

破骨細胞形成における FGF シグナル伝達機構の解明

大林 典彦 [北海道大学大学院薬学研究院 / 助教]

背景・目的

骨形成と骨吸収のバランスの崩壊は、骨粗鬆症などの骨疾患の原因と考えられるが、その治療ターゲットとして骨吸収を担う破骨細胞の制御について着目されている。破骨細胞形成過程は、最近になってその詳細が理解されるようになり、中心的な役割を担うRANKL等のサイトカインシグナルだけでなく、カルシウムシグナル、NOシグナル、免疫受容体シグナルなど多くのシグナルが破骨細胞形成・機能調節に必要であることが報告されている。本研究では、細胞間シグナル因子の1つであるFGF18に着目し、骨形成や骨吸収におけるFGF18シグナルの詳細なメカニズム解明や、サイトカインシグナルとFGFシグナルとの関連性を解明することを目的とする。

内容・方法

FGF18ノックアウトマウスは、ジーンターゲティング法により作出した。骨形成領域における様々な分子マーカーの発現プロファイルは、RNA in situ hybridizationにより検討を行った。長骨の器官培養は、ICRマウスの胎児脛骨を取り出し、ディッシュ上で培養した。破骨細胞分化は、マウス骨髄由来の破骨前駆細胞を、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞と共培養することにより行った。破骨細胞分化過程に対する影響について、分化した破骨細胞が特異的に有する酒石酸耐性アルカリフォスファターゼ活性を指標に解析を行った。

結果・成果

我々が世界で最初に発見したFGF18について、その個体における機能を明らかにするために、FGF18ノックアウトマウス (KO) をジーンターゲティング法により作出した。FGF18KOは胎生致死であり、長骨・頭蓋骨の形成不全を示した。詳細な表現型解析を行い、FGF18KOにおいて軟骨細胞の増殖が亢進すること、そして肥大化軟骨に発現が認められるCol XやIndian Hedgehogの発現が亢進することを明らかにした。FGF18の発現は軟骨周囲に認められ、軟骨細胞に発現しているFGFR3にシグナルを伝達することにより、軟骨細胞の増殖・分化を負に制御するものと考えられた。そこで、軟骨周囲を除去した状態で長骨を器官培養したところ、長骨の過剰な伸長が認められた。そこにFGF18タンパクを添加して培養すると、長骨の伸長が抑制されたことから、軟骨周囲に発現する負の制御因子としてFGF18は重要な役割を担っていることが明らかになった。

一方FGF18KOでは、骨前駆細胞の増殖低下、そして分化した骨芽細胞に発現が認められるオステオポンチン、オステオカルシンなどの発現低下など、骨芽細胞形成低下が認められた。また、骨芽細胞株であるMC3T3-E1に対してFGF

F18は強力な増殖促進因子として機能することを明らかにした。骨芽細胞系には、FGFR2が発現していることから、軟骨周囲のFGF18はFGFR2を介して骨芽細胞の増殖・分化を正に制御するものと考えられた。

さらに、FGF18KOの軟骨・骨境界部では、酒石酸耐性アルカリフォスファターゼ (TRAP) 陽性破骨細胞数の減少および破骨細胞あたりのTRAP mRNAの発現量低下が認められた。また、in vivoで骨髄由来破骨前駆細胞の分化をFGF18は強力に促進した。破骨細胞に対するFGF18の正の制御作用は、オステオプロテゲリンの共添加により減弱したことから、FGF18シグナルはRANKLを介して破骨細胞の形成を促進するものと考えられた。また、破骨細胞表面にはFGFR1が発現し、FGF18がFGFR1を活性化する能力を有することを明らかにした。

今後の展望

分化した破骨細胞に対してFGFを作用させるとERKの活性化が認められ、ピットアッセイによる吸収窩形成の亢進が起こることが報告されているが、FGFの破骨細胞に対する作用については未だ不明な点が多い。FGF18KOの骨髄に僅かばかり存在する破骨細胞の分化段階を各種マーカーを用いて調べていく必要がある。また、破骨細胞のマスターレギュレーターであるRANKLシグナルは、破骨細胞内でTRAF6を介したMAPKシグナルの活性化など、FGFシグナルと関連するシグナルを活性化することも報告されており、細胞内レベルでのRANKLシグナルとFGF18シグナルとのクロストークについて明らかにしたい。