慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	破骨細胞融合の骨代謝における役割の解明
Sub Title	To clarify the role of osteoclast fusion in bone homeostasis
Author	岩崎, 良太郎(Iwasaki, Ryotaro)
Publisher	
Publication year	2011
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2010.)
JaLC DOI	
Abstract	今までに我々はDC-STAMPのノックアウトマウスの解析により、破骨細胞の細胞融合に必須の分子であることが分かっている。今回、DC-STTAMPの過剰発現マウスを作成することによって、DC-STAMPは破骨細胞特異的に骨量を制御し、またDC-STAMPの機能を抑制する事で、破骨細胞による骨吸収抑制と骨芽細胞の活性上昇の両面から、骨量を増加させることが可能となる事が示唆された。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2009～2010 課題番号：21791813 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21791813seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成23年6月16日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2009～2010
課題番号：21791813
研究課題名（和文）
破骨細胞融合の骨代謝における役割の解明
研究課題名（英文）
To clarify the role of osteoclast fusion in bone homeostasis
研究代表者
岩崎　良太郎　(IWASAKI RYOUTAROU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30365390

研究成果の概要（和文）：
今までに我々はDC-STAMPのノックアウトマウスの解析により、破骨細胞の細胞融合に必須の分子であることが分かっている。今回、DC-STTAMP の過剰発現マウスを作成することによって、DC-STAMPは破骨細胞特異的に骨量を制御し、またDC-STAMPの機能を抑制する事で、破骨細胞による骨吸収抑制と骨芽細胞の活性上昇の両面から、骨量を増加させることが可能となる事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：
We generated a DC-STAMP transgenic mice and analysed it. We find out a Inhibition of DC-STAMP provides both decreased osteoclast activity and increased bone formation by osteoblasts, thereby increasing bone mass in an un-coupled and a tissue specific manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総　計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学
キーワード：歯学、発生・分化、遺伝子

１．研究開始当初の背景

口腔顎顔面外科領域において、骨代謝のメカニズム解明しようとする研究は極めて重要である。悪性腫瘍による顎骨破壊や制御困難な疼痛を惹起する全身骨転移、重度の関節破壊を伴う顎関節疾患、歯牙喪失後や歯周病進行に伴う骨吸収などが、どのようなメカニズムで起こっているのかを解明できれば、それらが生み出す様々な病態の対策を考える場合にも大いなるヒントになってくる。後述の研究業績に示したように、研究代表者が主として臨床研究で携わってきた腫瘍切除後、外傷後、顎裂、抜歯後の歯槽骨高度吸収患者に対する口腔顎顔面インプラント治療の分野においても、如何に母骨の吸収を抑制し、適切な骨造成に繋げていくかを常に考えなければならない。これら骨吸収過程の多くは、破骨細胞の増殖もしくは機能亢進によって引き起こされていることから、破骨細胞を理解しその制御を試みることが、症状の制御に

も必要である。最近話題の破骨細胞機能を強力に抑制するビスフォスフォネート製剤による顎骨壊死などの問題もあり、新たな破骨細胞制御法の確立が近未来的に求められている。

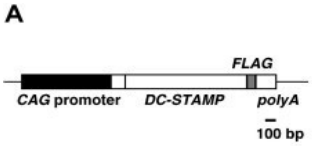
２．研究の目的

破骨細胞はその分化の最終段階で細胞融合により多核化するという極めて特徴的な細胞である。この細胞融合因子として我々が同定した dendritic cell specific transmembrane protein (DC-STAMP)は破骨細胞に特異性が高い。この DC-STAMP を介した破骨細胞の細胞融合制御機構および骨代謝制御機構を DC-STAMP 過剰発現マウスを用いて解明することを目的とした。

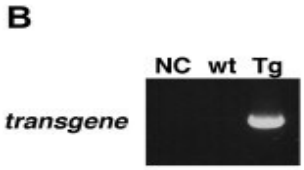
３．研究の方法

(1)DC-STAMP 過剰発現マウスの作製

（図 1A, B）



[図 1A: 導入された DC-STAMP 過剰発現遺伝子]



[図 1B: RT-PCR による DC-STAMP 過剰発現遺伝子の確認]

(2)In vitro における破骨細胞の作製

8 週齢のマウスの大腿骨および脛骨より骨髄細胞を回収し、Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)で 3 日間培養後、M-CSF および receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)を作用させて破骨細胞を作製した。

(3)Western blot

総タンパクをマウス尻尾および細胞から回収し、FLAG および Actin の発現を確認した。

(4)骨密度の測定

8 週齢の DC-STAMP 欠損、DC-STAMP 過剰発現および野生型マウスを the dual energy X-ray absorptiometry (DEXA)を用いて解析した。

(5)RT-PCR

総 RNA を RNeasy Kit を用いてマクロファージ、破骨細胞およびマクロファージ巨細胞から回収し、cDNA に逆転写させ PCR をおこなった。

(6)real-time PCR

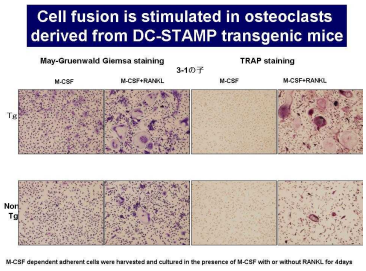
Thermal cycler Dice Real-Time system を用いて、プライマーは DC-STAMP、コントロールとして Actin を使用した。

４．研究成果

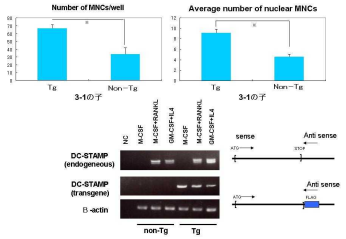
DC-STAMP を CAG promoter を用いて全身的に強発現させた遺伝子過剰マウスを作成しこれらの事を解明することとした

EGFP をノックインした DC-STAMP 欠損マウスとの交配により in vivo での細胞融合の回復を計るための CAG-DC-STAMP-FLAG トランスジェニックマウスを作成し、マウスのスクリーニングを行った結果 95 匹中 39 匹にトランスジーンを確認する事ができた。発現量の異なる複数のラインを得るためにサザンブロットによってトランスジーンのコピー数の確認を行い、RT-PCR においてメッセンジャー RNA レベル及びウエスタンブロットにて蛋白レベルでの発現を確認し、最終的に発現の強

いラインとして 10 ラインに絞った。
得られたラインにおいて in vitro で破骨細胞の形成を誘導した。マウス骨髄細胞を M-CSF のみで培養すると細胞融合しない単核のマクロファージ系の細胞が形成され、それに RANKL を加えて培養すると多核の破骨細胞が形成される。M-CSF のみでは DC-STAMP 過剰発現マウス由来の細胞では細胞融合は誘導されないが、RANKL を加えることによって、破骨細胞分化を誘導した場合、野生型に比べて、細胞融合の有意な亢進が認められた。(図 2A, B)

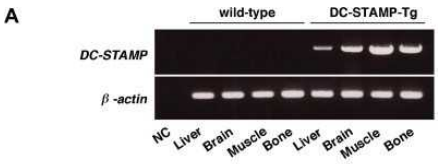


[図 2A: DC-STAMP 過剰発現マウス由来の細胞を in vitro での破骨細胞形成の誘導]



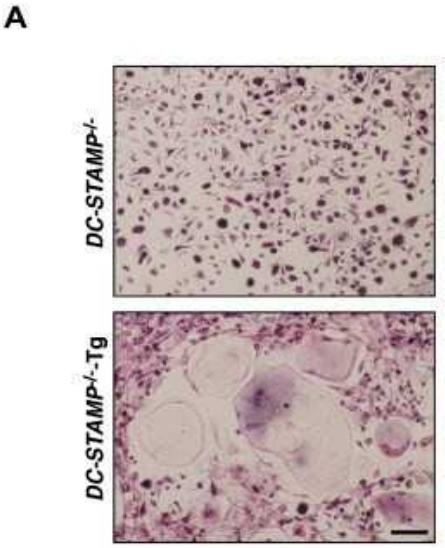
[図 2B: 定量化]

また今回作製した DC-STAMP 過剰発現マウスは CAG プロモーターを用いているので、DC-STAMP が全身に発現している。RT-PCR にて肝臓、筋肉、脳、等の臓器における DC-STAMP の発現が確認できたが、異所性の細胞融合が見られなかった。 (図 3A)



[図 3A: 全身の臓器における DC-STAMP の発現]

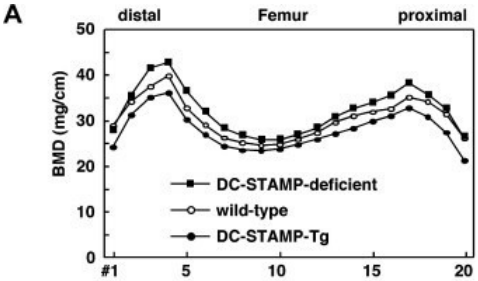
このことから、DC-STAMP は破骨細胞特異的に作用し、RANKL シグナルの下流で破骨細胞の細胞融合を促進することが示唆された。
また、DC-STAMP 過剰発現マウスと DC-STAMP 欠損マウスとの交配により、DC-STAMP 欠損マウスにおける破骨細胞の細胞融合の欠失がレスキューされるか検証した。DC-STAMP 過剰発現+ 欠損マウス由来の細胞を用いて、in vitro において、破骨細胞の形成を誘導したところ、多核の破骨細胞が形成されており、遺伝子欠損マウスの破骨細胞の表現系がレスキューされることが確認できた。(図 4A)



[図 4A: DC-STAMP 過剰発現遺伝子の導入による DC-STAMP 欠損マウス由来破骨細胞の欠失の回復]

骨代謝制御に関しては、in vivo での骨密度の測定、骨形態計測、骨吸収アッセイを行い DC-STAMP 欠損マウスでは、破骨細胞による骨吸収が抑制されているが、骨芽細胞による骨形成は促進されており、その結果骨量は増加していた。それに対し DC-STAMP 過剰発現マ

ウスでは、破骨細胞による骨吸収の亢進、および骨芽細胞の活性と骨量の低下を示した。（図 5A）



[図 5A: DC-STAMP 過剰発現マウスの骨量低下]

DC-STAMP を CAG promoter を用いて全身的に強発現させた遺伝子過剰マウスを作成し、in vivo および in vitro で解析を行った。その結果、破骨細胞の有意な細胞融合の亢進や全身に DC-STAMP の発現を認めているにも関わらず、破骨細胞のみに表現系が認められた。このことから、DC-STAMP は破骨細胞特異的に作用し、RANKL シグナルの下流で破骨細胞の細胞融合を促進することが示唆され、DC-STAMP 過剰発現マウスと DC-STAMP 欠損マウスとの交配により、DC-STAMP 欠損マウスにおける破骨細胞の細胞融合の欠失がレスキューされることも見出した。In vivo において、DC-STAMP 過剰発現マウスでは、破骨細胞による骨吸収の亢進、および骨芽細胞の活性による骨量の低下を示した。

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）

(1)Miyauchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, Sakamoto A, Iwasaki R, Hoshi H, Miyamoto K, Hao W, Yoshida S, Morioka H, Chiba K, Kato S, Tokuhisa T, Saitou M, Toyama Y, Suda T, Miyamoto T.
The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis.
J Exp Med. 2010 Apr 12; 207 (4):751-62. （査読有）

(2)Miyamoto K, Ninomiya K, Sonoda KH, Miyauchi Y, Hoshi H, Iwasaki R, Miyamoto H, Yoshida S, Sato Y, Morioka H, Chiba K, Egashira K, Suda T, Toyama Y, Miyamoto T.
MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner.
Biochem Biophys Res Commun. 2009 Jun 5;383(3):373-7. （査読有）

〔学会発表〕（計 3 件）

(1)岩崎良太郎、宮本健史、小山慶介、深谷千絵、中川種昭
破骨細胞の細胞融合は骨量と骨芽細胞の活性を制御する
第 10 回日本抗加齢医学会総会　京都
平成 22 年 6 月 11 日

(2)R.Iwasaki, H.Kawana, S.Asoda, Y.Toyam T.Nakagawa, T.Suda, T. Miyamoto
DC-STAMP regulates bone homeostasis through cell-cell fusion of osteoclasts
The 26th Naito Bonference on osteobiology
兵庫県　淡路島
平成 21 年 11 月 6 日

(3)岩崎良太郎、宮本健史、吉田重之、莇生田整治、中川種昭、河奈裕正
破骨細胞の細胞融合は骨量と骨芽細胞の活性を制御する
第 54 回口腔外科学会総会　札幌
平成 21 年 10 月 10 日

〔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
岩崎　良太郎（IWASAKI RYOUTAROU）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30365390

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし