

Thesis

血管内皮細胞由来のnetrin-4を介した
破骨細胞分化抑制による骨代謝の制御

臨床医学研究系 口腔外科学

榎木 祐一郎

骨代謝は様々な器官による内分泌系を介した制御を受けることが知られている。血管は多くの器官に重要な役割を果たしており、骨における血管形成も骨格の発達や骨代謝に不可欠な存在である。しかしながら、骨代謝における血管系の役割は完全に解明されているとは言い難い。血管内皮細胞と骨髄マクロファージ (BMMs) の非接触型共培養にて破骨細胞分化が著明に抑制される現象は知られていたが、これを担う分泌性因子については不明であった。本研究では、血管内皮細胞由来のnetrin (Ntn)-4がBMMsに作用して破骨細胞分化を抑制すること、骨粗鬆症モデルマウスにおいてNtn4投与により骨量が増加することを見出した。血管内皮細胞に強く発現する分泌型netrinであるNtn1およびNtn4の破骨細胞に対する作用を調べたところ、Ntn1は破骨細胞形成を促進し、Ntn4は破骨細胞形成を抑制した。そこで、共存培養においてNtn1あるいはNtn4の中和抗体を添加したところ、Ntn4の中和抗体は破骨細胞形成を有意に促進し、Ntn1の中和抗体は破骨細胞形成に影響を与えなかった。また、共存培養において、破骨細胞のDSCAM受容体発現が上昇しており、DSCAM中和抗体により破骨細胞分化抑制が解除された。さらに、*in vivo*においても、骨に孔をあけて治癒過程を観察した実験で、骨組織におけるPECAM-1陽性細胞である血管内皮細胞を持つ血管様組織は、Ntn4陽性細胞と一致し、Ntn4の発現を認めた。また、骨粗鬆症モデルマウスに対してNtn4を予防的に投与することで、破骨細胞の抑制を介して骨量低下を防止した。これらの結果より、血管内皮細胞由来Ntn4と破骨細胞のDSCAM受容体は少なくとも一部のメカニズムとして、破骨細胞分化を抑制し、骨量の低下を抑制することに関与している可能性が考えられた。

緒言

骨形成と骨吸収のバランスを保ちつつ行われる骨のリモデリングは、生体内の様々な器官による内分泌系を介した制御を受けることが知られているが^{1,2)}、近年、神経系も骨代謝を制御することが明らかとなりつつある^{2,3)}。一方で、血管は骨を含む生体内の多くの器官に酸素、栄養分、ホルモンやサイトカインを供給するため、血管形成は骨リモデリングや骨格系の発達に重要であることが示唆される⁴⁾。骨における血管形成も骨格の発達や骨代謝に不可欠な存在である。血管は神経に伴走しており、神経系と連絡を取り合っていることから⁵⁾、血管系による骨代謝の制御が存在する可能性も否定できない。

骨代謝における破骨細胞は、骨破壊をできる唯一の細胞で⁶⁾、単球・マクロファージ系の造血

細胞より分化した多核巨細胞である。破骨細胞の分化は、骨芽細胞が分泌するマクロファージコロニー刺激因子 (Macrophage colony-stimulating factor : M-CSF) とNF κ B活性化受容体リガンド (Receptor activator of NF- κ B ligand : RANKL) により厳密に制御されている⁶⁻⁸⁾。血管系と破骨細胞との関係では、血管を制御する因子が破骨細胞や破骨前駆細胞に作用することや、血管内皮細胞から産生される因子が破骨細胞分化を抑制することが報告されている⁹⁾。たとえば、強力な血管形成因子であるvascular endothelial growth factorは、低酸素状態で血管内皮細胞から誘導され、破骨細胞分化を促進させ、破骨細胞の寿命を延長させ、骨吸収を促進させる¹⁰⁾。また、血管内皮細胞由来のendothelin-1は、破骨前駆細胞に作用して破骨細胞による骨吸収および細胞遊走性を抑制する¹¹⁾。Chikatsuらは、血管内皮細胞と骨髄マクロファージの非接触型共培養により、破骨細胞形成が抑制されることを報告した¹²⁾。

医学博士 甲第1255号 平成26年3月28日 (埼玉医科大学)

○著者は本学位論文の研究内容について他者との利害関係を有しません。

この事実は、血管内皮細胞から産生される何らかの因子が、破骨細胞の分化を抑制することを示している。

哺乳類のネトリン (netrin) ファミリーは、ラミニン (laminin) のスーパーファミリーに属し、分泌タンパク質である netrin-1, netrin-3, netrin-4, netrin-5 と、膜タンパク質である netrin-G1 と netrin-G2 が存在し、神経軸索の移動、リンパ管の発生や血管の新生に関与している^{13, 14)}。これらのリガンドの受容体として、Deleted in colorectal cancer (DCC), Neogenin (Neo1), Adenosine A2b receptor (Adora2b), Uncoordinated 5a, 5b, 5c, 5d (Unc 5a, b, c, d), Down's syndrome cell adhesion molecule (DSCAM) が知られている¹³⁾。血管内皮細胞は、Ntn1 と Ntn4 を強く発現している。血管形成において重要な Ntn1 は、白血球遊走能を抑制し^{15, 16)}、ヒトやラットにおける胎盤血管形成の発達に不可欠である¹⁷⁾。一方、Ntn4 はリンパ脈管新生を誘導するが、角膜上皮細胞の増殖および網膜における血管分枝を抑制する^{14, 18)}。しかしながら、netrin family の骨代謝における役割は不明である。

今回、われわれは、血管内皮細胞が Ntn4 を介して骨髄マクロファージに作用して破骨細胞分化を抑制し、Ntn4 が骨粗鬆症モデルマウスにおいて骨吸収を抑制し、骨量の低下を防ぐことを報告する。

材料および方法

1. 試薬

リコンビナントタンパク質として、リコンビナントマウス Ntn1 (1109-N1, R&D systems 社) および、リコンビナントマウス Ntn4 (1132-N4, R&D systems 社) を用いた。中和抗体による実験は、ヤギポリクロナール抗 Ntn1 抗体 (AF1109, R&D systems 社)、ヤギポリクロナール抗 Ntn4 抗体 (AF1132, R&D systems 社)、ウサギポリクロナール抗 DSCAM 抗体 (sc-79437, Santa Cruz 社)、陰性コントロールとして、Normal goat IgG (sc-45077, Santa Cruz 社)、Normal rabbit IgG (sc-3888, Santa Cruz 社) を用いた。免疫染色による実験は、ヤギポリクロナール抗 Ntn4 抗体、ヤギポリクロナール抗 PECAM-1 抗体 (sc-1506, Santa Cruz 社) を用いた。

2. 実験動物

実験に用いたすべてのマウスは C57BL/6 で、東京実験動物株式会社より購入し、埼玉医科大学動物施設において飼育した。また、実験は埼玉医科大学動物実験委員会による動物実験規程に従った (許可番号 No.1165)。

3. 細胞培養

マウス破骨細胞は、*in vitro* における確立された培養プロトコールに従い分化させた¹⁹⁾。すなわち、8～10 週齢の雌の C57BL/6 マウスの脛骨から採取した骨髄細胞を、10% のウシ胎児血清 (FBS)、1% のペニシ

リン・ストレプトマイシン (P/S) を添加した培養液 (MEM) で 16～20 時間培養し、培養後、上清に含まれた非接着細胞を 1×10^5 cell/cm² で播種し、10 ng/ml の M-CSF (Peprotech 社) を添加し、48 時間培養した。培養後の接着細胞を骨髄マクロファージ (BMMs) として使用し、10 ng/ml の M-CSF と 100 ng/ml の RANKL (Oriental Yeast 社) を加えて培養した。5 日間の培養後、10% のホルマリンで 5 分間固定し、50:50 のエタノールおよびアセトンで 1 分間再固定した。破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) を検出するために、naphthol AS-MX phosphate (Sigma-Aldrich 社) と fast red violet LB salt (Sigma-Aldrich 社) を添加した 50 mM の酒石酸含有緩衝液を用い、室温で染色した (TRAP 染色)。3 核以上の TRAP 陽性細胞を破骨細胞として計算した。マウス血管内皮細胞系の UV φ 2 (UV2: RCB1994) は、理化学研究所バイオリソースセンターによって提供された細胞を用いた。UV2 は、10% の FBS と 1% の P/S を添加した培養液 (α -MEM) で培養した。細胞間非接触型共培養のトランスウェルシステム (Corning 社) での実験は、下段に BMMs を 1×10^5 cell/cm² で、上段に UV2 を 3×10^4 cell/cm² で播種し、10 ng/ml の M-CSF と 100 ng/ml の RANKL の存在下で培養し、TRAP 染色した。すべての細胞培養は、2～3 日毎に培地交換を行い、二酸化炭素濃度 5%、37℃ の環境下で培養した。

4. 細胞増殖能の検討

BMMs を 96well-plate に 1×10^4 cell/cm² で播種し、M-CSF の存在下にリコンビナントマウス Ntn1 と Ntn4 を添加し、48 時間培養した。培養後は Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega 社) を用い、Model 680 XR plate reader (BIO RAD 社) で 490 nm の波長を測定し、定量化した²⁰⁾。

5. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法による遺伝子発現の評価

Total RNA は、ISOGEN (Nippon Gene 社) で抽出し、Super Script One-Step RT-PCR kit (Life Technologies 社) で、遺伝子発現解析を検討した。用いた遺伝子特有のプライマーは Table に示す。cDNA の合成は 45℃ で 30 分間インキュベートし、94℃ の 2 分間で停止した。得られた cDNA は 94℃ で 60 秒間の変性と 55℃ で 90 秒間のアニーリングと 72℃ で 180 秒間の伸長を 32 サイクル行い増幅した。

6. リアルタイム定量 PCR (Real-time qPCR) 法による発現遺伝子の定量

Applied Biosystems Prism 7900HT Sequence Detection System (Life Technologies 社) を用い、プロトコールは添付文書に従った²⁰⁾。プライマーは Taq Man Gene Expression Assays (Life Technologies 社) の NFATc1 (Mm00479445_m1), Cathepsin K (Ctsk) (Mm00484039_m1), GAPDH (Mm03302249_g1)

を用いた。Total RNAは、ISOGENで抽出し、逆転写酵素反応はHigh Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies 社)を用いた。ウラシル-DNA グリコシラーゼ (UNG) で、50℃で2分間処理し、AmpliTaQ Gold DNA ポリメラーゼで、95℃で15秒間の変性と60℃で60秒間のアニーリングと伸長を40サイクル行い、増幅した。得られた結果は、*GAPDH* を内部標準とし、相対的な値をApplied Biosystems Prism Sequence Detection Software version 2.1 (Life Technologies 社)で分析した。

7. drill-holeを利用した大腿骨損傷モデルマウス

drill-holeを利用した大腿骨損傷モデルは、8週齢の雄のマウスを用いた。ペントバルビタールナトリウム (20 mg/kg) の腹腔内麻酔をしたマウスの大腿骨前面の筋肉および骨膜を剝離し、骨面を露出させ、膝関節より6 mm 近位の大腿骨に直径1 mmの骨孔を骨髓腔まで形成した²¹⁾。形成後、6日および14日後に屠殺し、免疫組織化学的染色により検討した。

8. 免疫組織化学染色

大腿骨損傷モデルマウスはペントバルビタールナトリウム (20 mg/kg) の腹腔内注射を行い、4%のパラホルムアルデヒド (pH 7.4) にて灌流固定し、大腿骨を採取した。採取した大腿骨は、ドライアイスを加えたヘキサンを用いて、5%のカルボキシメチルセルロースジェルに包埋し、CM1900 cryostat (Leica Microsystems 社) で、5 μmの切片に薄切した。得られた骨修復時の大腿骨と骨孔の形成をしていない大腿骨の非脱灰切片は、Kawamoto's film methodで固定し²²⁾、PECAM-1およびNtn4の特異抗体をDAB法で染色した。その後、TRAP染色、ヘマトキシリンで対比染色した。

9. RANKL誘発性骨粗鬆症モデルマウス作製

7週齢雄マウスに対して、可溶性RANKL (sRANKL; 1 mg/kg) を24時間毎に、3日間腹腔内注射を行い、RANKL誘発性骨粗鬆症モデルマウスを作製した²³⁾。ネガティブコントロールとしてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を、ポジティブコントロールとしてゾレドロン酸 (zoledronic acid : Zol) を用い、PBS, Zol (100 μg/ml), Ntn4 (1 mg/kg) はsRANKL投与前に腹腔内注射を行った。sRANKL投与マウスに対する対照としてPBSのみを投与したマウスを用意した。最後の腹腔内注射の90分後に屠殺し、PBS群 (PBS), PBSとRANKLを投与した群 (RANKL-PBS), Ntn4とRANKLを投与した群 (RANKL-Ntn4), ZolとRANKLを投与した群 (RANKL-Zol), それぞれ6匹について骨形態計測の分析を行った。

10. 血清Ntn 4濃度測定

RANKL誘発性骨粗鬆症モデルマウスの血清中のNtn4の濃度測定は、mouse Ntn4 ELISA kit (CUSABIO 社) を用い、プロトコールは添付文書に従った。PBS, RANKL-PBS, RANKL-Ntn4の3群について、それぞれ6個のサンプルを測定した。

11. 骨形態計測分析

屠殺する5日前と2日前にカルセイン (Sigma 社) を25 mg/kgで腹腔内注射した。RANKLで誘発した骨粗鬆症モデルマウスは、屠殺後に4%のパラホルムアルデヒドで固定し、エタノールで脱水し、椎骨を採取した。採取した椎骨はメチルメタクリル酸塩で包埋し、RM2255 (Leica Microsystems 社) で、4~7 μmの切片に薄切した。得られた非脱灰切片は、フォンコッサ染色、トレイジンブルー染色およびTRAP染色を行った²⁾。形態

Table. RT-PCR用プライマーの一覧表

gene name	forward	reverse
<i>Ntn1</i>	TCCAAAGGCAAGCTGAAGAT	GGCATTACCCAACAGCAAGT
<i>Ntn3</i>	GCTTGCAGAGCTTGTGACTG	GCTCCACAGGACTGCTTTCT
<i>Ntn4</i>	GGCCTGGAAGATGATGTTGT	AATGGTGAGGTTTTGCGTTC
<i>Ntn5</i>	TCCTGCAAGTTAGGGGTCAC	CACACTGCTGACGGAGACAT
<i>DCC</i>	GCTTTTGTCTCAGCCAGGAC	CGCTCAAGTCATCCTGTTCA
<i>Adora2b</i>	TCCCGCTCAGGTATAAAGGTT	GGACACACCCAAAGAAGTTGA
<i>Neo1</i>	AGAGGGCATGAGTCAGAGGA	GCTGGAGTGGAAATGATGGT
<i>Unc5a</i>	ACCTCTGAGGCTGAGGACTTC	GGCTTGTGCAGAGTGAGGTAG
<i>Unc5b</i>	CCATGGACCGGTACCTAACT	TGGCTACCAGCATCTCACTCT
<i>Unc5c</i>	AACTCTCTTGGGGGTCACCT	TGCAGAGTGAGGATGACAGG
<i>Unc5d</i>	CCTGAGTCCTGAAGTCACCTG	ATGTGGACTCATCTCCACTG
<i>DSCAM</i>	GAGGCAGCCAAACAGAAGTC	GTCTGTGGTGAGGGTGTGTG
<i>β-actin</i>	AGAAGGACTCCTATGTGGGTGA	CATGATCTGGGTCATCTTTTCA

計測分析は、米国骨代謝学会 (American Society for Bone and Mineral Research : ASBMR) の一般命名法に基づいた分類計測に沿って、骨密度の骨量/組織量 (BV/TV; %), 骨形成速度の骨形成率/骨面積 (BFR/BS; $\mu\text{m}^3 \text{mm}^{-1} \text{yr}^{-1}$), 石灰化速度 (MAR; mm yr^{-1}), 骨芽細胞面 (Ob.S/BS; %), そして海綿骨・破骨細胞数 (N.Oc/B.Pm; per 100 mm) の項目を OsteoMeasure Analysis System (OsteoMetrics 社) で分析した²⁾.

12. 統計学的解析

すべての実験は、独立した3個以上の結果を分析し、平均値 (AVG) および平均値の標準誤差 (SEM) で分析した。また、2つの結果の比較は Student's t-tests を用い、3つ以上の結果の比較は One -Way Analysis of Variance and Bonferroni / Dunn methods で分析した (# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$)。

結果および成績

1. BMMs と UV 2 の非接触型共培養は破骨細胞分化を抑制する

Chikatsu らは、血管内皮細胞と骨髄マクロファージの非接触型共培養において、破骨細胞分化が抑制されることを報告した¹²⁾。われわれはマウス血管内皮細胞様細胞株 (UV2) が BMMs との非接触型共培養にて破骨細胞分化を抑制するかどうかを検討したところ、予想通り、UV2 が存在しない場合と比較して破骨細胞形成は抑制された (Fig. 1)。また、破骨細胞分化マーカー遺伝子である *NFATc1*, *calcitonin receptor (Calcr)*, *Ctsk* の発現は抑制された (data not included)。従って、血管内皮細胞から産出される分泌性の因子により、破骨細胞分化が抑制されることが示唆された。

2. Ntn 1 は破骨細胞分化を促進し、Ntn 4 は破骨細胞分化を抑制する

血管内皮細胞は netrin ファミリーを発現している^{24, 25)}。

UV2 が分泌型 netrin を発現しているかどうかを検討した。ポジティブコントロールとしてマウス脳抽出物 (MBE), 脾臓 (spleen), 白色脂肪組織 (WAT) を用い、ネガティブコントロールとして BMMs を用い、RT-PCR を行った。UV2 は、Ntn1 と Ntn4 を強く発現していたが、Ntn3 と Ntn5 はほとんど発現していなかった (Fig. 2A)。次にわれわれは、UV2 が発現する Ntn1 あるいは Ntn4 が破骨細胞分化を抑制する因子であると仮定し、リコンビナントマウス Ntn1 あるいはリコンビナントマウス Ntn4 を BMMs の培養時に RANKL と同時に添加し、M-CSF および RANKL の存在下にて5日間の培養を行った。その結果、破骨細胞形成は Ntn1 により促進されたが (Sup. Fig. 1A), Ntn4 により抑制された (Fig. 2B)。Ntn1 の添加により *Ctsk* の発現は上昇していたものの *NFATc1* の発現に変化はなかった (Sup. Fig. 1B)。Ntn4 の添加により *NFATc1* と *Ctsk* の発現は下降していた (Fig. 2C)。一方で、リコンビナントマウス Ntn1 あるいは Ntn4 の添加により BMMs の細胞増殖に影響を与えなかった (Sup. Fig. 2)。

3. UV 2 から産生された Ntn 4 は破骨細胞分化を抑制する

次に、UV2 から産生される Ntn1 あるいは Ntn4 が、破骨細胞分化を抑制するかどうかを検討した。M-CSF および RANKL の存在下、UV2 と BMMs の非接触型共培養に Ntn1 あるいは Ntn4 の中和抗体を添加する実験を行った。Ntn4 の中和抗体は、破骨細胞形成を有意に促進したが (Fig. 3), Ntn1 の中和抗体は、破骨細胞形成に影響を与えなかった (Sup. Fig. 1C)。

4. BMMs と UV 2 の非接触型共培養により BMMs における DSCAM 受容体の発現が上昇する

次に、BMM が netrin 受容体を発現しているかどうか検討した。BMMs を RANKL にて5日間刺激後に受容体の mRNA 発現をみたところ、破骨

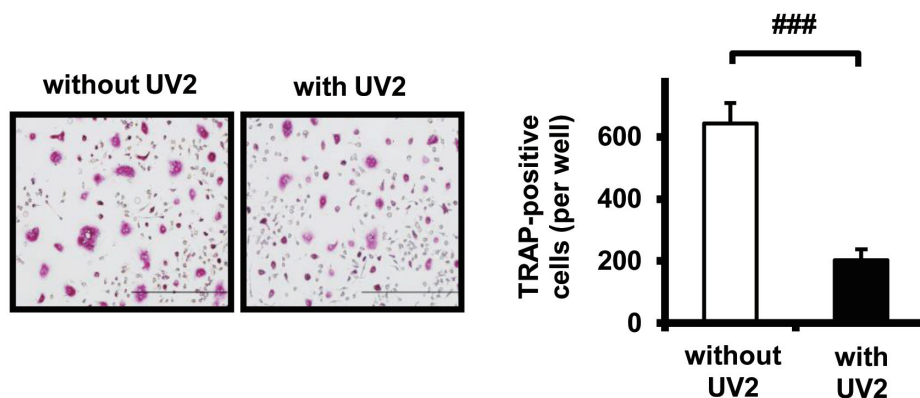


Fig. 1. 血管内皮細胞様細胞株と骨髄マクロファージの非接触型共培養は破骨細胞分化を抑制する。血管内皮細胞様細胞株 (UV2) と骨髄マクロファージ (BMMs) の非接触型共培養時の破骨細胞分化の TRAP 染色像と TRAP 陽性細胞の細胞数比較。Scale bar; 400 μm , AVG $\pm$ SEM, ###; $p < 0.001$.

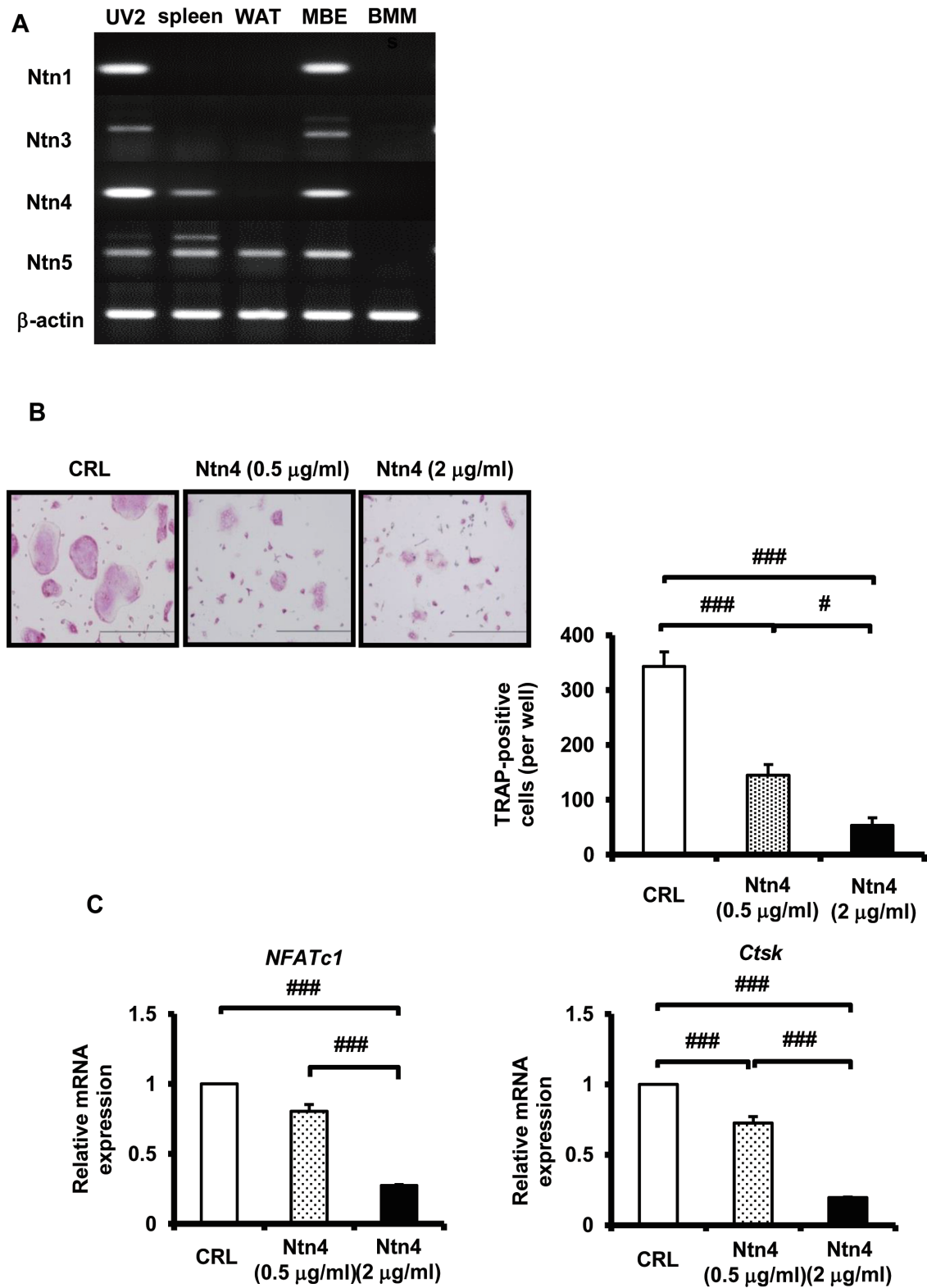
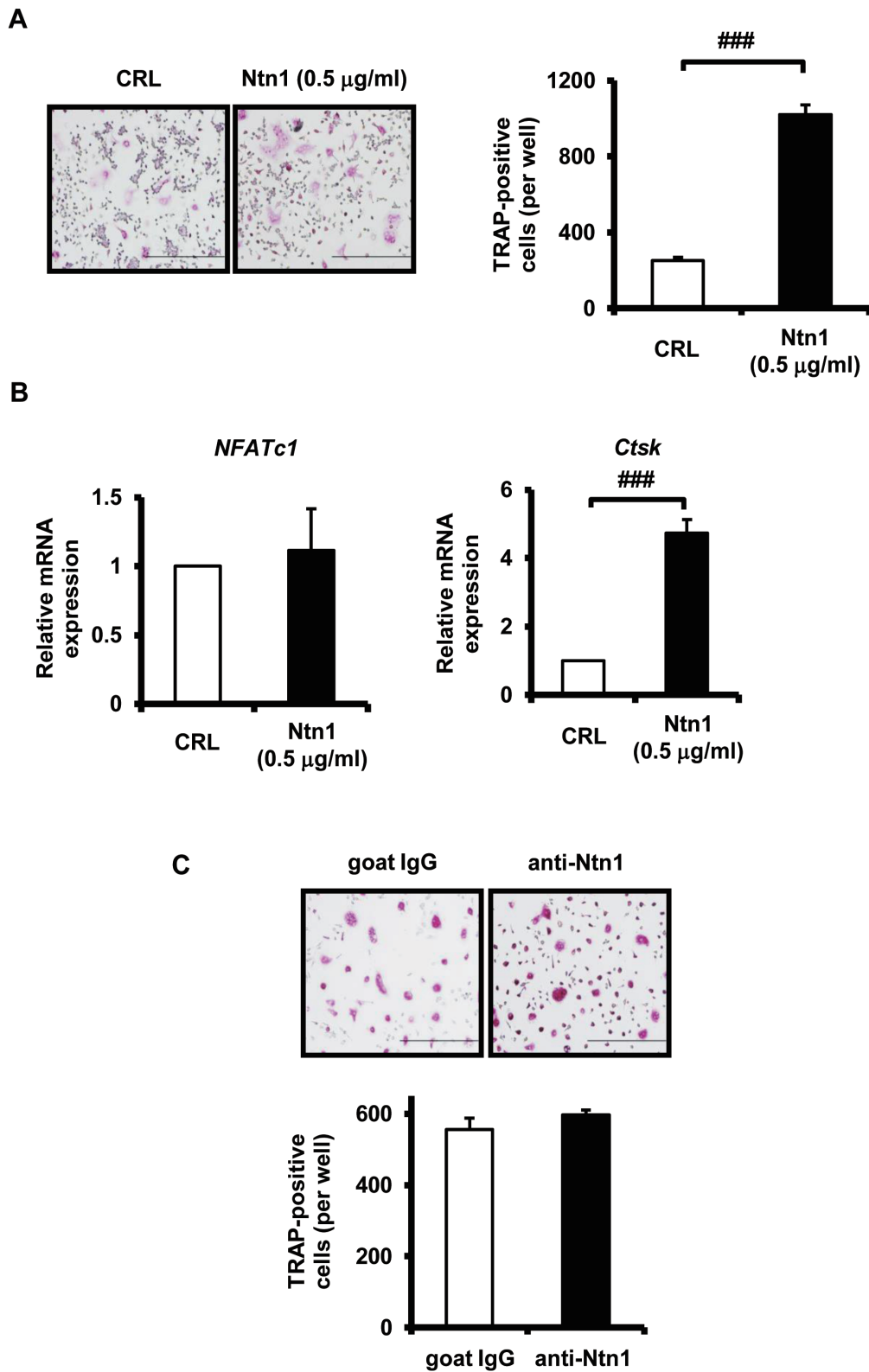
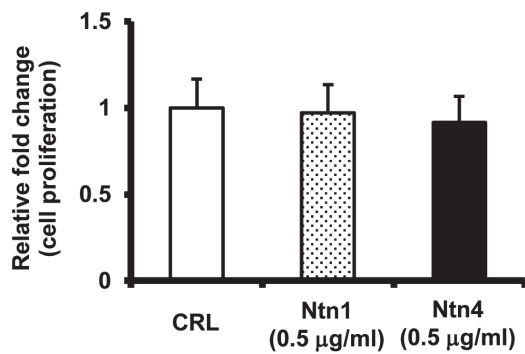


Fig. 2. 血管内皮細胞様細胞株と骨髄マクロファージの非接触型共培養の破骨細胞分化はNtn4を介して抑制する。A) RT-PCRによるUV2の分泌型netrinの発現分析：分泌型netrin (netrin-1 (Ntn1), netrin-3 (Ntn3), netrin-4 (Ntn4), netrin-5 (Ntn5)), 内部標準 (β-actin)：コントロール(マウス脳抽出物 (MBE), 脾臓 (spleen), 白色脂肪組織 (WAT), BMMs)。B) BMMsの分化培養時にリコンビナントマウスNtn4を添加した時の破骨細胞分化のTRAP染色像とTRAP陽性細胞の細胞数比較：Ntn4の培養液濃度 (0.5 μg/ml, 2 μg/ml)。C) Bの破骨細胞のReal-time qPCRによる破骨細胞分化マーカー遺伝子の分析：マーカー遺伝子 (*NFATc1*, *Ctsk*)。CRL (control), Scale bar; 400 μm, AVG ± SEM, ###; $p < 0.001$.



Sup. Fig. 1. Ntn1は破骨細胞分化を抑制しない. A) BMMsの分化培養時にリコンビナントマウスNtn1を添加した時の破骨細胞分化のTRAP染色像とTRAP陽性細胞の細胞数比較: Ntn1の培養液濃度 (0.5 µg/ml). B) Aの破骨細胞のReal-time qPCRによる破骨細胞分化マーカー遺伝子の分析: マーカー遺伝子 (*NFATc1*, *Ctsk*). C) 血管内皮細胞様細胞株 (UV2) と骨髄マクロファージ (BMMs) の非接触型共培養にNtn1の中和抗体を添加した時の破骨細胞分化のTRAP染色像とTRAP陽性細胞の細胞数: コントロール (normal goat-IgG): 培養液濃度 (100 ng/ml). CRL (control), Scale bar; 400 µm, AVG ± SEM, ###; $p < 0.001$.



Sup. Fig. 2. Ntn1およびNtn4は骨髄マクロファージの増殖に影響しない。骨髄マクロファージ (BMMs) に培養時にリコンビナントマウスNtn1およびNtn4を添加による細胞増殖試験：Ntn1およびNtn4の培養液濃度(0.5 µg/ml)。CRL(control), AVG ± SEM.

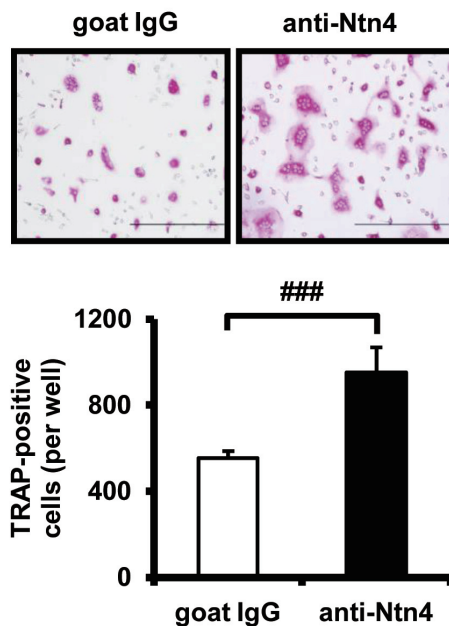


Fig. 3. 血管内皮細胞由来のNtn4は非接触型共培養において破骨細胞分化を抑制する血管内皮細胞様細胞株 (UV2) と骨髄マクロファージ (BMMs) の非接触型共培養にNtn4の中和抗体を添加した時の破骨細胞分化のTRAP染色像とTRAP陽性細胞の細胞数：コントロール (normal goat-IgG)：培養液濃度 (100 ng/ml)。Scale bar; 400 µm, AVG ± SEM, ###; $p < 0.001$.

細胞はAdora2b, Neo1, Unc5b, DSCAMを発現していた (Fig. 4A)。さらに、UV2との共培養において、これらの受容体の遺伝子発現を定量したところ、DSCAMが有意に上昇していた (Fig. 4B)。DSCAM受容体が破

骨細胞形成を抑制するのに重要かどうかを検討するために、DSCAMの細胞外ドメインを認識する抗体を加えたところ、破骨細胞形成の抑制が解除された (Fig. 4C)。

5. 骨組織における血管内皮細胞はNtn 4を発現する

*in vivo*での骨組織においても、血管内皮細胞はNtn4を発現するかどうかを組織学的に観察するために、大腿骨に骨孔を形成し、その治癒過程を観察する実験を行った。骨孔形成後6日目および14日目にサンプリングを行い、それぞれの時期においてPECAM-1とNtn4の免疫染色を行った。Fig. 2Aで血管内皮細胞にNtn4が発現していることと一致して、6日後および14日後の大腿骨の修復過程においても、Ntn4はPECAM-1陽性の血管組織に主に局在していた (Fig. 5)。また、未処置の大腿骨においても、Ntn4はPECAM-1陽性の血管組織に主に局在していた (Sup. Fig. 3)。以上の結果から、*in vivo*の骨組織における血管内皮細胞にも、Ntn4を発現すると示唆される。また、骨修復時の一部のTRAP陽性細胞は、血管内皮細胞およびNtn4陽性細胞の近傍に局在していた (Fig. 5)。

6. Ntn 4 はRANKL 誘導性骨粗鬆症モデルマウスの骨量の減少を抑制する

*in vivo*におけるNtn4の骨代謝における作用を調べるためにRANKLを投与して骨粗鬆症を引き起こすモデルマウスを用いた²³⁾。7週齢の雄のマウスに24時間の間隔でRANKLを投与し骨吸収を誘導させた (Fig. 6A)。Ntn4の予防的効果を検討するために、Ntn4を腹腔内注射したマウスの腰椎について骨形態計測を行った。陰性コントロールとしてPBSを、陽性コントロールとしてZolを腹腔内注射したマウスを分析した。その結果、Ntn4は、破骨細胞形成の抑制を介して、骨量の低下を防いだ (Fig. 6A, B)。一方で、骨形成速度、石灰化速度、骨芽細胞数には影響を与えなかった (Fig. 6C-E)。また、Ntn4を投与したマウスでは対照よりも血清中のNtn4濃度は有意に高かった (Sup. Fig. 4)。

考 察

netrinファミリーは軸索誘導や血管形成において不可欠な因子である¹³⁾が、骨代謝における役割は解明されていなかった。本研究において、血管内皮細胞が破骨細胞分化を制御することを明らかにし、Ntn1が破骨細胞分化を促進し、Ntn4が破骨細胞分化を抑制することを明らかにした。また、Ntn4は、血管内皮細胞から産生される破骨細胞分化抑制因子の1つであることを明らかにした。これは次の理由に依る。まずは、M-CSFおよびRANKL存在下でのBMMsの培養において、Ntn1ではなくNtn4が破骨細胞分化を抑制することである。次に、非接触型共培養において破骨

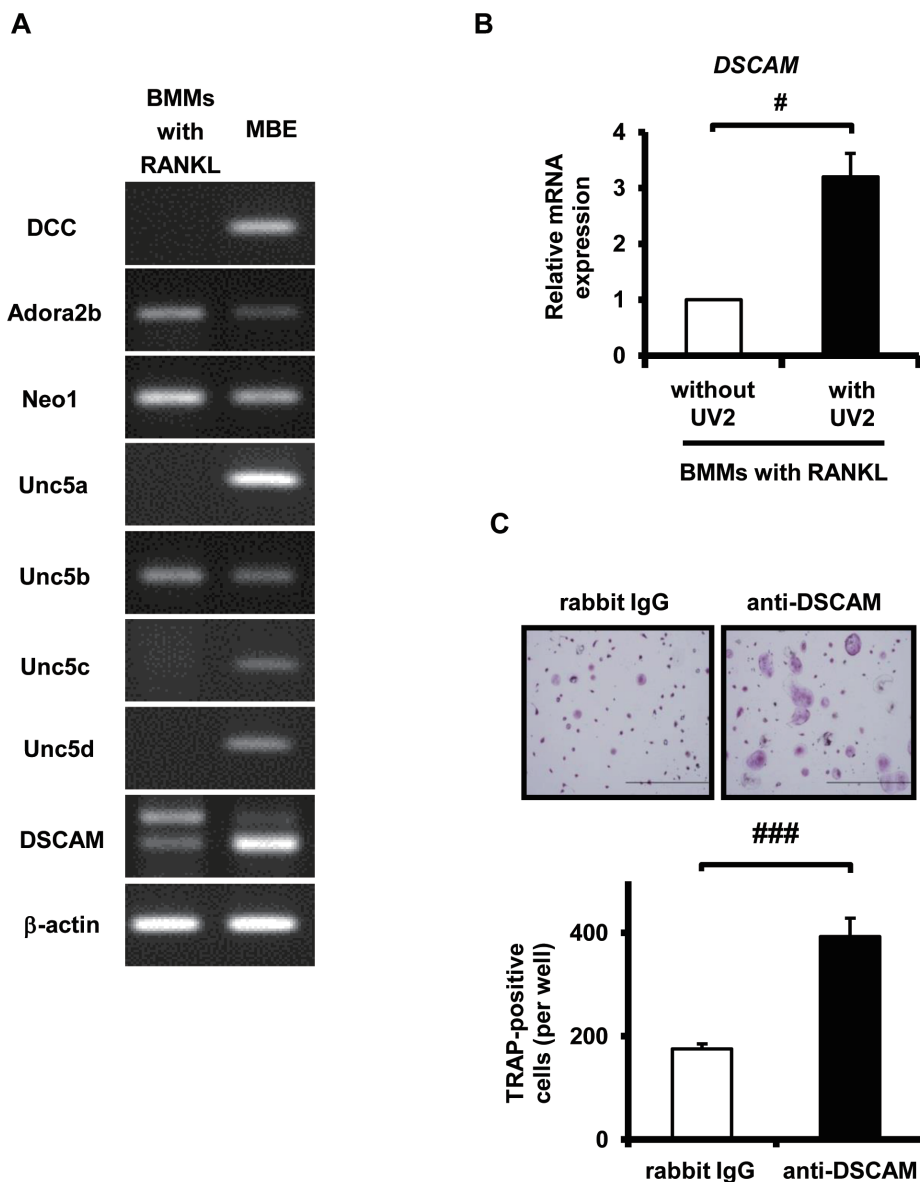


Fig. 4. DSCAMは非接触型共培養において破骨細胞分化を抑制する役割がある. A) RT-PCRによるM-CSFおよびRANKL存在下の骨髄マクロファージ (BMMs) のnetrin受容体の発現分析: netrin受容体 (Deleted in Colorectal Cancer (DCC), adenosine A2b receptor (Adora2b), neogenin (Neo1), uncoordinated 5a, 5b, 5c, 5d (Unc5a, 5b, 5c, 5d), Down's syndrome cell adhesion molecule (DSCAM)), 内部標準 (β -actin): コントロール (マウス脳抽出物 (MBE)). B) 血管内皮細胞様細胞株 (UV2) と骨髄マクロファージ (BMMs) の非接触型共培養時の破骨細胞のReal-time qPCRによるDSCAM遺伝子の分析. C) UV2とBMMsの非接触型共培養にDSCAMの中和抗体を添加した時の破骨細胞分化のTRAP染色像とTRAP陽性細胞の細胞数: コントロール (normal rabbit-IgG): 培養液濃度 (100 ng/ml). Scale bar; 400 μ m, AVG $\pm$ SEM, #; $p < 0.05$, ###; $p < 0.001$.

細胞分化の抑制が、Ntn1ではなくてNtn4の中和抗体で解除されることである。

Ntn1はUnc5bを介して血管形成を抑制させる²⁶⁾。また、Ntn1はDCCを介して血管形成を促進させる¹⁶⁾が、Ntn4はUnc5a-d, Adora2b, DCC, Neo1以外の受容体を介して血管形成を促進させることが報告されている。本研究において、

Ntn1は破骨細胞分化を促進させることを見出した。同様に、MedieroらはNtn1が破骨細胞分化促進因子であることを発表している²⁷⁾。興味深いことに、彼らはNtn1による破骨細胞分化促進は、破骨細胞におけるUnc5bを介していると主張している。Unc5bはマクロファージに発現しており、Ntn1はUnc5bを介してマクロファージによるアテローム

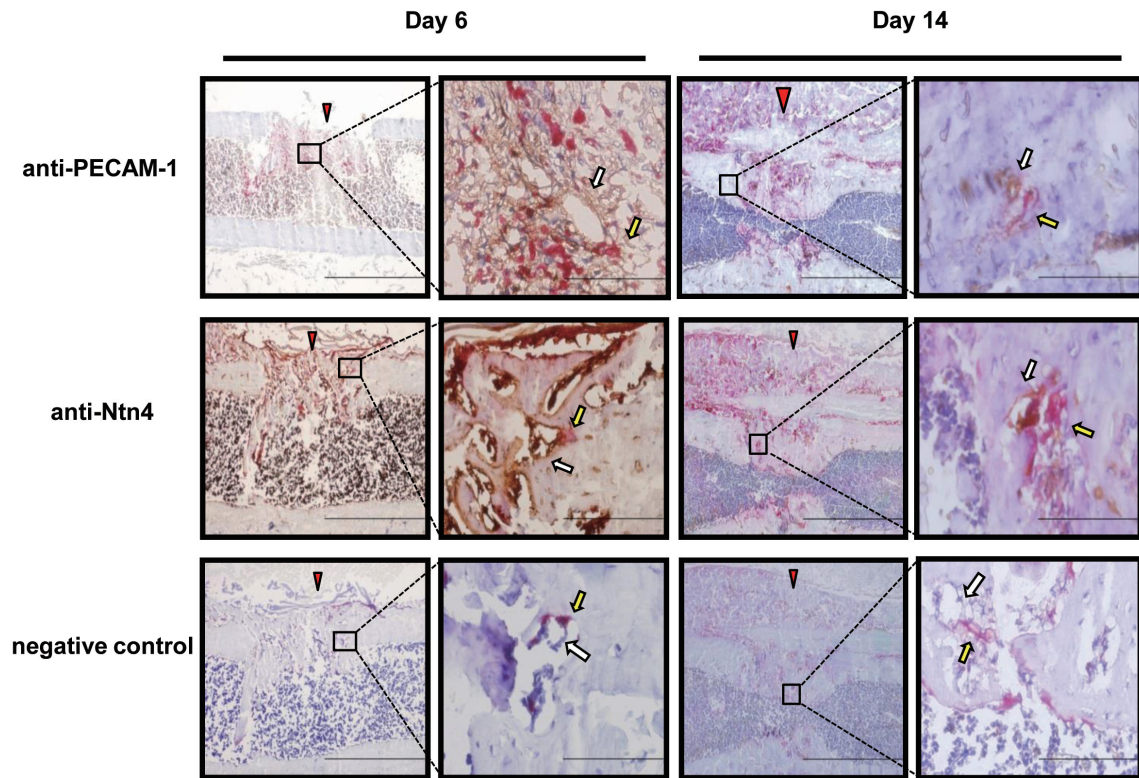
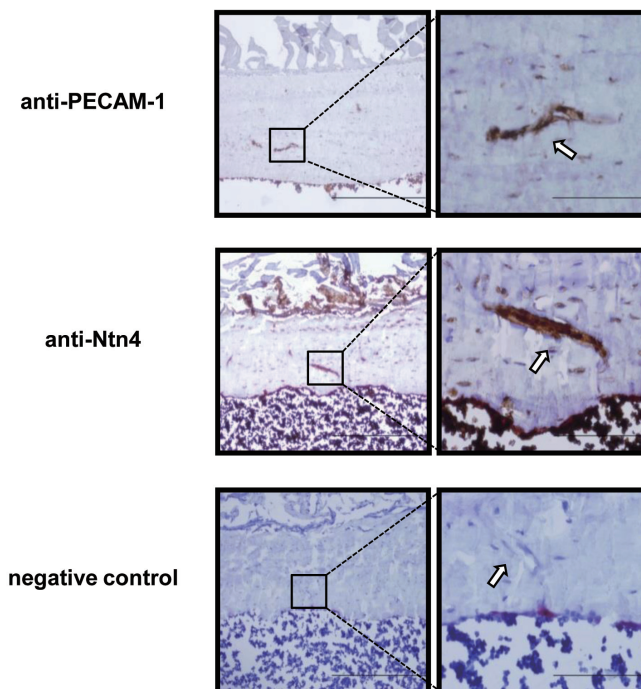


Fig. 5. *in vivo*において骨修復時の血管内皮細胞はNtn4を発現する. 6日間と14日間の治癒過程を得た大腿骨損傷モデルマウスのDrill-hole部のNtn4陽性細胞と血管内皮細胞: 上段 (PECAM-1抗体の免疫染色), 中段 (Ntn4抗体の免疫染色), 下段 (コントロール), 白矢 (血管内皮細胞), 黄矢 (破骨細胞). 弱拡大 Scale bar; 1000 μ m, 強拡大 Scale bar; 100 μ m.



Sup. Fig. 3. *in vivo*において未処置の大腿骨の血管内皮細胞はNtn4を発現する. 損傷の加えていないマウス大腿骨においてNtn4陽性細胞と血管内皮細胞: 上段 (PECAM-1抗体の免疫染色), 中段 (Ntn4抗体の免疫染色), 下段 (コントロール), 白矢 (血管内皮細胞). Scale bar; 弱拡大; 1000 μ m, 強拡大 Scale bar; 100 μ m.

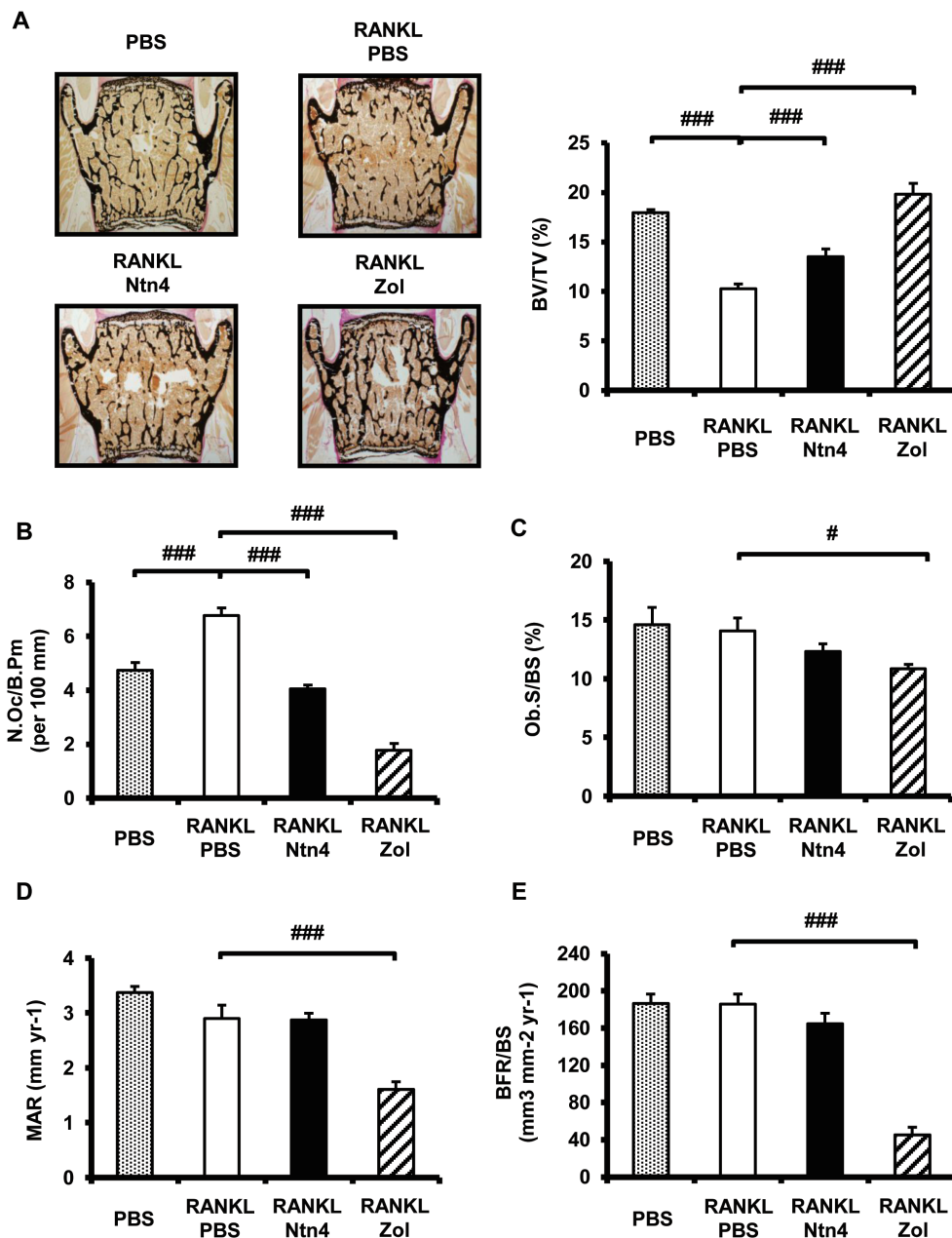
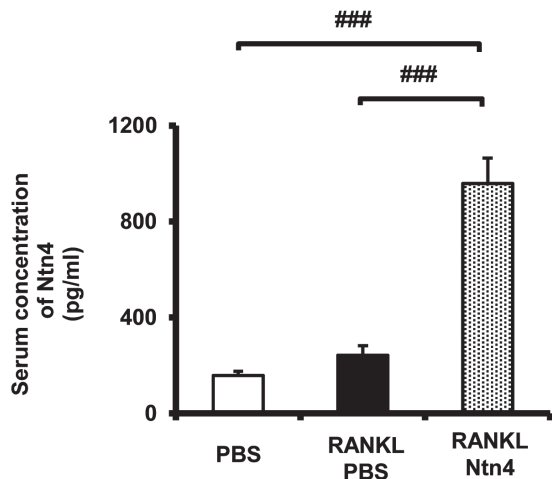


Fig. 6. *in vivo*においてNtn4は骨量の低下を防止する。Ntn4を腹腔内注射した骨粗鬆症モデルマウスの椎骨の組織形態計測的分析：PBSのみ群 (PBS), PBSを投与したRANKL誘発モデルマウス群 (RANKL-PBS), Ntn4を投与したRANKL誘発モデルマウス群 (RANKL-Ntn4), zoledronic acid (Zol)を投与したRANKL誘発モデルマウス群 (RANKL-Zol)：A) フォンコッサ染色の組織像と骨密度の骨量/組織量 (BV/TV; %). B) 海綿骨・破骨細胞数 (N.Oc/B.Pm; per 100 mm). C) 骨芽細胞面 (Ob.S/BS; %). D) 骨形成速度の骨形成率/骨面積 (BFR/BS; $\mu\text{m}^3 \text{mm}^{-1} \text{yr}^{-1}$). E) 石灰化速度 (MAR; mm yr^{-1}). AVG $\pm$ SEM, #; $p < 0.05$, ###; $p < 0.001$.

硬化症を促進することが報告されている^{28, 29)}。今回の研究で、血管内皮細胞との共培養で破骨細胞のDSCAM受容体発現が上昇しており、血管内皮細胞の破骨細胞分化抑制は、DSCAM受容体が主である可能性があると考えられたため、DSCAM抗体を共培養系に添加する実験を行ったところ、破骨細胞分化抑制が解除されたことから、血管内皮細胞による破骨

細胞分化抑制は、DSCAMを介している可能性が示唆された。しかしながら、今回の研究では他のUnc5b, Adora2b, Neol1受容体について検討していないため、これらの受容体を介している可能性も否定はできない。

DSCAMを介してnetrinと同じ軸索誘導因子であるセマフォリン (semaphorin) ファミリーの中で、semaphorin3Aは、Ntn4と同じように破骨細胞分化を



Sup. Fig. 4. *in vivo*においてNtn4の腹腔内投与は血清中のNtn4濃度を上昇させる。Ntn4を腹腔内注射した骨粗鬆症モデルマウスのmouse Ntn4 ELISA kitによる血清中の濃度測定：PBSのみ群 (PBS), PBSを投与したRANKL誘発モデルマウス群 (RANKL-PBS), Ntn4を投与したRANKL誘発モデルマウス群 (RANKL-Ntn4), 腹腔内投与濃度 (1 mg/kg). AVG $\pm$ SEM, ###; $p < 0.001$.

抑制する^{2,30)}。そしてまた, semaphorin6Dは, Ntn1と同じように破骨細胞分化を促進する³¹⁾。semaphorin6Dは, 免疫グロブリン-プレキシン転写制御領域をもつplexin-A1と結合する。このplexin-A1は, Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) / DNAX-activation protein 12 (DAP12) 複合体と関係し, 破骨細胞分化を促進する。一方で, semaphorin3Aは, neuropilin-1と結合するが, これによりTREM2/DAP12複合体が分離し, 破骨細胞分化を抑制することが報告されている³⁰⁾。netrinの受容体のひとつであるDSCAMは, 免疫グロブリン-タイプC2領域を持つため, Ntn4がこのDSCAMを介してsemaphorin3Aと同じように作用する可能性が考えられる。現在われわれは, この仮説に関して検討中である。

血管は骨端部や骨幹部の海綿骨, 軟骨層や皮質骨に入り込み, 骨の隅々まで血管が張り巡らされている⁹⁾。今回の実験でも, 骨幹部の皮質骨や骨修復時の骨組織に血管内皮細胞を認め, Ntn4を発現していた。従って, *in vivo*においてもNtn4は, 血管内皮細胞から産生される破骨細胞分化抑制因子の1つであることが示唆される。また, 骨損傷修復時に多く発現する破骨細胞の一部は, 血管内皮細胞の近傍に認めた。抑制因子を産生する細胞が近傍にある例として, 骨芽細胞が破骨細胞に接触して破骨細胞分化抑制因子であるosteoprotegerinを産生することが

あげられる。骨芽細胞がRANKLとOPGという作用の相反する因子を産生するように, 血管内皮細胞もNtn1とNtn4という作用の相反する因子を産生する。このように同じ細胞が作用の相反する因子を産生することは大変興味深い, 何故このようなシステムを備えているか, 骨修復時の血管内皮細胞はどの因子が重要かを解明するには今後さらなる研究が必要である。なぜ, 血管が破骨細胞分化を抑制する必要があるのだろうか。メカニカルストレスなどさまざまな外的ストレスを骨が受けると, 骨リモデリング領域における種々の細胞もストレスを受けると考えられる。たとえば, 骨芽細胞においてはメカニカルストレスでRANKL発現が上昇し³²⁾, 虚血状態の血管内皮細胞ではNtn4が過剰に産生される³³⁾。骨折や過重負荷など病的状態において, 破骨細胞前駆細胞は骨芽細胞由来のRANKLにより刺激を受け一方, 血管内皮細胞はNtn4を産生して破骨細胞分化を抑制して, 破骨細胞分化を制御しているメカニズムをわれわれは考えている。

骨における血管内皮細胞は特徴的であることが報告されている³⁴⁾。Streetenらは, 骨髄由来血管内皮細胞は副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone : PTH) に反応するが, 肺動脈由来内皮細胞は反応しないことを示した³⁵⁾。本研究で使用した血管内皮細胞は骨髄由来ではないため, われわれのモデルには限界がある。

われわれは, Ntn4が破骨細胞数を抑制することで骨粗鬆症モデルマウスの骨量低下を防止することを示した。この*in vivo*における結果は, *in vitro*におけるNtn4が破骨細胞分化を抑制する結果と一致した。さらに, Ntn4を*in vivo*において投与することで, 生理的濃度のおよそ5倍になることが明らかとなった。Ntn4は血管新生を促進すること³⁶⁾を考慮すると, Ntn4が血管と骨構造の再構築を必要とする骨疾患である骨粗鬆症や歯周炎の治療薬として有用な因子となることが示唆される。

結論および要約

本研究では, 血管内皮細胞は骨髄マクロファージにNtn4を介して作用し, 破骨細胞分化抑制することで, 骨量低下を予防し, 骨減少性疾患の有用な予防薬になりえることを示した。そして, 脈管系がnetrinを介して骨代謝の制御に関与していることを示した。しかしながら, 血管と骨組織の相互作用はまだ不明な点が多く存在する。よって今後も引き続き, 更なる実験が必要であると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり, ご指導をいただきました埼玉医科大学口腔外科学教室 依田哲也教授に心より感謝いたします。また, 直接ご指導をいただきました

埼玉医科大学口腔外科学教室 佐藤毅講師に心より感謝いたします。また、議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた埼玉医科大学整形外科教室 田中伸哉講師、埼玉医科大学中央研究施設形態部門 穂田真澄教授、埼玉医科大学ゲノム医学研究センター ゲノム科学部門 須田立雄客員教授、松本征仁講師に心より感謝いたします。また、実験手技のご指導頂いた早川万里子氏、関川三四子氏、松本幸子氏に心より感謝いたします。

引用文献

- 1) Karsenty G, Ferron M. The contribution of bone to whole-organism physiology. *Nature* 2012;481(7381):314-20.
- 2) Fukuda T, Takeda S, Xu R, Ochi H, Sunamura S, Sato T, et al. Sema3A regulates bonemass accrual through sensory innervations. *Nature* 2013;497(7450):490-3.
- 3) Takeda S, Eleftheriou F, Lévassieur R, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 2002;111(3):305-17.
- 4) Clarkin C, Olsen BR. On bone-forming cells and blood vessels in bone development. *Cell Metab* 2010;12(4):314-6.
- 5) Saito D, Takase Y, Murai H, Takahashi Y. The dorsal aorta initiates a molecular cascade that instructs sympatho-adrenal specification. *Science* 2012;336(6088):1578-81.
- 6) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999;20(3):345-57.
- 7) Chambers TJ. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol* 2000;192(1):4-13.
- 8) Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15(1):2-12.
- 9) Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, et al. Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013;24(3):297-310.
- 10) Trebec-Reynolds DP, Voronov I, Heersche JN, Manolson MF. VEGF-A expression in osteoclasts is regulated by NF-kappaB induction of HIF-1alpha. *J Cell Biochem* 2010;110(2):343-51.
- 11) Alam AS, Gallagher A, Shankar V, Ghatei MA, Datta HK, Huang CL, et al. Endothelin inhibits osteoclastic bone resorption by a direct effect on cell motility: implications for the vascular control of bone resorption. *Endocrinology* 1992;130(6):3617-24.
- 12) Chikatsu N, Takeuchi Y, Fukumoto S, Yano K, Fujita N, Tsuruo T, et al. Clonal endothelial cells produce humoral factors that inhibit osteoclast-like cell formation in vitro. *Endocr J* 2002;49(4):439-47.
- 13) Rajasekharan S, Kennedy TE. The netrin protein family. *Genome Biol* 2009;10(9):239.
- 14) Larrieu-Lahargue F, Welm AL, Thomas KR, Li DY. Netrin-4 induces lymphangiogenesis in vivo. *Blood* 2010;115(26):5418-26.
- 15) Ly NP, Komatsuzaki K, Fraser IP, Tseng AA, Prodhon P, Moore KJ, et al. Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(41):14729-34.
- 16) Park KW, Crouse D, Lee M, Karnik SK, Sorensen LK, Murphy KJ, et al. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(46):16210-5.
- 17) Xie H, Zou L, Zhu J, Yang Y. Effects of netrin-1 and netrin-1 knockdown on human umbilical vein endothelial cells and angiogenesis of rat placenta. *Placenta* 2011;32(8):546-53.
- 18) Li YN, Pinzon-Duarte G, Dattilo M, Claudepierre T, Koch M, Brunken WJ. The expression and function of netrin-4 in murine ocular tissues. *Exp Eye Res* 2012;96(1):24-35.
- 19) Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Yamashita T, Hosoya A, et al. Identification of cell cycle arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *J Cell Biol* 2009;184(4):541-54.
- 20) Sato T, Abe T, Chida D, Nakamoto N, Hori N, Kokabu S, et al. Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts. *FEBS Lett* 2010;584(4):817-24.
- 21) Tanaka K, Tanaka S, Sakai A, Ninomiya T, Arai Y, Nakamura T. Deficiency of vitamin A delays bone healing process in association with reduced BMP2 expression after drillhole injury in mice. *Bone* 2010;47(6):1006-12.
- 22) Kawamoto T, Shimizu M. A method for preparing 2- to 50-micron-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. *Histochem Cell Biol* 2000;113(5):331-9.
- 23) Tomimori Y, Mori K, Koide M, Nakamichi Y, Ninomiya T, Udagawa N, Yasuda H. Evaluation of pharmaceuticals with a novel 50-hour animal model

- of bone loss. *J Bone Miner Res* 2009;24(7):1194-205.
- 24) Yebra M, Diaferia GR, Montgomery AM, Kaido T, Brunken WJ, Koch M, et al. Endothelium-derived Netrin-4 supports pancreatic epithelial cell adhesion and differentiation through integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$. *PLoS One* 2011;6(7):e22750.
- 25) van Gils JM, Ramkhalawon B, Fernandes L, Stewart MC, Guo L, Seibert T, et al. Endothelial expression of guidance cues in vessel wall homeostasis dysregulation under proatherosclerotic conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(5):911-9.
- 26) Lu X, Le Noble F, Yuan L, Jiang Q, De Lafarge B, Sugiyama D, et al. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* 2004;432(7014):179-86.
- 27) Mediero A RB, Purdue E, Goldring S, Moore K, Cronstein B. Netrin1 is a critical autocrine factor for osteoclast differentiation. *Proceedings of the American Society for Bone and Mineral Research 2013 Annual Meeting*; 2013 Oct4-7; Baltimore, Maryland. USA:110.
- 28) Ramkhalawon B, Yang Y, van Gils JM, Hewing B, Rayner KJ, Parathath S, et al. Hypoxia induces netrin-1 and Unc5b in atherosclerotic plaques: mechanism for macrophage retention and survival. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(6):1180-8.
- 29) van Gils JM, Derby MC, Fernandes LR, Ramkhalawon B, Ray TD, Rayner KJ, et al. The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. *Nat Immunol* 2012;13(2):136-43.
- 30) Hayashi M, Nakashima T, Taniguchi M, Kodama T, Kumanogoh A, Takayanagi H. Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature* 2013;485(7396):69-74.
- 31) Takegahara N, Takamatsu H, Toyofuku T, Tsujimura T, Okuno T, Yukawa K, et al. Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat Cell Biol* 2006;8(6):615-22.
- 32) Kreja L, Liedert A, Hasni S, Claes L, Ignatius A. Mechanical regulation of osteoclastic genes in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368(3):582-7.
- 33) Hoang S, Liauw J, Choi M, Guzman RG, Steinberg GK. Netrin-4 enhances angiogenesis and neurologic outcome after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29(2):385-97.
- 34) Brandi ML, Collin-Osdoby P. Vascular biology and the skeleton. *J Bone Miner Res* 2006;21(2):183-92.
- 35) Streeten EA, Ornberg R, Curcio F, Sakaguchi K, Marx S, Aurbach GD, et al. Cloned endothelial cells from fetal bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(3):916-20.
- 36) Wilson BD, Ii M, Park KW, Suli A, Sorensen LK, Larrieu-Lahargue F, et al. Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis. *Science* 2006;313(5787):640-4.