

氏名	浜田 勇作
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第7027号
学位授与の日付	令和6年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	IGFBP5による破骨細胞分化および骨吸収メカニズムの解明
論文審査委員	山本 直史 教授      吉田 竜介 教授      窪木 拓男 教授

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

骨粗鬆症による重度の骨量減少は病的な骨折を誘発し、生活の質を著しく低下させる。骨粗鬆症の病理的メカニズムに関連する研究は、高齢者の生活の質だけでなく、関連した医療費の削減にも貢献すると言える。骨代謝に関連してインスリン様成長因子(Insulin-like growth factor : IGF)は内分泌、傍分泌、および自己分泌に関与し生物学的機能調整を行い、骨芽細胞に対して分化、成熟を促進することが知られている。骨芽細胞はreceptor activator of NF- $\kappa$ B ligand(RANKL)とマクロファージコロニー刺激因子(macrophage colony stimulating factor : M-CSF)という破骨細胞形成に必須のサイトカインを発現するため間接的に IGF は破骨細胞形成に関与している。また IGF 結合タンパク質(Insulin-like growth factor binding protein : IGFBP)はIGFRよりも親和性が高く IGF の結合を阻害する働きや、細胞外マトリクスと結合することで IGF の作用を増強したり、IGFBP が単独で特異的な受容体に結合したりすることで標的細胞へ作用することが知られている。なかでも IGFBP5 は骨芽細胞において IGF の作用を促進することが明らかとなっている。しかしながら IGFBP5 に関しても破骨細胞に対する作用は不明な点が多いことが現状である。そこで 骨と関連の深い IGFBP5 シグナルによる破骨細胞分化および骨代謝の調整機構に対する影響を解析することを本研究の目的とした。

### 【材料ならびに方法】

C57BL/6J マウス(WT マウス)および *IGFBP5*<sup>-/-</sup>マウス(理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研センター生体モデル開発ユニット/生体ゲノム光学研究チームより提供; CDB0503K)を使用し実験を行った。破骨細胞分化ステージでの IGFBP5 の役割を解析するために、WT マウスの大腿骨よりマウス骨髄由来マクロファージ(mouse bone marrow-derived macrophages : mBMMs)を採取し、加温加湿中(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)の環境下で RANKL(100 ng/ml)および M-CSF(50 ng/ml)にて刺激を行った。刺激後の IGFBP5 の発現を qPCR, Western blot により解析した。次にレトロウイルスを用いて IGFBP5 を過剰発現させた mBMMs を用いて破骨細胞への分化・機能を酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP)染色, アクチンリング染色, 骨吸収アッセイ, Pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (CTX)-ELISA にて評価した。また IGFBP5shRNA レンチウイルスを用いて IGFBP5 ノックダウン mBMMs の破骨細胞への分化を qPCR にて解析した。*IGFBP5*<sup>-/-</sup>マウスより採取した mBMMs を用いて RANKL による刺激応答や各種破骨細胞に関わるマーカーを western blot により解析した。さらに IGFBP5 の各ドメインである IGF binding domain 欠失体( $\Delta$ IGFBD)や Thyroglobulin type-1 domain 欠失体( $\Delta$ Thy)を作製しレスキュー実験を行った。また *in vivo* においてリコンビナント IGFBP5 と IGFBP5 中和抗体を投与し、大腿骨部の解析を Micro Computed Tomography ( $\mu$ CT)を用いて行った。

### 【結果】

mBMMs を RANKL(100 ng/ml)と M-CSF(50 ng/ml)で刺激した後、48時間で mRNA レベルでの IGFBP5 の著しい発現上昇が認められた。また Western blot の結果より破骨細胞の初期の分化マーカーである Nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATc1)と発現パターンが類似していることが明らかと

なった。IGFBP5 遺伝子 WT マウス破骨細胞に過剰発現させたところ、TRAP 染色において破骨細胞形成の亢進、ピットアッセイの結果より吸収範囲の増加が認められた。また CTx-ELISA から骨吸収能の有意な増加を認めた。IGFBP5 ノックダウン mBMMs を破骨細胞へ分化させ、破骨細胞形成の比較を行った。IGFBP5 をノックダウンすると著しい破骨細胞数の減少がみられた。また qPCR を用いて解析したところ、各種破骨細胞マーカーの発現低下を認めた。IGFBP5<sup>-/-</sup>における Western blot 解析による各種破骨細胞マーカーの減弱を認めた。またレセプター RANK やアダプター蛋白である Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) に関しては発現に変化は認められなかった。IGFBP5<sup>-/-</sup>における mBMMs の RANKL と M-CSF 刺激に対する応答性の解析では、RANKL 刺激においてシグナルは減弱し、M-CSF の刺激に対しては変化しなかった。IGFBP5 ドメインの欠失体による破骨細胞のレスキュー実験において、IGFBP5 遺伝子の強制発現では破骨細胞形成、骨吸収能の回復を認めたが、各ドメインの欠失体では、いずれも破骨細胞形成能、骨吸収能の回復は認めなかった。さらに *in vivo* において、リコンビナント IGFBP5 投与にて骨量の低下、骨梁表面あたりの破骨細胞数の増加、マウス血清中 CTx-1 の増加を示し、一方で IGFBP5 中和抗体投与にて骨量の増加、骨量表面あたりの破骨細胞数の減少、マウス血清中 CTx-1 の低下を認めた。

### 【考察】

本研究では、IGFBP5 は破骨細胞の分化または活性化に重要な役割を果たすと考えられる。また NFATc1 と発現パターンが類似していることから破骨細胞分化における初期のステージに影響していることが示唆された。次に IGFBP5 を過剰発現において、IGFBP5 は破骨細胞の形成のみではなく破骨細胞の機能へ影響することが明らかとなり、これは他の研究における結果とも一致する。また IGFBP5<sup>-/-</sup> mBMMs における破骨細胞分化過程でのウェスタンブロット解析では、破骨細胞マーカーの発現低下を認めた一方で、RANK や TRAF6 の発現に関しては影響が見られなかった。さらに IGFBP5<sup>-/-</sup> mBMMs の RANKL と M-CSF それぞれ単独の刺激に対する反応では、RANKL 刺激に対する反応は減弱し、一方で M-CSF 刺激に対しては変化を認めなかった。また今回の研究では RANK と結合した TRAF6 の発現量は確認できていないことから、IGFBP5 は RANK/RANKL シグナリングによって RANK に結合する TRAF6 に対しても影響があることが推察される。しかしながら、RANK/RANKL シグナリングを介した NFATc1 の発現制御に関して IGFBP5 がどのような経路を介し作用するかは判明していない。また他の研究において、IGFBP5 の C 末端ドメインペプチドが NF- $\kappa$ B を阻害することが報告されていることから、IGFBP5 は標的細胞に特異的なプロテアーゼと受容体が存在する可能性が示唆される。さらに IGFBP5<sup>-/-</sup>マウスにおける他の研究では IGFBP の一つをノックアウトしても生存や生殖に大きく影響はなく、その他の IGFBP の発現が上昇している報告がある。このことから IGFBP5 に関してもノックアウトされた際にはその他の IGFBP ファミリーが IGFBP5 の作用を補償している可能性が示唆される。

### 【結論】

今回の研究によって IGFBP5 は NFATc1 とほぼ同期した破骨細胞分化の初期に重要な役割を果たし、RANK/RANKL シグナリングに作用して破骨細胞の分化と機能を亢進することが明らかとなった。

## 論文審査結果の要旨

【緒言】骨代謝に関連してインスリン様成長因子(Insulin-like growth factor : IGF)は内分泌, 傍分泌, および自己分泌に関与し生物学的機能調節を行い, 骨芽細胞に対して分化と成熟を促進することが知られている。インスリン様成長因子結合タンパク質(Insulin-like growth factor binding protein : IGFBP)は IGF の作用を制御することに加えて, それぞれのファミリーで特異的な作用を持つ。なかでも IGFBP5 は骨芽細胞の分化を促進することが判明しているが破骨細胞に対する作用は不明な点が多いため, IGFBP5 シグナルの破骨細胞分化および骨代謝機構に対する影響を解析することを本研究の目的とした。

【方法】C57BL/6J マウス(WT マウス)および *IGFBP5*<sup>-/-</sup>マウス(CDB0503K, 理化学研究所から供与)を使用し実験を行った。大腿骨から分離培養したマウス骨髄由来マクロファージ(mouse bone marrow-derived macrophages : mBMMs)にレトロウイルスを用いて IGFBP5 を過剰発現させた状態での破骨細胞への分化と骨吸収能を TRAP 染色, アクチンリング染色, 骨吸収アッセイ, Pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (CTX)-ELISA にて評価した。また, IGFBP5 shRNA レンチウイルスを用いて IGFBP5 ノックダウンさせた状態での破骨細胞への分化を TRAP 染色, qPCR にて解析した。さらに *IGFBP5*<sup>-/-</sup>マウス由来 mBMMs の破骨細胞への分化を western blot, qPCR にて評価した。加えて, IGFBP5 の各機能ドメインの欠損体を作製し, レスキュー実験を行った。さらに *in vivo*においてリコンビナント IGFBP5 と IGFBP5 中和抗体を投与し, Micro Computed Tomography ( $\mu$ CT)を用いて解析を行った。

【結果】破骨細胞分化における初期の分化マーカーである Nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATc1)と IGFBP5 の発現パターンが類似していることが明らかとなった。IGFBP5 の過剰発現では, 破骨細胞形成の亢進, 骨吸収能の増加を認めた。*IGFBP5*<sup>-/-</sup>マウス由来 mBMMs の western blot 解析では各種破骨細胞マーカーの減弱を認めたが, Receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK)や Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)に関しては, 変化を認めなかった。さらに *in vivo*において, リコンビナント IGFBP5 投与にて骨量の低下, IGFBP5 中和抗体投与にて骨量の増加を認めた。

【考察】本研究結果から, IGFBP5 は破骨細胞の分化または活性化に重要な役割を果たすと考えられる。また NFATc1 と発現パターンが類似していることから, 破骨細胞分化における初期のステージに影響していることが示唆された。また IGFBP5 は RANK/RANKL シグナリングを介して破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化と成熟破骨細胞における骨吸収能を増加させると考えられる。しかしながら, RANK/RANKL シグナリングを介した NFATc1 の発現制御に関して IGFBP5 がどのような経路を介し作用するかは判明していない。

本研究では IGFBP5 が RANK/RANKL シグナリングを介して破骨細胞分化の初期に重要であるという新しい知見を得た。この成果は新規性に富んでおり、骨代謝機構に関する有用な知見である。よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。