

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09433

研究課題名(和文) 骨芽細胞特異的AMPK欠損マウスを用いたAMPKの骨形成における重要性の解明

研究課題名(英文) An in vivo study to examine the roles of AMPK in bone formation by using osteoblast-specific AMPK knockout mice

研究代表者

金沢 一平 (Kanazawa, Ippei)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：50452553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞特異的AMPKノックアウトマウスにおいて、生後から骨格成長の障害を認め、海綿骨量、皮質骨量の有意な減少が認められた。皮質骨内膜面骨形成の低下と骨芽細胞分化抑制を認めたことから、骨芽細胞AMPKは骨形成に重要な因子であることが明らかとなった。さらに、骨芽細胞特異的AMPKノックアウトマウスでは破骨細胞数の上昇を認め、骨芽細胞からのRANKL発現が上昇していることから、骨芽細胞AMPKは骨リモデリングにも重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The present study using osteoblast-specific AMPK knockout mice showed that deletion of osteoblast AMPK induced retardation of postnatal bone development, as well as reduction in trabecular and cortical bone volume, by decreasing osteoblast differentiation and increasing RANKL expression. These findings suggest that osteoblast AMPK plays important roles in bone modeling and remodeling. Accordingly, activation of osteoblast AMPK may be a candidate for treatment of osteoporosis with high bone turnover, as well as diabetes-related osteoporosis, although further studies are necessary to clarify the roles of AMPK in bone.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：AMPK 骨芽細胞 骨細胞 骨形成 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国では、健康寿命をいかに伸ばすかが重要な社会問題である。加齢とともに発症頻度が増える骨粗鬆症は、高齢者のADLやQOLに直接関連する重要な疾患であることから、骨粗鬆症の予防と治療を充実させることは高齢者の自立や老老介護の問題に直結する重要な課題である。

日常診療において、骨粗鬆症治療薬の中心はビスホスホネートやデノスマブのような骨吸収抑制薬である。一方、骨形成促進薬として使用可能な薬剤はテリパラチドがあるが、ヒトにおける使用は2年までと限定されている。したがって、新たな作用機序の骨形成促進薬の開発は、臨床現場において求められている重要な課題である。

AMP-activated protein kinase (AMPK)は細胞内エネルギーセンサーとして細胞活動にとって重要な分子である。我々はこれまでに、骨芽細胞のAMPK活性化が強力な骨形成誘導因子であるbone morphogenetic protein-2 (BMP-2)の発現を増強して、骨芽細胞の分化、石灰化を促進することを世界に先駆けて報告した。その後他のグループからも同様の報告がされ、骨代謝におけるAMPKの役割について注目されている。しかしながら、骨代謝におけるAMPKの役割については不明な点が多いのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 骨芽細胞AMPKのin vivoにおける役割を明らかにする、2) 骨細胞におけるAMPKの役割を検討することである。

3. 研究の方法

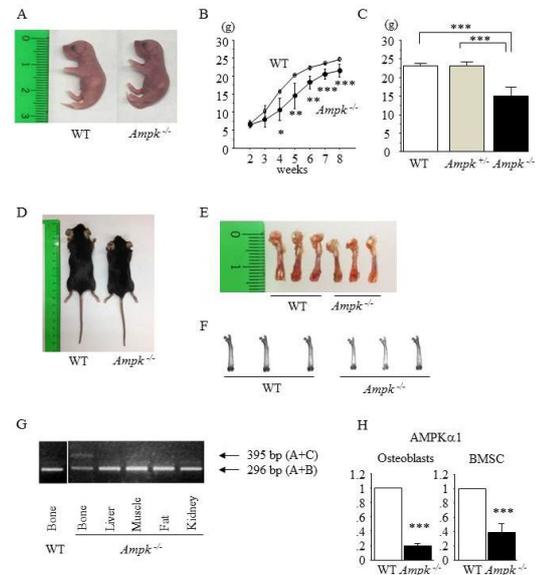
1) 骨芽細胞特異的AMPKノックアウトマウスを作製し、骨構造への影響を検討する。  
2) 骨細胞株MLO-Y4細胞を用いて、AMPK活性化の影響を検討する。

4. 研究成果

1) 骨芽細胞AMPKのin vivoでの役割  
Osterix-CreマウスとAMPK $\alpha$ 1 exon3 floxed(AMPK $^{f/f}$ )マウスの交配により、骨芽細胞特異的AMPKノックアウトマウス(AMPK $^{-/-}$ )マウスを作製し、生後8週齢の大腿骨における骨構造解析を行った。対照マウスはAMPK $^{f/f}$ マウス(WT)とヘテロ接合体ノックアウトマウス(AMPK $^{+/-}$ )とした。

AMPK $^{-/-}$ マウスにおいて、生後は明らかな外観の変化はなかったが(Fig.1A) 対照群と比較して明らかな成長障害を認め、生後8週齢では約25%の身長、四肢の短縮を認めた(Fig.1B-F)。各組織でのAMPKノックアウトを確認し(Fig.1G) 初代骨芽細胞、骨髄細胞においてAMPK $\alpha$ 1発現が有意に低下していることを確認した。

Fig. 1



大腿骨のマイクロCT解析により、AMPK $^{-/-}$ マウスでは海綿骨では有意な骨量(BV/TV)の低下(Fig.2B) 骨梁間隔(TbSp)の増大(Fig.2E) structure model index(SMI)の上昇(Fig.2G)を認めた。

Fig. 2

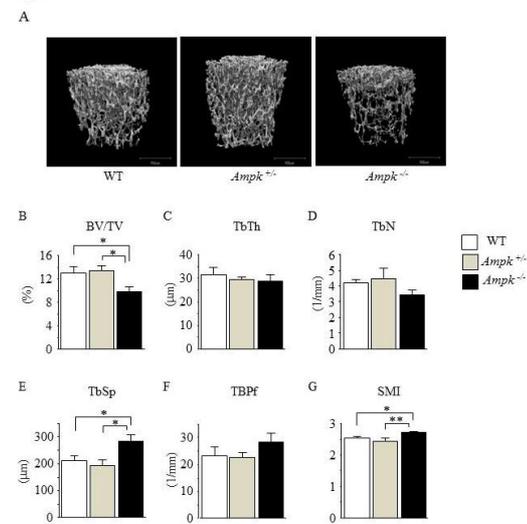
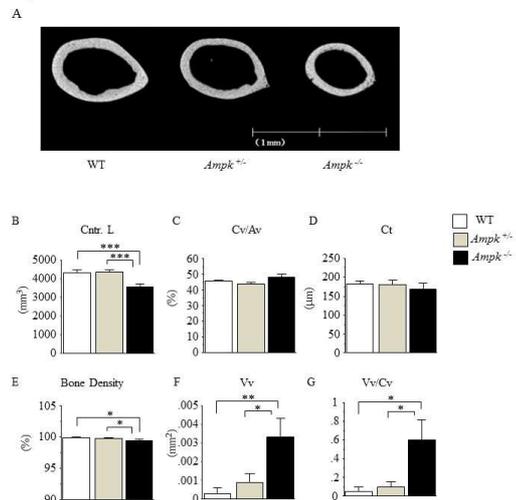
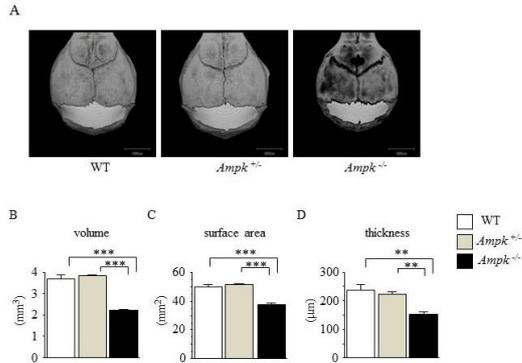


Fig. 3



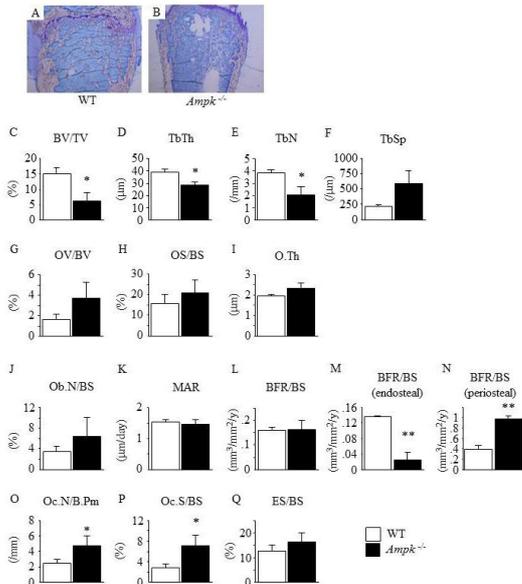
皮質骨での解析では、AMPK<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意な皮質骨周囲長 (Fig.3B) と骨密度 (Fig.3E)、管腔面積の上昇 (Fig.3F-G) を認めた。頭蓋骨のマイクロ CT 解析により、骨量 (Fig.4B)、骨表面積 (Fig.4C)、骨厚 (Fig.4D) の有意な減少を認めた。

Fig. 4



骨組織構造解析では、AMPK<sup>-/-</sup>マウスにおいて海綿骨量 (BV/TV)、骨梁幅 (TbTh)、骨梁数 (TbN) の有意な減少を認めた (Fig.5C-E)。骨芽細胞数や骨形成指標 (MAR、BFR/BS) に有意な変化は認めなかったが (Fig.5J-L)、皮質骨内膜面の骨形成指標の有意な低下を認めた (Fig.5M)。一方、破骨細胞数 (OCN/B.Pm、OcS/BS) の有意な増加を認めた (Fig.5O-P)。

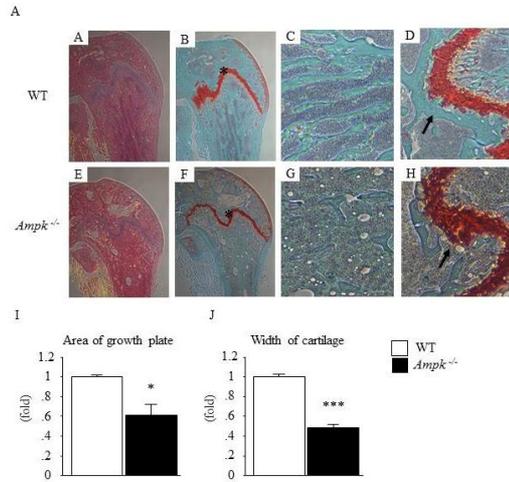
Fig. 5



サフラニン 0 染色では、AMPK<sup>-/-</sup>マウスにおいて成長軟骨板細胞の柱状配列に乱れを認め (Fig.6E-H)、著明な成長軟骨板幅と軟骨層の減少を認めた (Fig.6I-J)。

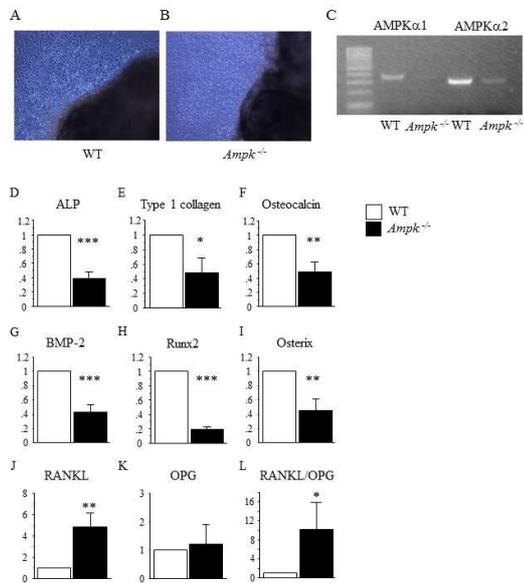
初代骨芽細胞培養系では、AMPK<sup>-/-</sup>マウス由来骨芽細胞において、細胞の球状変化を認め (Fig.7B)、ALP、type 1 collagen、osteocalcin、BMP-2、Rynx2、Osterix などの骨芽細胞分化関連因子の有意な低下を認め

Fig. 6



た (Fig.7D-I)。さらに破骨細胞誘導因子である RANKL の発現は有意に上昇し (Fig.7J)、RANKL/OPG 比の有意な上昇を認めた (Fig.7L)。

Fig. 7



以上の結果より、骨芽細胞特異的 AMPK ノックアウトマウスにおいて、生後から骨格成長の障害を認め、海綿骨量、皮質骨量の有意な減少が認められた。皮質骨内膜面骨形成の低下と Ex vivo では有意な骨芽細胞分化抑制を認めたことから、骨芽細胞 AMPK は骨形成に重要な因子であることが明らかとなった。さらに、骨芽細胞特異的 AMPK ノックアウトマウスでは破骨細胞数の上昇を認め、骨芽細胞からの RANKL 発現が上昇していることから、骨芽細胞 AMPK は骨リモデリングにも重要であることが明らかとなった。

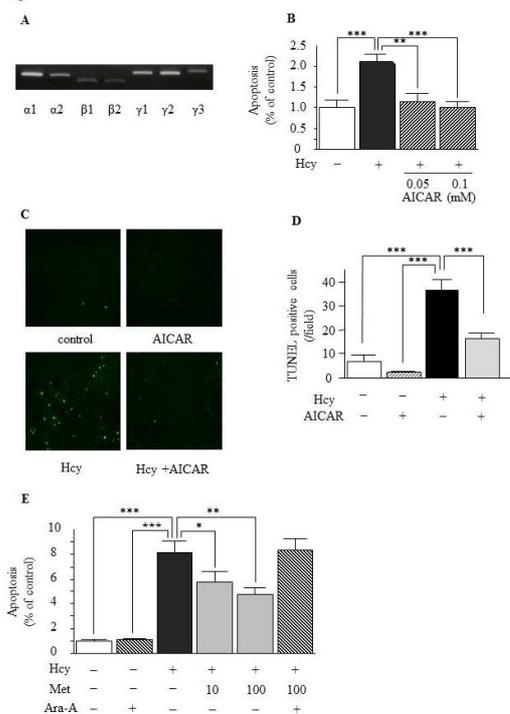
## 2) 骨細胞における AMPK 活性化の役割

ホモシステイン (Hcy) による骨細胞株 MLO-Y4 細胞のアポトーシス増強への AMPK 活性化の影響を検討した。

まず MLO-Y4 細胞にすべての AMPK サブユニットが発現していることを確認した (Fig. 8A)。次に、AMPK 活性化剤である AICAR を投与して Hcy によるアポトーシス誘導への効果を ELISA キットを用いて検討したところ、AICAR により有意なアポトーシス抑制が認められた (Fig. 8B)。さらに、TUNEL 染色を用いた検討でも同様に、Hcy によるアポトーシス誘導を有意に抑制した (Fig. 8C-D)。

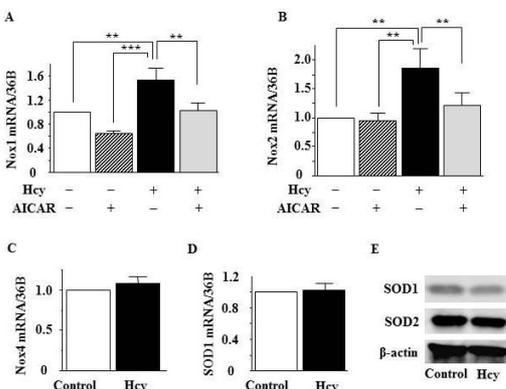
次に、他の AMPK 活性化剤であるメトホルミン (Met) を用いて同様の検討を行った。Met は Hcy によるアポトーシス誘導を有意に抑制し、さらに AMPK 阻害薬である Ara-A の同時添加にて抗アポトーシス作用が减弱したことから、Met による抗アポトーシス作用は AMPK 活性化を介していることが示された (Fig. 8E)。

Fig. 8



次に、AMPK 活性化による抗アポトーシス作用に酸化ストレスが関連しているか否かを検討した。Hcy は酸化ストレス誘導因子である Nox1、Nox2 の発現を有意に増強したが、

Fig. 9

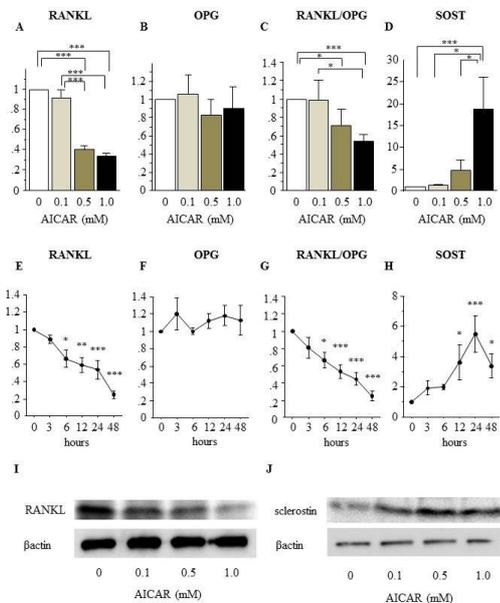


Nox4 や SOD の発現には有意な変化を与えなかった。さらに、AICAR は Hcy による Nox1、Nox2 発現増強作用を有意に抑制したことから、AMPK 活性化による抗アポトーシス作用は Nox1、Nox2 発現抑制を介している可能性が示唆された (Fig. 9A-B)。

次に、骨細胞 MLO-Y4 における AMPK 活性化のリモデリング制御因子である RANKL、スクレロスチン (SOST) 発現への影響を検討した。

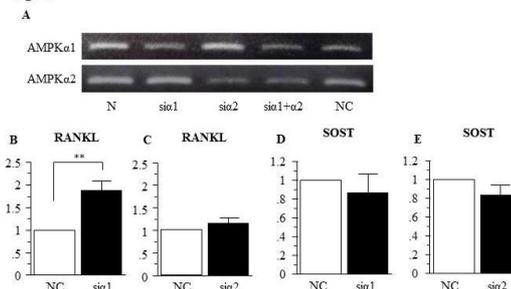
Real-time PCR を用いた検討では、AICAR は濃度依存的に RANKL 発現を有意に抑制し (Fig. 10A)、SOST 発現は増強した (Fig. 10D)。時間依存的な影響を検討したところ、AICAR は 48 時間まで持続的に RANKL 発現を抑制したが (Fig. 10E)、SOST の発現増強作用は 24 時間がピークであり、48 時間後には低下した (Fig. 10H)。ウェスタンブロットにより RANKL、スクレロスチン蛋白発現への影響を検討したところ、Real-time PCR の結果と同様の所見が認められた (Fig. 10I-J)。

Fig. 10



次に、siRNA を用いて AMPK $\alpha$ 1 あるいは  $\alpha$ 2 をノックダウンし、RANKL、SOST 発現への影響を検討した。

Fig. 11



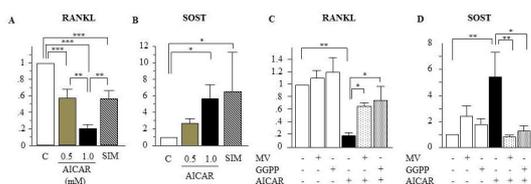
まず siRNA がそれぞれ AMPK $\alpha$ 1 あるいは  $\alpha$ 2 発現をノックダウンしていることを確認し

た (Fig.11A), AMPK $\alpha$ 1 ノックダウンにより RANKL 発現は有意に上昇したが (Fig.11B), AMPK $\alpha$ 2 ノックダウンでは RANKL 発現には変化を与えなかった (Fig.11C). AMPK $\alpha$ 1 あるいは  $\alpha$ 2 のノックダウンでは SOST 発現には影響を認めなかった (Fig.11D-E). したがって、AMPK 活性化により SOST 発現増強が一過性であり、siRNA により有意な変化がなかったことから AMPK の SOST 発現制御作用はそれほど重要ではない可能性が考えられる。

我々は以前に AMPK 活性化がメバロン酸経路の阻害により骨芽細胞分化を促進することを報告している。次に、AICAR による RANKL、SOST 発現への影響がメバロン酸経路阻害を介しているか否かを検討した。

まずメバロン酸経路阻害薬であるシンバスタチン (SIM) が AICAR と同様の影響があるかを検討した。SIM は AICAR と同様に RANKL 発現を有意に抑制し、SOST 発現を有意に増強した (Fig.12A-B)。さらに、メバロン酸経路の中間代謝産物であるメバロン酸 (MV)、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を同時に添加することにより AICAR による RANKL 発現抑制、SOST 発現増強作用は解除された (Fig.12C-D)。したがって、AMPK 活性化による RANKL、SOST 発現に与える影響はメバロン酸経路阻害を介している可能性が示唆された。

Fig. 12



以上の結果より、骨細胞における AMPK 活性化は Hcy によるアポトーシス誘導を抑制し、さらにメバロン酸経路阻害を介して骨リモデリング因子である RANKL、SOST の発現を制御することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Kanazawa I, Takeno A, Tanaka K, Notsu M, Sugimoto T. Osteoblast AMP-activated protein kinase regulates postnatal skeletal development in male mice. *Endocrinology*, 2018; 159(2): 597-608
2. Takeno A, Kanazawa I, Notsu M, Tanaka KI, Sugimoto T. Glucose uptake inhibition decreases expressions of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and osteocalcin in osteocytic MLO-Y4-A2 cells. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 2018;

314(2): E115-E123

3. Takeno A, Kanazawa I, Notsu M, Tanaka K, Sugimoto T. Inhibition of adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses bone morphogenetic protein-2-induced mineralization of osteoblasts via Smad-independent mechanisms. *Endocrine Journal*, 2018; 65(3): 291-298
4. Kanazawa I. Interaction between bone and glucose metabolism. *Endocrine Journal*, 2017; 64(11): 1043-53
5. Takeno A, Kanazawa I, Tanaka K, Notsu M, Yokomoto-Umakoshi M, Sugimoto T. Simvastatin rescues homocysteine-induced apoptosis of osteocytic MLO-Y4 cells by decreasing the expressions of NADPH oxidase 1 and 2. *Endocrine Journal*, 2016; 63(4): 389-95
6. Yokomoto-Umakoshi M, Kanazawa I, Takeno A, Tanaka KI, Notsu M, Sugimoto T. Activation of AMP-activated protein kinase decreases receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand expression and increases sclerostin expression by inhibiting the mevalonate pathway in osteocytic MLO-Y4 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016; 469(4): 791-6
7. Takeno A, Kanazawa I, Tanaka KI, Notsu M, Yokomoto M, Yamaguchi T, Sugimoto T. Activation of AMP-activated protein kinase protects against homocysteine-induced apoptosis of osteocytic MLO-Y4 cells by regulating the expression of NADPH oxidase 1 (Nox1) and Nox2. *Bone*, 2015; 77: 135-41

[学会発表](計 17 件)

1. Kanazawa I, Takeno A, Tanaka KI, Notsu M, Sugimoto T. The in vivo roles of osteoblast AMP-activated protein kinase in skeletal development. *American Society for Bone and Mineral Research 2017 Annual Meeting*, 2017
2. Takeno A, Kanazawa I, Notsu M, Tanaka KI, Sugimoto T. Effects of glucose uptake inhibition by phloretin on expressions of RANKL and osteocalcin in osteocytic MLO-Y4-A2 cells. *American Society for Bone and Mineral Research 2017 Annual Meeting*, 2017
3. Kanazawa I, Takeno A, Tanaka KI, Notsu M, Sugimoto T. Osteoblast AMP-activated protein kinase regulates skeletal development in vivo. *Joint meeting of the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society & the International Federation of Musculoskeletal Research*

- Societies in conjunction with the Japanese Society for Bone & Mineral Research, 2017
4. Takeno A, Kanazawa I, Notsu M, Tanaka KI, Sugimoto T. Roles of glucose transporter in expressions of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and osteocalcin in osteocytic MLO-Y4-A2 cells. Joint meeting of the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society & the International Federation of Musculoskeletal Research Societies in conjunction with the Japanese Society for Bone & Mineral Research, 2017
  5. 竹野歩、金沢一平、野津雅和、田中賢一郎、杉本利嗣：骨細胞における glucose transporter 阻害は AMP-activated protein kinase 活性化と MAPK 経路抑制を介して osteocalcin、RANKL 発現を低下させる。第 35 回日本骨代謝学会学術集会、2017
  6. 金沢一平、竹野歩、田中賢一郎、野津雅和、杉本利嗣：骨芽細胞 AMP-activated protein kinase の骨伸長、骨量増加における役割の検討。第 35 回日本骨代謝学会学術集会、2017
  7. 竹野歩、金沢一平、野津雅和、田中賢一郎、杉本利嗣：糖代謝における骨細胞グルコース感知の重要性についての検討。第 90 回日本内分泌学会学術総会、2017
  8. 竹野歩、金沢一平、杉本利嗣：あり方委員会企画シンポジウム「内分泌疾患から見た骨代謝の世界」骨細胞の糖代謝における役割について。第 35 回日本骨代謝学会学術集会、2017
  9. 金沢一平：「研究奨励賞受賞講演」骨代謝と糖・エネルギー代謝の相互関連性についての研究。第 90 回日本内分泌学会学術総会、2017
  10. Kanazawa I, Yokomoto-Umakoshi M, Takeno A, Tanaka KI, Notsu M, Sugimoto T. Activation of AMP-activated Protein Kinase Decreases RANKL Expression and Increases Sclerostin Expression by Inhibiting the Mevalonate Pathway in Osteocytic MLO-Y4 Cells. American Society for Bone and Mineral Research 2016 Annual Meeting, 2016
  11. Takeno A, Kanazawa I, Tanaka KI, Notsu M, Yokomoto-Umakoshi M, Sugimoto T. Simvastatin rescues Homocysteine-Induced Apoptosis of Osteocytic MLO-Y4 Cells by Decreasing the Expressions of NADPH oxidase 1 (Nox1) and Nox2. American Society for Bone and Mineral Research 2016 Annual Meeting, 2016
  12. 竹野歩、金沢一平、田中賢一郎、野津雅和、横本真希、杉本利嗣：マウス骨細胞系 MLO-Y4 細胞株においてシバスタチンは NADPH oxidase 1 および 2 発現の抑制を介してホモシステインによるアポトーシス促進を解除する。第 34 回日本骨代謝学会学術集会、2016
  13. 横本真希、金沢一平、竹野歩、田中賢一郎、野津雅和、杉本利嗣：骨細胞系 MLO-Y4 細胞において AMP-activated protein kinase 活性化はメバロン酸経路を阻害することにより RANKL 発現を減少させ、スクレロスタチン発現を増加させる。第 34 回日本骨代謝学会学術集会、2016
  14. Takeno A, Kanazawa I, Tanaka KI, Notsu M, Yokomoto M, Yamaguchi T, Sugimoto T. Activation of AMP-activated protein kinase protects against homocysteine-induced apoptosis of osteocytic MLO-Y4 cells by regulating the expressions of NADPH oxidase 1 (Nox1) and Nox2. American Society for Bone and Mineral Research 2015 Annual Meeting, 2015
  15. Kanazawa I, Takeno A, Tanaka KI, Notsu M, Yokomoto M, Yamaguchi T, Sugimoto T. Metformin protects against homocysteine-induced apoptosis of osteocytic MLO-Y4 cells by activation of AMP-activated protein kinase. 51<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, 2015
  16. 竹野歩、金沢一平、田中賢一郎、野津雅和、横本真希、山口徹、杉本利嗣：AMP kinase 活性化はホモシステインによる骨細胞 MLO-Y4 のアポトーシス誘導を解除する。第 33 回日本骨代謝学会学術集会、2015
  17. 竹野歩、金沢一平、田中賢一郎、野津雅和、横本真希、山口徹、杉本利嗣：AMP kinase 活性化はホモシステインによる骨細胞 MLO-Y4 のアポトーシス誘導を解除する。第 88 回日本内分泌学会学術総会、2015
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)  
取得状況 (計 0 件)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
金沢 一平 (KANAZAWA, IPPEI)  
島根大学・医学部・講師  
研究者番号：50452553
- (2)  
研究協力者  
竹野 歩 (TAKENO, AYUMU)  
野津 雅和 (NOTSU, MASAKAZU)  
田中 賢一郎 (TANAKA, KENICHIRO)