

博士論文番号：0581015

骨代謝における増殖因子 HB-EGF の機能解析

中村 尚志

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞増殖学講座
(竹家 達夫 教授)

平成21年12月21日提出

目次

目次	2
序論	4
骨代謝	4
骨芽細胞	4
破骨細胞	5
HB-EGF	6
EGF ファミリーと骨代謝	7
材料と方法	13
細胞培養	13
HB-EGF 変異マウス	13
マイクロ CT 撮影および骨形態計測	13
組織標本・骨切片作製	14
組織染色・骨形態計測	14
可溶性 RANKL	15
リコンビナント M-SCF	16
初代破骨前駆細胞	16
破骨細胞分化誘導	16
初代骨芽前駆細胞	16
骨芽細胞分化誘導	17
レトロウイルスを用いた遺伝子導入	17
ウサギ抗マウス HB-EGF 抗体	17
RT-PCR	18
リアルタイム PCR	19
ウェスタンブロットティング	19
免疫染色	19
アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色・アリザリンレッド染色	19
細胞増殖アッセイ (WST アッセイ)	20
ルシフェラーゼアッセイ	20
骨髄移植	20
結果	21
1) 破骨細胞分化過程における HB-EGF の発現プロファイル	21
2) HB-EGF 変異マウスにおける骨形態	21
3) 破骨細胞における HB-EGF の機能解析	22
4) 骨芽細胞における HB-EGF の機能解析	24
5) 骨芽細胞分化に対する破骨細胞由来の HB-EGF が与える影響	28

Figure.1	破骨細胞分化過程における HB-EGF 発現プロファイル	30
Figure.2	HB-EGF 変異マウスの体型および骨格における表現型	31
Figure.3	3D マイクロ CT を用いた HB-EGF 変異マウスにおける骨形態計測	32
Figure.4	HB-EGF 変異マウスにおける組織学的骨形態計測	33
Figure.5	<i>in vitro</i> 破骨細胞分化誘導系における HB-EGF の機能	35
Figure.6	破骨細胞分化過程におけるメタロプロテアーゼの発現プロファイル	37
Figure.7	sHB-EGF が破骨細胞分化に及ぼす影響	38
Figure.8	HB-EGF 各種変異体強制発現細胞を用いた多核破骨細胞形成	39
Figure.9	初代破骨細胞における HB-EGF 各種変異体強制発現細胞を用いた多核破骨細胞形成	41
Figure.10	破骨細胞における HB-EGF の細胞内局在	42
Figure.11	HB-EGF が骨芽細胞におよぼす影響	43
Figure.12	骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現プロファイル	45
Figure.13	骨芽細胞における HB-EGF-EGFR シグナルの作用機序	47
Figure.14	骨芽細胞において HB-EGF が Runx2 転写活性に与える影響	49
Figure.15	骨芽細胞において HB-EGF が Smad の核内移行に与える影響	50
Figure.16	骨芽細胞において HB-EGF が細胞増殖に与える影響	51
Figure.17	骨芽細胞における内在性 HB-EGF の関与	53
Figure.18	骨芽細胞における sHB-EGF による分化抑制シグナルのモデル図	54
Figure.19	破骨細胞由来の HB-EGF による骨芽細胞分化の機能解析	55
Figure.20	骨代謝における HB-EGF 作用機序のモデル図	56
考察		57
	破骨細胞における HB-EGF の役割	57
	骨芽細胞における HB-EGF の役割	58
	骨代謝における HB-EGF の役割	59
謝辞		62
参考文献		63

序論

骨代謝

脊椎動物において、骨はその体型を維持するための支持器官、外力から内蔵を保護するための防御器官として機能するだけでなく、カルシウムなどのミネラルの貯蔵や造血系細胞産生の場合など生理的な機能も有する。これらの機能を維持するために、骨は、他の臓器と同様、常に骨形成・骨吸収を繰り返す代謝を行っている。この骨代謝には、間葉系細胞に由来する骨芽細胞と造血系細胞に由来する破骨細胞の主に2種類の細胞が関与している。(参考図 1A) 生体内において、骨芽細胞と破骨細胞は近隣に存在すると考えられており、両者は緊密に連携を取り合うことにより、骨形成・骨吸収のバランスを保ち、骨量を一定に保っている。(Harada and Rodan, 2003; Teitelbaum and Ross, 2003) このバランスの破綻は様々な骨疾患を引き起こすことが知られている。(参考図 1B) 例えば、骨吸収が過剰となると骨内腔を占める海綿骨の減少、引き続く皮質骨の減少により骨が脆く折れやすくなる骨粗鬆症を引き起こす。閉経後骨粗鬆症など老齢の女性で見られる骨粗鬆症は、女性ホルモン(エストロゲン)の分泌低下により、破骨細胞による骨吸収が過剰となり引き起こされることが明らかとなっている。(Nakamura et al., 2007) 一方、骨形成が過剰となると、骨の過剰な硬化および骨内腔が海綿骨で満たされることによる骨髄細胞の減少が観察される大理石骨病といった疾患を引き起こす。このことから、骨量を正常に維持することは、骨機能を維持する上で非常に重要である。

様々な骨疾患の中でも、特に骨吸収過剰により引き起こされる骨粗鬆症は50代以上の日本人女性の1/3以上に認められ、骨折リスクを増大させる。力学的負荷の多くかかる腰周辺骨の骨折は、寝たきりの状態を強いられ、患者のQOL(Quality of life)の低下のみならず、寝たきり生活により引き起こされる心肺機能の低下に結びつく。このように、骨疾患は直接患者の生命に直結はしないが、QOLの低下など様々な負担をもたらす。これら骨疾患の根本的治療には、骨芽細胞・破骨細胞の分化機構の解明、および両細胞間のシグナル伝達・骨代謝機構の解明が不可欠なものであると考えられる。

骨芽細胞

骨芽細胞は骨成長板および骨表面に存在する。骨芽細胞の生体内における重要な役割の1つとして骨基質を石灰化し、骨形成を行うことが挙げられる。間葉系細胞に由来する骨芽細胞は、Bone Morphology Protein (BMP)などの刺激により骨基質石灰化能を有する成熟骨芽細胞へと分化する。(参考図2) 骨芽前駆細胞から成熟骨芽細胞への分化過程においては、まず細胞の増殖が

起こり、次に細胞外を石灰化するための石灰化基質が細胞内で合成され、その後、細胞外基質の石灰化を行う成熟骨芽細胞へと分化する。その分化過程で、分化過程早期に当たる石灰化基質合成期ではType I collagen (ColI)、Alkaline phosphatase (Alp)、Osteopontin (Opn)、分化過程後期に当たる細胞外基質石灰化期にはOsteocalcin (Ocn)等のマーカー遺伝子の発現が上昇してくることが知られている。(Stein and Lian, 1993) これまでに、上記骨芽細胞マーカー遺伝子の発現には転写因子Runx2が関与していることが報告されている。Runx2ノックアウトマウスは骨形成不全により、骨格形成に異常が認められる。(Komori et al., 1997; Nakashima et al., 2002; Otto et al., 1997) このことから、Runx2は骨芽細胞分化に必須の転写因子であると考えられている。Runx2は、BMPシグナルによりリン酸化を受け核内移行したSmadによる制御を受け、転写活性を持つ。また、Runx2の転写活性はATF4、SATB2、C/EBP β により促進、Twist1/2により抑制されることが知られている。(Bialek et al., 2004; Franceschi et al., 2007) しかし、Runx2転写活性制御因子の制御機構、骨芽細胞分化過程の詳細なシグナル機構に関しては不明な点が多い。

骨芽細胞は骨基質石灰化能を担うだけでなく、破骨細胞の分化支持細胞として機能することも知られている。骨芽細胞は生体内において破骨細胞の近傍に局在していると考えられており、破骨細胞の生存に関与するMacrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF)、分化誘導因子であるReceptor Activator of NF-kappa B Ligand (RANKL)、RANKLのデコイレセプターとして機能しRANKL活性を阻害する役割を持つOsteoprogenitor (OPG) を産生することが知られている。(Jimi et al., 1996; Takahashi et al., 1988) このことから、骨芽細胞はM-CSFおよびRANKLにより破骨細胞の分化を促進、OPGにより破骨細胞の分化を抑制することにより、破骨細胞の分化を制御していると考えられる。

破骨細胞

破骨細胞は生体内において、骨芽細胞と同様、骨成長板および骨表面に局在しており、その局在は骨芽細胞の近辺であることが示唆されている。骨代謝において、骨吸収を担う破骨細胞は、造血系細胞より骨芽細胞の提示するM-CSF、RANKLの刺激により単核破骨細胞前駆体を経て、細胞融合を起こした後、多核で巨大な成熟破骨細胞へと分化する。(参考図3) M-CSF遺伝子の自然変異系統である op/op マウスは破骨細胞の形成不全により大理石骨病の症状を呈するが、アポトーシスを制御するBcl-2の過剰発現により正常な骨吸収が回復することが報告されている。このことから、M-CSFは破骨細胞の分化推進作用よりも破骨前駆細胞の生存維持に関わると考えられている。(Lagasse and Weissman, 1997) 一方、RANKLは破骨前駆細胞の細胞膜上に

発現している受容体Receptor Activator of NF-kappa B (RANK)との結合を介して細胞内にシグナルを伝え破骨細胞への分化を誘導する。RANKLまたはRANKノックアウトマウスは破骨細胞欠失の表現型を呈し、大理石骨病を引き起こすことから、RANKL-RANKシグナル伝達系は破骨細胞分化に必須であることが考えられる。(Li et al., 2000; Theill et al., 2002) また、RANKLデコイレセプターであるOPGのノックアウトマウスは成熟破骨細胞過形成による骨粗鬆症、関節炎を引き起こすことが知られている。(Bucay et al., 1998) このことから、OPGはRANKLシグナルを負に制御することにより、破骨細胞の分化を抑制していると考えられる。

破骨細胞の分化異常、特に骨吸収活性の異常亢進は骨粗鬆症の原因となることから、その分化機構の解明は重要な課題であり、多くの研究がなされてきた。当研究室では、マウスマクロファージ由来細胞株RAW264にリコンビナントRANKLを添加することにより成熟破骨細胞へと分化させる*in vitro*分化誘導系を用いて、破骨細胞の分化機構の解明を行ってきた。破骨細胞の分化過程において発現変動が認められる遺伝子群をマイクロアレイ法により網羅的に解析し、破骨細胞の分化に必須な因子の1つとして転写因子NFAT2を同定した。(Ishida et al., 2002) NFAT2が転写因子として機能することから、さらにNFAT2の標的候補遺伝子を探索するため、NFAT2の転写活性を薬剤により阻害することで発現が低下する遺伝子群をマイクロアレイ法により網羅的に調べた。その結果、NFAT2標的遺伝子の候補としてHeparin-Binding EGF-like growth factor (HB-EGF)、CCL3、CCR1、IL1-ra、Interferon activated gene 202、BLIMP-1、Angiopoietin like 2、Shroom、Expressed sequence C80638の9遺伝子を見出した。(Ishida et al., 2006)

HB-EGF

HB-EGFはEGFファミリーに属する増殖因子で、208アミノ酸からなる膜一回貫通型タンパク質である。N末端側(細胞外)よりシグナルペプチド-ヘパリン結合領域(HB)-EGF様領域(EGF-like)-細胞膜貫通領域(TM)-細胞質内領域(CT)を有し、ヘパリン結合領域で細胞外マトリックスに存在するヘパリンと結合することによりその増殖活性が増強されるという特徴を持つ。(参考図4A) HB-EGFは細胞膜上で膜貫通型リガンドとして合成された後、A Disintegrin And Metalloprotease (ADAM)などのメタロプロテアーゼによる切断を受け、遊離型リガンド(sHB-EGF)および細胞質内領域(HB-EGF-C)が産生されることが知られている。(参考図4B)(Goishi et al., 1995) 遊離型リガンド(proHB-EGF)および遊離型リガンド(sHB-EGF)はEGFレセプター(EGFR)ファミリーのうちErbB1、4に結合し、EGFR下流シグナル経路により隣接・近隣の細胞または自身へと細胞増殖/遊走シグナルを伝える。また、近年、切断後のHB-EGF-Cが細胞増殖やアポトーシスに関与することが報告

されたが、その生理学的機能はいまだ明らかとなっていない。(Kinugasa et al., 2007; Nanba et al., 2003) HB-EGF ノックアウトマウスの解析により、生体内においてHB-EGF は心臓弁形成、皮膚の創傷治癒、目蓋形成、肺胞形成、胎盤形成といった発生過程における様々な局面で重要な役割を担っていることが明らかとなっている。(Iwamoto et al., 2003; Jackson et al., 2003; Minami et al., 2008; Mine et al., 2005; Shirakata et al., 2005; Xie et al., 2007) EGF を始めとする他の EGF ファミリーノックアウトマウスではマイルドな表現型が観察されないのに対し、HB-EGF ノックアウトマウスは非常に重篤な表現型を示すことから、EGF ファミリーの中でも他の因子では補完できない独自の機能を持つことが示唆される。遊離型リガンド (sHB-EGF) のみを発現するノックインマウス (Δ TM マウス) は皮膚の形成異常、臓器機能不全といった表現型を示し、出生直後に死亡する。また、非切断型 HB-EGF ノックインマウス (UC マウス) は HB-EGF ノックアウトマウスとほぼ同様の表現型を示す。(Yamazaki et al., 2003) 近年、HB-EGF ノックアウトマウスで観察される一部の表現型が、UC マウスでは回復していることが明らかとなった。(unpublished data) このことから、HB-EGF の切断は正常な発生のために厳密に制御されていると考えられる。また、HB-EGF は多くのガン細胞において、その増殖を促進する作用を持つ。(Miyamoto et al., 2004) 特に卵巣癌では、他の EGF ファミリーメンバーに比べ HB-EGF の発現が顕著に高く、HB-EGF 特異的阻害剤により増殖抑制、ヌードマウスにおける腫瘍形成能の抑制が認められる。(Miyamoto et al., 2006) これらの結果を元に、現在、卵巣癌患者に対する HB-EGF を標的とした抗がん剤の治験が進められているが、これまでの Gefitinib などをはじめとする受容体を標的とした抗がん剤ではなく、特異的なリガンドを標的にすることにより、副作用の少ない抗がん剤となり得る可能性があり期待されている。

上記のように、HB-EGF は他の EGF ファミリーでは補完できない独自の機能を持ち、また、膜型、分泌型の転換が厳密に制御されることでその機能が使い分けられていると考えられる。

EGF ファミリーと骨代謝

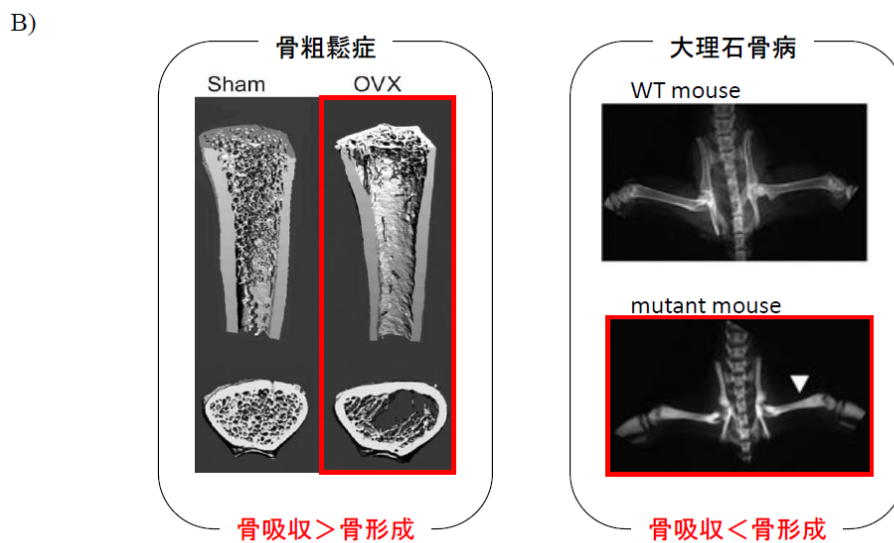
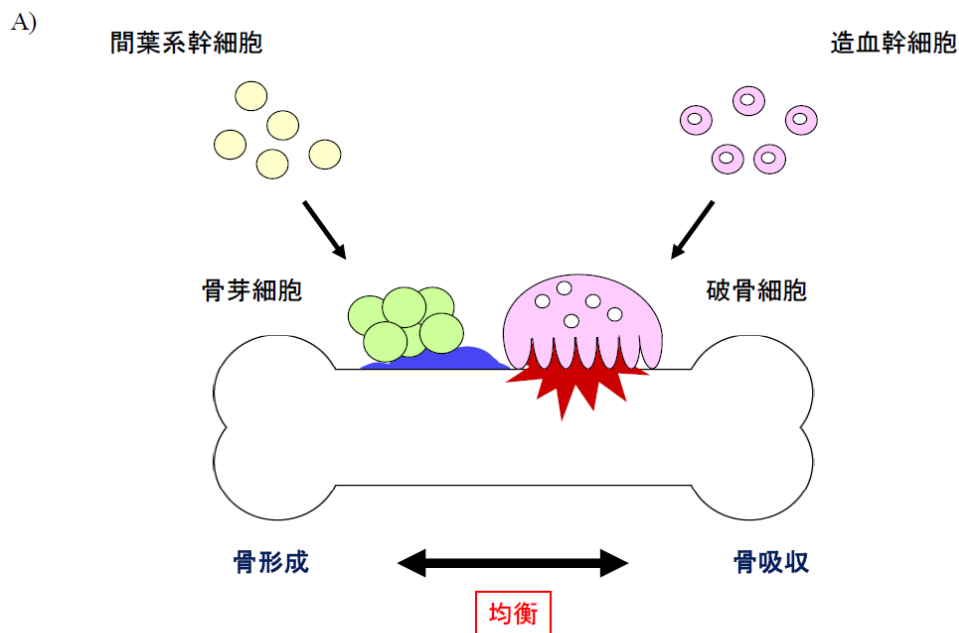
骨代謝、特に骨芽細胞におけるEGFファミリー因子の関与は以前よりよく知られている。EGFRノックアウトマウスは骨芽細胞分化の遅延に伴い、胎生期において骨石灰化が遅れることが明らかとなっている。(Sibilia et al., 2003; Wang et al., 2004) また、*In vitro* 骨芽細胞分化系において、EGF は骨芽細胞の分化の指標となるコラーゲンの合成、ALP の活性を共に抑制することが知られている。(Canalis et al., 1989; Hata et al., 1984; Kumegawa et al., 1983) また、Runx2の転写活性に重要な役割を果たすSmadは、BMP2 シグナルによりC末端側にあるセリン (S462/463/465) がリン酸化を受け核内

へと移行しRunx2と結合するが、EGFR-MAPKを介したシグナルにより、リンカー部位(169-227a. a.)のセリンがリン酸化を受け核内移行が阻害されることが明らかとなっている。(Kretzschmar et al., 1997) このことから、骨芽細胞において、EGFRシグナルは細胞増殖および分化抑制に機能することが示唆されてきた。一方で、ヒトではEGFが間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を促進するという報告がなされている。(Kratchmarova et al., 2005) しかし、HB-EGFは間葉系幹細胞から、軟骨細胞、骨芽細胞、脂肪分化への分化を抑制するという知見も得られている。(Krampera et al., 2005) EGF強制発現トランスジェニックマウスでは骨芽前駆細胞の増殖亢進および皮質骨骨密度の低下が観察され、*in vivo*においても骨芽細胞の分化が抑制されている可能性が示唆された。(Chan and Wong, 2000) 一方で、EGFファミリー因子であるBetacellulin強制発現トランスジェニックマウスでは皮質骨骨密度の増加が認められ、骨芽細胞の分化が亢進されることが観察された。(Schneider et al., 2009) また、破骨細胞におけるEGFファミリー因子の機能については、報告されていない。

このように、EGFファミリー変異マウスの解析から、骨組織、特に骨芽細胞においてEGFファミリーは何らかの機能を担っていることが示唆されているが、その表現型は骨芽細胞の分化亢進/抑制と相反するものであり、明確な機能は明らかとなっていない。

我々は、*in vitro*破骨細胞分化誘導系を用いて、破骨細胞の分化過程において、EGFファミリー因子のうちHB-EGFの発現が転写因子NFAT2の下流で誘導される可能性を見出した。これまでにHB-EGFトランスジェニックマウスにおいて骨組織における異常などは観察されていない。

そこで、本研究では新たに破骨細胞での発現誘導の可能性が示唆された増殖因子HB-EGFの骨代謝における機能を明らかとすることを目的とし、*in vitro*および*in vivo*において研究を遂行した。

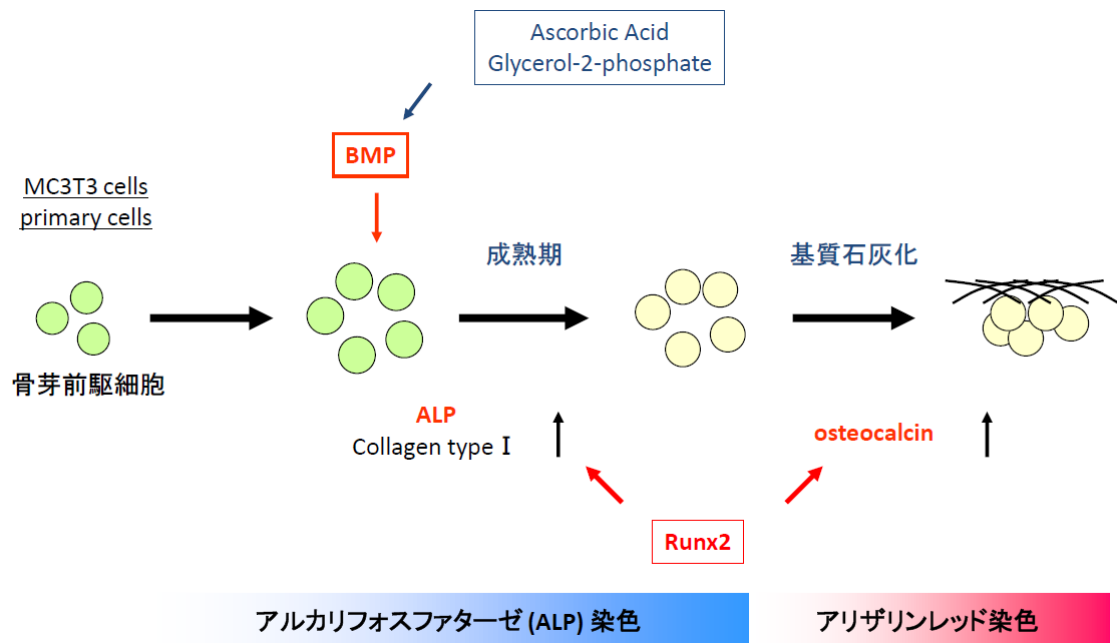


参考図 1 骨代謝と骨疾患

A) 骨代謝のモデル図。

B) 骨代謝異常によって引き起こされる骨疾患例。骨吸収活性が優勢となると骨内腔海綿骨の減少など骨粗鬆症となる。一方、骨形成が優勢となると骨密度の増加とともに、骨内腔が海綿骨により埋め尽くされ骨髄領域が減少する大理石骨病となる。

OVX：卵巣摘出術（閉経後骨粗鬆症モデル）、sham：偽手術。

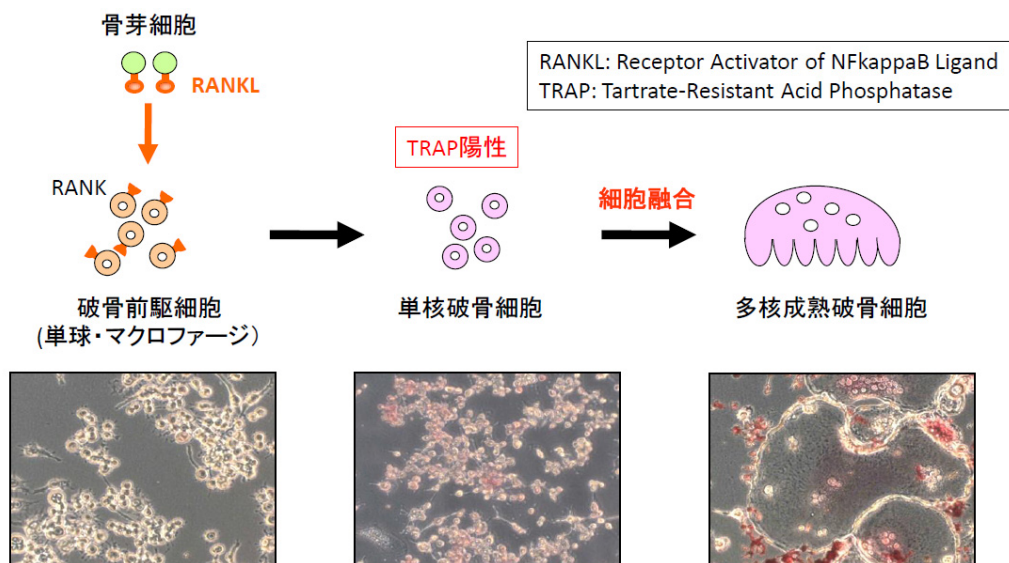


参考図 2 骨芽細胞分化過程

骨芽前駆細胞は BMP (Bone morphogenic protein) の刺激により分化が誘導される。 *In vitro* 分化誘導系においては BMP 刺激、またはアスコルビン酸および・グリセロールフォスフェート刺激による BMP2 発現誘導を伴った分化誘導が用いられる。

骨芽前駆細胞は細胞増殖を伴う成熟期を経て基質石灰化能をもつ成熟骨芽細胞へと分化する。分化過程早期には ALP (alkaline phosphatase) および Collagen Type I 遺伝子の発現、後期には osteocalcin 遺伝子の発現が誘導されることが知られている。また、これらの遺伝子の発現は転写因子 Runx2 により制御を受けている。

骨芽細胞の分化状態を可視化する手法として ALP 染色 (分化前期)、およびアリザリンレッド染色 (基質石灰化) が用いられる。

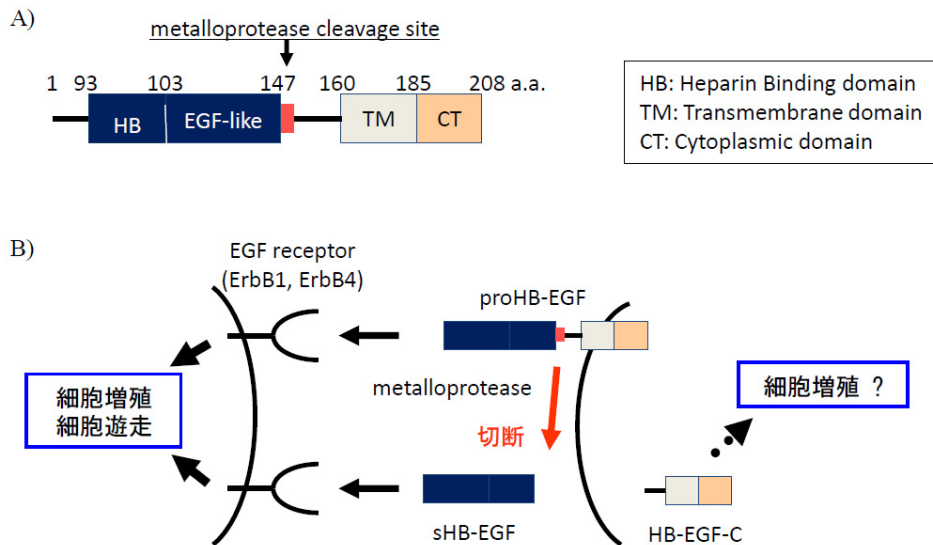


参考図3 破骨細胞分化過程

単球・マクロファージに由来する破骨前駆細胞は骨芽細胞により提示される分化誘導因子 RANKL の刺激により分化を開始する。

RANKL 刺激により酒石酸耐性酸性フォスファターゼ陽性単核破骨細胞へと分化した後、細胞融合を繰り返し、骨吸収能を持つ多核成熟破骨細胞へと分化する。

(写真は各分化段階における細胞を TRAP 染色したもの。赤：TRAP 陽性細胞)



参考図4 HB-EGF の構造とシグナル伝達

A) HB-EGF の構造。全長 208 アミノ酸からなる膜一回貫通型タンパク質で細胞外領域にヘパリン結合領域(HB)および EGF 様領域(EGF-like)を有する。EGF-like 領域 C 末端側(148L/149L)にてメタロプロテアーゼにより切断を受ける。

B) HB-EGF の切断と EGF レセプターを介したシグナル伝達。膜型タンパク質(proHB-EGF)として合成された HB-EGF は、細胞膜表面で ADAM ファミリーを始めとするメタロプロテアーゼによる切断を受け遊離型リガンド(sHB-EGF)および細胞質内領域(HB-EGF-C)を産生する。膜型および遊離型リガンド HB-EGF は EGF レセプターファミリーのうち ErbB1 および ErbB4 を介したシグナル経路により周囲または自身へと増殖・遊走シグナルを伝える。切断後の細胞質内領域は細胞増殖に関与するという報告がなされたが、その詳細な機能は不明である。

材料と方法

細胞培養

マウスマクロファージ由来 RAW264 細胞は MEM(ニッスイ)with L-Glutamine and NEAA (Gibco) + 10% FBS(Thermo) 培地で培養し、3 日ごとに 10%濃度で継代維持した。

マウス新生仔頭頂骨由来 MC3T3-E1 細胞は MEM α with L-Glutamine and NEAA (WAKO) + 10%FBS(Thermo) + Penicillin and Streptomycin 培地で培養し、3 日ごとに 10%濃度で継代維持した。

HB-EGF 変異マウス

HB-EGF ノックアウトマウスおよび非切断型 HB-EGF ノックインマウスは既報の通り作製された。(Iwamoto et al., 2003; Yamazaki et al., 2003)

HB-EGF ノックアウトマウスは、HB-EGF Exon1 遺伝子座部位に loxP-HB-EGF cDNA-polyA-loxP-lacZ-polyA をターゲット挿入後、トランスジェニックマウスを作製し、CAG-CRE マウスと交配することで HB-EGF ノックアウトマウスを作製した。(Iwamoto et al., 2003)

非切断型 HB-EGF ノックインマウスは、メタロプロテアーゼ認識部位 L148; P149 に変異を入れ L148S; P149T に置換した非切断型 HB-EGF cDNA を HB-EGF Exon1 遺伝子座部位にノックインすることにより作製した。(Yamazaki et al., 2003)

HB-EGF 変異マウスは C57BL/6 と 3 世代バッククロス後、mix バックグラウンドマウスとして SPF 環境下にて交配・維持した。実験には生後 6-10 週齢の雌マウスを用いた。すべての動物実験は奈良先端科学技術大学院大学および大阪大学動物実験規定等に基づき行った。

マイクロ CT 撮影および骨形態計測

野生型および HB-EGF 変異マウスより後肢大腿骨を摘出後、軟組織および微小骨を慎重に取り除き 70%エタノール/4°C で保存した。

マイクロ CT 撮影には Scan X-mate(コムスキャンテクノ)を用いた。骨サンプルを撮影回転台に微小チューブに挿入した状態でセットし、X 線透過画像を確認しながら、大腿骨遠位部が 360 度撮影枠内に収まるように位置決めを行った。CT 撮影は以下の条件下で行った;管電圧: 80kV、管電流: 100 μ A、積算レート: 2 フレーム/秒、プロジェクション(撮影枚数): 900 (0.4 度毎)。得られた画像は ConeCTexpress software を用いて輝度値を設定後、再構成した。輝度値は撮影日毎に標準物質を元に設定を行った。得られた再構成画像を元に、TRI/3D-BON image analysis software (ラトックシステムエンジ

ニアリング)を用いて3次元構築を行い、形態計測を行った。骨形態計測には成長板より0.5mm骨幹側から1.0mmの範囲を抽出し解析に用いた。解析における人為的影響を抑えるため、微小骨片の除去などの操作以外はソフトによる自動処理で行った。

骨密度および骨塩量は既知骨塩量サンプル(200-800mg/cm³)を同日に上記と同様に測定し、作製した検量線より計測した。

組織標本・骨切片作製

全身骨格標本は生後1日のマウスの皮膚・内臓を取り除き100%エタノールで3日間固定後、アセトンで脱脂を行った。後肢骨格標本は、8週齢のマウスより後肢を採取し、骨格を壊さないように筋肉などの軟組織を除去後、100%エタノールで3日間固定、アセトンで脱脂を行った。その後、全身・後肢骨格標本共に、Alcian Blue 溶液 (Alcian Blue 8GX (Sigma) 7.5mg、酢酸 10ml、100%EtOH 40ml 用時調整) に24時間浸漬した。100%EtOHで3回洗浄後、骨以外の軟組織を溶解させるため、50ml 2% KOH 溶液で1日処理し、alizarin red 溶液 (1% KOH 100ml、alizarin red S (Sigma) 2.5mg) で8時間処理した。洗浄溶液 (20% glycerol、1% KOH) で7日間洗浄処理後、長期保存のため、100% glycerol 溶液に浸漬し保存した。骨長は写真撮影後、ImageJにより解析した。

骨切片は、既報のプロトコールに従い作製した (Miao and Scutt, 2002)。生後6-10週齢雌マウスより、後肢を関節を保持したまま採取した。採取した後肢をPLP固定液(2% paraformaldehyde、0.075M lysine、0.01M Sodium periodate、pH7.4)で4℃・24時間固定した。固定後、0.01MPBSに5%、10%、15% glycerolを添加した溶液でそれぞれ12時間ずつ(4℃)洗浄しEDTA-G 溶液(14.5g EDTA、1.25g NaOH、15ml Glycerol in 100ml DDW、pH7.3、室温)で20日間脱灰を行った。脱灰後、PBSに15% sucrose+15% glycerol、20% sucrose+10% glycerol、20% sucrose+5% glycerol、20% sucrose、10% sucrose、5% sucroseを加えた溶液で12時間ずつ順に洗浄し、最後に100% PBSで洗浄した。洗浄後、後肢をパラフィン固定(70% EtOH 24時間、80% EtOH 3時間、100% EtOH 3時間、Xylene 2時間 x2回、paraffin 1時間 x3回)し、パラフィン包埋ブロックを作製した。マイクロトームにて厚さ5μmの切片を作製し、MASコート付スライドガラス(MATSUNAMI)に固定した。

組織染色・骨形態計測

作製した骨切片は、脱パラフィン処理(Xylene 10分 x3回、100% EtOH 5分 x2回、80%EtOH 5分、流水水洗 5分)後、各染色に用いた。ヘマトキシリン&エオジン(H&E)染色は、脱パラフィン処理した切片をマイヤーヘマトキシリン溶液で10分間染色後、流水で色だしを確認しながら約30分間洗浄、

その後 80% EtOH でアルコール置換し、1%エオジン溶液で 4 分間染色した。染色後、100% EtOH ですばやく 5 回洗浄し、Xylene で透徹処理後、エンテランニュー (Merck) で封入した。TRAP 染色は、脱パラ後の切片をメタノールで脱水処理した後、TRAP 染色液(後述)で 30 分間染色した。ALP 染色は脱パラ後の切片を 1%塩化マグネシウム (100mM Tris-maleate buffer、pH9.2) で 8 時間処理し賦活処理後、ALP 基質溶液(後述)で 30 分間染色を行った。染色後の骨切片は洗浄後、エンテランニュー (Merck) で封入した。

破骨細胞および骨芽細胞数の計測は、染色後の切片を顕微鏡下で写真撮影後、計測を行った。尚、骨形態計測統計処理はアメリカ骨代謝学会のガイドラインに沿って行った。(Parfitt et al., 1987)

骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン(Dpd)濃度は、マウスより尿を採取後、オステオリックス「DPD」(大日本住友製薬)を用いて測定した。尿中クレアチニン濃度は Creatinine assay kit (Cayman)を用いて測定し、Dpd 濃度の補正を行った。骨形成マーカーである血中オステオカルシン濃度は、マウスより血液を採取後、血清を分離し、mouse osteocalcin EIA kit (Biomedical Technologies)を用いて測定した。

可溶性 RANKL

可溶性 RANKL の発現ベクターは、RANKL のC 末端領域244 アミノ酸を pGEX-2TK に挿入し作製された。RANKL/ pGEX-2TKは大腸菌JM109 へ形質転換し組み換えタンパク質の発現に用いた。これらの大腸菌をSuper Broth 培地 (Bacto™ Tryptone (BD Bio) 25g、Bacto™ Yeast Extract (BD Bio) 15g、NaCl (ナカライ) 5g /1L H2O) に入れて37°Cで一晩前培養し、続いて500ml Super Broth 培地あたり前培養液を5ml 加えて37°Cで、OD600=0.6~0.8 の範囲内になるまで(約3時間) 主培養を行った。次にIPTG (Iso-propyl-β-D-thiogalactopyranoside、ナカライ)を終濃度0.25mM になるように主培養液に加えてタンパク質の発現誘導を開始し、18°Cで約12時間培養した。全培養液を遠心して集菌し、上清を捨ててから培養液1L分の菌体量あたり40mlのNET buffer(20mM Tris pH8.0 (Wako)、100mM NaCl (ナカライ)、1mM EDTA (DOJINDO))に懸濁し、ソニケーション (20 秒×4 回) を行って大腸菌を破碎した。続いて遠心を行い得た上清を得た上清約40mlあたり Glutathione Sepharose™ 4B (GE healthcare) 1mlを加えて4°Cで一晩反応させた。反応後のビーズを遠心回収し、氷冷PBS で5 回洗った。ビーズ1ml あたり1.6ml のGlutathione-NaCl buffer(100mM Tris pH8.0, 120mM NaCl, 20mM glutathione (ナカライ))を加えてタンパク質を溶出、遠心後に上清を回収した。さらにLPSを除去するためにDetoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel (PIERCE)を用いて精製した。

リコンビナント M-CSF

NIH 3T3 細胞に、M-CSF 発現ベクター-pCAhMCSF (RDB:1524、RIKEN DNA BANK) を FuGENE6 (Roche) を用いて遺伝子導入を行い、安定発現細胞株を得た。 α -MEM で 5 日間培養した後に 0.2 μ m フィルターで精製した培養上清をリコンビナント M-CSF として用いた。

初代破骨前駆細胞

初代破骨前駆細胞としてマウスより採取した骨髄マクロファージ細胞 (BMM) を用いた。BMM の採取・調整は既報の方法で行った。(Ishida et al., 2006) 6-10 週齢のマウスより後肢を採取し、27G ニードル付き注射器を用いて大腿骨および脛骨より骨髄領域をフラッシュアウトすることにより骨髄細胞を採取した。採取した骨髄細胞を溶血バッファー (0.016M NH_4Cl + Tris-HCl (pH7.65)) で溶血処理後、MEM α (WAKO) + 10% FBS + 1% M-CSF で 24 時間培養し浮遊細胞を回収した。回収した浮遊細胞を 3% M-CSF 条件下で 3 日間培養し、付着細胞を BMM として用いた。

破骨細胞分化誘導

RAW264 細胞、または BMM を 1.3×10^4 cells/cm² で培養プレートに播種し、24 時間後に可溶性 GST-RANKL (500ng/ml) で刺激し分化誘導を行った。必要に応じ、メタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001 (Calbiochem) 終濃度 25 μ M、TPA (12-*O*-Tetradecanoylphorbol 13-acetate、SIGMA) 終濃度 50ng/ml で添加した。

RANKL 刺激 96 時間後に細胞をメタノールで固定した後、TRAP 染色液 (0.025M tartrate acetate buffer stock solution : Naphtol AB-AI phosphate (12.5mg/ml) = 96 : 4 混合溶液に Fast Garnet GBC を少量添加し作製) を用いて染色し (37°C、20 分間)、顕微鏡下にて多核破骨細胞形成を観察した。(Meiyanto et al., 2001)

初代骨芽前駆細胞

初代骨芽前駆細胞は、生後2-3日のマウス新生仔頭頂骨より採取した。新生仔頭部皮膚を切開後、頭頂骨を剥離した。繊維芽細胞の混入を防ぐため、頭頂骨周辺に付着した軟組織を除去後、コラゲナーゼ (SIGMA:C-9891) 溶液 (1mg/ml in HBSS) で37°C、10分間振倒した。(頭頂骨に付着している繊維芽細胞を除くためにこの操作を行った) その後、上清を取り除き、さらにコラゲナーゼ/HBSS で30 分間振倒した。上清を回収後、遠心により細胞を回収し、初代骨芽前駆細胞として使用した。

骨芽細胞分化誘導

骨芽前駆細胞株 MC3T3-E1 および初代骨芽前駆細胞を、50%コンフルエントとなるように培養プレートに播種し、24 時間後にアスコルビン酸(Sigma、50 μ g/ml) + Glycerol 2-phosphate(Sigma、10mM)またはリコンビナント BMP2(Peprotech、300ng/ml)を添加し分化誘導を行った。

レトロウイルスを用いた遺伝子導入

レトロウイルスベクター pCX4pur および pCX4bsr はカン研究所 赤城博士より供与いただいた。HA タグを C 末側に付加した human HB-EGF 全長および各種変異体をマルチクローニングサイトに挿入し、発現ベクターを構築した。(Wang et al., 2006) HA エピトープをコードしたオリゴヌクレオチドを pBluescript-SK(+) XbaI-NotI site に組み込んだ (pBlue-HA)。ストップコドンを除き PCR 法により増幅した HB-EGF 全長 cDNA を pBlue-HA EcoRI-XbaI site に組み込んだ (pBlue-HBfull-HA)。pBlue-HBfull-HA の EcoRI-NotI site より HBfull-HA を切り出し、pCX4 ベクターの EcoRI-XbaI site に組み込みウイルス発現ベクターを作製した (pCX4-HBfull-HA)。領域欠損変異体は、pCX4-HBfull-HA より PCR を用いたブラントライゲーション法により作製した。非切断型変異体(L148S/P149T)、非リン酸化型変異体(S207A)、疑似リン酸化型変異体(S207A)は pCX4-HBfull-HA より QuickChange site-direct mutagenesis kit (stratagene)を用いて作製した。ドミナントネガティブ Ras (Ras S17N)発現ベクターは名古屋大学 貝淵博士より供与いただいた。

レトロウイルスはウイルス産生細胞 PLTE に上記発現ベクターおよび pGL、pE-Eco を FuGENE6 (Roche)を用いて導入し、2 日後に培養上清を回収することにより得た。ウイルス溶液は 8000g で 16 時間遠心し濃縮後、RAW264 細胞に添加し、ウイルス感染を行った。安定発現株は Puromycin 5 μ g/ml または Blasticidin 2 μ g/ml にてセレクションを行い得た。

ウサギ抗マウス HB-EGF 抗体

マウス HB-EGF 細胞外領域 (93-149a. a.) をコードした cDNA を pGEX3X ベクター (Applied Biosystems) に挿入し、大腸菌で GST 融合型タンパク質を発現させた後、GST ビーズを用いてタンパク質精製を行った。精製後のタンパク質 (初回 100 μ g、2 回目以降 50 μ g) をフロイントアジュバンド (Rockland、初回 complete アジュバンド、2 回目以降 incomplete アジュバンド) と混合しウサギ (オリエンタル酵母、New Zealand White Rabbit、11 週齢) の背中に皮下注射し免疫を行った。隔週で皮下注射を行い、6 ヶ月後に全採血を行い、回収した血清を抗体として用いた。

RT-PCR

細胞を PBS で洗浄後、ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて totalRNA を抽出した。抽出した totalRNA は random primer を用いて逆転写酵素 SuperScriptII (Invitrogen) で逆転写を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA は rTaq (Takara) を用いてサーマルサイクラー (Takara) により増幅し、アガロース電気泳動により発現解析を行った。

PCR に用いたプライマーは以下のとおりである。

Gene	Forward Primer 5' -3'	Reverse Primer 5' -3'
<i>HB-EGF</i>	aaataccgcaagctcgagaa	gggatagaggaccaggaagc
<i>EGF</i>	cccaggcaacgtatcaaagt	ggtcataccaggaaagcaa
<i>TGFα</i>	cagcatgtgtctgccactct	caagcagtccttcccttcag
<i>Amphiregulin</i>	tggcagtgaactctccacag	caattgcatgtcaccacctc
<i>Epiregulin</i>	cgctgctttgtctaggttc	ctcacatcgcagaccagtgt
<i>Betacellulin</i>	gcacaggtaccaccctaga	tgaacaccaccatgaccact
<i>EGFR</i>	tacagctttggtgccactg	ggccaagcctgaatcagcaa
<i>ErbB4</i>	gaaatgtccagatggcctacaggg	ctttttgatgctctttcttctgac
<i>ADAM9</i>	gtgtgtactcagttattggc	tcccagagaccagtataatt
<i>ADAM10</i>	ccatcaacttgtgccagtac	cccatttgataactctctcg
<i>ADAM12</i>	ccaatgaaaaacaccactga	cttggaataaaaccccactg
<i>ADAM17</i>	cacttttggaagtttctgg	ctctgtctctttgctgtcaac
<i>Collagen I</i>	cgaaaggtgaacctggtgat	tccagcaataacctgaggtc
<i>ALP</i>	aaccagacacaagcattcc	gcctttgagggtttttggtca
<i>Osteopontin</i>	tctgatgagaccgtcactgc	tctcctggctctctttggaa
<i>Osteocalcin</i>	cttcatgtccaagcaggag	agctgctgtgacatccatac
<i>Runx2</i>	cccagccacctttacctaca	cagctgcaacaccatcattc
<i>Osterix</i>	tgatgggacagagttagctg	gggaagggtgggtagtcatt
<i>ATF4</i>	tcgatgctctgtttcgaatg	actccgggctcatacagatg
<i>SATB2</i>	ctttgcaagagtggcattca	gcagctgtgatgttgacgtt
<i>Twist1</i>	tggacagagattcccagagg	attttgcaggccagtttgat
<i>Twist2</i>	accagtgaggaagagctgga	cgctctggagaacctggtag
<i>Cyclin D1</i>	ggcggatgagaacaagcaga	accagcctcttctccactt
<i>p27^{kip1}</i>	cactgccgggatatggaaga	agtagaactcgggcaagctg
<i>p21^{cip1}</i>	cctggtgatgtccgacctg	ccatgagcgcategcaate
<i>Gapdh</i>	atggtgaaggtcggtaacgga	actccttgaggccatgtag

リアルタイム PCR

上記と同様に得られた cDNA を PowerSyber Green master mix (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR (7300 realtime PCR system、Applied Biosystems) により発現解析を行った。得られた結果は内在性コントロールとして用いた Gapdh の発現量で補正し、発現量を定量的に解析した。

ウェスタンブロッティング

細胞抽出液は PBS 洗浄後の細胞を Lysis Buffer (50mM Tris HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1%Triton X-100) に溶解し、遠心後、上清を回収し調整した。核抽出液は NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents (PIERCE) を用いて抽出した。得られたタンパク質を SDS-PAGE により泳動分離後、PVDF メンブレンに転写し、ウェスタンブロッティング法により目的のタンパク質を検出した。ブロッキングは 5%BSA または 5% skim milk 溶液で行った。1 次抗体は以下の抗体を用いた：anti- β -actin monoclonal antibody (AC-74; Sigma)、rabbit anti-ERK、rabbit anti-pERK (以上 Promega)、anti-cyclin D1 (DCS-6; MBL)、anti-Rb (BD biosciences)、anti-phospho-Smad1/5/8 (Chemicon)、anti-Smad1、anti-HA (Y11)、anti-Lamin A/C、anti-p21 (以上 Santa Cruz)、anti-p27 (MBL)。2 次抗体には HRP-conjugated anti-mouse IgG、protein-A (GE Healthcare UK Ltd.)、anti-rat IgG (Jackson laboratory)、anti-goat IgG (Chemicon) を用いた。1 次抗体は 1/1000 希釈 (anti-HA のみ 1/200)、2 次抗体は 1/3000 希釈で用いた。

免疫染色

細胞をカバーガラス上で培養後、PBS で洗浄し、3.7%パラフォルムアルデヒド(PFA)-メタノール(MeOH)混合溶液 (PFA:MeOH=6:4) を用いて 10 分間室温で固定した。PBS 洗浄後、0.2%TritonX-100 で透過処理(室温 10 分間)を行い、5%スキムミルクでブロッキングを行った。ブロッキング後、1 次抗体 (anti-phospho-Smad1/5/8 (1/50 希釈、Chemicon)、anti-HA (1/100 希釈、Y11、Santa Cruz)、anti-Lamin A/C (1/200 希釈、Santa Cruz) を用いて一晩 4°C で反応させた。蛍光色素付加 2 次抗体 (Alexa fluor488、Alexa fluor546) を用いた標識を行い、スライドガラス上にマウント・封入後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (LSM Pascal) を用いて観察した。撮影は 100 倍油浸レンズ (破骨細胞) および 64 倍油浸レンズ (骨芽細胞) を用いて行い、冷却 CCD カメラにより撮影後、AxioVision software を用いて画像処理を行った。

アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色・アリザリンレッド染色

ALP 染色は、細胞を PBS で洗浄後、3.7%パラフォルムアルデヒドで固定(室

温 10 分間)した。その後、NBT/BCIP 溶液(Wako)を用いて基質反応を室温 20 分間行い、染色を行った。

アリザリンレッド染色は、冷 70%エタノールで細胞を固定後、アリザリンレッド溶液(40mM)で染色を行った。

細胞増殖アッセイ(WST アッセイ)

細胞増殖はWSTアッセイにより測定した。96wellプレートに細胞を2000個播種し、必要に応じHB-EGFを30ng/ml添加し、0.3%FBS条件下で3日間培養した。その後、Cell Counting kit-8 (DOJINDO)により450nmの吸光度を測定した。

ルシフェラーゼアッセイ

pGL3 ベーシックベクター(Promega)にマウス ALP プロモーター(-1838/+81)を組み込んだプラスミドは、長崎大学 小守博士より提供していただいた。(Harada et al., 1999; Terao et al., 1990)

pGL-ALP および対照コントロールとなる pRL ベクターを LipofectAMINE を用いて co-transfection した。ルシフェラーゼアッセイは Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega)を用いてルミノメーターにより発光強度を測定した。

骨髄移植

骨髄移植には recipient に C57BL/6 マウス、donor に mix background で維持されている野生型および HB-EGF ノックアウトマウスを用いた。Background の差から引き起こされる免疫応答を防ぐため、移植する骨髄細胞は胎生 14.5 日の肝臓細胞を用いた。ヘテローヘテロ交配により得られた胎児(E14.5)より肝臓を取り出し、スライドガラスのフロスト部分に挟みこすり合わせるようにしてすりつぶし、肝臓細胞を抽出した。残りの皮膚を用いて遺伝系確認を行い、野生型およびノックアウトマウス由来の骨髄細胞を得た。Recipient となる C57BL/6 マウスは γ 線照射装置を用いて、計 8.4Gy (4.2 Gy x2 回、3 時間間隔)の放射線照射を行い、骨髄細胞を破壊した。Donor より調整した骨髄細胞を PBS 中で懸濁し、放射線照射後の recipient マウス 1 匹あたり 2×10^6 個の細胞を静脈より移植した。マウスの解析は移植 6 週間後に行った。

結果

1) 破骨細胞分化過程における HB-EGF の発現プロファイル

RAW264 細胞を用いた *in vitro* 破骨細胞分化誘導系において、NFAT2 の転写標的候補遺伝子をマイクロアレイ法により網羅的に解析した結果、増殖因子 HB-EGF が候補の 1 つとして同定された。そこで、分化過程における HB-EGF の mRNA およびタンパク質の発現プロファイルを、RT-PCR 法およびウェスタンブロッティング法により調べた。その結果、RAW264 細胞を用いた分化誘導系において、HB-EGF mRNA、タンパク質ともに RANKL 刺激後 24 時間以降に経時的な発現上昇が認められた。(Fig. 1) また、マウス骨髄より採取した初代破骨前駆細胞を用いた分化誘導系においても、RANKL 刺激後、HB-EGF mRNA の経時的な発現上昇が認められた。(Fig. 1A)

mRNA の発現が経時的に上昇するのに対し、タンパク質の発現は RANKL 刺激 96 時間後において消失していることが観察された。これは、抗体の認識部位が細胞外領域であり、HB-EGF が切断を受け細胞外に遊離したため、確認できなかったと推察された。

2) HB-EGF 変異マウスにおける骨形態

HB-EGF ノックアウトマウス (KO) および非切断型 HB-EGF ノックインマウス (UC) における主な表現型は心臓肥大、心臓弁形成異常であり、骨に関する異常は報告されていない。しかし、破骨細胞分化過程において HB-EGF の発現上昇が認められたことから、HB-EGF 変異マウスにおける骨形態を詳細に調べた。

HB-EGF 変異マウスは外見上、野生型と比較して大きさや骨格に異常は認められなかった。(Fig. 2A) また、骨代謝異常を呈するマウスで観察される歯牙形成も正常であった。(Fig. 2B) さらに生後 1 日の全身骨格標本、また生後 8 週齢の後肢骨格標本を作製し、全体像の観察および大腿骨・脛骨の長さを測定したが、野生型と比べ有意な差は認められなかった。(Fig. 2C-E) 骨内部の微細な構造を観察するために、マイクロ CT を用いた 3 次元画像構築を行い、骨形態計測を行った。(Fig. 3) 得られた 3 次元画像より、野生型と比べ、HB-EGF KO および UC マウスにおいて、海綿骨および皮質骨の増加/減少は認められなかった。(Fig. 3A) 次に成長板下 0.5-1.5mm の範囲より抽出した海綿骨画像を用いて骨形態計測解析ソフトにより骨形態パラメーターの解析を行った。骨粗鬆症などの骨吸収過大表現型を示す症例においては BV/TV (海綿骨体積/骨組織体積)、BS/BV (骨表面積/海綿骨体積)、Tb.N (骨梁数)、Tb.Th (骨梁幅)、BMD (骨密度)、BMC/TV (骨塩量/骨組織体積) の値は減少し、Tb.Sp (骨梁間隔) は増加する。計測の結果、野生型マウスと

比較し、HB-EGF 変異マウスではこれらの骨形態パラメーターに有意差は認められなかった。(Fig. 3B)

次に、マウスより採取した後肢大腿骨から骨切片を作製し、H&E 染色による組織学的解析、TRAP 染色による破骨細胞、ALP 染色による骨芽細胞の観察を行った。H&E 染色による結果から、マイクロ CT により得られた結果と同様、骨梁数の増減など、多くの骨疾患で認められる異常は認められなかった。(Fig. 4A) 一方、TRAP 染色および ALP 染色により破骨細胞および骨芽細胞を観察したところ、HB-EGF 変異マウスで破骨および骨芽細胞数が野生型に比べ有意に増加していた。(Fig. 4A、B) さらに、骨吸収マーカーとして知られている尿中デオキシピリジノリン(Dpd)濃度および骨形成マーカーとして知られている血中オステオカルシン濃度を測定したところ、野生型マウスと比べ、HB-EGF KO マウスではその値が有意に上昇していた。(Fig. 4C、D)

以上の結果より、生体内において HB-EGF は骨芽細胞および破骨細胞の分化を共に負に制御する因子であることが示唆された。また、非切断型 HB-EGF ノックインマウスでも HB-EGF ノックアウトマウス同様、破骨・骨芽細胞数の増加が認められたことから、HB-EGF の切断が分化の抑制機構に重要であることが示唆された。

3) 破骨細胞における HB-EGF の機能解析

In vivo において HB-EGF が破骨細胞の分化を抑制する可能性が示唆されたことから、より詳細な解析を行うために、*in vitro* 分化培養系を用いて解析を行った。

HB-EGF が破骨細胞の分化におよぼす影響を調べるため、RAW264 細胞に HB-EGF cDNA を発現させた細胞(HB-Fu11)を樹立し、多核破骨細胞の形成を観察した。その結果、*in vivo* の解析結果から示唆された様に、HB-EGF 強制発現細胞では多核破骨細胞の形成が抑制された。(Fig. 5A) *In vivo* の解析結果より、分化抑制機能に HB-EGF の切断が関与している可能性が示唆されたことから、メタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001 を添加し、同様に多核破骨細胞の形成を観察した。その結果、分化抑制の観察された HB-Fu11 において、多核破骨細胞形成の回復が認められた。(Fig. 5A) また RAW264 細胞に GM6001 を添加した実験区においても、多核破骨細胞の形成亢進が観察された。(Fig. 5A) この時、HB-EGF の切断をウェスタンブロッティング法により調べたところ、HB-EGF 強制発現細胞で認められる HB-EGF-C(7kDa 付近)が GM6001 処理により消失していることが確認された。(Fig. 5D) 次に、HB-EGF 変異マウスより採取した初代破骨前駆細胞を用いて分化誘導を行ったところ、HB-EGF ノックアウトマウス(KO)および非切断型 HB-EGF ノックインマウス(UC)いずれにおいても野生型(WT)に比べ多核破骨細胞への分化効率が増加していた。(Fig. 5B) また、GM6001 を添加した実験区において、WT では

多核破骨細胞形成が亢進し、KOおよびUCではその効果は認められなかった。このことから、GM6001による多核破骨細胞形成亢進はHB-EGFの切断阻害によるものであることが示唆された。さらに、細胞融合度合いを確認するため、野生型(WT)およびHB-EGFノックアウトマウス(KO)由来初代破骨細胞より分化誘導を行った多核破骨細胞の核数を計測したところ、WTに比べ、KOでは核数の多い、融合度の亢進した多核破骨細胞が形成されることが明らかとなった。(Fig. 5C) 破骨細胞分化過程においてHB-EGFの切断に関与することが報告されているメタロプロテアーゼADAM9、10、12、17の発現をRT-PCR法により調べたところ、いずれのADAMも恒常的な発現が認められた。(Fig. 6) このことから、HB-EGFは破骨細胞において、切断を受ける可能性が示唆された。

以上の結果より、破骨細胞においてHB-EGFは分化抑制因子として機能し、細胞融合を制御している可能性が示唆された。また、HB-EGFによる抑制機能にはメタロプロテアーゼによる切断が重要であることが示唆された。

HB-EGFの切断が破骨細胞分化抑制機能に重要であることから、切断により産生される遊離型HB-EGF(sHB-EGF)および細胞質内領域(HB-EGF-C)のいずれが分化抑制に機能しているかを調べた。

切断後のHB-EGFの機能としては、sHB-EGFがEGFレセプター(EGFR)を介したシグナルにより隣接する細胞などの細胞増殖・遊走に関与することがよく知られている。そこで、破骨細胞分化過程におけるEGFRおよびErbB4の発現をRT-PCR法により確認した。その結果、*ErbB1*の恒常的な発現およびRANKL刺激72時間後における*ErbB4*の一過的な発現誘導が認められた。(Fig. 7A) 破骨細胞におけるHB-EGF-EGFRシグナル伝達をERKのリン酸化を指標に、培地中にリコンビナントsHB-EGFを添加することで確認した。その結果、sHB-EGFを添加した実験区においてERKのリン酸化が確認された。(Fig. 7B) このことから、sHB-EGFは破骨細胞にEGFRを介したシグナルを伝達することが確認された。そこで、sHB-EGFが破骨細胞の分化に与える影響を調べるために、リコンビナントsHB-EGFを分化誘導培地中に添加し、破骨細胞分化誘導を行った。その結果、sHB-EGF添加実験区においても多核破骨細胞形成は正常に進行し、多核破骨細胞数はコントロールと比べ有意な差は認められなかった。(Fig. 7C)

次に、HB-EGF全長(Full)、非切断型変異体(Full-UC、L148S/P149T)、細胞質内領域欠損変異体(Δ C)、HBおよびEGF-like領域欠損変異体(C)を強制発現させたRAW264細胞を樹立し、破骨細胞分化誘導を行った。その結果、Full-UCおよび Δ C強制発現細胞では多核破骨細胞の形成が認められたのに対し、FullおよびC強制発現細胞では多核破骨細胞形成は顕著に抑制され

た。(Fig. 8A-C) このことから、切断後の細胞質内領域(HB-EGF-C)が破骨細胞の分化抑制に重要であることが示唆された。同様の結果は野生型マウスおよびHB-EGF KOマウス由来初代破骨細胞を用いたHB-EGF変異体強制発現細胞でも観察された。(Fig. 9A、B)

HB-EGF-Cは約20アミノ酸からなる短い領域で、その詳細な機能は不明である。近年、HB-EGF-CのS207がHB-EGF-C領域の中で唯一リン酸化を受けることが報告された。(Wang et al., 2006) そこでFullおよびC非リン酸化型変異体(C S207A、Full S207A)、疑似リン酸化変異体(Full S207D)およびC末端側欠損変異体(Δ 203:204-208欠損、 Δ 197:198-208欠損)強制発現細胞を樹立し、多核破骨細胞に与える影響を調べた。その結果、非リン酸化変異体強制発現細胞およびC末端側欠損変異体では分化抑制が回復した。(Fig. 8A-C) 一方、疑似リン酸化変異体では分化が抑制された。(Fig. 8A、C) 非リン酸化変異体による分化抑制の回復は野生型およびHB-EGF KOマウス由来初代破骨細胞においても観察された。(Fig. 9)

以上の結果より、破骨細胞において、切断を受けた後産生される細胞質内領域HB-EGF-Cが分化抑制因子として機能することが示唆された。また、その抑制機能にはS207のリン酸化が重要であることが示唆された。

HB-EGF-Cの機能は不明な点が多いが、細胞周期抑制因子と結合し、その抑制機能を解除することにより細胞周期を亢進する機能を持つことが報告されている。(Nanba et al., 2003; Toki et al., 2005) また、HB-EGF-Cは切断後、核内膜に移行することが報告された。(Kinugasa et al., 2007) そこで、破骨細胞におけるHB-EGF-Cの局在を免疫染色法により調べた。その結果、メタロプロテアーゼ阻害剤GM6001添加HB-fullおよびHB-C S207A細胞ではHB-EGF-Cは細胞膜に局在が観察された。一方、切断誘導剤TPA処理HB-FullおよびC強制発現細胞ではHB-EGFは核近傍に局在が観察された。(Fig. 10) 抗Lamin A/C抗体を用いて核膜を染色しHB-EGF-Cの局在を共染色により確認したところ、破骨細胞においてHB-EGF-Cは核近傍に局在するが、核膜には局在していないことが示唆された。

以上の結果より、破骨細胞において、切断後のHB-EGF-CはS207のリン酸化を受け、細胞膜から核近傍へと局在を変化させることにより破骨細胞の分化を抑制している可能性が示唆された。

4) 骨芽細胞におけるHB-EGFの機能解析

EGFファミリーに属する増殖因子が骨芽細胞の分化を抑制する、という報告はなされているが、HB-EGFについては報告がない。破骨細胞とともに *in vivo* においてHB-EGFが骨芽細胞の分化も抑制する可能性が示唆されたこと

から、より詳細な解析を行うために、*in vitro* 分化培養系を用いて解析を行った。

破骨細胞分化に切断後の遊離型 HB-EGF (sHB-EGF) が影響を与えないことから、隣接する骨芽細胞に影響を与える可能性を考え、sHB-EGF が骨芽細胞の分化に与える影響を解析した。

マウス新生仔頭頂骨由来骨芽前駆細胞株 MC3T3-E1 細胞および初代骨芽前駆細胞を用いた骨芽細胞分化誘導系において、リコンビナント sHB-EGF を添加し分化誘導を行い、ALP 染色およびアリザリンレッド染色により骨芽細胞の分化および基質石灰化能を調べた。その結果、HB-EGF の存在下では ALP およびアリザリンレッドによる染色は顕著に抑制され、分化が抑制されていることが示唆された。(Fig. 11A、B) 3 日ごとに培地交換およびリコンビナント HB-EGF を添加し長期培養を行った分化誘導系においても、ALP 活性は sHB-EGF により抑制された。(Fig. 11C) sHB-EGF による分化抑制が可逆的なものであるか調べるために、3 日間毎に sHB-EGF の添加/非添加を組み合わせた実験区で分化誘導を行い、分化誘導 6 日後に ALP 染色により分化を観察した。その結果、分化誘導と同時に sHB-EGF を添加し、3 日後に非添加培地とした実験区では ALP の活性が回復していた。(Fig. 11D) 一方で、分化誘導後 3 日後に sHB-EGF を添加した実験区では、コントロールに比べ、ALP の活性は減弱していた。このことから、sHB-EGF による分化抑制は骨芽細胞の未分化状態を維持するものであることが示唆された。

さらに、分化状態を遺伝子発現レベルで確認するため、RT-PCR 法により骨芽細胞分化マーカーとして知られているコラーゲン I (*Col1*)、*alp*、オステオポンチン (*opn*)、オステオカルシン (*ocn*) mRNA の発現を調べたところ、HB-EGF 存在下では *alp* および *ocn* の発現が減少していた。(Fig. 12A-C)

以上の結果より、骨芽細胞において、sHB-EGF は分化抑制因子として機能することが示唆された。また、sHB-EGF による分化抑制は可逆的であることが示唆された。

骨芽細胞分化過程における EGF レセプターの発現を RT-PCR により確認したところ、*EGFR* および *ErbB4* の発現が認められた。(Fig. 13A) 骨芽細胞における HB-EGF-EGFR シグナル伝達を ERK のリン酸化を指標に、培地中にリコンビナント sHB-EGF を添加し確認した。その結果、sHB-EGF を添加した実験区では ERK のリン酸化が確認され、このリン酸化は HB-EGF 中和抗体 (R&D systems)、MEK 阻害剤 PD98059 および EGFR 阻害剤 AG1478 の添加により抑制された。(Fig. 13B) また、分化誘導系において sHB-EGF とともに AG1478 または HB-EGF 中和抗体を添加した実験区において、ALP 活性の回復が観察された。(Fig. 13C) アスコルビン酸による骨芽細胞分化誘導は、アスコルビン酸刺激により骨芽細胞内在性 BMP の発現を誘導し、自己分泌的に BMP

シグナルが伝わることにより骨芽細胞への分化が誘導される。HB-EGF による分化抑制が内在性 BMP の発現誘導を抑制する結果ではなく BMP レセプター下流シグナル伝達に関与するかを調べるため、BMP2 を用いた骨芽細胞分化誘導系において、ALP 染色により HB-EGF の影響を調べた。その結果、HB-EGF の添加により骨芽細胞の分化は抑制された。(Fig. 13D)

以上の結果より HB-EGF は EGFR 下流シグナルを介し、BMP レセプター下流シグナルを抑制することにより骨芽細胞の分化を抑制していることが示唆された。

EGFR 下流で Ras が機能することが知られている。そこで、MC3T3-E1 細胞にドミナントネガティブ Ras 変異体 (DN-Ras) を強制発現させた細胞を樹立し、HB-EGF による分化抑制との関与を分化誘導後、ALP 染色により調べた。その結果、DN-Ras 強制発現細胞では sHB-EGF による分化抑制は認められなかった。(Fig. 13E) この結果より、EGFR-Ras シグナルを介して HB-EGF は骨芽細胞の分化を抑制していることが示唆された。

骨芽細胞分化マーカー遺伝子である ALP およびオステオカルシン (Ocn) は転写因子 Runx2 により発現誘導を受けることが知られている。そこで、ALP 遺伝子のプロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイにより sHB-EGF の Runx2 転写活性への関与を調べた。その結果、HB-EGF の添加により、sHB-EGF 添加実験区において Runx2 の転写活性が抑制されていた。(Fig. 14A) Runx2 の転写活性は、Runx2 の発現量、または転写調節因子により制御を受ける。そこで Runx2 および Runx2 転写調節因子 mRNA の発現を RT-PCR 法により調べた。その結果、Runx2 の発現量は sHB-EGF の添加により変動しなかった。(Fig. 14B) また、転写促進因子 ATF4、SATB2、転写抑制因子 Twist1 の発現にも変動は認められなかった。一方、転写抑制因子 Twist2 の発現が sHB-EGF 添加により分化誘導 1 日後に誘導された。(Fig. 14B) さらに、Twist2 の発現誘導に関与する EGFR 下流シグナルを同定するために、MAPK 阻害剤 PD98059 および PI3K 阻害剤 LY294002 を培地中に添加し、Twist2 の発現を調べた。その結果、LY294002 添加により Twist2 の発現誘導は顕著に抑制され、また、PD98059 によっても抑制されることが明らかとなった。(Fig. 14C)

以上の結果より、骨芽細胞において sHB-EGF は PI3K または MAPK シグナル経路により Twist2 の発現を誘導し、Runx2 の転写活性を抑制することにより骨芽細胞の分化を抑制していることが示唆された。

転写因子 Smad1 は BMP シグナルによりリン酸化を受け (pSmad) 核内に移行し、Runx2 と結合することで Runx2 の転写活性を正に制御する。一方で、EGF

ファミリーメンバーの1つであるEGFは、EGFR-ERKシグナル経路によりSmadのリンカー部位をリン酸化し、BMPシグナルによるSmadの核内移行を抑制することが報告されている。そこで、骨芽細胞においてsHB-EGFがSmadの局在に影響を与えるか免疫染色法および核抽出液を用いたウェスタンブロッティング法により調べた。分化誘導6時間後にpSmadの局在を免疫染色法により観察した結果、pSmadは分化誘導により核に集積が確認されたが、sHB-EGFの添加により核への集積は抑制された。また、MEK阻害剤PD98059の添加により核への集積は回復した。(Fig. 15A) 核抽出液を用いたウェスタンブロッティング法による局在解析でも同様の結果が認められた。(Fig. 15B) MEK阻害剤PD98059添加によりSmadの核移行が回復することから、PD98059がsHB-EGFによる骨芽細胞分化抑制に与える影響をALP染色により調べた。その結果、sHB-EGFを添加した実験区において、PD98059を添加しても分化の回復は認められなかった。(Fig. 15C)

以上の結果より、骨芽細胞において、sHB-EGFによりRunx2の転写活性が抑制されており、その抑制には転写抑制因子Twist2の発現誘導とSmadの核内移行阻害が同時に関与していることが示唆された。また、この分化抑制機構にはMAPK以外の経路も関与していることが示唆された。

EGFファミリーは骨芽前駆細胞の増殖を促進することが報告されている。そこで、sHB-EGFが骨芽細胞の細胞増殖に与える影響を調べた。WSTアッセイによりsHB-EGFの影響を調べたところ、分化誘導の有無にかかわらず、sHB-EGFの添加により細胞増殖は亢進した。(Fig. 16A) 次に、sHB-EGFが骨芽細胞分化過程において細胞周期関連因子のmRNAおよびタンパク質発現プロファイルに与える影響をRT-PCRおよびウェスタンブロッティング法により確認した。その結果、mRNAレベルではCyclinD1、p27、p21の発現量に差は認められなかった。(Fig. 16B) 一方、タンパク質レベルではsHB-EGF添加によりCyclinD1およびp21の発現量増加、またp27の発現量低下が認められた。(Fig. 16B) p27は骨芽細胞分化過程において増殖から分化への移行に重要な役割を果たしていることが報告されている。(Drissi et al., 1999) そこでMC3T3-E1細胞にp27を強制発現させた細胞を樹立し、sHB-EGFによる分化抑制が回復されるか確認した。細胞増殖アッセイよりp27強制発現細胞ではmock細胞に比べ細胞増殖能が低下していた。(Fig. 16C) p27強制発現細胞にsHB-EGFを添加し分化誘導を行い、ALP染色により骨芽細胞への分化を確認した。その結果、p27強制発現細胞でも、sHB-EGFによる分化抑制は回復されなかった。(Fig. 16D)

以上の結果より、sHB-EGFはEGFなどと同様、骨芽前駆細胞の増殖を亢進することが明らかとなった。また、細胞増殖能をp27強制発現により抑制した際に、sHB-EGFによる分化抑制が解除されなかったことから、細胞増殖の

亢進と分化抑制の相関関係は明らかとならなかった。

5) 骨芽細胞分化に対する破骨細胞由来の HB-EGF が与える影響

これまでの研究結果より、HB-EGF は破骨・骨芽細胞の分化を共に抑制し、その抑制には破骨細胞では HB-EGF-C、骨芽細胞では sHB-EGF が機能していることが明らかとなった。

そこで、骨芽細胞の分化抑制に必要な sHB-EGF が何により分泌されるかを検討するため、骨芽細胞分化過程における EGF ファミリーの mRNA 発現プロファイルを RT-PCR により確認した。その結果、MC3T3-E1 細胞において、HB-EGF および Epregrin(Epr) の発現が、分化誘導 1 日後に一過的に誘導されることが明らかとなった。(Fig. 17A) 骨芽細胞において HB-EGF の発現が認められることから、骨芽細胞間において sHB-EGF の自己分泌因子として機能し、その結果、分化が抑制される可能性を検討した。sHB-EGF の遊離を抑制するため、メタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001 を培地中に添加し pre-incubation することにより、内在性 HB-EGF による sHB-EGF の産生を抑制した (preGM6001)。その後、分化誘導と同時に再び GM6001 を添加する実験区 (postGM6001)、リコンビナント HB-EGF を添加する実験区を用いて、内在性 HB-EGF が分化抑制に関与する可能性を検討した。その結果、コントロール実験区と比較し preGM6001 および postGM6001 の添加による ALP 活性への影響は認められなかった。

以上の結果より、骨芽細胞の分化を抑制する sHB-EGF は骨芽細胞自身ではなく、周辺細胞より提供される可能性が強く示唆された。

次に、破骨細胞において sHB-EGF は分化に影響を与えないことから、破骨細胞で発現し、切断後遊離する sHB-EGF が骨芽細胞の分化を抑制する可能性を検討した。

破骨細胞の産生する sHB-EGF が骨芽細胞の分化を抑制する機能を有するか検討するために、野生型および HB-EGF KO マウス由来初代破骨細胞を用いて破骨細胞分化誘導を行い、分化誘導刺激 4 日後に培養上清を回収した。この培養上清中には野生型マウス由来のものでは sHB-EGF が含まれており、KO マウス由来のものでは sHB-EGF が含まれていないものと考えられる。この培養上清を骨芽細胞分化培地に添加し、骨芽細胞の分化に与える影響を確認した。その結果、野生型由来培養上清を添加した骨芽細胞では濃度依存的に ALP 活性の低下が認められた。一方、HB-EGF ノックアウトマウス由来培養上清を添加した骨芽細胞では ALP 活性の抑制は認められなかった。(Fig. 19A)

以上の結果より、破骨細胞に由来する sHB-EGF が骨芽細胞分化抑制能を有することが示唆された。

次に、*in vivo*において検証するために、骨髄移植による疑似コンディショナルノックアウトマウスを作製した。破骨細胞は骨髄細胞に由来する単球・マクロファージより分化することから、放射線照射により骨髄細胞を破壊した recipient マウスに、donor マウス由来の骨髄細胞を移植することにより、破骨細胞において donor マウスと同遺伝系統のコンディショナルノックアウトマウスを作製することが可能である。放射線照射を行った野生型 C57BL/6 マウスに donor である野生型 (TWT) または HB-EGF KO マウス (TKO) 由来骨髄細胞を移植し、6 週間後に骨形態計測を行った。その結果、外見上および形態学的解析から有意差は認められなかった。(Fig. 19B) 一方、骨切片を作製し、破骨・骨芽細胞数を計測したところ、TKO マウスにおいて、破骨・骨芽細胞数の有意な増加が認められた。また、骨吸収マーカー(尿中 Dpd) および骨形成マーカー(血中オステオカルシン)を測定したところ、TKO マウスでは TWT に比べ有意に上昇していた。

以上の結果より、破骨細胞に由来する sHB-EGF が骨芽細胞分化抑制因子として機能することが強く示唆された。

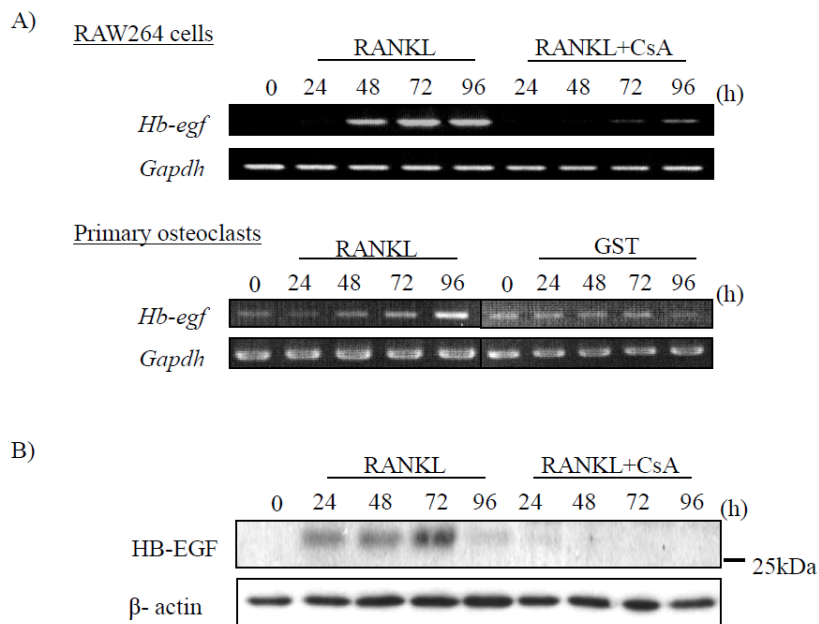


Figure. 1 破骨細胞分化過程における HB-EGF 発現プロファイル

A) HB-EGF mRNA の発現プロファイル。RAW264 細胞(上段)およびマウス初代破骨前駆細胞(下段)を用いた *in vitro* 破骨細胞分化培養系において、RANKL 刺激後 24 時間ごとに mRNA を回収し、RT-PCR 法により *Hb-Egf* mRNA の発現を解析した。CsA: NFAT 阻害剤。*Gapdh*: 内在性コントロール。

B) HB-EGF タンパク質発現プロファイル。A)と同様、RAW264 細胞を用いた分化培養系において、RANKL 刺激後 24 時間ごとにタンパク質を回収し、ウェスタンブロッティング法により HB-EGF タンパク質の発現を解析した。

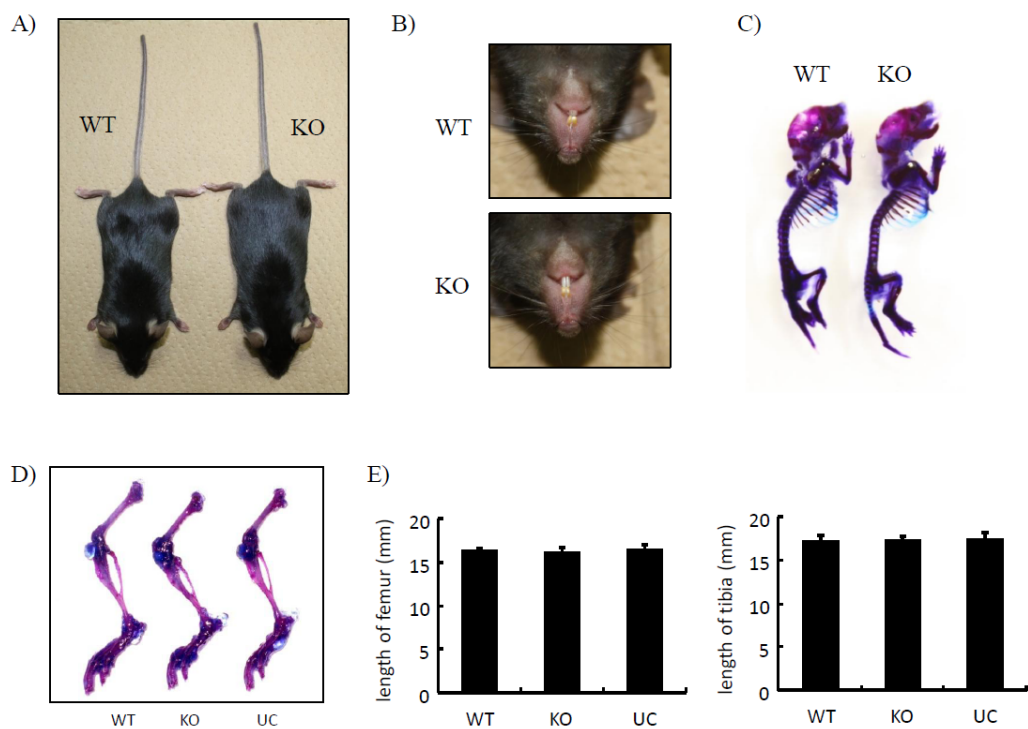


Figure. 2 HB-EGF 変異マウスの体型および骨格における表現型

- A) 野生型 (WT、左) および HB-EGF ノックアウトマウス (KO、右) の全身像 (8 週齢)。
- B) 野生型 (WT、上段) および HB-EGF ノックアウトマウス (KO、下段) における歯牙形成 (8 週齢)。
- C) 野生型 (WT、左) および HB-EGF ノックアウトマウス (KO、右) 新生仔の全身骨格標本 (生後 2 日)。 Red : Alizarin Red、石灰化骨 ; Blue : Alcian Blue、軟骨。
- D) 野生型 (WT、左)、HB-EGF ノックアウトマウス (KO、中央) および非切断型 HB-EGF ノックインマウス (UC、右) 後肢の骨格標本 (8 週齢)。 Red : Alizarin Red、石灰化骨 ; Blue : Alcian Blue、軟骨。
- E) 野生型 (WT)、HB-EGF ノックアウトマウス (KO) および非切断型 HB-EGF ノックインマウス (UC) 後肢における大腿骨 (左) および脛骨 (右) の長さ。 D) と同様、写真撮影後、大腿骨および脛骨の長さを測定した。 (n=5)。

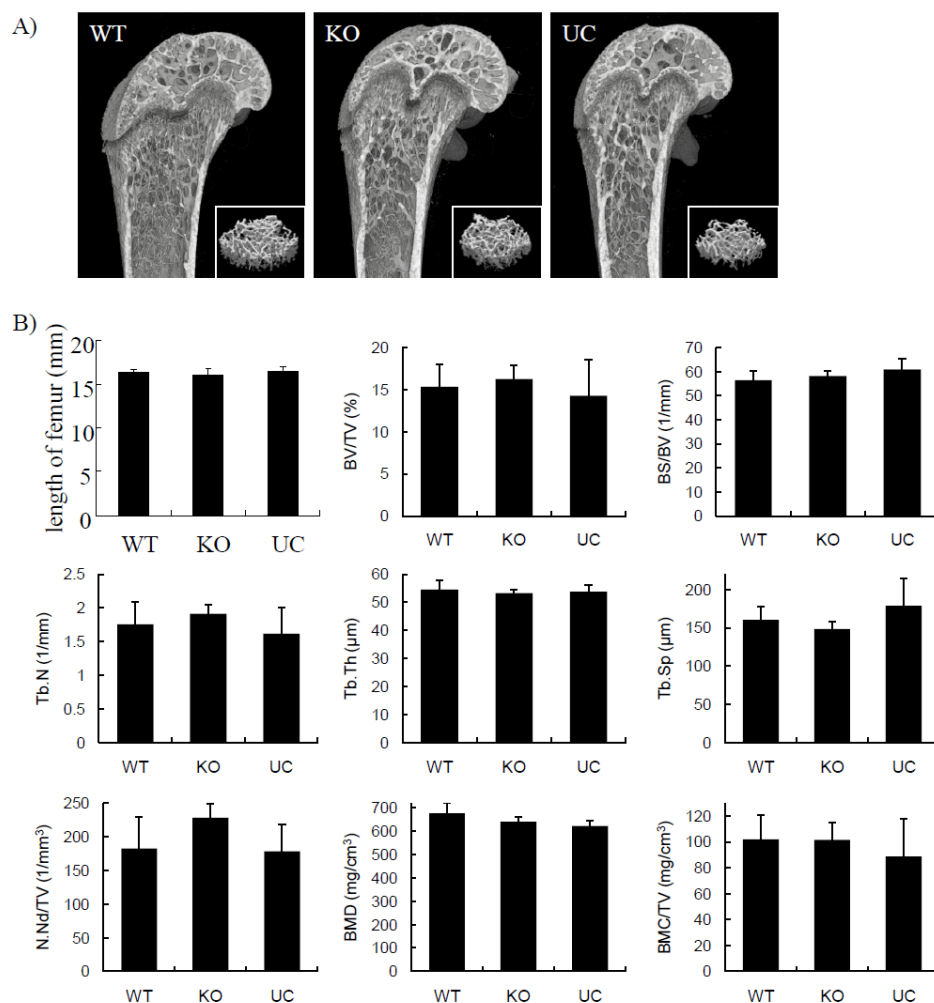


Figure. 3 3D マイクロ CT を用いた HB-EGF 変異マウスにおける骨形態計測

A) 野生型 (WT)、HB-EGF ノックアウトマウス (KO) および非切断型 HB-EGF ノックインマウス (UC) 後肢大腿骨遠位部における 3D マイクロ CT 画像。マウス後肢大腿骨を摘出後、マイクロ CT 撮影を行い、画像処理により 3 次元構築を行った。枠内：海綿骨の抽出 3D 画像。

B) 骨形態計測パラメーター。A) で得られた画像を用いて骨形態計測を行った。BV/TV: 海綿骨体積/骨組織体積; BS/BV: 骨表面積/海綿骨体積; Tb. N: 骨梁数; Tb. Th: 骨梁幅; Tb. Sp: 骨梁間隔; N. Nd/TV: 骨梁結合点数/骨組織体積; BMD: 骨密度; BMC/TV: 骨塩量/骨組織体積。

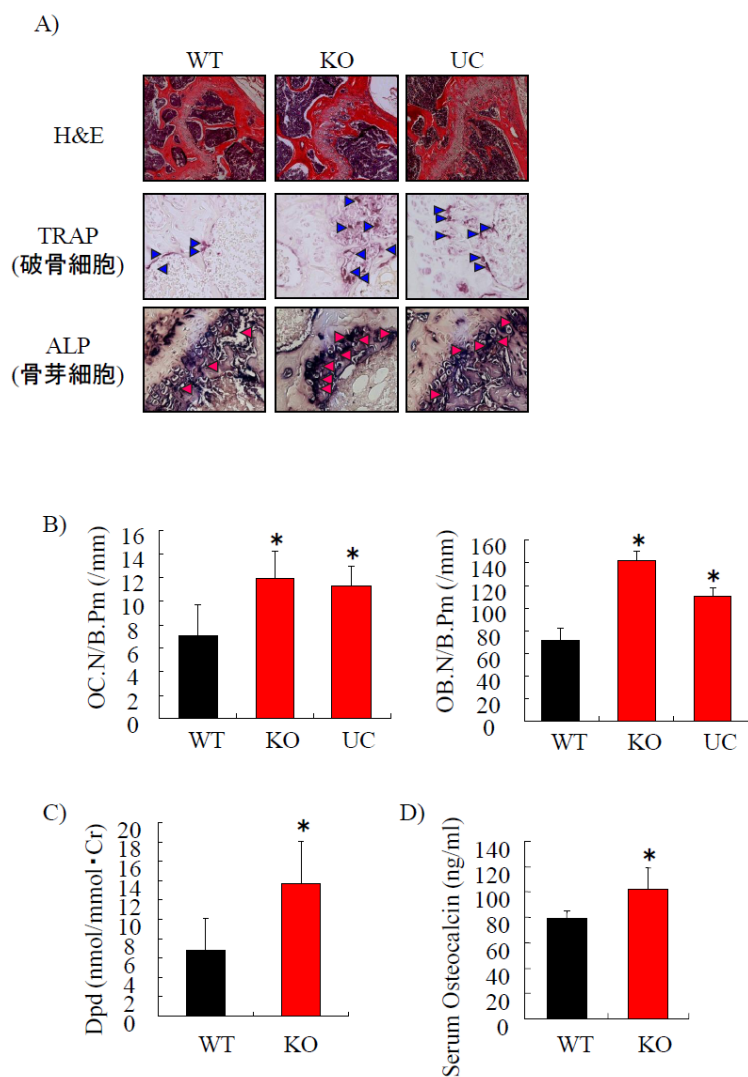


Figure. 4 HB-EGF 変異マウスにおける組織学的骨形態計測

A) 野生型 (WT)、HB-EGF ノックアウトマウス (KO) および非切断型 HB-EGF ノックインマウス (UC) 後肢大腿骨切片染色画像。後肢大腿骨切片を作成後、それぞれ H&E 染色 (上段、組織学的解析)、TRAP 染色 (中段、破骨細胞、青矢頭)、ALP 染色 (下段、骨芽細胞、赤矢頭) を行った。

B) 野生型 (WT)、HB-EGF ノックアウトマウス (KO) および非切断型 HB-EGF ノックインマウス (UC) における破骨細胞、骨芽細胞数。A) で得られた切片画像を用いて破骨細胞および骨芽細胞の数を計測した。OC.N/B.Pm: 骨梁長に対する破骨細胞の数; OB.N/B.Pm: 骨梁長に対する骨芽細胞の数。

C) 野生型 (WT) および HB-EGF ノックアウトマウス (KO) における骨吸収マーカーの測定。マウスより尿を採取し、尿中デオキシピリジノリン濃度 (Dpd、骨吸収マーカー) を測定した。

D) 野生型 (WT) および HB-EGF ノックアウトマウス (KO) における骨形成マーカーの測

定。マウスより採血後、血清を単離し、血中オステオカルシン濃度(骨形成マーカー)を測定した。

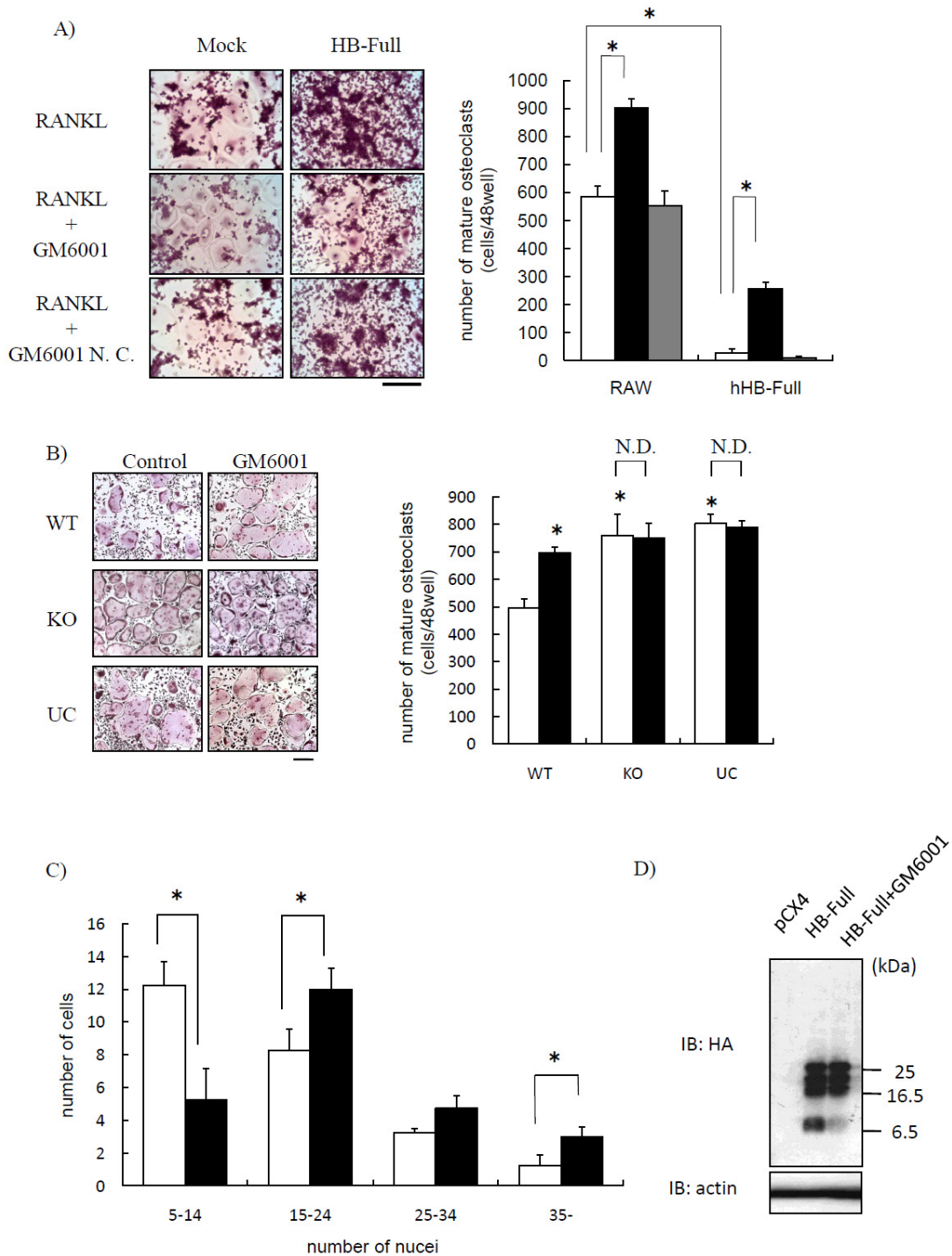


Figure. 5 *in vitro*破骨細胞分化誘導系における HB-EGF の機能

A) HB-EGF 強制発現細胞における多核破骨細胞形成。HB-EGF 全長強制発現細胞 (HB-Full) を樹立し、多核破骨細胞形成を観察した(写真上段)。また、メタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001(写真中段)および GM6001 negative control(N.C、写真下段)を培地中に添加し、同様に多核破骨細胞形成を観察した。得られた画像より多核破骨細胞

数を計測し、統計処理を行った(右グラフ)。Bar:200 μ m。白棒：コントロール；黒棒：GM6001；灰棒：GM6001N. C.。 *；p<0.01。

B) 野生型(WT)、HB-EGF ノックアウトマウス(KO)および非切断型 HB-EGF ノックインマウス(UC)由来初代破骨細胞における多核破骨細胞形成。野生型および HB-EGF 変異マウスより調整した初代破骨細胞を用いて破骨細胞分化誘導を行い、多核破骨細胞形成を観察した(写真左段)。また、メタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001(写真右段)を培地中に添加し、同様に多核破骨細胞形成を観察した。得られた画像より多核破骨細胞数を計測し、統計処理を行った(右グラフ)。Bar:200 μ m。白棒：コントロール；黒棒：GM6001。*；p<0.001。

C) 野生型(WT)、HB-EGF ノックアウトマウス(KO)由来多核破骨細胞における核数。野生型および HB-EGF ノックアウトマウスより調整した初代破骨細胞を用いて破骨細胞分化誘導を行い、多核化した破骨細胞の核を Hoechst で染色後、核数を計測し統計処理を行った。白棒：WT；黒棒：KO。

D) HB-EGF 強制発現細胞における HB-EGF の切断。Mock 細胞(pCx4)、HB-EGF 強制発現細胞(HB-Full)およびHB-EGF 強制発現細胞をメタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001 で処理した細胞よりタンパク質を抽出しウェスタンブロッティング法により抗 HA 抗体を用いて HB-EGF タンパク質を検出した。 β -actin：内在性コントロール。

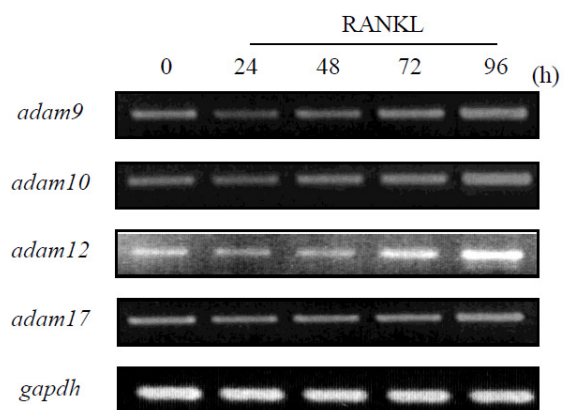


Figure. 6 破骨細胞分化過程におけるメタロプロテアーゼの発現プロファイル

Fig.1 と同様、RAW264 細胞を用いた *in vitro* 破骨細胞分化培養系において、RANKL 刺激後 24 時間ごとに mRNA を回収し、RT-PCR 法により *Adam9*, *10*, *12*, *17* mRNA の発現を解析した。*Gapdh* : 内在性コントロール。

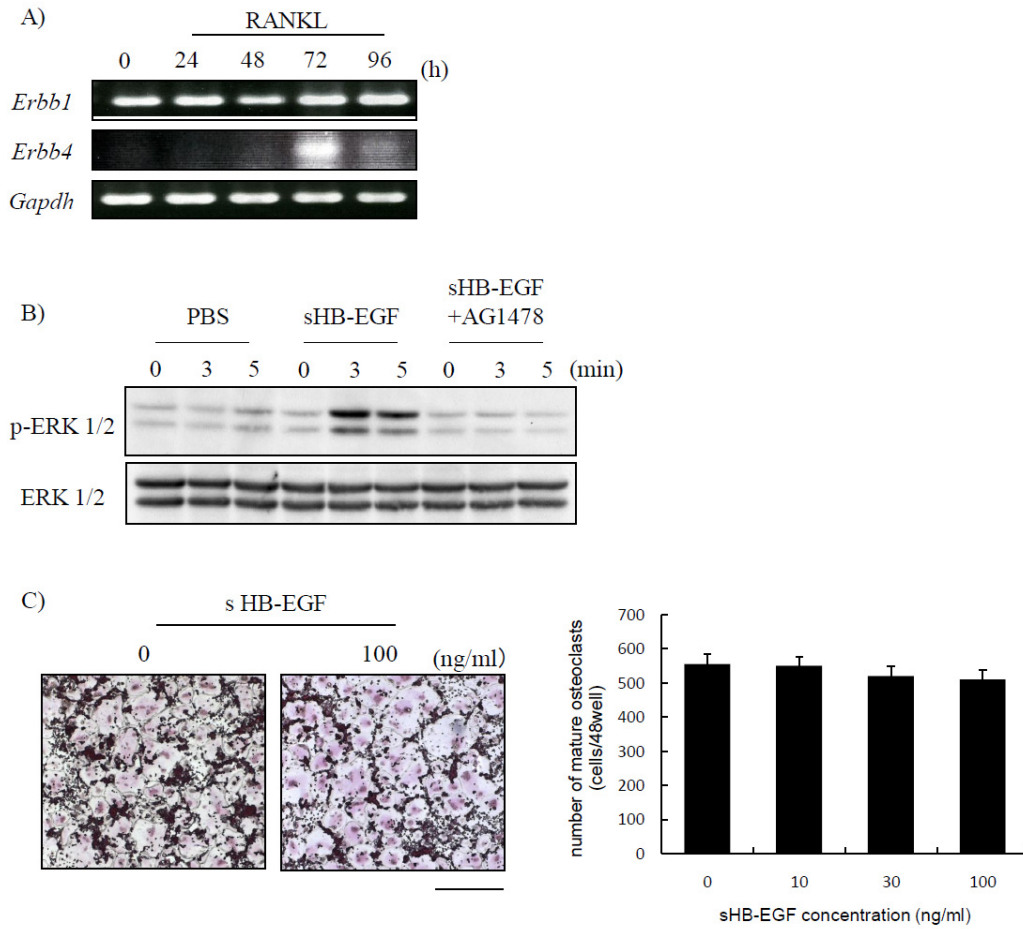


Figure. 7 sHB-EGF が破骨細胞分化に及ぼす影響

A) 破骨細胞分化過程における EGFR(ErbB1)および ErbB4 の発現プロファイル。RAW264 細胞を用いた *in vitro* 破骨細胞分化培養系において、RANKL 刺激後 24 時間ごとに mRNA を回収し、RT-PCR 法により *ErbB1* および *ErbB4* mRNA の発現を解析した。*Gapdh* : 内在性コントロール。

B) 破骨細胞における HB-EGF-EGFR シグナル伝達。破骨細胞における HB-EGF シグナル伝達を ERK のリン酸化を指標にウェスタンブロッティング法により調べた。RAW264 細胞にリコンビナント HB-EGF を添加し、表記時間後にタンパク質を回収し解析を行った。AG1478 : EGFR 阻害剤。

C) sHB-EGF が多核破骨細胞形成に与える影響。RAW264 細胞を用いた *in vitro* 破骨細胞分化培養系において、リコンビナント sHB-EGF を添加し破骨細胞分化誘導を行い、多核破骨細胞の形成を観察した。また、得られた画像より多核破骨細胞数を計測し、統計処理を行った(右グラフ)。Bar:200 μ m。

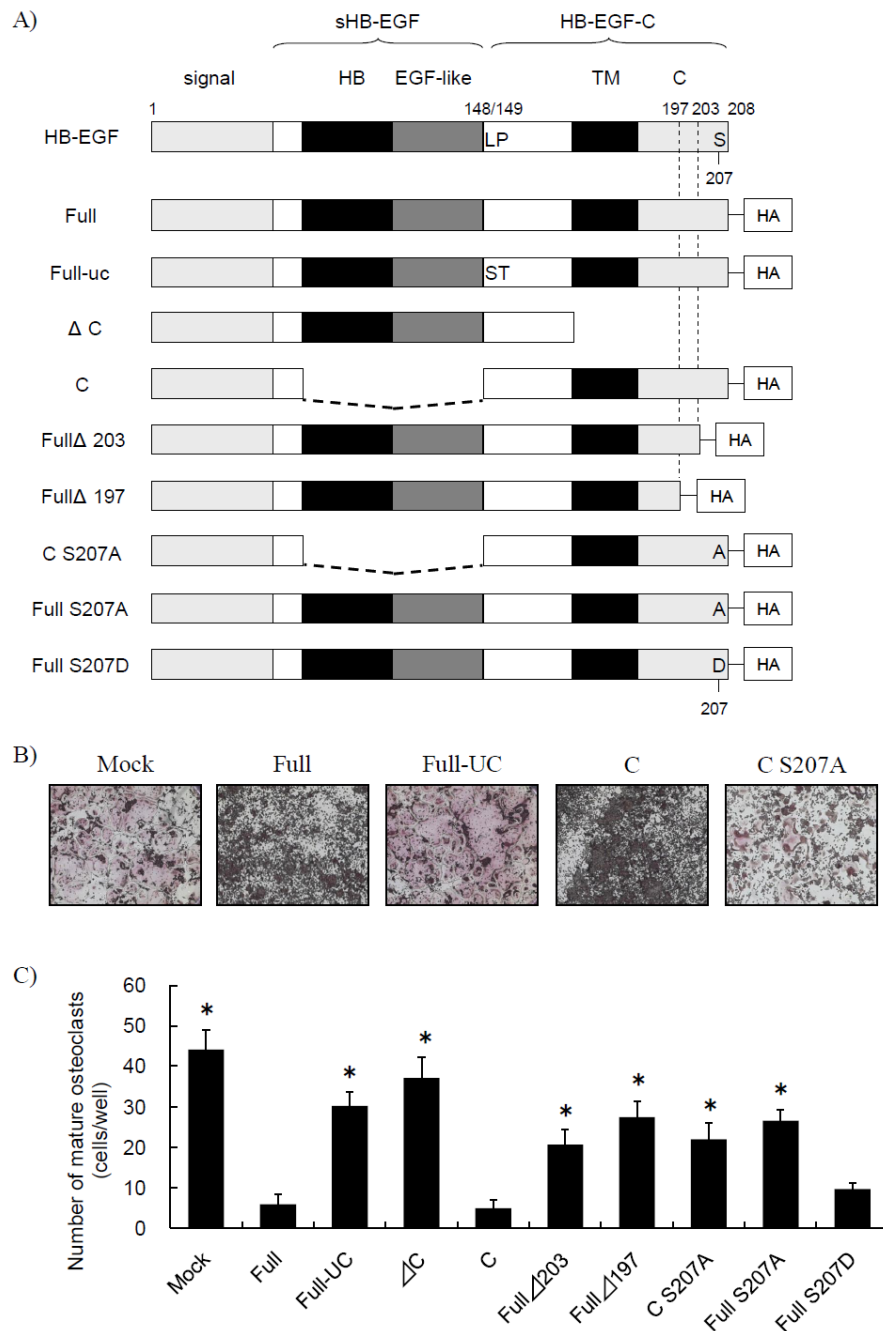


Figure. 8 HB-EGF 各種変異体強制発現細胞を用いた多核破骨細胞形成

A) HB-EGF 各種変異体のコンストラクト模式図：Full：HB-EGF 全長、Full-uc：非切断型変異体、 Δ C：細胞質内領域欠損変異体、C：細胞外領域欠損変異体、 Δ 203：204-207a. a. 欠損変異体、 Δ 197：198-207a. a. 欠損変異体、S207A：非リン酸化型変異体、S207D：疑似リン酸化型変異体。

B) HB-EGF 各種変異体強制発現細胞における多核破骨細胞形成。RAW264 細胞に HB-EGF 各種変異体を強制発現させた細胞を樹立し、多核破骨細胞の形成を観察した。

C) B)で得られた画像より多核破骨細胞数を計測し、統計処理を行った。

* ; $p < 0.01$ vs. Full。

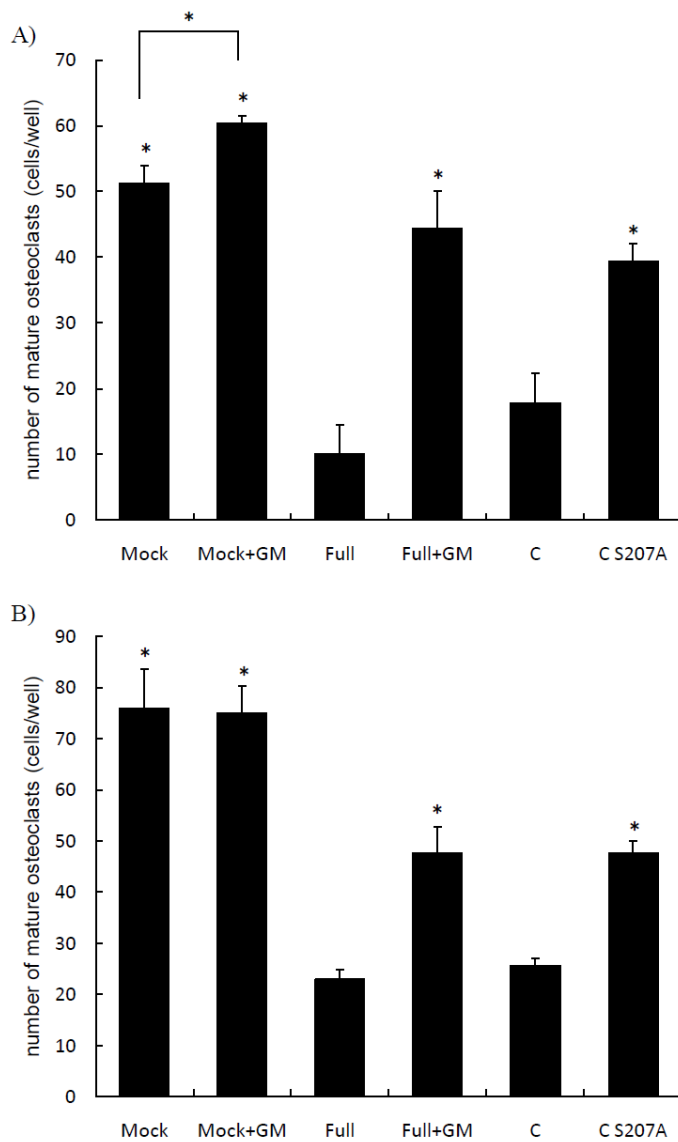


Figure. 9 初代破骨細胞における HB-EGF 各種変異体強制発現細胞を用いた多核破骨細胞形成

野生型マウス(A)および HB-EGF ノックアウトマウス(B)由来初代破骨細胞に HB-EGF 各種変異体を強制発現させた細胞を樹立し、多核破骨細胞の形成を観察後、多核破骨細胞数を計測し、統計処理を行った。* ; $p < 0.01$ vs. Full。

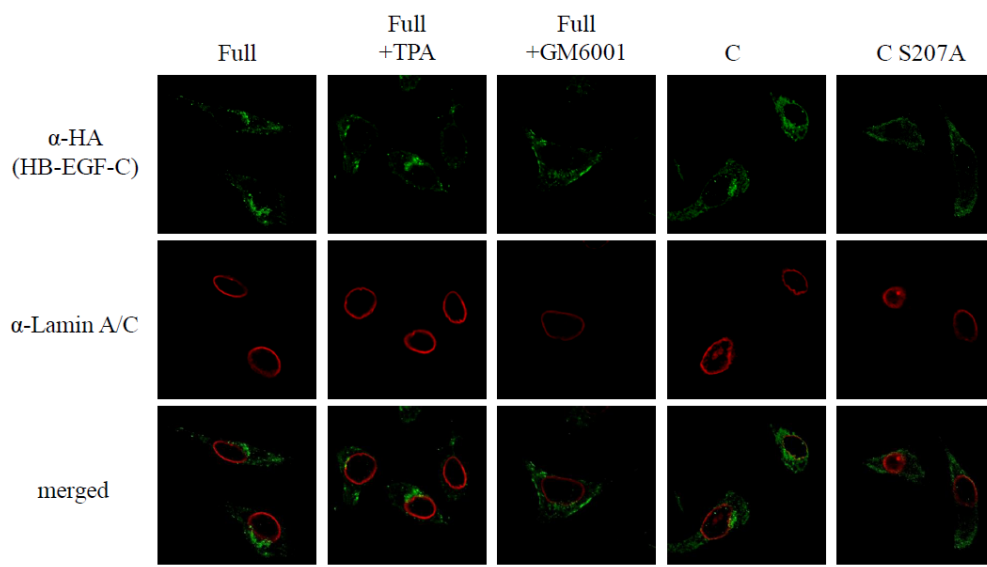


Figure. 10 破骨細胞における HB-EGF の細胞内局在

Fig. 8 で用いた HB-EGF-full、HB-C および HB-C S207A 強制発現細胞における HB-EGF の局在を免疫染色法により調べた。TPA : 12-*O*-Tetradecanoylphorbol 13-acetate、HB-EGF 切断誘導剤 ; GM6001 : メタロプロテアーゼ阻害剤、HB-EGF 切断阻害剤。Lamin A/C : 核膜マーカー。 Bar : 50 μ m。

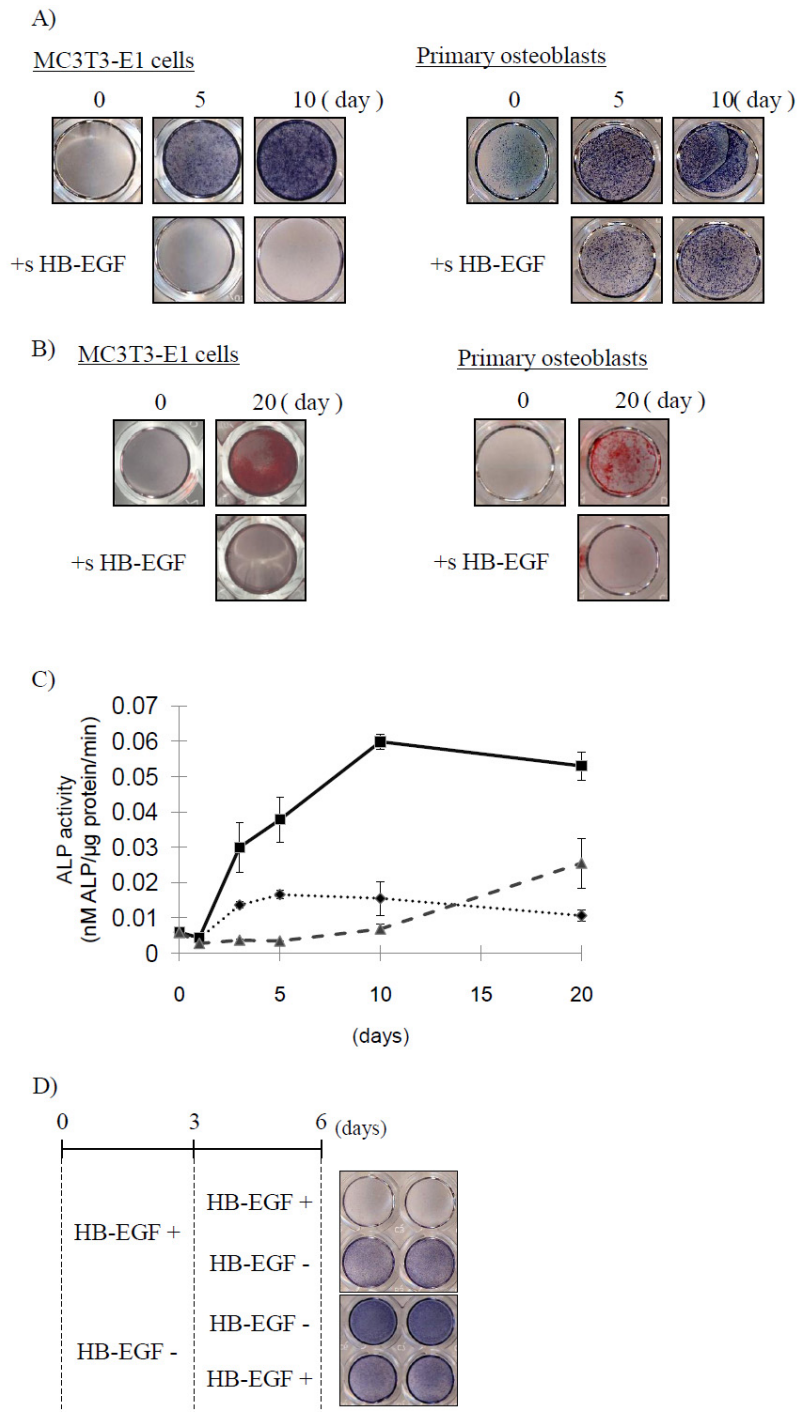


Figure. 11 HB-EGF が骨芽細胞におよぼす影響

A) ALP 染色による骨芽細胞分化の観察。MC3T3-E1 細胞およびマウス初代骨芽細胞を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化誘導系において、リコンビナント sHB-EGF が分化に与える影響を ALP 染色により調べた。

B) アリザリンレッド染色による骨芽細胞分化の観察。A) と同様にリコンビナント

sHB-EGF が骨芽細胞の基質石灰化能に与える影響をアリザリンレッド染色により調べた。

C) 骨芽細胞分化過程(長期)における ALP 活性。MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化誘導系において、リコンビナント sHB-EGF が分化に与える影響を ALP 活性を測定し調べた。実線：コントロール、破線：+sHB-EGF、点線：非分化誘導

D) 分化抑制の可逆性の検討。MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化誘導系において、リコンビナント sHB-EGF の添加時期を 3 日ごとの組み合わせで添加、分化誘導を行い、誘導 6 日後に ALP 染色により分化を観察した。

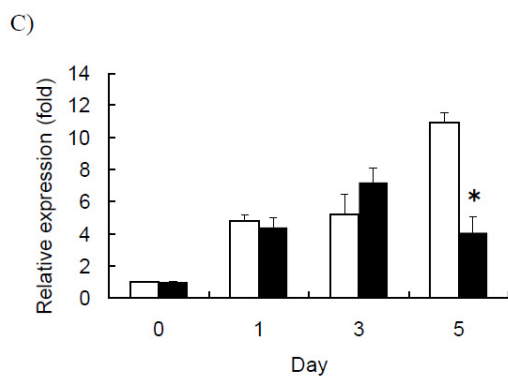
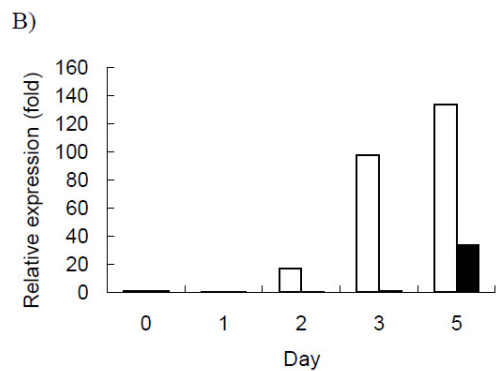
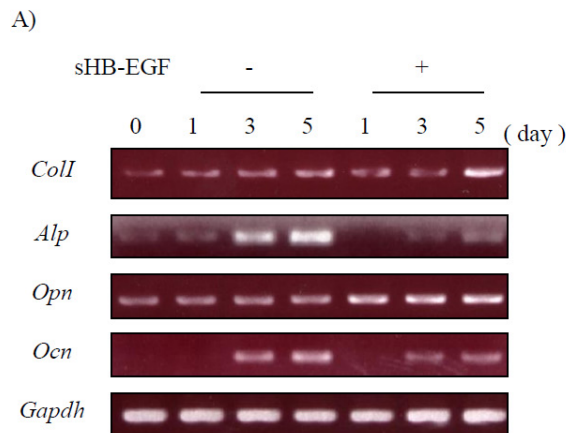


Figure. 12 骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現プロファイル

A) 骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現プロファイル。MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化培養系において、リコンビナント sHB-EGF 添加/非添加実験区で分化誘導後表記時間において mRNA を回収し、RT-PCR 法により骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を調べた。 *Alp*: アルカリフォスファターゼ、*Opn*: オステオポンチン、*Ocn*: オステオカルシン、*Gapdh*: 内在性コントロール。

B) 定量的 PCR 法を用いた *Alp* mRNA の発現プロファイル。A) と同様に抽出した cDNA サンプルを用いてリアルタイム PCR により *Alp* mRNA 発現量を定量的に解析した。白棒: コントロール、黒棒: +sHB-EGF。

C) 定量的 PCR 法を用いた *Ocn* mRNA の発現プロファイル。A) と同様に抽出した cDNA サンプルを用いてリアルタイム PCR により *Ocn* mRNA 発現量を定量的に解析した。白棒：コントロール、黒棒：+sHB-EGF。* ; $p < 0.01$ 。

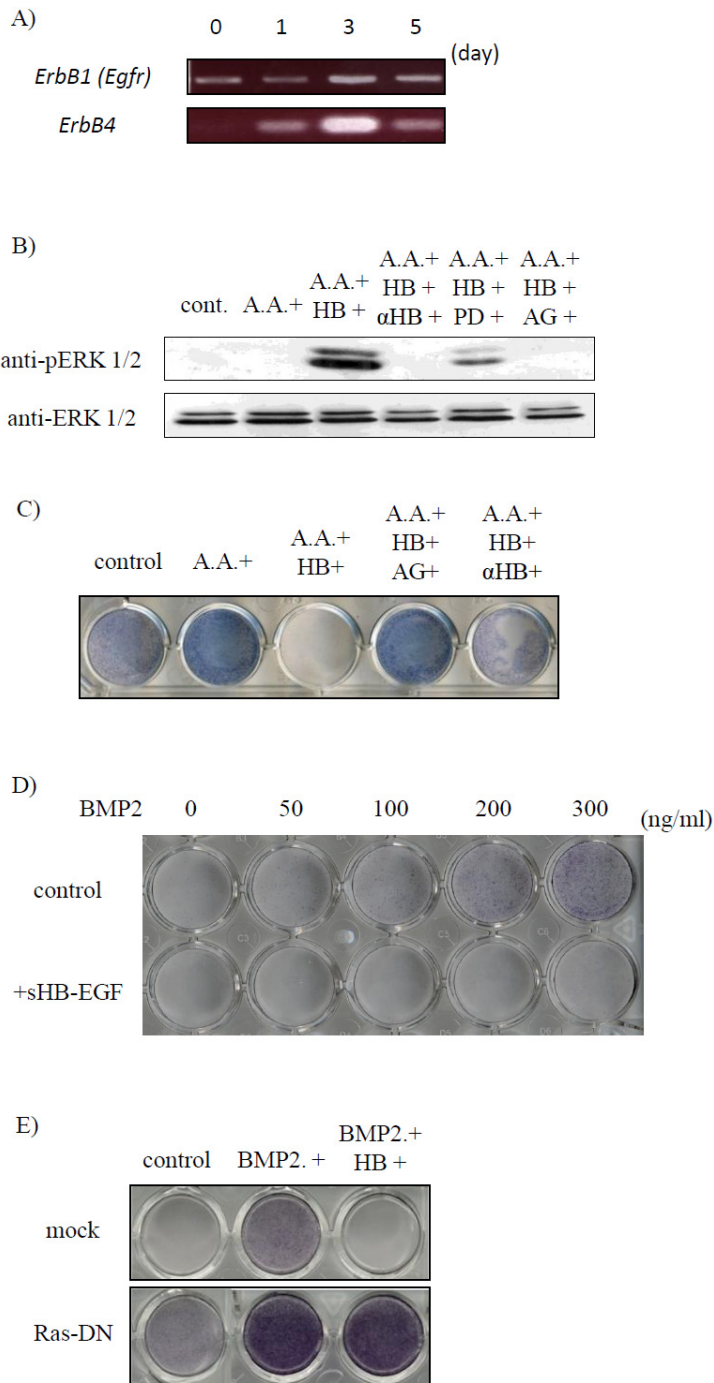


Figure. 13 骨芽細胞における HB-EGF-EGFR シグナルの作用機序

A) 骨芽細胞分化過程における EGFR (ErbB1) および ErbB4 の発現プロファイル。MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化培養系において、分化誘導刺激後表記時間に mRNA を回収し、RT-PCR 法により *ErbB1* および *ErbB4* mRNA の発現を解析した。

B) 骨芽細胞における HB-EGF-EGFR シグナル伝達。骨芽細胞における HB-EGF シグナル伝達を ERK のリン酸化を指標にウェスタンブロッティングにより調べた。MC3T3-E1 細

胞にリコンビナント sHB-EGF を添加し、5 分後にタンパク質を回収し解析を行った。

・ -HB : HB-EGF 中和抗体、PD : PD98059、MEK 阻害剤、AG : AG1478、EGFR 阻害剤。

C) HB-EGF による分化抑制時における EGFR シグナルの関与。MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化誘導系において、リコンビナント sHB-EGF-EGFR シグナルが分化に与える影響を ALP 染色により調べた。AG : AG1478、EGFR 阻害剤、 α -HB : HB-EGF 中和抗体。

D) BMP2 を用いた分化誘導時における sHB-EGF の影響。BMP2 を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化誘導系において、リコンビナント sHB-EGF が分化に与える影響を ALP 染色により調べた。

E) HB-EGF による分化抑制時における Ras の関与。ドミナントネガティブ Ras (DN-Ras) 強制発現細胞を樹立し、sHB-EGF による骨芽細胞分化抑制シグナルに与える影響を ALP 染色により調べた。

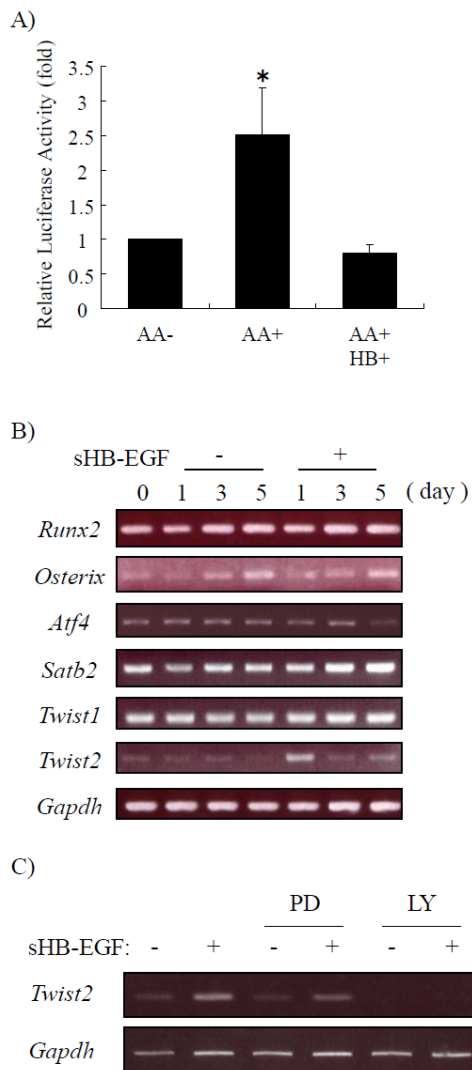


Figure. 14 骨芽細胞において HB-EGF が Runx2 転写活性に与える影響

A) ALPプロモーターを用いた Runx2 転写活性測定。ALPプロモーター(-1838/+81)-luc ベクターを強制発現させた MC3T3-E1 を用いて分化誘導を行い、sHB-EGF が Runx2 転写活性に与える影響を調べた。* ; $p < 0.01$ 。

B) Runx2 および Runx2 転写調節因子の発現プロファイル。MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化培養系において、リコンビナント sHB-EGF 添加/非添加実験区で分化誘導後、表記時間において mRNA を回収し、RT-PCR 法により Runx2 および Runx2 転写調節因子の発現を調べた。 *Gapdh*: 内在性コントロール。

C) EGFR 下流シグナルと Twist2 の発現誘導。MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化培養系において、リコンビナント sHB-EGF および MAPK/PI3K 阻害剤添加/非添加実験区で分化誘導 24 時間後において mRNA を回収し、RT-PCR 法により Twist2 の発現を調べた。 PD: PD98059、MEK 阻害剤 ; LY: LY294002、PI3K 阻害剤。 *Gapdh*: 内在性コントロール。

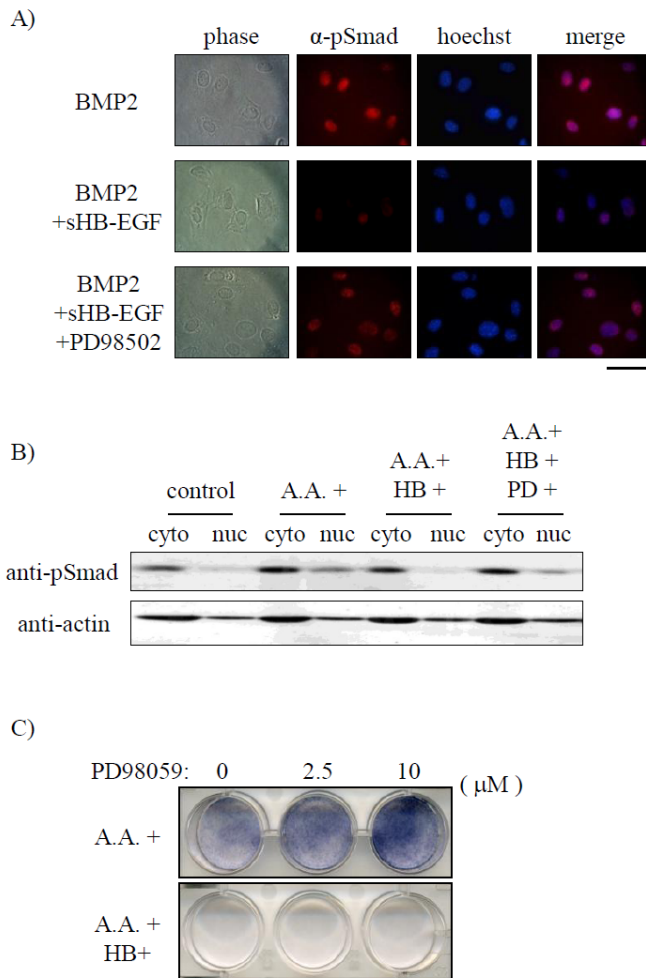


Figure. 15 骨芽細胞において HB-EGF が Smad の核内移行に与える影響

A) sHB-EGF が Smad の局在に与える影響。MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化培養系において、リコンビナント sHB-EGF 添加/非添加実験区で分化誘導後 6 時間後の pSmad の局在を免疫染色法により調べた。Hoechst : 核。Bar: 100 μ m。

B) sHB-EGF が Smad の核内移行に与える影響。MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化培養系において、リコンビナント sHB-EGF 添加/非添加実験区で分化誘導後 6 時間後にタンパク質を核フラクションおよび細胞質フラクションとして回収しウェスタンブロッティング法により pSmad の発現を解析した。PD : PD98059、MEK 阻害剤。

C) MEK 阻害剤が sHB-EGF による分化抑制に与える影響。MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化培養系において、リコンビナント sHB-EGF 添加/非添加実験区で MEK 阻害剤 PD98059 の有無条件下で分化誘導を行い、誘導 3 日後に ALP 染色を行い観察した。

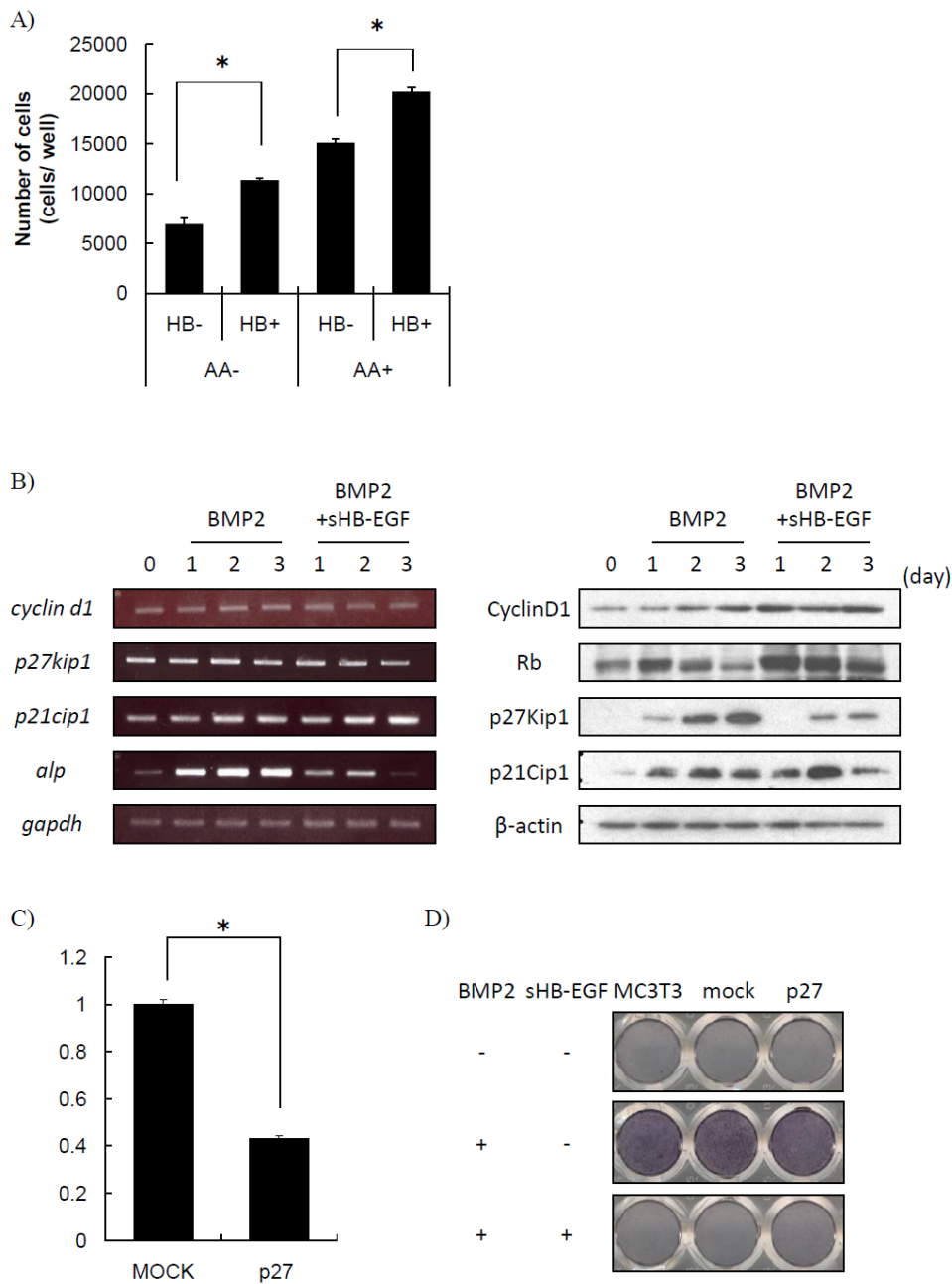


Figure. 16 骨芽細胞において HB-EGF が細胞増殖に与える影響

A) MTT assay による細胞増殖測定。MC3T3 を表記の組み合わせで培養し、刺激 3 日後の細胞数を MTT assay により計測した。 * ; $p < 0.01$ 。

B) 細胞周期関連因子の発現プロファイル。MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化培養系において、リコンビナント sHB-EGF 添加/非添加実験区で分化誘導後表記時間において mRNA およびタンパク質を回収し、細胞周期関連因子の mRNA およびタンパク質の発現をそれぞれ RT-PCR 法(左)およびウェスタンブロッティング法(右)により調べた。

C) p27 が細胞増殖に与える影響。p27 強制発現細胞を樹立し、MTT assay により細胞数を計測した。Mock 細胞を基準とし統計処理を行った。* ; $p < 0.01$ 。

D) p27 が骨芽細胞分化に与える影響。C) で樹立した p27 強制発現細胞を用いて、骨芽細胞分化誘導を行い、分化誘導 3 日後に ALP 染色を行い観察した。

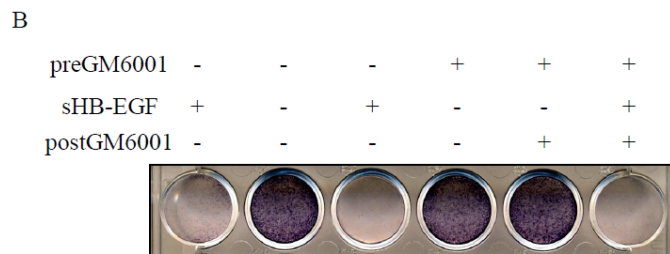
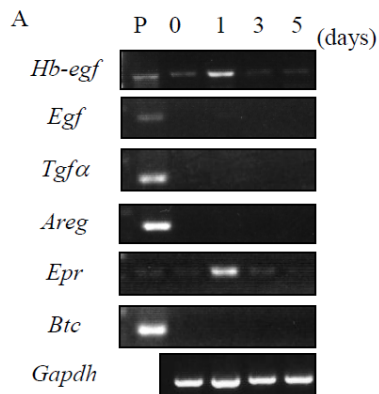


Figure. 17 骨芽細胞における内在性 HB-EGF の関与

A) 骨芽細胞分化過程における EGF ファミリーの発現プロファイル。MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化培養系において、分化誘導後表記時間において mRNA を回収し、RT-PCR 法により EGF ファミリー遺伝子の発現を調べた。 *Areg* : amphiregulin ; *Epr* : epiregulin ; *Btc* : betacellulin。 *Gapdh* : 内在性コントロール。

B) 内在性 HB-EGF が骨芽細胞の分化に与える影響。MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨芽細胞分化培養系において、分化誘導 24 時間前にメタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001 を培地中に添加し、内在性 HB-EGF に由来する sHB-EGF の産生を抑制した。培地交換後、分化誘導刺激と同時に、リコンビナント sHB-EGF および GM6001 を培地中に添加し、誘導 3 日後に ALP 染色により分化を観察した。

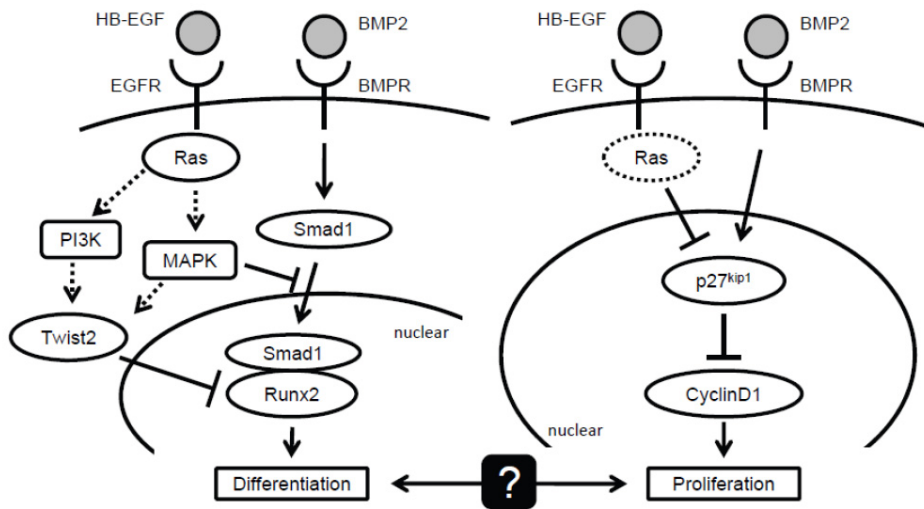


Figure. 18 骨芽細胞における sHB-EGF による分化抑制シグナルのモデル図

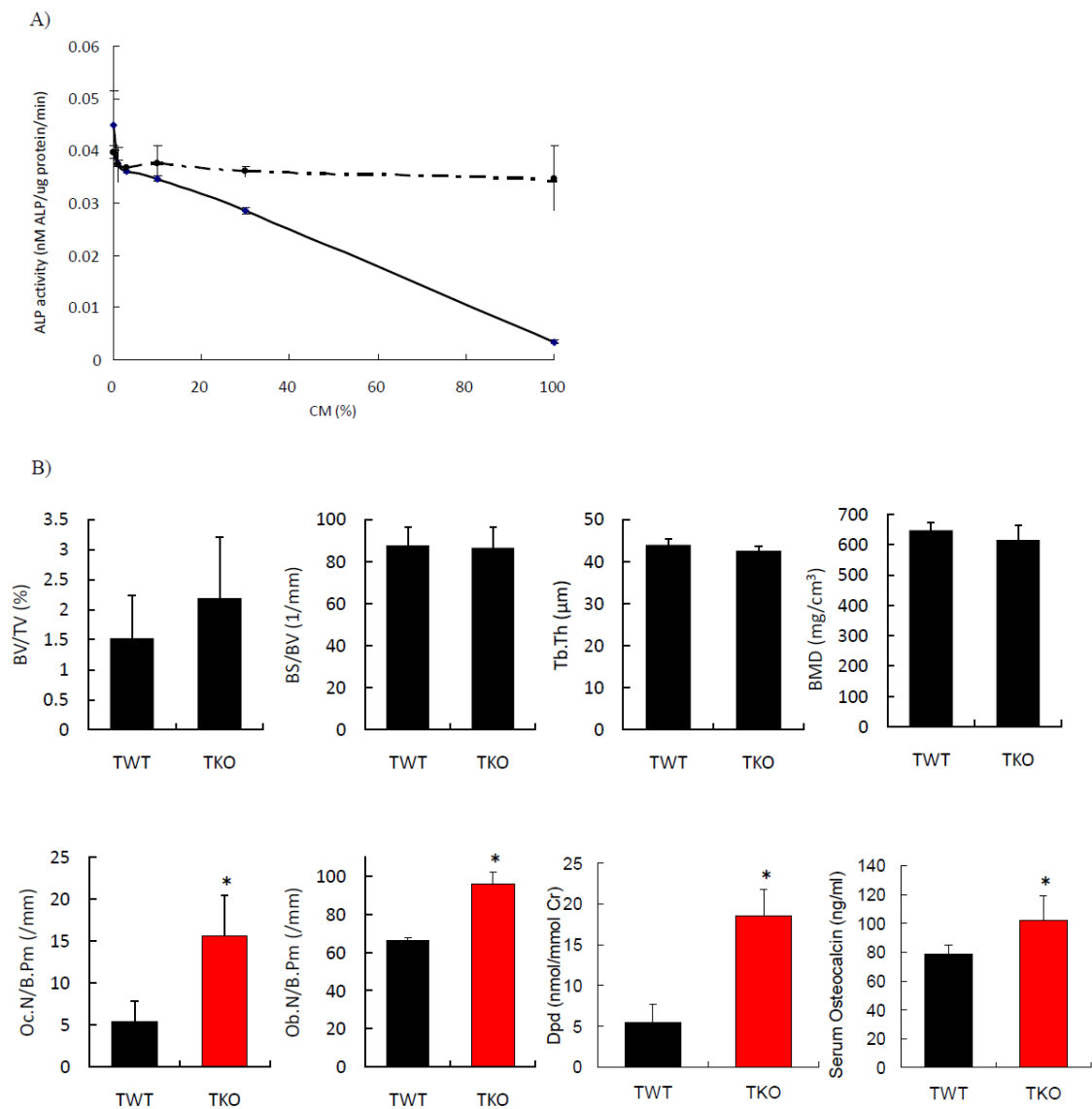


Figure. 19 破骨細胞由来のHB-EGFによる骨芽細胞分化の機能解析

A) 野生型およびHB-EGFノックアウトマウス初代破骨細胞培養上清を用いた骨芽細胞分化誘導。マウスから採取した初代破骨細胞を用いて、破骨細胞分化誘導を行った後、RANKL刺激96時間後に培養上清を回収した。それぞれの培養上清を骨芽細胞分化系に表記の濃度で添加し、骨芽細胞の分化誘導を行った。誘導3日後にAL活性を計測した。実線：野生型；破線：HB-EGFノックアウトマウス。CM：培養上清。

B) 骨髄移植法により作製した疑似破骨細胞コンディショナルノックアウトマウスの骨形態計測。野生型およびHB-EGFノックアウトマウス胎生14.5日より摘出した肝臓より骨髄細胞を調整し、γ線照射(Total 8.4 Gy)を行った野生型マウスに移植した。移植6週間後にFig. 3、4と同様に骨形態計測および骨代謝マーカーの計測を行った。

TWT：野生型由来骨髄細胞移植；TKO：HB-EGFノックアウトマウス由来骨髄細胞移植。

* ; p<0.01。

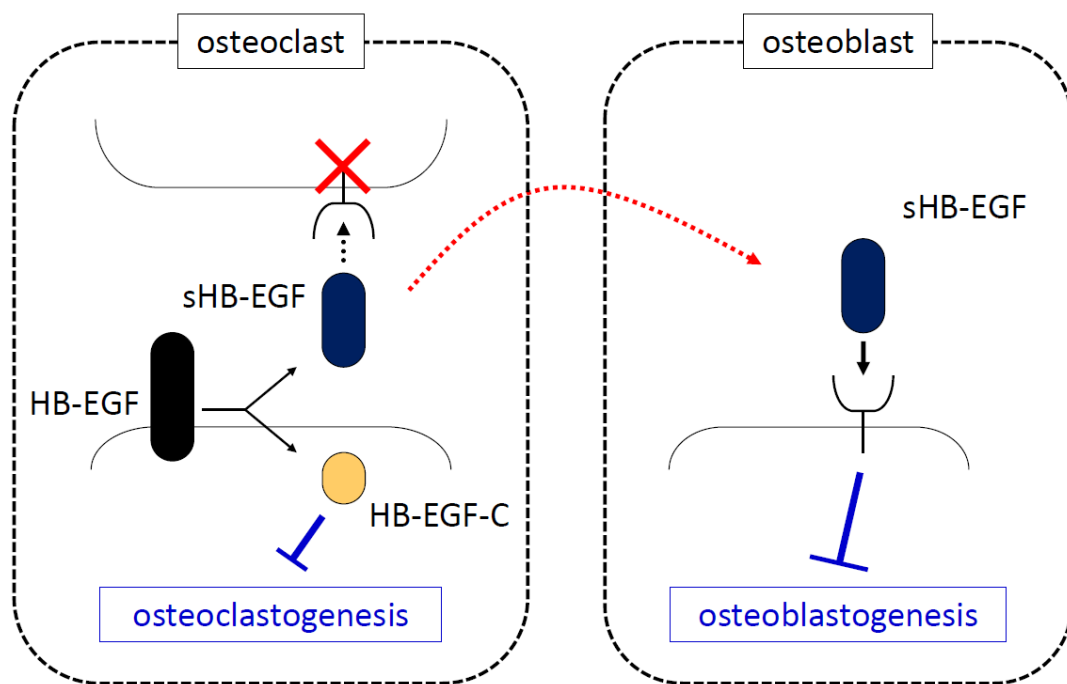


Figure. 20 骨代謝における HB-EGF 作用機序のモデル図

考察

骨機能の維持には骨代謝が正常に保たれる必要がある。骨代謝の異常は重篤な骨疾患に結び付くことから、骨代謝機構の解明は骨疾患の治療だけでなく予防にも重要な課題である。

本研究により、I) 破骨細胞分化過程において転写因子 NFAT2 の標的遺伝子として増殖因子 HB-EGF を見出した。II) 破骨細胞において、切断を受けた後産生される HB-EGF-C が分化抑制因子として機能することを見出した。III) HB-EGF-C による破骨細胞分化抑制には S207 のリン酸化に伴う HB-EGF-C の細胞膜から核周辺への移行が重要であることが示唆された。IV) 骨芽細胞において sHB-EGF が分化抑制因子として機能することが明らかとなった。V) sHB-EGF は骨芽細胞において Runx2 の転写抑制を介した分化抑制、また骨芽前駆細胞の細胞増殖を亢進していることが見出された。VI) 破骨細胞から放出された sHB-EGF が骨芽細胞の分化を抑制することが示唆された。(Fig. 20)

これまでに、骨代謝において骨芽細胞による破骨細胞の分化制御に関しては、破骨細胞分化誘導因子である RANKL や M-CSF の同定など多くの研究がなされてきたが、破骨細胞による骨芽細胞の分化制御機構はほとんど研究がなされていない。(Zhao et al., 2006) 今回私の見出した HB-EGF は、破骨細胞で発現誘導された後、1 因子で破骨細胞および骨芽細胞両者の分化を抑制することが示唆された。このような因子はこれまでに報告がなく、新たな骨代謝制御機構を提唱するものと考えられる。

破骨細胞における HB-EGF の役割

私は、HB-EGF が、破骨細胞の分化に必須な転写因子 NFAT2 の標的候補遺伝子として、破骨細胞の分化過程において発現が誘導され、切断を受けた後、細胞質内領域 HB-EGF-C が破骨細胞の分化を抑制することを見出した。

HB-EGF-C 強制発現細胞では、多核破骨細胞形成は抑制されるが、TRAP 陽性単核破骨細胞への分化は正常に進行する。また、HB-EGF ノックアウトマウスおよび非切断型 HB-EGF ノックインマウス由来初代破骨細胞では細胞融合度が亢進することから、HB-EGF は分化過程の中でも TRAP 陽性単核破骨細胞から多核破骨細胞へと分化する細胞融合過程において抑制的因子として機能していることが考えられる。

HB-EGF-C の機能として、これまでに細胞周期抑制因子 PLZF や Bcl-6 に結合し、細胞周期の制御に関与することが知られている (Kinugasa et al., 2007; Nanba et al., 2003)。また、207 番目のセリン(S207)のリン酸化により、in vivo における腫瘍形成能が上昇することが報告されている (Wang

et al., 2006)。しかし、生体内における HB-EGF-C の生理学的な機能は明らかとなっていない。

私は、HB-EGF-C が S207 のリン酸化および細胞膜からの局在変化を伴い破骨細胞の分化を抑制することを見出した。これまでに HB-EGF-C と結合することが報告されている PLZF は、HB-EGF の細胞質内領域 189-198 a. a. 領域と結合することが報告されている。(Nanba et al., 2003) しかし、破骨細胞では、203-207 a. a. 領域の欠損変異体でも分化抑制が回復することから、PLZF との結合領域が分化抑制に重要ではないことが示唆される。このことから、これまでに報告のある PLZF などとの相互作用は破骨細胞における分化抑制機能には関与していない可能性が考えられる。また、近年、HB-EGF-C が切断後、核内膜に移行することが報告された。(Hieda et al., 2008) HB-EGF-C を強制発現させた破骨細胞の免疫染色の結果より、HB-EGF-C は核近傍に局在が観察されるものの、核膜マーカーである Lamin A/C の共局在は確認されなかった。このことから、破骨細胞において HB-EGF-C は核膜には局在していない可能性が示唆された。Hieda らの報告では、HB-EGF-C の核膜への移行には HB-EGF-C の 185-195 a. a 領域が重要であることが示されている。一方、破骨細胞では、S207 の非リン酸化型変異体において HB-EGF-C の局在が細胞膜上に観察されることから、異なる機構で制御されていると考えられる。

このことから、破骨細胞においては、HB-EGF-C の新規結合タンパク質の存在や局在制御機構の存在が示唆される。

今後、破骨細胞における HB-EGF-C 結合タンパク質の探索、HB-EGF-C による分化抑制シグナルの作用点の解析を行い、HB-EGF-C による破骨細胞分化抑制機構を明らかにする必要があると考えられる。

骨芽細胞における HB-EGF の役割

これまでに、EGF など EGF ファミリーに属する増殖因子や TGF- β などが骨芽細胞の増殖・分化を制御することが報告されている。しかし、どのような機構で骨芽細胞の制御を行っているのかは不明である。今回、私は、遊離型 HB-EGF (sHB-EGF) が EGF ファミリーの中で、新たに骨芽細胞の分化を抑制することを明らかとした。

sHB-EGF により骨芽細胞の分化過程で発現が誘導される ALP、Ocn の発現誘導が抑制された。また、ALP プロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイにより、HB-EGF により ALP は転写レベルで抑制を受けていることが明らかとなった。ALP の転写因子として Runx2 が知られているが、Runx2 mRNA 発現レベルに変化は認められなかった。このことから、Runx2 の転写活性を制御する因子に注目し、転写抑制機能を持つ Twist2 の発現が HB-EGF 添加により上昇してくることを見出した。さらに、阻害剤を用いた実験より HB-EGF

による Twist2 の発現誘導は PI3K および MAPK を介していることが明らかとなった。また、Runx2 は、Smad による転写活性調節を受けることが知られている。BMP レセプターの下流で転写因子である Smad の C 末端領域がリン酸化され、核内に移行することにより Runx2 と結合し転写活性を促進することが知られている。これに対し、EGF は MAPK を介した経路で Smad のリンカー部位をリン酸化し、Smad の核内移行が阻害されることが明らかとなっている。Smad の局在を免疫染色により調べたところ、sHB-EGF においても Smad の核への集積が抑制され、その抑制は MAPK 阻害剤により回復した。このことから、sHB-EGF-EGFR 下流において、少なくとも 2 重の経路により骨芽細胞の分化は抑制されていることが示唆された。(Fig. 18) しかし、骨芽細胞分化誘導系において、HB-EGF 添加時に、MEK 阻害剤を添加しても骨芽細胞の分化回復は認められなかった。また、PI3K 阻害剤を添加した分化誘導系では、通常の分化誘導条件においても分化抑制が観察された。さらに、ドミナントネガティブ Ras 強制発現細胞では sHB-EGF による分化抑制は観察されなかった。このことから、HB-EGF-EGFR-Ras 下流で MAPK および PI3K が協調的に働き、骨芽細胞の分化を抑制していることが示唆された。また、PI3K は骨芽細胞の分化に必須な一方、sHB-EGF による Twist2 の発現誘導にも関与することから、分化段階によるシグナル経路の厳密な切り換え、または他の経路の関与が示唆される。

一方、sHB-EGF により骨芽前駆細胞の細胞増殖が亢進した。これまでに、細胞周期抑制因子 p27 が骨芽細胞において、増殖期から分化への転換に重要な機能を持つことが報告されてきた。sHB-EGF により p27 の mRNA 発現量は変化しないが、タンパク質量が減少したことから、sHB-EGF は翻訳後の p27 タンパク質の安定性などを制御し、細胞増殖に関与していることが示唆された。しかし、p27 強制発現細胞を用いた分化誘導系において、sHB-EGF による分化抑制は回復しなかった。

本研究より、sHB-EGF による分化抑制機構および細胞増殖機構の一端が明らかとなった。しかし、シグナル経路の関連、また、これまで相反するものと考えられてきた分化と増殖の関連性については不明な点が多く残った。

今後、様々なシグナル経路の阻害剤、ノックダウン細胞の樹立などを行い、包括的な解析が必要であると考えられる。

骨代謝における HB-EGF の役割

本研究より破骨細胞において発現した HB-EGF は、切断後、HB-EGF-C は破骨細胞の分化を抑制し、sHB-EGF は骨芽細胞の分化を抑制することが明らかとなった。(Fig. 20)

これまで、HB-EGF ノックアウトマウスや非切断型 HB-EGF ノックインマウスの骨形態に関する異常は報告されていなかった。実際に HB-EGF 変異マウ

スを解析した結果、形態学的な顕著な異常は認められなかった。しかし、詳細な解析を行った結果、HB-EGF 変異マウスでは、骨芽細胞・破骨細胞いずれもその数が増加していることが分かった。さらに、骨吸収マーカーおよび骨形成マーカーを計測したところ、HB-EGF ノックアウトマウスでは骨吸収および骨形成が亢進していることが分かった。これらの結果より、HB-EGF 変異マウスでは高回転型骨代謝が引き起こされ、外見上、骨形態に異常が認められないということが示唆された。

破骨細胞において発現した HB-EGF は切断後、骨芽細胞・破骨細胞の分化を共に負に制御することが示唆された。これまでに、骨芽細胞による破骨細胞の制御機構については多くの報告がなされてきた。一方、破骨細胞による骨芽細胞の分化制御機構についてはあまり研究がなされていなかった。しかし、近年、Ephrin-Eph receptor シグナルが破骨細胞から骨芽細胞へと分化促進に機能することが報告され、破骨細胞による骨芽細胞の分化制御にも注目が集まってきている (Zhao et al., 2006)。また、これまで骨代謝の制御機構については多くの報告がなされているが、ほとんどが代謝/分化促進因子としての機能であり、抑制因子として機能するものは報告されていない。

今回、私が新たに見出した HB-EGF は、破骨細胞から骨芽細胞へと抑制的に機能する可能性をもったものであり、さらに、破骨細胞自らの分化を抑制する。HB-EGF が骨代謝において持つ生理学的な意味は現在明らかとなっていない。しかし、破骨細胞において、HB-EGF は細胞融合を抑制することにより破骨細胞の分化を抑制し、骨吸収活性を抑制する因子として機能することが考えられる。一方、骨芽細胞においては、分化を抑制するとともに骨芽前駆細胞の増殖を亢進する因子として機能することが示唆された。HB-EGF による分化抑制が可逆的であることから、HB-EGF は骨芽細胞の未分化状態を維持し、前駆細胞の増殖を亢進する機能を担っていることが考えられる。これらの結果より、HB-EGF は破骨細胞の分化を抑制することで骨吸収活性を制御するとともに、sHB-EGF を放出し、骨芽前駆細胞の増殖を促す。破骨細胞のアポトーシスとともに HB-EGF の放出がなくなり、BMP シグナルにより新たに骨芽細胞の分化が開始され、骨代謝が繰り返されるというスイッチングファクターとして機能している可能性が考えられる。

以上の仮説より、HB-EGF ノックアウトマウスでは骨芽前駆細胞の生産が遅れ、徐々に前駆細胞が枯渇し、老齢化とともに骨組織に異常が観察される可能性が強く示唆される。しかし、HB-EGF ノックアウトマウスは心臓弁肥大および心臓肥大の表現型により多くが 4-6 カ月で死亡し、長期にわたる解析が不可能である。今後、CRE-loxP システムによる破骨細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスの作製を行い、破骨細胞に由来する HB-EGF の骨代謝における機能を詳細に検討する必要がある。

本研究により、破骨細胞による骨芽細胞制御機構の一端が明らかとなった。HB-EGF が骨組織自身で産生される因子であることから、今後、HB-EGF-C や sHB-EGF を標的にした薬剤開発により、より効果的かつ安全な骨疾患治療薬および骨代謝改善薬の開発が期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました竹家達夫教授、北川教弘助教、小川拓哉助教、静岡大学に栄転されました与語圭一郎准教授に厚くお礼申し上げます。

本研究の共同研究者として、HB-EGF 変異マウスおよび HB-EGF 各種コンストラクトの提供、また様々な助言をいただきました大阪大学微生物病研究所細胞機能分野 目加田英輔教授、岩本亮准教授、水島寛人助教、南誠剛博士にお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、骨芽細胞分化系の樹立は小島久恵さん(奈良先端大)、骨切片作製技術は堀恵子さん(大阪府立成人病センター)のご指導・ご助言をいただきました。

また、ALP レポーターアッセイ用プラスミドは長崎大学 小守 壽文博士、Ras-DN 発現ベクターは名古屋大学 貝淵弘三博士よりご提供いただきました。

この場を借りてお礼申し上げます。

本研究は、細胞増殖学講座の吉本晃正君、戸井田英俊君、阿部絵美さん、安田法永君、西邨大吾君、高木朋代さんとともに進めてきました。みなさんと助け合い、議論しあいながら研究を進められたことに感謝します。

最後に、時には衝突しながらもお互い叱咤激励しあってきた同期の川田滋久君、圓岡真宏君、多くの助言をいただいた先輩方、また日々の研究室の雑務をこなしてくれた細胞増殖学講座のメンバー皆さんに感謝します。

参考文献

Bialek, P., Kern, B., Yang, X., Schrock, M., Sosic, D., Hong, N., Wu, H., Yu, K., Ornitz, D.M., Olson, E.N., *et al.* (2004). A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell* 6, 423-435.

Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Xu, W., Lacey, D.L., *et al.* (1998). osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12, 1260-1268.

Canalis, E., McCarthy, T.L., and Centrella, M. (1989). Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *J Cell Physiol* 140, 530-537.

Chan, S.Y., and Wong, R.W. (2000). Expression of epidermal growth factor in transgenic mice causes growth retardation. *J Biol Chem* 275, 38693-38698.

Drissi, H., Hushka, D., Aslam, F., Nguyen, Q., Buffone, E., Koff, A., van Wijnen, A., Lian, J.B., Stein, J.L., and Stein, G.S. (1999). The cell cycle regulator p27kip1 contributes to growth and differentiation of osteoblasts. *Cancer Res* 59, 3705-3711.

Franceschi, R.T., Ge, C., Xiao, G., Roca, H., and Jiang, D. (2007). Transcriptional regulation of osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1116, 196-207.

Goishi, K., Higashiyama, S., Klagsbrun, M., Nakano, N., Umata, T., Ishikawa, M., Mekada, E., and Taniguchi, N. (1995). Phorbol ester induces the rapid processing of cell surface heparin-binding EGF-like growth factor: conversion from juxtacrine to paracrine growth factor activity. *Mol Biol Cell* 6, 967-980.

Harada, H., Tagashira, S., Fujiwara, M., Ogawa, S., Katsumata, T., Yamaguchi, A., Komori, T., and Nakatsuka, M. (1999). Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 274, 6972-6978.

Harada, S., and Rodan, G.A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423, 349-355.

Hata, R., Hori, H., Nagai, Y., Tanaka, S., Kondo, M., Hiramatsu, M., Utsumi, N., and

Kumegawa, M. (1984). Selective inhibition of type I collagen synthesis in osteoblastic cells by epidermal growth factor. *Endocrinology* 115, 867-876.

Hieda, M., Isokane, M., Koizumi, M., Higashi, C., Tachibana, T., Shudou, M., Taguchi, T., Hieda, Y., and Higashiyama, S. (2008). Membrane-anchored growth factor, HB-EGF, on the cell surface targeted to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol* 180, 763-769.

Ishida, N., Hayashi, K., Hattori, A., Yogo, K., Kimura, T., and Takeya, T. (2006). CCR1 acts downstream of NFAT2 in osteoclastogenesis and enhances cell migration. *J Bone Miner Res* 21, 48-57.

Ishida, N., Hayashi, K., Hoshijima, M., Ogawa, T., Koga, S., Miyatake, Y., Kumegawa, M., Kimura, T., and Takeya, T. (2002). Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J Biol Chem* 277, 41147-41156.

Iwamoto, R., Yamazaki, S., Asakura, M., Takashima, S., Hasuwa, H., Miyado, K., Adachi, S., Kitakaze, M., Hashimoto, K., Raab, G., *et al.* (2003). Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3221-3226.

Jackson, L.F., Qiu, T.H., Sunnarborg, S.W., Chang, A., Zhang, C., Patterson, C., and Lee, D.C. (2003). Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *Embo J* 22, 2704-2716.

Jimi, E., Nakamura, I., Amano, H., Taguchi, Y., Tsurukai, T., Tamura, M., Takahashi, N., and Suda, T. (1996). Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinology* 137, 2187-2190.

Kinugasa, Y., Hieda, M., Hori, M., and Higashiyama, S. (2007). The carboxyl-terminal fragment of pro-HB-EGF reverses Bcl6-mediated gene repression. *J Biol Chem* 282, 14797-14806.

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., *et al.* (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764.

Krampera, M., Pasini, A., Rigo, A., Scupoli, M.T., Tecchio, C., Malpeli, G., Scarpa, A., Dazzi, F., Pizzolo, G., and Vinante, F. (2005). HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood* 106, 59-66.

Kratchmarova, I., Blagoev, B., Haack-Sorensen, M., Kassem, M., and Mann, M. (2005). Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 308, 1472-1477.

Kretschmar, M., Doody, J., and Massague, J. (1997). Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* 389, 618-622.

Kumegawa, M., Hiramatsu, M., Hatakeyama, K., Yajima, T., Kodama, H., Osaki, T., and Kurisu, K. (1983). Effects of epidermal growth factor on osteoblastic cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 35, 542-548.

Lagasse, E., and Weissman, I.L. (1997). Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell* 89, 1021-1031.

Li, J., Sarosi, I., Yan, X.Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H.L., McCabe, S., Elliott, R., Scully, S., Van, G., *et al.* (2000). RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1566-1571.

Meiyanto, E., Hoshijima, M., Ogawa, T., Ishida, N., and Takeya, T. (2001). Osteoclast differentiation factor modulates cell cycle machinery and causes a delay in s phase progression in RAW264 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 278-283.

Miao, D., and Scutt, A. (2002). Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *J Histochem Cytochem* 50, 333-340.

Minami, S., Iwamoto, R., and Mekada, E. (2008). HB-EGF decelerates cell proliferation synergistically with TGFalpha in perinatal distal lung development. *Dev Dyn* 237, 247-258.

Mine, N., Iwamoto, R., and Mekada, E. (2005). HB-EGF promotes epithelial cell

migration in eyelid development. *Development* 132, 4317-4326.

Miyamoto, S., Hirata, M., Yamazaki, A., Kageyama, T., Hasuwa, H., Mizushima, H., Tanaka, Y., Yagi, H., Sonoda, K., Kai, M., *et al.* (2004). Heparin-binding EGF-like growth factor is a promising target for ovarian cancer therapy. *Cancer Res* 64, 5720-5727.

Miyamoto, S., Yagi, H., Yotsumoto, F., Kawarabayashi, T., and Mekada, E. (2006). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule for cancer therapy. *Cancer Sci* 97, 341-347.

Nakamura, T., Imai, Y., Matsumoto, T., Sato, S., Takeuchi, K., Igarashi, K., Harada, Y., Azuma, Y., Krust, A., Yamamoto, Y., *et al.* (2007). Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 130, 811-823.

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17-29.

Nanba, D., Mammoto, A., Hashimoto, K., and Higashiyama, S. (2003). Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF. *J Cell Biol* 163, 489-502.

Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W., Beddington, R.S., Mundlos, S., Olsen, B.R., *et al.* (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89, 765-771.

Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., and Recker, R.R. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2, 595-610.

Schneider, M.R., Mayer-Roenne, B., Dahlhoff, M., Proell, V., Weber, K., Wolf, E., and Erben, R.G. (2009). High cortical bone mass phenotype in betacellulin transgenic mice is EGFR dependent. *J Bone Miner Res* 24, 455-467.

Shirakata, Y., Kimura, R., Nanba, D., Iwamoto, R., Tokumaru, S., Morimoto, C., Yokota,

K., Nakamura, M., Sayama, K., Mekada, E., *et al.* (2005). Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J Cell Sci* *118*, 2363-2370.

Sibilia, M., Wagner, B., Hoebertz, A., Elliott, C., Marino, S., Jochum, W., and Wagner, E.F. (2003). Mice humanised for the EGF receptor display hypomorphic phenotypes in skin, bone and heart. *Development* *130*, 4515-4525.

Stein, G.S., and Lian, J.B. (1993). Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* *14*, 424-442.

Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J.M., Martin, T.J., and Suda, T. (1988). Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* *123*, 2600-2602.

Teitelbaum, S.L., and Ross, F.P. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* *4*, 638-649.

Terao, M., Studer, M., Gianni, M., and Garattini, E. (1990). Isolation and characterization of the mouse liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene. *Biochem J* *268*, 641-648.

Theill, L.E., Boyle, W.J., and Penninger, J.M. (2002). RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* *20*, 795-823.

Toki, F., Nanba, D., Matsuura, N., and Higashiyama, S. (2005). Ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF like growth factor and subcellular localization of the C-terminal fragment in the cell cycle. *J Cell Physiol* *202*, 839-848.

Wang, K., Yamamoto, H., Chin, J.R., Werb, Z., and Vu, T.H. (2004). Epidermal growth factor receptor-deficient mice have delayed primary endochondral ossification because of defective osteoclast recruitment. *J Biol Chem* *279*, 53848-53856.

Wang, X., Mizushima, H., Adachi, S., Ohishi, M., Iwamoto, R., and Mekada, E. (2006). Cytoplasmic domain phosphorylation of heparin-binding EGF-like growth factor. *Cell Struct Funct* *31*, 15-27.

Xie, H., Wang, H., Tranguch, S., Iwamoto, R., Mekada, E., Demayo, F.J., Lydon, J.P., Das, S.K., and Dey, S.K. (2007). Maternal heparin-binding-EGF deficiency limits pregnancy success in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 18315-18320.

Yamazaki, S., Iwamoto, R., Saeki, K., Asakura, M., Takashima, S., Yamazaki, A., Kimura, R., Mizushima, H., Moribe, H., Higashiyama, S., *et al.* (2003). Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J Cell Biol* *163*, 469-475.

Zhao, C., Irie, N., Takada, Y., Shimoda, K., Miyamoto, T., Nishiwaki, T., Suda, T., and Matsuo, K. (2006). Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab* *4*, 111-121.