

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592739

研究課題名(和文) LPSで誘導される高OPN骨芽細胞の骨免疫学的解析

研究課題名(英文) Characterization of LPS-induced hyper OPN osteoblasts

研究代表者

坂東 健二郎 (Bandow, Kenjiro)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：50347093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：LPSにより誘導される高OPN骨芽細胞は正常に骨分化する能力を有していた。また、高OPN骨芽細胞はメカニカルストレスの感受性が低かった。これにはLmw-ptpの発現が高くなることが関係していると考えられる。また、OPN-Lmw-tp系はメカニカルストレスを負荷した際のFAKのリン酸化を抑制的に調節している事が示唆された。しかし、OPN、Lmw-tp、FAKがどのように相互作用しているのかはまだ不明のままである。今後、研究が進めば、高OPN骨芽細胞は炎症性骨疾患の治療のターゲットとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：LPS-induced hyper OPN osteoblasts have an ability of osteoblastic differentiation and respond to mechanical stress less than low OPN cells. Lmw-tp is up-regulated in hyper OPN osteoblast and decreases phosphorylation of FAK induced by mechanical stress. Though, it is unclear how OPN interacts with Lmw-tp and FAK. Hyper OPN osteoblasts may be an intriguing target to develop therapeutic drugs against inflammatory bone diseases.

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：OPN osteoblast LPS Lmw-tp FAK elaidic acid

1. 研究開始当初の背景

オステオポンチン (OPN) は骨基質に存在するリン蛋白質として同定され、骨芽細胞においては、分化が進むにつれて発現が高くなっていく骨分化マーカーとして知られる。また、メカニカルストレスにより発現が調節されるなど、骨代謝と密接に関係していると考えられている。しかし、OPN 欠損マウスは骨形態に異常は見られず、野生型と同様の発育過程をたどるなど、OPN の骨分化における役割は不明な点が多い。一方で、OPN は骨の細胞ばかりでなく、様々な組織で発現することが知られている。特に免疫細胞でよく研究されており、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞や T 細胞に対して、分化や遊走、サイトカインの発現など、様々な作用が報告されている。また、OPN は細胞外に分泌されて、インテグリンや CD44 などを通じてサイトカインとして働くと考えられていたが、マクロファージにおいて分泌されない細胞内 OPN が I 型インターフェロンの産生を調節しているとの報告もあり、より詳細な作用機序の解明が急務である。

申請者はこれまで、骨分化に影響を与える様々なファクター (メカニカルストレスや AMP-dependent kinase (AMPK)、Lipopolysaccharide (LPS) など) について研究を行ってきたが、骨芽細胞をアスコルビン酸で分化誘導する際に、グラム陰性菌の内毒素である LPS で持続的に刺激すると、細胞外マトリックスの石灰化が抑制され、Osterix、Runx2、ATF4 などの骨分化に必須な転写因子の発現や、骨シアロ蛋白、オステオカルシン (OCN)、アルカリホスファターゼ (ALP) などの骨分化マーカー分子の発現が抑制された。しかし、骨分化マーカーの一つである OPN の発現は、短期の LPS 刺激では影響を受けないが、2 週間以上持続する事により、むしろ促進された。さらに、LPS により高 OPN となった骨芽細胞への LPS 刺激を止めると、細胞外マトリックスの石灰化が起こった。おそらく、細菌などが骨組織に感染した際に、このような骨分化能を維持した高 OPN 骨芽細胞が誘導され、何らかの役割を担っていると考えられる。また、OPN は前述のように、メカニカルストレスとの関係や、免疫系との関係が報告されており、高 OPN 骨芽細胞の細胞内 OPN は自身の細胞に何らかの作用を及ぼしていると考えられる。そこで、高 OPN 骨芽細胞の分化過程や作用、機能、メカニカルストレスへの反応性などを骨免疫学的に解析する研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

オステオポンチン (OPN) は骨分化が進むにつれ発現が高くなる骨分化マーカーの一つであり、メカニカルストレスによって発現が調節されている事が知られている。また、骨の細胞ばかりでなく、様々な組織で発現しており、特に免疫細胞に対して、分化、遊走、

サイトカインの発現の促進など様々な作用が報告されている。申請者は予備実験において、骨分化培養系にグラム陰性菌の内毒素である Lipopolysaccharide (LPS) を作用させると、細胞外基質の石灰化が抑えられ、各骨分化マーカーの発現も抑制されるが、OPN の発現だけが分化型骨芽細胞よりも高くなる高 OPN 骨芽細胞に分化することを見出した。OPN の免疫系での多彩な作用から考えて、高 OPN 骨芽細胞は骨代謝のみならず、免疫系と相互作用していることが予測される。また、メカニカルストレスの感受性が他の骨芽細胞と異なっている可能性がある。そこで、高 OPN 骨芽細胞の分化過程や作用、機能を骨免疫学的に解析する研究を計画した。

3. 研究の方法

【動物】

C57BL/6 マウスは九動 (佐賀県鳥栖市) より購入した。cot/tpl2 ノックアウトマウスは C57BL/6 マウスがバックグラウンドのマウスで、我々が維持している。myd88 ノックアウトマウスは大阪大学の審良静雄先生の厚意により使わせていただいた。

【細胞培養】

マウス培養骨芽細胞株 MC3T3-E1、マウス培養マクロファージ株 RAW264.7 細胞、マウス骨髄由来ストローマ細胞株 ST2 細胞および軟骨前駆細胞株 ATDC5 は理化学研究所バイオリソースセンター (茨城県つくば市) より購入した。その他に、初代培養骨芽細胞はマウス新生仔の頭蓋冠を摘出し、0.125% Collagenase type I, 0.25% Trypsin で処理して、回収した。また、腹腔マクロファージは、マウス腹腔に 5% 液状チオグリコレート培地 2 ml を注入し、48 時間後に誘導されてきた腹腔内のマクロファージを回収した。そして、骨髄細胞はマウスの大腿骨と脛骨の両骨端を切断し、培地で洗い出し、回収した。さらに、初代培養軟骨芽細胞は胎生 13 日の前後肢芽を採取し、0.125% Collagenase type II で処理して回収した。骨分化は、 α -MEM に 10% ウシ胎仔血清、28 mM アスコルビン酸、5 mM β -グリセロリン酸を添加し、0-3 週間、培養を行った。破骨細胞分化は α -MEM に 10% ウシ胎仔血清、5 ng/ml RANKL、50 ng/ml M-CSF を添加し、3-7 日間、培養した。軟骨分化は、Ham's F-12/DMEM に 5% ウシ胎仔血清、10 μ g/ml インスリン、10 μ g/ml トランスフェリン、30 nM 亜セレン酸ナトリウムを添加して、0-4 週間、培養を行った。

【Tet-on inducible expression system】

マウス OPN mRNA を RT-PCR し、増幅された cDNA を pEFBOS plasmid に組み込んで、pEFBOS-OPN plasmid を作成した。また、クロンテック社の pTet-On plasmid の CMV promoter を human elongation factor 1 α (EF1 α) promoter に置換した pEF-1 α -Tet-On を作成し

た。これらのプラスミドを Lipofectamine 2000 (インビトロジェン社) で MC3T3-E1 細胞にトランスフェクトし、Doxycycline (Doxy) 処理で OPN が強制的に誘導される MC3T3-E1 細胞を作成した。

【RNA 干渉法】

シグマ社で設計と合成をした siRNA (small interfering RNA) を HillyMax 試薬(同仁社)で細胞に導入し、数日後にウエスタンブロット法で蛋白質の発現が抑制されているか確認した。

【細胞染色】

数週間、培養した細胞は 3.7%ホルムアルデヒド PBS 溶液で固定後、染色した。石灰化を見る目的で、アリザリンレッド S 染色と Von Kossa 染色を行った。アリザリンレッド S 染色は固定後の細胞を 5%アリザリンレッド S 水溶液で 5 分間染色したのち、水洗した。Von Kossa 染色は固定した細胞を 5%硝酸銀水溶液で処理し、800 mJ/cm² の紫外線を照射して染色し、5%チオ硫酸ナトリウム水溶液で反応を停止した。TRAP 染色は固定した細胞を TRAP 染色液(0.1 mg/ml Naphtol AS-MX phosphate, 0.6 mg/ml Fast red violet LB salt, 50 mM sodium tartrate, 100 mM sodiumacetate pH5.0 水溶液)で染色した。また、軟骨基質を染色する目的で、アルシアンブルー染色を行った。固定した軟骨芽細胞を 0.5%アルシアンブルー-8GX、0.1 M 塩酸水溶液で 12 時間、染色したのち、水洗した。

【リアルタイム PCR 法】

様々な処理を行った細胞から Isogen 試薬(ニッポンジーン社)を用いて total RNA を抽出し、oligo dT プライマーを用いて cDNA に逆転写した。20000 倍希釈した SYBR Green I (CAMBREX 社) を加えて PCR 反応を行い、反応中の蛍光を Step One Plus (ABI 社) で読み取り、発現していた mRNA の量を解析した。

【ウエスタンブロット法】

実験に用いた細胞は RIPA buffer で溶解し、10%ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行った。泳動後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜にトランスファーし、5%スキムミルク TBST でブロッキングを行った。1 次抗体と反応させた後、ペルオキシダーゼ (POD) 標識 2 次抗体と反応させた。その後、ルミノール試薬で化学発光させ、X 線フィルムに焼付け、現像を行った。

【低出力超音波(LIPUS)】

LIPUS 照射装置で 30 mW/cm² の出力で 20 分間、細胞に照射した。これは臨床で骨折治療に用いられている出力と照射時間である。これまでの我々の研究で、骨芽細胞に LIPUS を照射すると、*rankl*, *mcp-1*, *mip-1β* などの遺伝子の発現が促進されることがわかってい

る。なお、LIPUS 照射装置は(株) 帝人ファームより貸与されている。

4. 研究成果

【高 OPN 骨芽細胞の骨分化能】

LPS によって誘導される高 OPN 骨芽細胞が骨芽細胞としての機能を維持しているかを確認した。高 OPN 骨芽細胞をアスコルビン酸含有の骨分化誘導培地で 2 週間、培養すると正常な石灰化がアリザリンレッド染色と von Kossa 染色で確認された。次に、骨分化マーカーの発現をリアルタイム PCR 法で確認したところ、*ocn* (オステオカルシン)、*bsp* (骨シアロタンパク)、*runx2* などの発現が段階的に増加していった。一方で、*opn* の発現は高いレベルのままであった。このことから、LPS により誘導される高 OPN 骨芽細胞は低 OPN 骨芽細胞と同様に分化する能力を有していると考えられる。

【LPS 以外の刺激による高 OPN 骨芽細胞の誘導】

LPS 以外に高 OPN 骨芽細胞を誘導する刺激がないか、様々な生理活性物質を骨芽細胞の培地に添加していったところ、トランス型不飽和脂肪酸である Elaidic acid (Ela) に高 OPN 骨芽細胞を誘導する活性がある事がわかった。過去の報告で、脂肪酸が TLR4 を刺激するという報告があったので、MyD88 ノックアウトマウス由来の骨芽細胞を Ela で刺激したところ、OPN の発現が高くなった。MyD88 ノックアウトの骨芽細胞は LPS で刺激しても、高 OPN 骨芽細胞にならないため、Ela は LPS-TLR4 経路とは異なる経路で高 OPN 骨芽細胞を誘導すると考えられる。

マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞に低出力超音波(LIPUS)を照射しても OPN の発現は影響がなかったが、マウス骨髄由来ストローマ細胞株 ST2 細胞を骨分化誘導培地で培養しながら LIPUS を照射すると *opn* の発現が高くなった。しかし、*opn* 以外の *runx2*, *alp*, *ocn* などの骨分化マーカーの発現も高くなった。また、脂肪細胞分化誘導培地で培養しながら LIPUS を照射すると脂肪細胞分化マーカー遺伝子である *pparγ2* の発現が抑制されたことから、LIPUS は高 OPN 骨芽細胞に誘導するというより、*runx2* や *pparγ2* などの転写因子の発現を通じて、脂肪細胞分化から骨芽細胞分化に方向づける働きがあると考えられる。

【高 OPN 骨芽細胞のメカニカルストレス感受性】

OPN ノックアウトマウスの尾椎がメカニカルストレスに不応であるという報告があるので、高 OPN 骨芽細胞はメカニカルストレスの感受性が高い可能性があると考えた。LPS で誘導した高 OPN 骨芽細胞のメカニカルストレス感受性を確認するため、低出力超音波(LIPUS)を照射し、*rankl*, *mcp-1*, *mip-1β* などの遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で解

析した。すると、予想に反して、高 OPN 骨芽細胞では、低 OPN 骨芽細胞に比べ、LIPUS による *rankl*, *mcp-1*, *mip-1β* の発現誘導が抑制された。高 OPN 骨芽細胞はメカニカルストレス感受性が低い可能性がある。

しかし、高 OPN 骨芽細胞を誘導する際に用いた LPS が LIPUS の感受性に影響を与えている可能性も考えられるので、低 OPN 骨芽細胞を LIPUS または LPS もしくはその両方で刺激したところ、*groα*, *ip10*, *rankl* など LPS で誘導される遺伝子の発現が LIPUS で同時に刺激する事で抑制された。さらに、詳しく解析を進めたところ、LIPUS は LPS の受容体である TLR4 の細胞膜での局在を減少させている事がわかった。この結果から、LPS 以外の刺激で誘導した高 OPN 骨芽細胞についても解析する必要があると考えられる。

LPS の影響を排除するため、Doxy で OPN の発現を強制的に誘導できる MC3T3-E1 細胞を構築し、LIPUS 照射したときの LIPUS 感受性の遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で解析したところ、Doxy で OPN を強制的に誘導した細胞は OPN を誘導していない細胞に比べ、*rankl*, *mcp-1*, *mip-1β* などの遺伝子発現が抑制されていた。また、Ela で高 OPN 骨芽細胞を誘導して、同様の実験を行ったところ、Ela で誘導した高 OPN 骨芽細胞でも、LIPUS 感受性遺伝子の発現は抑制された。

これらの結果から、高 OPN 骨芽細胞はメカニカルストレスの感受性が低くなっている可能性がある。

【高 OPN 骨芽細胞と Cot/Tpl2】

LPS 刺激により高 OPN 骨芽細胞を誘導する際に、LPS の受容体である TLR4 の下流の分子である MyD88 と Cot/Tpl2 のノックアウトマウス由来の骨芽細胞で検討をしていたが、Cot/Tpl2 ノックアウト骨芽細胞では OPN の発現が野生型の高 OPN 細胞の 2 倍以上、高くなっていた。また、MyD88 ノックアウト骨芽細胞も OPN の発現が高くなったが、LPS によるものなのか、骨分化が進んだことによるものなのか、判断ができなかった。そこで、LPS-TLR4 の下流のシグナルを解析する事にした。

野生型マウス、MyD88 と Cot/Tpl2 のノックアウトマウス由来の骨芽細胞を LPS で刺激し、およそ 40 種類のケモカインの発現をリアルタイム PCR 法で網羅的に解析した。すると、LPS-TLR4 の下流のシグナルは MyD88 依存的に Cot/Tpl2 が抑制する経路、

MyD88 依存的に Cot/Tpl2 が促進する経路、

MyD88 非依存的に Cot/Tpl2 が抑制する経路の 3 通りがある事が判明した。ただし、骨芽細胞ではケモカインの発現が低く、評価がしにくいので、同様の解析をそれぞれのマウスの腹腔マクロファージを用いておこなったが、同じ結果になった。これらの結果を考え合わせると、Cot/Tpl2 ノックアウト骨芽細胞で LPS により OPN の発現が高くなる際、

MyD88 に非依存的な可能性もある事がわかった。

【AMPK の OPN への影響】

細胞内の ATP が枯渇すると AMPK (AMP-activated protein kinase) が活性化して、ATP を産生する事が知られている。AMPK を活性化する Metformin で初代培養骨芽細胞や MC3T3-E1 細胞を処理すると、OPN の発現が抑制された。また、マウス軟骨芽細胞前駆細胞株 ATDC5 細胞の培地に Metformin を添加したところ、*sex determining region Y box 6 (sox6)*, *sox9*, collagen type 2 a1 (*col2a1*) などの発現が抑制されたが、*opn* の発現への影響は確認できなかった。

【高 OPN 骨芽細胞と Lmw-ptp】

LPS により誘導される高 OPN 骨芽細胞で発現が高くなる分子を解析していったところ、Lmw-ptp (low molecular weight protein tyrosine phosphatase) の発現が高くなっている事がわかった。また、Ela で誘導した高 OPN 骨芽細胞や Doxy で OPN を強制的に誘導した MC3T3-E1 細胞でも Lmw-ptp の発現は高くなっていた。さらに、低 OPN 骨芽細胞をリコンビナント OPN で刺激したところ、3 時間ほどで急速に *lmw-ptp* の発現が促進された。Lmw-ptp は OPN により発現が調節されている可能性がある。

高 OPN 骨芽細胞はメカニカルストレス感受性が低い可能性があるので、メカニカルストレスでリン酸化する事が知られている FAK (focal adhesion kinase) が低出力超音波 (LIPUS) でどのような影響を受けるのか確認したところ、低 OPN 骨芽細胞では LIPUS 刺激により著明な FAK のリン酸化が確認されたが、LPS や Ela で誘導した高 OPN 骨芽細胞では FAK のリン酸化が抑制された。また、Doxy で OPN を強制的に誘導した MC3T3-E1 細胞でも LIPUS による FAK のリン酸化は OPN を誘導していない MC3T3-E1 細胞に比べて抑制されていた。さらに低 OPN 骨芽細胞をリコンビナント OPN で全処理して、LIPUS を刺激しても FAK のリン酸化は対照群に比べ、抑制されていた。

次に、OPN により発現が促進されている可能性がある Lmw-ptp について検討した。LPS または Ela で誘導した高 OPN 骨芽細胞の Lmw-ptp を siRNA 法でノックダウンし、LIPUS で刺激したところ、OPN により抑制されていた FAK のリン酸化が回復した。さらに、Doxy で OPN を強制的に誘導した MC3T3-E1 細胞の Lmw-ptp を siRNA 法でノックダウンし、LIPUS を照射したところ、同様に OPN により抑制されていた FAK のリン酸化が回復した。

【まとめ】

LPS により誘導される高 OPN 骨芽細胞は正常に骨分化する能力を有していた。また、

LPS 以外でも Ela で誘導する事ができる。そして、OPN の発現が高くなる際、Cot/Tpl2 が抑制的に働いている可能性がある。

OPN は骨芽細胞のメカニカルストレスの感受性を下げる働きがあり、これには Lmw-ntp の発現が高くなることに関係していると考えられる。また、OPN-Lmw-ntp 系はメカニカルストレスを負荷した際の FAK のリン酸化を抑制的に調節している事が示唆された。しかし、OPN、Lmw-ntp、FAK がどのように相互作用しているのかはまだ不明のままである。そして、高 OPN 骨芽細胞のメカニカルストレス感受性が低いという事にどのような生理的な意義があるのかを今後は明らかにしていきたい。

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 4 件)

1. Low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) influences the multilineage differentiation of mesenchymal stem and progenitor cell lines through ROCK-Cot/Tpl2-MEK-ERK signaling pathway.
Kusuyama J, Bandow K, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T.
J Biol Chem. 2014 Apr 11; 289(15): 10330-10344. (査読あり)

2. Long-time treatment by low-dose N-acetyl-L-cysteine enhances proinflammatory cytokine expressions in LPS-stimulated macrophages.
Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Kusuyama J, Matsuguchi T.
PLoS One. 2014 Feb 4; 9(2): e87229 (査読あり)

3. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) inhibits LPS-induced inflammatory responses of osteoblasts through TLR4-MyD88 dissociation.
Nakao J, Fujii Y, Kusuyama J, Bandow K, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T.
Bone. 2014 Jan; 58: 17-25. (査読あり)

4. LPS-induced chemokine expression in both MyD88-dependent and -independent manners is regulated by Cot/Tpl2-ERK axis in macrophages.
Bandow K, Kusuyama J, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T.
FEBS Lett. 2012 May 21; 586(10): 1540-1546. (査読あり)

[学会発表](計 5 件)

1. 骨芽細胞分化に対する遊離脂肪酸の影響
坂東健二郎、楠山譲二、柿元協子、大西智和、松口徹也
第 36 回日本分子生物学会年会 (兵庫)

2013 年 12 月 3 日 ~ 6 日

2. Low-Intensity Pulsed Ultra Sound (LIPUS)が炎症性遺伝子発現に及ぼす影響
松口徹也、楠山譲二、坂東健二郎、柿元協子、大西智和
第 54 回歯科基礎医学会学術大会 (福島)
2012 年 9 月 14 日 ~ 16 日

3. マクロファージにおける LPS による Cot/Tpl2-ERK 経路を介したケモカインの誘導
坂東健二郎、楠山譲二、柿元協子、大西智和、松口徹也
第 54 回歯科基礎医学会学術大会 (福島)
2012 年 9 月 14 日 ~ 16 日

4. Characterization of LPS-induced OPN^{HIGH} OCN^{LOW} osteoblasts
坂東健二郎、楠山譲二、社本光央、柿元協子、大西智和、松口徹也
第 34 回日本分子生物学会年会 (神奈川)
2011 年 12 月 13 日 ~ 16 日

5. 骨芽細胞における Cot/Tpl2 を介したメカニカルストレスのシグナル伝達経路
楠山譲二、坂東健二郎、柿元協子、大西智和、松口徹也
第 53 回歯科基礎医学会学術大会 (岐阜)
2011 年 9 月 30 日 ~ 10 月 2 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]
とくになし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
坂東 健二郎 (BANDOW KENJIRO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 50347093

(2) 研究分担者
松口 徹也 (MATSUGUCHI TETSUYA)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 10303629

大西 智和 (OHNISHI TOMOKAZU)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 30244247

(平成 23 年 4 月 1 日 ~ 平成 24 年 2 月 23 日)
楠山 譲二 (KUSUYAMA JOJI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 70596105

(平成 24 年 2 月 24 日 ~)
柿元 協子 (KAKIMOTO KYOKO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号 : 40274049

(3)連携研究者

なし