

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861347

研究課題名(和文) 骨・軟骨再生への筋からのアプローチと疾患治療への展開

研究課題名(英文) Approach from muscle to bone and cartilage regeneration and development of the treatment of diseases

研究代表者

矢野 昌人 (YANO, Masato)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：30500821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では筋組織が骨・軟骨再生を誘導する機序を明らかにすることを目的として、筋組織での異所性骨化を破骨細胞形成の観点から検討した。筋組織では皮下組織と比較して、筋芽細胞とBMP-2の移植による異所性骨化が増加し、また破骨細胞の増加が見られた。さらに、進行性骨化性線維異形成症の原因遺伝子である活性型BMP受容体を強制発現させた筋芽細胞はin vivoおよびin vitroにおいてTGF- β の発現を増加させ破骨細胞分化を促進することが明らかとなった。以上より、筋芽細胞が破骨細胞形成を促進して骨・軟骨再生を誘導することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of osteoclasts during heterotopic bone formation in muscle tissue. The implantation of myoblasts with BMP-2 induced robust heterotopic ossification with an increase in the formation of osteoclasts in the muscle tissues than subcutaneous tissues. Moreover, the causal mutation transfection of fibrodysplasia ossification progressive in myoblasts enhanced the formation of osteoclasts through TGF- β in vivo and in vitro. This study demonstrated that the causal mutation transfection of fibrodysplasia ossification progressive in myoblasts enhances bone and cartilage regeneration through formation of osteoclasts from its precursor in muscle tissues.

研究分野：医歯薬学

キーワード：破骨細胞 筋芽細胞 異所性骨化 進行性骨化性線維異形成症 TGF- β

1. 研究開始当初の背景

骨・軟骨欠損の修復、変形性関節症や骨粗鬆症などの頻度の多い加齢にともなう疾患の治療の発展に骨・軟骨再生は有力な手段となる。現在、骨・軟骨再生の分野はヒト幹細胞を用いた研究でも多くの臨床研究が開始されており、期待される分野の一つと考えられる。再生医学では、再生に使用する細胞源、再生の足場、再生をおこなう周囲の環境因子の3つの因子を中心に研究が進められている。

骨・軟骨再生の基礎的な検討では、骨形成タンパク(BMP)に関連したシグナル、古典的 Wnt-β カテニン系、腫瘍壊死因子(TNF)-α などのサイトカインの骨・軟骨再生への影響が検討されているが、筋組織の骨・軟骨再生への直接的な影響を視点を置いた研究はほとんどみられない。

これまで、筋組織で被覆すると骨折の修復が促進されることや筋由来の幹細胞は骨髄由来の幹細胞よりも有効に骨を誘導できたことが報告されているが(J Bone Joint Surg Am 73:1323,1991;Proc Natl Acad Sci USA 108:1585,2011)、筋由来の細胞が骨分化を促進する機序については詳細に検討されていない。

私の所属する研究室では、以前より筋組織が全身性・進行性に骨化する遺伝性疾患である進行性骨化性線維異形成症(FOP)と BMP 受容体の恒常活性化型変異であるその原因遺伝子変異を手がかりに筋組織と骨代謝の相互関連について研究を進めてきた。その中で骨化関連遺伝子の DNA マイクロアレイデータをもとに筋骨化を促進する因子の一つとして Tmem119 を見だし(J Biol Chem 286:9787,2011;Bone 51:158,2012)、さらに新規因子の解析を進めている。また筋組織が産生する体液性骨形成促進因子の候補として、オステオグリシン、FAM5Cを見出した(J Biol Chem 287:11616,2012;Biochem Biophys Res Commun 418:134,2012)。現在、遺伝子改変マウスやヌードマウスを用いて、骨修復、骨・軟骨再生、異所性骨化を検討できる実験系を確立しており、今回の研究では、

これらの研究状況を背景として、筋組織が骨・軟骨再生を誘導する機序を新たな視点から検討したい。

2. 研究の目的

筋組織が骨・軟骨再生に支持的に働くことを示唆する知見が集積されてきたが、その機序の詳細は不明である。今回の研究では、筋組織が骨・軟骨再生を誘導する機序と骨吸収系細胞の破骨細胞やマクロファージなどの周囲の細胞が果たす役割を明らかにし、筋組織の骨・軟骨再生誘導に重要な因子を同定したい。それらの研究を通して、斬新な骨・軟骨再生法の開発、筋骨化をきたす疾患の新しい治療法の開発につなげたい。

3. 研究の方法

(1) 筋組織の有無および FOP 原因変異 ALK2(R206H)による異所性骨化の差異について検討 (in vivo)

成体マウスの背中の皮下もしくは大腿部の筋肉内へ野生型または FOP の原因変異 ALK2 (R206H)強制発現筋芽細胞株 C2C12 細胞と BMP-2 を含んだコラーゲンスポンジを移植することで異所性骨化を誘導し、異所性骨化における筋組織および ALK2 (R206H)の役割について検討した。具体的には、以下の項目について解析した。

- ① 骨塩量の解析: BMP-2 により誘導される異所性骨の骨塩量を qCT を用いて評価した。
- ② 骨の解析: コラーゲンスポンジを中心とした骨化組織を回収し、骨芽細胞の集積について組織免疫学的に定量解析した。

③ 破骨細胞の同定: ②と同様に回収した組織を TRAP 染色により破骨細胞の集積について定量解析した。

(2) 破骨細胞分化における筋組織および ALK2(R206H)の影響の検討 (in vitro)

マウス単球細胞である Raw264.7 細胞は RANKL により破骨細胞に分化誘導できるが、この系に筋芽細胞株、線維芽細胞株、さらにそれぞれの細胞に ALK2 (R206H)を強制発現させたものを共培養させて、破骨細胞形成への影響を破骨細胞分化マーカーの発

現および TRAP 染色により検討した。

(3) ALK2 (R206H)導入により筋芽細胞から誘導される破骨細胞形成促進因子の同定とその作用機序の検討 (in vitro, in vivo)

DNA マイクロアレイ解析により ALK2 (R206H)の導入により発現量が増加する破骨細胞形成促進因子として抽出された TGF- β について、組換え体タンパク質および阻害剤、中和抗体を Raw264.7 細胞の破骨細胞分化誘導系に添加実験をおこない、TGF- β の破骨細胞形成促進作用を検討した。さらにマウス筋肉内異所性骨化誘導系に TGF- β 阻害剤を投与し、in vivo での破骨細胞形成に対する TGF- β の作用を検討した。

4. 研究成果

(1) 筋組織は BMP-2 による異所性骨を増加させる

BMP-2 と筋芽細胞の免疫不全マウスへの移植により誘導される異所性骨は皮下組織と比較して筋肉内で有意に増加した (図 2)。また、破骨細胞数も筋肉内で有意な増加がみられた (図 2)。

(2) FOP 原因変異 ALK2 (R206H)強制発現筋芽細胞は筋肉内異所性骨を増加させる

BMP-2 と筋芽細胞の免疫不全マウスへの移植により誘導される異所性骨は筋芽細胞に ALK2 (R206H)強制発現させることで有意に増加した (図 1)。また、破骨細胞数の有意な増加がみられた (図 2)。

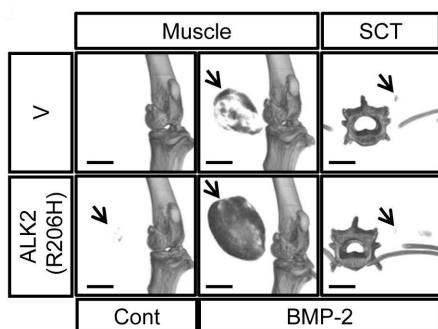


図 1 BMP-2 と筋芽細胞移植による異所性骨誘導 (qCT)

筋肉内 (muscle) および皮下 (SCT) への移植

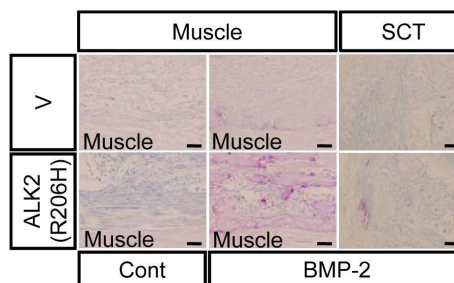


図 2 BMP-2 と筋芽細胞移植による破骨細胞形成 (TRAP 染色)

筋肉内 (muscle) および皮下 (SCT) への移植

(3) 筋芽細胞の培養上清は破骨細胞形成を促進する

Raw264.7 細胞の破骨細胞分化誘導系において、筋芽細胞の培養上清は線維芽細胞と比較して破骨細胞形成を促進した (図 3)。

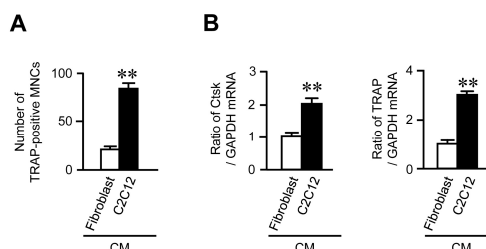


図 3 筋芽細胞の培養上清は破骨細胞形成を促進する

(A) TRAP 染色 (B)リアルタイム PCR
**p<0.01

(4) ALK2 (R206H)強制発現筋芽細胞の培養上清は破骨細胞形成を増加させる

Raw264.7 細胞の破骨細胞分化誘導系において、ALK2 (R206H)を強制発現させた筋芽細胞の培養上清はコントロール群と比較して破骨細胞形成を促進した (図 4)。

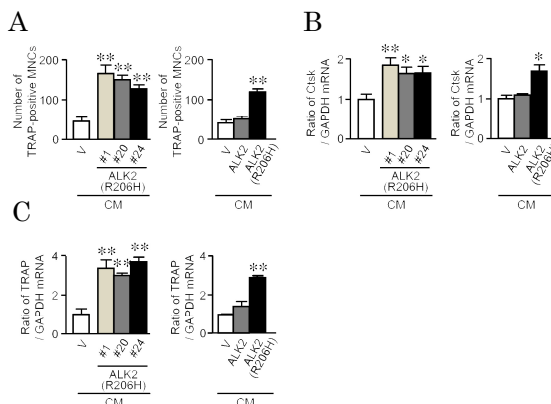


図4 ALK2 (R206H)強制発現筋芽細胞の培養上清は破骨細胞形成を促進する

(A) TRAP 染色 (B, C)リアルタイム PCR
*p<0.05, **p<0.01

(5) 筋芽細胞において ALK2 (R206H)の強制発現は TGF-β の発現量を増加させる

ALK2 (R206H)発現筋芽細胞とコントロール細胞の発現プロファイルから、破骨細胞分化および骨代謝関連の液性因子について発現比較した結果、活性型 ALK2 発現細胞において破骨細胞分化促進作用が報告されている TGF-β の発現量が増加していることが明らかとなった (表1)。

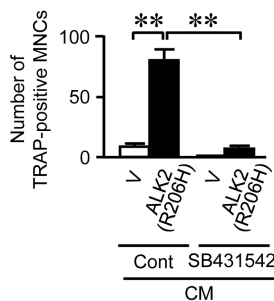
Gene name	Ratio	Gene name	Ratio
CCN2	1.5	IL-34	0.7
EGF	0.7	MCP-1	0.5
FGF-5	1.1	MCP-2	0.5
FGF-7	1.1	MCP-3	1.5
FGF-9	0.9	MCSF	1.0
GDF-11	1.1	MIP-1γ	0.4
GDF-15	1.5	MIP-2	0.4
IGFBP-2	1.1	PDGFA	0.9
IGFBP-5	0.8	PDGFB	1.4
IGFBP-6	1.1	Sema3b	0.6
IGFBP-7	1.1	Sema3c	0.7
IL-1β	1.1	Sema3d	0.2
IL-6	1.0	TGF-β1	1.7
IL-7	0.2	TGF-β2	1.7
IL-11	0.7	TGF-β3	1.4
IL-12	0.7	VEGFA	1.4
IL-16	0.9	VEGFB	0.7
IL-18	0.4	WNT-7A	0.6
IL-33	0.1	WNT-9A	1.1

表1 筋芽細胞における ALK2(R206H)導入による骨代謝関連因子の発現変動

(6) ALK2 (R206H)強制発現筋芽細胞による破骨細胞形成促進作用は TGF-β シグナルを介する

ALK2 (R206H)強制発現筋芽細胞の培養上清による破骨細胞形成促進系に TGF-β 受容体の阻害剤または中和抗体を添加することで破骨細胞形成は抑制された (図5)。さらに in vivo においても BMP-2 と ALK2 (R206H) 強制発現筋芽細胞により誘導される破骨細胞形成の増加は TGF-β シグナルの阻害により抑制された (図6)

A



B

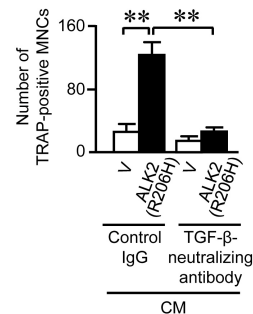


図5 ALK2 (R206H)発現筋芽細胞の培養上清による破骨細胞形成促進作用は TGF-β シグナルを介する
(A, B) TRAP 染色 **p<0.01

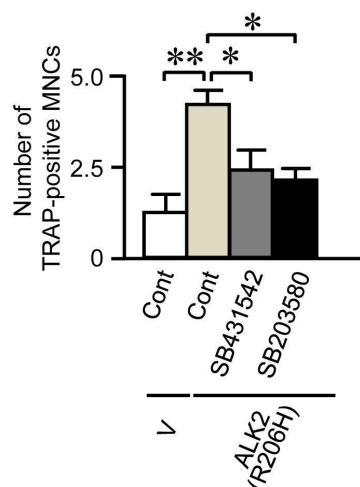


図6 ALK2 (R206H)発現筋芽細胞移植により誘導される破骨細胞形成促進作用は TGF-β シグナルおよび p38 MAP キナーゼを介する

これらの結果から、活性型 ALK2 シグナルは筋芽細胞からの TGFβ の発現を増加させ、ALK5 および p38 MAPK を介して、破骨細胞分化を促進することが示唆された。

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2件)

(1) Yano M, Kawao N, Okumoto K, Tamura Y, Okada K, Kaji H. Fibrodysplasia ossificans progressiva-related activated activin-like kinase signaling enhances osteoclast formation during heterotopic ossification in muscle tissues. J Biol Chem. 2014

13;289(24):16966-77. 査読有 doi:
10.1074/jbc.M113.526038.

研究者番号：

(2) Mao L, Yano M, Kawao N, Tamura Y, Okada K, Kaji H. Role of matrix metalloproteinase-10 in the BMP-2 inducing osteoblastic differentiation. *Endocr J*. 2013;60(12):1309-19. 査読有 https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/60/12/60_EJ13-0270/_article.

〔学会発表〕(計4件)

(1) 矢野昌人, 河尾直之, 奥本勝美, 田村行識, 岡田清孝, 梶博史. 活性化 ALK(activin-like kinase)2 シグナルは筋骨化過程における破骨細胞の形成を促進する. 第32回日本骨代謝学会学術集会. 大阪国際会議場. 大阪府大阪市. 2014年7月24-26日.

(2) 矢野昌人, 河尾直之, 田村行識, 岡田清孝, 梶博史. 進行性骨化性線維異形成症の原因変異より誘導される新規因子 Tmem176b は筋芽細胞から骨芽細胞への分化を促進する. 第32回日本骨代謝学会学術集会. 大阪国際会議場. 大阪府大阪市. 2014年7月24-26日.

(3) 岡田清孝, 毛莉, 矢野昌人, 田村行識, 河尾直之, 梶博史. MMP-10 は BMP-2 による筋芽細胞から骨芽細胞への分化を促進する. 第32回日本骨代謝学会学術集会. 大阪国際会議場. 大阪府大阪市. 2014年7月24-26日.

(4) 矢野昌人, 河尾直之, 田村行識, 岡田清孝, 梶博史. 筋骨化シグナルより誘導される新規因子 Tmem176b は筋芽細胞から骨芽細胞への分化を促進する. 第106回近畿生理学談話会. 奈良県立医科大学. 奈良県橿原市. 2013年11月2日.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/physio2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 昌人 (YANO MASATO)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：30500821

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()