn3 → c-Src と

このシグナル系が作動することを確認した(図 2)。このシグナル経路は破骨細胞の骨吸収を誘導する経路であることが示された。現在、このシグナル系が RANK 発現を誘導するかの解析中である。



(3) Wnt シグナル解析

破骨細胞への分化に伴い、Wnt5a の発現が急上昇することを見出した。破骨細胞特異的 Wnt5a 欠損 (Oc-Wnt5a-cKO) マウスを作製したところ、骨形成が抑制されていた。また、Wnt5a は骨芽細胞の Lrp5 の発現を促進することで、骨芽細胞の分化を促進した。Wnt16、Wnt4 および Wnt3a は破骨細胞形成を抑制した。Wnt5a のみ rOP の分化を促進した。Wnt4 と Wn3a は OPG の産生亢進を介して破骨細胞形成を抑制したのに対し、Wnt16 による破骨細胞形成抑制は Wnt5a シグナルで調節されていた (図 3)。



5. 主な発表論文等

(雑誌論文) 計 8 件

Thirukonda GJ, Uehara S, Nakayama T, Yamashita T, Nakamura Y, Mizoguchi T, Takahashi N, Yagami K, Udagawa N,

Kobayashi Y: The dynamin inhibitor dynasore inhibits bone resorption by rapidly disrupting actin rings of osteoclasts. *J Bone Miner Metab.* 2016 Jun 11. [Epub ahead of print]. 査読有

Kobayashi Y, Uehara S, Koide M, Takahashi N: The regulation of osteoclast differentiation by Wnt signals. *Bone Key Rep*, 4:713. 2015. doi: 10.1038/bonekey2015.82. eCollection 2015. 査読有

Kobayashi Y, Thirukonda GJ, Nakamura Y, Koide M, Yamashita T, Uehara S, Kato H, Udagawa N, Takahashi N: Wnt16 regulates osteoclast differentiation in conjunction with Wnt5a. *Biochem Biophys Res Commun*, 463:1278-83. 2015 doi:

10.1016/j.bbrc.2015.06.102. 査読有

Takahashi N, Udagawa N, Suda T: Vitamin D endocrine system and osteoclasts *Vitamin D and Bone*, *Bone Key*, 3:495. 2014. doi:

10.1038/bonekey.2013.229. 査読有

Nakayama T, Thirukond GJ, Nagasawa S, Kawahara I, Udagawa N, Yagami K, Kawatani M, Osada H, Doi Y, Yoshinaria N, Takahashi N: Polarization of osteoclasts on dental implant materials is similar to that observed on bone. *J Oral Biosci* 56:136-142, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2014.06.005> 査読有

org/10.1016/j.job.2014.06.005

Nakamichi Y, Horibe K, Udagawa N, Takahashi N: Roles of cathelicidins in inflammation and bone loss. *Odontology* 102(2):137-46, 2014. doi:

10.1007/s10266-014-0167-0. 査読有

Yamashita T, Uehara S, Udagawa N, Li F, Kadota S, Esumi H, Kobayashi Y, Takahashi N: Arctigenin inhibits osteoclast differentiation and function by suppressing both calcineurin-dependent and osteoblastic cell-dependent NFATc1 pathways. *PLOS*

ONE 9(1): e85878. 2014. doi:
10.1371/journal.pone.0085878. 査読有
Okamoto M, Udagawa N, Uehara S, Maeda K,
Yamashita T, Nakamichi Y, Kato H, Saito N,
Minami Y, Takahashi N, Kobayashi Y:
Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ β -catenin
signaling during osteoblastogenesis. Sci Rep
4:4493, 2014. doi: 10.1038/srep04493. 査読
有

[学会発表] (計 3 件)

高橋直之: 破骨細胞の研究からわかってきた
こと. 歯科基礎平成 27 年度社員総会 生化学
分野分科会講演会, 日本歯科大学富士
見ホール, 東京都千代田区, (招待講演)
2015 年 4 月 25 日

高橋直之: 破骨細胞の分化と機能を調節す
る RANKL-RANK シグナル. 第一回日本骨
免疫会議, 沖縄万国津梁館, 沖縄 (招待講
演) 2014 年 7 月 5 日

高橋直之: 歯周病において破骨細胞はどの
ように誘導されるか. 第 57 回春季日本歯周
病学会, 長良川国際会議場, 岐阜 (招待講
演) 2014 年 5 月 23 日

[その他]

ホームページ等

松本歯科大学大学院歯学独立研究科 HP
[http://www.mdu.ac.jp/graduate/index.htm](http://www.mdu.ac.jp/graduate/index.html)
l

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 直之 (Takahashi Naoyuki)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号: 90119222

(2) 研究分担者

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

溝口 利英 (Mizoguchi Toshihide)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号: 90329475

細矢 明宏 (Hosoya Akihiro)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 70350824

小林 泰浩 (Kobayashi Yasuhiro)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号: 20264252

(3) 連携研究者

川原 一郎 (Kawahara Ichiro)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 20319114

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