

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861761

研究課題名(和文) EMT誘導による骨微小環境変化の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the bone microenvironment inducing EMT

研究代表者

山村 倫世 (Yamakura, Michiyo)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70647883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はRAW264.7細胞を用いて骨微小環境におけるTGF- β および細胞外基質の硬さと破骨細胞分化への影響を検討することを目的とした。TGF- β やRANKLを投与下に硬い細胞外基質上で培養すると円形の細胞は紡錘や多角形へ変化し、TGF- β とRANKLを投与し群が最も破骨細胞に分化した。一方、TGF- β およびRANKLを投与しても軟らかい基質上で培養すると細胞は円形のまま変化せず、分化もしない。破骨前駆細胞において細胞外基質と分化には関係がある可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to determine the effects of TGF- β and matrix stiffness on morphological changes and differentiation of osteoclast precursors (OCPs) using the pre-osteoclastic RAW264.7 cells. RAW264.7 cells treated with TGF- β 1 and RANKL on stiff matrix showed morphological changes from round to spindle or polygonal morphology. Osteoclast differentiation was significantly induced by treating RAW264.7 cells with TGF- β 1 and RAKL on stiff matrix. Otherwise, there is no osteoclast differentiation on soft matrix. There is a systematic relationship between tissue mechanics and differentiation.

研究分野：口腔外科学

キーワード：骨微小環境 TGF- β 細胞外基質 EMT

1. 研究開始当初の背景

ビスホスホネート(BP)に関連した顎骨壊死の報告は年々増加している。顎骨壊死はBP製剤に限った副作用ではなく、抗RANKL抗体デノスマブが2012年1月に「多発性骨髄腫や固形癌骨転移による骨病変」、2013年3月に「骨粗鬆症」の適応で製造販売が承認され、顎骨壊死の副作用が報告されている。さらに、がん分子標的薬の開発・認可は日進月歩で、血管新生阻害剤のベバスタマブ投与によりBP製剤投与による顎骨壊死の発現率増加が示唆されている。このように、最近の骨修飾薬の発展は著しく、われわれ口腔外科医は、顎骨の骨壊死、骨破壊の問題に直面する機会が、今後、ますます増加すると考えられる。このような状況で、生体内での顎骨リモデリングにおける骨微小環境の解明は急務である。

2. 研究の目的

破骨細胞分化のメカニズムは明らかになりつつあるが、*in vivo*での分化メカニズムは未だ不明な点が多い。生体内では単球系破骨前駆細胞が血中から骨へ遊走し、細胞周期の停止した静止期破骨前駆細胞は骨芽細胞により長期間(数週間)支持されている。このようなニッチと呼ばれる安定した微小環境の状態から、どのように破骨前駆細胞や骨芽細胞が極性を失って、運動性の高い形態を獲得していくのかは明らかでない。このように一旦安定した微小環境が極性を失って壊れ、細胞が運動性をもった状態に変化していく姿は、上皮-間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)に類似していることに着目した。EMTの概念から、この微小環境を変化させるシグナルや変化に伴うマーカーを検索していくことが本研究の目的であり、今回、EMTと関連が深いTGF- β による破骨前駆細胞への影響を検討した。

破骨前駆細胞は血液中から骨へ遊走してきた後、骨表面にとどまって破骨細胞へ分化する。われわれ体内の細胞は細胞外環境から絶えず張力など力学的な力が働いている。このような力学的シグナルが細胞増殖・分化・運動などに影響を及ぼすことが明らかになってきた。細胞外環境の硬さは細胞の分化状態を規定する重要なファクターの一つされている。体内の最も柔らかい細胞外環境は血液で、最も硬い環境は骨組織であることが知られている。そこで、破骨前駆細胞の細胞外物理的環境の変化(血液中から骨)に依存する細胞運命決定機構におけるHippoシグナルの関与について検討した。

3. 研究の方法

細胞はマクロファージ系破骨前駆細胞RAW264.7細胞(以下RAW細胞)を、薬剤はTGF- β 1、SB431542(TGF- β 1型受容体キナーゼ活

性阻害剤)およびRANKLを使用した。

(1)細胞増殖能の検討

RAW細胞にTGF- β 1およびSB431542の投与を行い、細胞増殖能を検討した。上記薬剤投与下で細胞外環境の異なる状態(血液中または骨を模倣した状態)で培養を行った。硬い基質はポリスチレン製ディッシュ、血液中を模倣した状態はポリスチレンにハイドロゲルを結合し細胞を浮遊した状態で培養可能なultra-low attachment(ULA)ディッシュを用いた。

(2)細胞外環境の変化による細胞形態の変化

RAW細胞をポリスチレン製ディッシュ、ULAディッシュおよび、その中間の硬さの環境としてTypeアテロコラーゲンゲル上で培養し、1日目に細胞形態を観察した。

(3)破骨細胞様細胞への分化の検討

上記薬剤投与下でポリスチレン製ディッシュ、ULAディッシュおよびTypeアテロコラーゲンゲル上で培養し、4日目にTRAP染色を行い、多核化の破骨細胞細胞様細胞数を計測した。

(4) Hippoシグナル関連マーカーの発現の検討

RAW細胞をポリスチレン製ディッシュ、ULAディッシュに播種、各種薬剤を投与し、3日後のHippoシグナル関連マーカー(YAP、LATS1、LATS2)の発現を比較検討した。

4. 研究成果

(1)細胞増殖:ポリスチレン製ディッシュおよびULAディッシュでRAW細胞をTGF- β 1、SB431542の投与下で培養した細胞増殖に有意差はみられなかった(図1)。

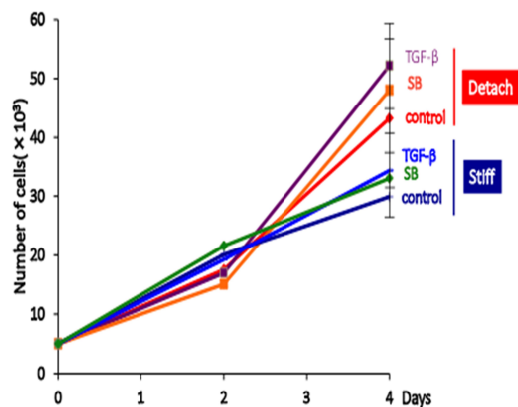


図1 異なる細胞外環境下での薬剤投与による増殖曲線

(2)細胞形態の変化:ポリスチレン製ディッシュで培養した場合は、細胞形態は、TGF- β 1およびRANKL投与群は、コントロール群と比較して円型のほかに紡錘形、多角形が多くみられたが、ULAディッシュやコラーゲンゲル上で培養した場合は、TGF- β 1やRANKL投与群も細胞形態は円型で、コントロール群と比較

して著明な形態変化は認めなかった(図2-4)。

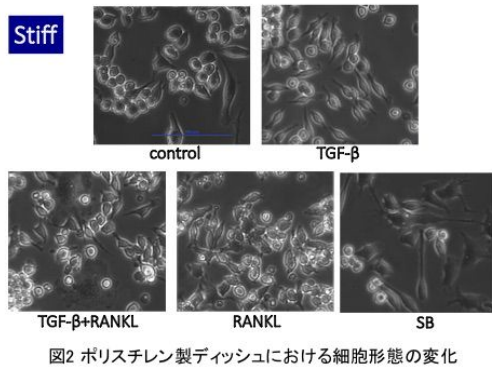


図2 ポリスチレン製ディッシュにおける細胞形態の変化

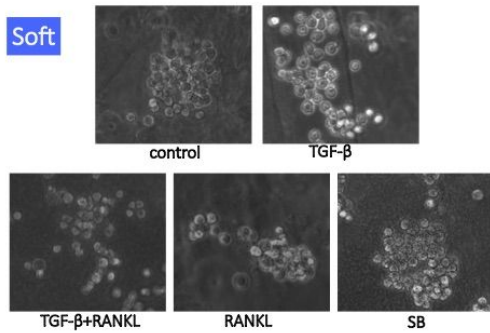


図3 コラーゲンゲル上における細胞形態の変化

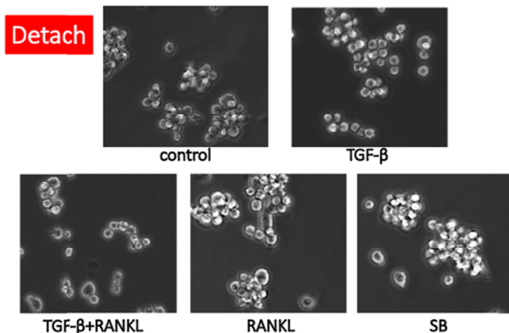


図4 ULAディッシュにおける細胞形態の変化

(3)破骨細胞様細胞の分化：RAW 細胞は RANKL 投与により破骨細胞様細胞への分化が見られ、TGF- 1 刺激によりさらに分化細胞数が増加した。SB431542 の投与により分化は抑制された。

ULA ディッシュやコラーゲンゲル上で培養した RAW 細胞は、RANKL+TGF- 1 投与群を含む全ての群で破骨細胞様細胞への分化は認められなかった(図5)。

(4) Hippo シグナル関連マーカーの発現：破骨細胞様細胞への分化傾向と同様に RAW 細胞の YAP 発現が増加し、LATS1 が減弱していた(図6)。

RAW 細胞は硬い基質上で培養した場合は破骨細胞様細胞に分化するが、軟らかい基質上や浮遊した状態で培養しても分化傾向はみられなかった。浮遊状態で培養を行うと

LATS1 発現は増加して YAP 発現が減弱する。硬い基質上で培養を行うとその逆の現象が生じる。

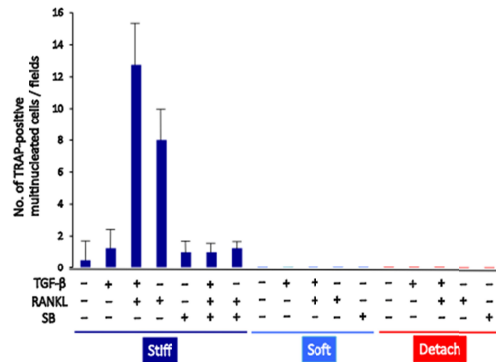


図5 ULAディッシュにおける細胞形態の変化

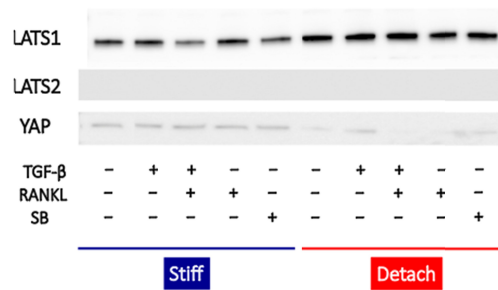


図6 Hippoシグナル関連マーカーの発現

破骨前駆細胞に対する骨微小環境内における細胞外物理的環境の変化が破骨細胞への分化に関与する可能性が考えられた。

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1件)

Takaoka K, Yamamura M, Nishioka T, Abe T, Tamaoka J, Segawa E, Shinohara M, Ueda H, Kishimoto H, Urade M. Establishment of an Animal Model of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws in Spontaneously Diabetic Torii Rats. PLoS One. (査読有) 2015 Dec 14;10(12):e0144355. doi: 10.1371/journal.pone.0144355.

[学会発表](計9件)

山村倫世、高岡一樹、川邊睦記、荒木華子、玉岡丈二、野口一馬、岸本裕充、骨微小環境における TGF- の破骨前駆細胞への影響、日本口腔外科学会学術集会、2015年10月16-18日、名古屋国際会議場(名古屋)
高岡一樹、西岡稔浩、阿部徹也、山村倫世、瀬川英美、野口一馬、浦出雅裕、岸

本裕充、自然発症 2 型糖尿病ラットにおけるビスフォスフォネート関連顎骨壊死、第 59 回日本口腔外科学会学術集会、2014 年 10 月 17-19 日、幕張メッセ（千葉）
Takaoka K, Yamamura M, Nishioka T, Abe T, Segawa E, Noguchi K, Urade M, Kishimoto H, Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws using Spontaneously Diabetic Torii rats, The 2014 Annual Meeting of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, 8-13 Sep., 2014, Honolulu, (USA)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山村 倫世 (YAMAMURA, Michiyo)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70647883