

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15781

研究課題名(和文)ステロイド性骨粗鬆症の病因となるグルココルチコイドレセプター標的遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of the target genes of glucocorticoid receptor in the pathogenesis of steroid-induced osteoporosis

研究代表者

小守 壽文 (KOMORI, Toshihisa)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：00252677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイド剤は、現在でも多くの炎症性疾患や自己免疫疾患の効果的治療薬であり、ステロイド剤の投与によって生じる骨粗鬆症は二次性骨粗鬆症のなかで最も頻度が高い。ステロイド剤の治療を長期に受けている患者の30-50%が骨折を起こす可能性がある。ヒトのステロイド剤治療では海綿骨が主に低下し、椎体や大腿骨頸部骨折を起こす。グルココルチコイドレセプターのシャペロン分子であるFkbp5のノックアウトマウスは、グルココルチコイド投与により、強い骨形成抑制を示した。このマウスを用い、ステロイド性骨粗鬆症の病因となるグルココルチコイドレセプター標的遺伝子の同定を試みた。

研究成果の概要(英文)：Steroids are effective drugs for inflammatory diseases and autoimmune diseases. However, steroids most frequently induce secondary osteoporosis. The risk of bone fracture in the patients with steroid treatment is about 30-50%. Trabecular bone is reduced and the fractures of vertebral body and femoral neck occur in the patients with steroid treatment. Fkbp5 is a chaperon molecule of glucocorticoid receptor, and Fkbp5 knockout mice showed severely reduced bone formation by glucocorticoid treatment. We tried to identify the target genes of glucocorticoid receptor, which are responsible for steroid-induced osteoporosis, using Fkbp5 knockout mice.

研究分野：生物系学、骨代謝学、歯学

キーワード：グルココルチコイド ステロイド性骨粗鬆症 Fkbp5 骨形成 骨吸収

1. 研究開始当初の背景

ステロイド剤は、現在でも多くの炎症性疾患や自己免疫疾患の効果的治療薬であり、ステロイド剤の投与によって生じる骨粗鬆症は二次性骨粗鬆症のなかで最も頻度が高い。ステロイド剤の治療を長期に受けている患者の30-50%が骨折を起こす可能性がある。ヒトのステロイド剤治療では、早期の骨吸収の増加により、急激な骨密度の低下をきたす。そして長期に続く骨形成の低下により、さらに骨密度は低下していく。ヒトでは海綿骨が主に低下し、椎体や大腿骨頸部骨折を起こす。

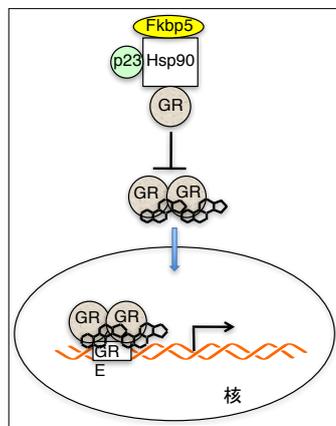
グルココルチコイドレセプター (GR) は、細胞質内で Hsp90、Fkbp5 を含むシャペロン分子と複合体を形成する。グルココルチコイドの GR への結合により、複合体は解体し、GR は、二量体を形成、核移行する。核移行した二量体は、DNA 上のグルココルチコイドレスポンスエレメント

(GRE) に結合、ターゲット遺伝子の転写を誘導あるいは抑制する (図1)。

骨細胞は、2つのネットワークを形成していると考えられる。一つは細胞間ネットワークであり、骨細管中を通る骨細胞突起がギャップ結合によって連結し、骨細胞同士でネットワークを

形成している。骨芽細胞突起と骨細胞突起もギャップ結合で連結しており、この細胞間ネットワークは骨表面の骨芽細胞に及んでいる。もう一つは、傍骨細胞間隙を介した細胞外ネットワークであり、これも骨表面へと及んでいる。この2つのネットワークを介して、血管および骨髄から酸素、栄養、生存シグナルを得る他、骨表面の骨芽細胞への様々なシグナルの伝達および液性因子の骨外への放出を行っていると考えられる。我々はこの2つのネットワークが破壊された Bcl2 トランスジェニック (tg) マウスを用いて、骨細胞ネットワークが、非荷重を感知し、骨量を調節することを明らかにした。その分子メカニズムを明らかにするために、Bcl2 tg マウスで尾部懸垂を行い、骨芽細胞・骨細胞において、野生型マウスでは非荷重時に誘導されるが、Bcl2 tg マウスでは誘導されない遺伝子をマイクロアレイで検索、Fkbp5 を同定した。

Fkbp5 の骨での機能を明らかにするため、Fkbp5^{-/-}マウスを作製した。Fkbp5 は先に述べたように、GR と複合体を形成するシャペロン分子であるため、まず、GR 活性を調べた。GR



〈図1〉 Fkbp5 による GR の制御
GRはHsp90、Fkbp5、p23からなるシャペロン複合体と結合すると、グルココルチコイドとの結合、二量体形成および核移行が抑制されると考えられている。

レポーター活性は Fkbp5^{-/-}骨芽細胞で有意に上昇しており、Fkbp5 は GR シグナルを負に制御していた。そこで、Fkbp5^{-/-}マウスのグルココルチコイドに対する反応を見ることにした。プレドニンペレットを皮下に埋め込んだが、Fkbp5^{-/-}マウスでは、野生型マウスより著明な骨量減少を認めた。したがって、Fkbp5^{-/-}マウスはステロイド性骨粗鬆症の発症メカニズムの解明に最適のモデルマウスと考えられ、このマウスを用いて、ステロイド性骨粗鬆症の発症メカニズムの解明に取り組むことにした。

2. 研究の目的

Fkbp5^{-/-}マウスを用いてステロイド性骨粗鬆症の発症メカニズムを解明することを目的とする。まず、グルココルチコイド投与によって起こる表現型を野生型マウスと Fkbp5^{-/-}マウスで比較し、その違いを明確にする。これまで、ステロイド剤投与により骨芽細胞および骨細胞のアポトーシス誘導と Wnt シグナルの抑制が起こり、骨形成が抑制され骨量減少が起こると、多数報告されてきた。また、ステロイド剤投与は、osteoprotegerin (Op) 発現の抑制、Rank1 発現の誘導、さらに破骨細胞の寿命の延長により骨吸収を促進させると報告されてきた。したがって、これらのことが、Fkbp5^{-/-}マウスへのグルココルチコイド投与でも観察されるかを確認する。さらに、グルココルチコイド投与により、Fkbp5^{-/-}マウスの骨細胞分画・骨芽細胞分画で、野生型マウスと比較し強く誘導・抑制される遺伝子群を同定する。最後に GR の標的遺伝子として特定した遺伝子の骨芽細胞特異的トランスジェニックマウスを作製し、Fkbp5^{-/-}マウスと交配、グルココルチコイド投与実験でグルココルチコイドに対する反応を比較検討する。これにより、ステロイド性骨粗鬆症の病因となる GR 標的遺伝子を同定、その機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) グルココルチコイド投与実験

- ① 8週齢の野生型マウスおよび Fkbp5^{-/-}マウスの背部皮下に、徐放性プレドニゾンペレット (低容量 1.25mg/kg/day、高容量 3.2mg/kg/day) あるいはプラセボペレットを植え込み、1週間ごとに体重を測定するとともにマウスの挙動を観察した。4週間後に屠殺、大腿骨をマイクロCT、骨組織形態計測で比較した。また、8週齢の野生型マウスおよび Fkbp5^{-/-}マウスにデキサメタゾン (2mg/kg、5mg/kg、10mg/kg) を、コントロール群は溶媒であるエタノールを4週間毎日注射した。4週間後に屠殺、大腿骨をマイクロCT、骨組織形態計測で比較した。
- ② 血清の骨形成マーカー (オステオカルシン)、吸収マーカー (CTX-1、TRAP5b) を測定した。
- ③ TUNEL染色で、骨芽細胞、骨細胞におけるアポトーシスを比較した。
- ④ 屠殺時に血清を採取し、血糖、コレステロ

ール、中性脂肪、アルブミン、コリンエステラーゼ、CPK、LDH等を測定し、プレドニゾロンの耐糖能、脂質代謝、筋に対する作用を調べた。

⑤筋重量を測定するとともに組織切片で筋細胞面積を計測し、筋萎縮を比較した。また、消化管潰瘍や出血がないか腸管を調べた。

(2)マイクロアレイ解析によるグルココルチコイド投与後の発現変動遺伝子の探索

①8週齢の野生型マウスおよびFkbp5^{-/-}マウスにデキサメタゾン(2mg/kg)を、コントロール群は溶媒であるエタノールを4週間毎日注射した。

②4週間注射後に屠殺、大腿骨及び脛骨から筋組織及び外骨膜細胞を除いた後、PBSで骨髄を除去、歯間ブラシで内骨膜上の骨芽細胞を採取、骨芽細胞分画RNAを抽出した。また、残りの骨よりRNAを抽出、骨細胞分画のRNAとした。

③野生型マウスおよびFkbp5^{-/-}マウスのデキサメタゾン注射群とエタノール注射群から得られた骨芽細胞分画RNA、骨細胞分画RNAをそれぞれマイクロアレイにて比較、野生型マウスでの発現変動がFkbp5^{-/-}マウスで増強された遺伝子を選択した。選択された遺伝子は、リアルタイムRT-PCRで確認後、アノテーション情報、パスウェイ解析等によりクラス分けした。

(3)骨芽細胞特異的 tg マウス及び Fkbp5^{-/-} tg マウスの作製

①2.3 kb Colla1 プロモーターに同定した遺伝子を組み込み、骨芽細胞特異的 tg マウスを作製した。さらに Fkbp5^{-/-}マウスと交配し、最終的に Fkbp5^{-/-}tg マウスを作製した。

4. 研究成果

(1)グルココルチコイド投与実験

①8週齢の野生型マウスおよびFkbp5^{-/-}マウスの背部皮下に、徐放性プレドニゾロンペレット(低容量 1.25mg/kg/day、高容量 3.2mg/kg/day)あるいはプラセボペレットを植え込み、1週間ごとに体重を測定するとともにマウスの挙動を観察した。4週間後に屠殺、大腿骨をマイクロCT、骨組織形態計測で比較した。また、8週齢の野生型マウスおよびFkbp5^{-/-}マウスにデキサメタゾン(2mg/kg、5mg/kg、10mg/kg)を、コントロール群は溶媒であるエタノールを4週間毎日注射した。4週間後に屠殺、大腿骨をマイクロCT、骨組織形態計測で比較した。

②血清の骨形成マーカー(オステオカルシン)、吸収マーカー(CTX-1、TRAP5b)を測定した。

③TUNEL染色で、骨芽細胞、骨細胞におけるアポトーシスを比較した。

④屠殺時に血清を採取し、血糖、コレステロール、中性脂肪、アルブミン、コリンエステラーゼ、CPK、LDH等を測定し、プレドニゾロンの耐糖能、脂質代謝、筋に対する作用を調べ

た。

⑤筋重量を測定するとともに組織切片で筋細胞面積を計測し、筋萎縮を比較した。また、消化管潰瘍や出血がないか腸管を調べた。

(2)マイクロアレイ解析によるグルココルチコイド投与後の発現変動遺伝子の探索

①8週齢の野生型マウスおよびFkbp5^{-/-}マウスにデキサメタゾン(2mg/kg)を、コントロール群は溶媒であるエタノールを4週間毎日注射した。

②4週間注射後に屠殺、大腿骨及び脛骨から筋組織及び外骨膜細胞を除いた後、PBSで骨髄を除去、歯間ブラシで内骨膜上の骨芽細胞を採取、骨芽細胞分画RNAを抽出した。また、残りの骨よりRNAを抽出、骨細胞分画のRNAとした。

③野生型マウスおよびFkbp5^{-/-}マウスのデキサメタゾン注射群とエタノール注射群から得られた骨芽細胞分画RNA、骨細胞分画RNAをそれぞれマイクロアレイにて比較、野生型マウスでの発現変動がFkbp5^{-/-}マウスで増強された遺伝子を選択した。選択された遺伝子は、リアルタイムRT-PCRで確認後、アノテーション情報、パスウェイ解析等によりクラス分けした。

(3)骨芽細胞特異的 tg マウス及び Fkbp5^{-/-} tg マウスの作製

①2.3 kb Colla1 プロモーターに同定した遺伝子を組み込み、骨芽細胞特異的 tg マウスを作製した。さらに Fkbp5^{-/-}マウスと交配し、最終的に Fkbp5^{-/-}tg マウスを作製した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

- ①Komori T: Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochem Cell Biol.* 査読有, 149(4):313-323, 2018. DOI: 10.1007/s00418-018-1640-6
- ②Yang M, Arai A, Udagawa N, Hiraga T, Lijuan Z, Ito S, Komori T, Moriishi T, Matsuo K, Shimoda K, Zahalka AH, Kobayashi Y, Takahashi N, Mizoguchi T: Osteogenic Factor Runx2 Marks a Subset of Leptin Receptor-Positive Cells that Sit Atop the Bone Marrow Stromal Cell Hierarchy. *Sci Rep.* 査読有, 10;7(1):4928, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-05401-1
- ③Miyazaki T, Inoue M, Baba T, Komori T: Overexpression of Sp7 in odontoblasts results in dentinogenesis imperfecta due to the inhibition of odontoblast maturation. *J Oral Biosci.* 査読有, 59(2)113-120, 2017. DOI: 10.1016/j.job.2017.03.003
- ④Oya K, Ishida K, Nishida T, Sato S,

- Kishino M, Hirose K, Ogawa Y, Ikebe K, Takeshige F, Yasuda H, Komori T, Toyosawa S: Immunohistochemical analysis of dentin matrix protein 1 (Dmp1) phosphorylation by Fam20C in bone: implications for the induction of biomineralization. *Histochem Cell Biol*. 査読有, 147(3):341-351, 2017.
DOI: 10.1007/s00418-016-1490-z
- ⑤ Komori T: Roles of Runx2 in skeletal development. *Adv Exp Med Biol*. 査読有, 962:83-93, 2017.
DOI: 10.1007/978-981-10-3233-2_6
- ⑥ Komori T: Cell Death in Chondrocytes, Osteoblasts, and Osteocytes. *Int J Mol Sci*. 査読有, 17(12): 2045, 2016.
DOI: 10.3390/ijms17122045
- ⑦ Komori T: Glucocorticoid signaling and bone biology. *Horm Metab Res*. 査読有, 48(11):755-763, 2016.
DOI: 10.1055/s-0042-110571
- ⑧ Togo Y, Takahashi K, Saito K, Kiso H, Tsukamoto H, Huang B, Yanagita M, Sugai M, Harada H, Komori T, Shimizu A, MacDougall M, Bessho K: Antagonistic functions of USAG-1 and RUNX2 during tooth development. *PLoS One*. 査読有, 11(8): e0161067, 2016.
DOI: 10.1371/journal.pone.0161067
- ⑨ Moriishi T, Fukuyama R, Miyazaki T, Furuichi T, Ito M, Komori T: Overexpression of BCLXL in osteoblasts inhibits osteoblast apoptosis and increases bone volume and strength. *J Bone Miner Res*. 査読有, 31(7):1366-80, 2016.
DOI: 10.1002/jbmr.2808
- ⑩ Jiang Q, Qin X, Kawane T, Matsuo Y, Taniuchi I, Komori H, Ito K, Izumi S, Komori T: Cbfb2 isoform dominates more potent Cbfb1 and is required for skeletal development. *J Bone Miner Res*. 査読有, 31(7):1391-404, 2016.
DOI: 10.1002/jbmr.2814
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Komori T: A role of Runx2 in the proliferation of osteoblast precursors, RUNX PHILADELPHIA 2017, 2017.
- ② Qin X, Komori T: Elucidation of the functions of Runx2 in differentiated osteoblasts, RUNX PHILADELPHIA 2017, 2017.
- ③ 社領美紀, 佐藤淳, 宇佐美悠, 廣瀬勝俊, 大家香織, 小守壽文, 豊澤 悟: ゼレドロン酸投与が骨細胞マーカー Dmp1 に及ぼす影響について, 第 59 回歯科基礎医学会学術集会, 2017.
- ④ 廣瀬勝俊, 宇佐美悠, 佐藤淳, 大家香織, 小守壽文, 豊澤悟: Fam20C 過剰発現マウスにおける骨組織の変化について, 第 35 回 日本骨代謝学会学術集会, 2017.
- ⑤ 小守 壽文: ステロイドシグナルと bone biology, 第 35 回日本骨代謝学会学術集会, 2017.
- ⑥ 姜晴, 小守壽文: Functions of Runx family transcription factors and Cbfb in skeletal development, 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017.
- ⑦ 山本 知真也, 長谷川 智香, 小守 壽文, 網塚 憲生: 骨芽細胞特異的 PTHrP 過剰発現マウスの下顎骨・長管骨における 組織化学・微細構造学的解析, 第 36 回日本骨形態計測学会, 2016.
- ⑧ 小守 壽文: 骨細胞ネットワークによる骨量調節, 第 36 回日本骨形態計測学会, 2016.
- ⑨ 姜晴, 秦昕, 小守寿人, 松尾友紀, 宮崎敏博, 森石武史, 小守壽文: Cbfb1 と Cbfb2 アイソフォームは骨格形成過程において重要な役割を果たす, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016.
- ⑩ 廣瀬勝俊, 佐藤淳, 社領美紀, 野田百合, 小守壽文, 豊澤悟: Fam20C 過剰マウスの作成とその解析について, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016.
- ⑪ 楊孟雨, 溝口利英, 宇田川信之, 松尾光一, 小守壽文, 森石武史, 小林泰浩, 高橋直之: PTH アナボリック作用に対する骨髄間葉系幹細胞の寄与, 第 34 回日本骨代謝学会学術集会, 2016.
- ⑫ 森石武史, 福山亮, 古市達哉, 伊東昌子, 小守壽文: アポトーシス抑制遺伝子 BCLXL を骨芽細胞に過剰発現させると骨量が増加し生涯を通して骨量が維持される, 第 34 回日本骨代謝学会学術集会, 2016.
- [その他]
ホームページ等
<http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/dokuji/kaibou-2/index.html>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
小守 壽文 (KOMORI, Toshihisa)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・教授
研究者番号: 00252677