

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09034

研究課題名(和文)細胞老化制御タンパク質による新たな骨代謝調節機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of a novel regulatory mechanism of bone metabolism by cellular senescence regulators and its therapeutic application

研究代表者

久木田 明子(Kukita, Akiko)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：30153266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の老化制御に関わる塩基性HLH型転写因子の骨代謝と骨の老化における働きについて解析を行った。bHLH-1を欠損した若年マウスでは、骨芽細胞のオートファジーや分化が亢進し、骨形成が促進され骨量が増加していた。老齢においてもbHLH-1を欠損したマウスでは骨量が野生型マウスと比較して高く、老化による骨量減少も低下していた。さらに、bHLH-1を欠損したマウスの骨芽細胞や骨細胞において老化細胞のマーカー遺伝子の発現が低下していた。bHLH-1は、老齢マウスにおける老化細胞の蓄積と加齢による骨量減少に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会に伴い骨粗鬆症や変形性関節症などの骨・関節疾患の患者数が増加している。近年、このような加齢に関連する疾患において、複製やストレスなどの刺激で形成した老化細胞の蓄積が病態の原因となることが報告されている。本研究では老化細胞の制御機能が知られているbHLH型転写因子が、老化した骨で老化細胞の蓄積に関わる可能性を初めて明らかにした。本研究で得た知見は、骨・関節疾患の治療法の開発などの研究に将来的に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the role of basic HLH-type transcription factors involved in cellular senescence in bone metabolism and bone aging. bHLH-1 knockout (KO) mice showed increased bone mass and bone formation in femurs, and osteoblasts showed increased proliferation and differentiation of progenitor cells, and increased number of osteocytes. On the other hand, autophagy in osteoblasts was increased whereas apoptosis in osteoblasts and osteocytes was decreased. The bone mass of bHLH-1 KO mice was higher than that of wild type (WT) mice even in old age, and the bone loss due to aging was also reduced. Furthermore, the expression of senescent marker genes was decreased in osteoblasts and osteocytes of bHLH-1 KO mice, suggesting that bHLH-1 may be involved in the accumulation of senescent cells and age-related bone loss.

研究分野：骨代謝 分子生物学

キーワード：骨代謝 骨芽細胞 骨細胞 老化 骨粗鬆症 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症や変形性関節症において加齢は重要な危険因子であるが、最近体内に蓄積した老化細胞が病態の原因となることがわかってきた。マウスの個体で老化細胞を除去すると、加齢による骨量減少が減弱し変形性関節症の病態が軽減されることが報告された。老化した骨組織では、骨芽細胞の分化や機能が不全となり骨形成が低下し、低レベルの炎症が原因となり骨吸収が亢進すると考えられている。しかしながら、老化細胞がどのように老化した骨軟骨組織の病態に関与しているか不明な点が多い。申請者らは、細胞の老化制御に関わる2つの塩基性ヘリックスループヘリックス(bHLH)型転写因子が骨形成に関わる可能性を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、bHLH 型転写因子の骨代謝と骨の老化における役割及びその調節機構を、若齢や老齢の遺伝子欠損マウスを用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスの骨量・骨構造解析及び骨形態計測

μCTを用いて野生型及びノックアウトマウス(11週令、19か月♂♀)の大腿骨・椎骨の海綿骨の骨量と骨構造解析を行った。野生型及びノックアウトマウス(11週令♂)の大腿骨を単離し Villanueva 染色後、非脱灰標本を作製し海綿骨における骨芽細胞と骨細胞の骨形態計測を行なった。

(2) 骨芽細胞及び骨細胞の解析

新生児マウスの頭蓋冠からコラゲナーゼ、ディスペラーゼ処理により骨芽細胞前駆細胞を単離し、ascorbic acid 及びβ-glycerophosphate を添加した石灰化培地で6~18日間培養し、骨芽細胞の分化を誘導した。培養後アリザリン染色を行い石灰化の評価を行った。細胞からRNAを単離しRT-PCR解析、及びタンパク質を抽出してWestern解析を行った。shRNAレンチウイルスプラスミドを構築しレンチウイルスを作成し、骨芽細胞に感染させbHLHの発現をノックダウンした。大腿骨と脛骨から骨髓細胞を除き、骨表面の骨芽細胞を単離した後、骨を粉砕して骨細胞のRNAおよびタンパク質を単離した。

(3) オートファジーの解析

骨芽細胞の分化培養系において、培地をアミノ酸を含まない培地に交換し飢餓状態としオートファジーを誘導させた。オートファジー関連タンパク質の発現をRT-PCR及びWestern解析した。オートファゴソームの形成はCyto-IDを用いて染色し、共焦点顕微鏡で観察した。骨細胞のアポトーシスは大腿骨の凍結切片をTUNEL法を用いて染色することにより評価した。

4. 研究成果

(1) bHLH 型転写因子ノックアウトマウスの骨量と骨形態計測

野生型(WT)と2種類のbHLH型転写因子bHLH-1とbHLH-2ノックアウト(KO)マウスの大腿骨をμCTにより解析したところ、どちらのKOの場合も海綿骨では野生型と比較し、骨密度の増加、海綿骨量、数及び厚さの有意な増加が見られた。まずbHLH-1(Nupr1)KOマウスを用いて大腿骨の骨形態計測を行ったところ、骨面上の骨芽細胞数の増加や類骨量

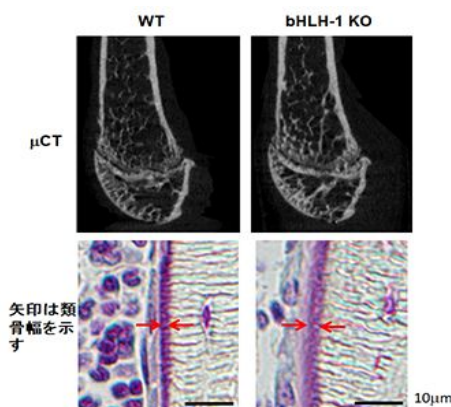


図1野生型WTとbHLH-1 KOマウスの大腿骨のμCT画像とVillanueva染色画像

の増加が見られた。さらに、カルセイン及びテトラサイクリンを用いた2重骨標識を行い骨形成の動的な状態を調べたところ、bHLH-1 KO マウスは WT マウスと比較して骨形成が有意に亢進していた(図1)。

(2) bHLH-1 KO マウスの骨芽細胞の分化及び増殖能の解析

WT と KO の新生児マウスから骨芽細胞前駆細胞を単離して、*in vitro* における骨芽細胞の増殖及び分化能を比較した。その結果、KO マウス由来の骨芽細胞前駆細胞は、WT と比較し増殖能が高く骨芽細胞に分化したときに Osteocalcin, Osteopontin Bone sialoprotein などの骨芽細胞特異的な遺伝子の発現が顕著に上昇していた。さらにアリザリン染色により骨芽細胞の石灰化能を比較したところ、bHLH-1 KO マウスの骨芽細胞において石灰化が亢進していた。

(3) bHLH-1 KO マウス骨芽細胞と骨細胞のオートファジーとアポトーシスの解析

in vitro 骨芽細胞の分化系ではオートファジー関連遺伝子である Foxo3 や Bnip3 の発現が分化に伴い上昇し、その上昇は KO マウスの骨芽細胞で亢進していた。また、bHLH-1 KO マウス由来の骨芽細胞ではアミノ酸飢餓状態においてひきおこされるオートファゴソームの形成が顕著に亢進していた(図2)。さらに、骨芽細胞のアミノ酸飢餓は骨芽細胞のアポトーシスをおこし生存する細胞数を減少させたが、KO マウス由来の骨芽細胞では有意に生存細胞数が増加した。また、bHLH-1 KO マウスの大腿骨では骨芽細胞が最終分化して形成される骨細胞数が増加

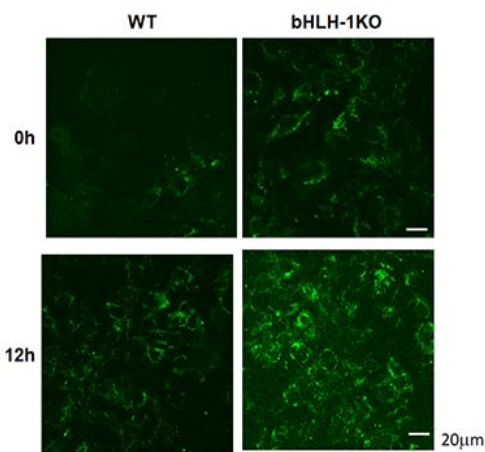


図2 野生型WTとbHLH-1 KOマウス由来の初代骨芽細胞のアミノ酸飢餓開始前と開始後12時間のオートファゴソームの形成

していた。さらに、TUNEL 陽性の骨細胞数は KO マウスの骨で顕著に減少し、骨細胞のアポトーシスが低下していると考えられた。このように、bHLH-1 は骨芽細胞のオートファジーや骨細胞のアポトーシスを制御することにより骨形成に関与することが示唆された。

(4) 老齢 bHLH-1 KO マウスの骨量及び減少率の解析

bHLH-1 KO マウスの老齢マウス(19 か月)を作成し、椎骨の骨量や骨構造解析を行った。その結果、WT と比較して海綿骨量 (BV/TV)、海綿骨数及び厚さの有意な増加が見られた。老齢マウスでは若年マウス(11 週令)と比較した時、椎骨の海綿骨量が 56.7%と低下したのに対し、bHLH-1 KO 老齢マウスにおいては若年マウスと比較したときの骨量の減少率が 32.6%と顕著に低下していた。

(5) 老齢 bHLH-1 KO マウスの老化関連タンパク質の発現の解析

老齢マウスの骨細胞では老化細胞の指標となるマーカー遺伝子 p16 が上昇していた。そこで、老齢の bHLH-1 KO マウスの骨細胞における老化細胞関連遺伝子の発現を解析したところ、WT と比較して p16 や p21 の発現が低下していた。さらに、骨芽細胞に shRNA レンチウイルス感染させ bHLH-1 の発現を抑制すると p16 や p21 の発現が低下した。

以上のことから bHLH-1 は、老齢マウスにおける老化細胞の蓄積と加齢による骨量減少に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirata Hirohito, Xu Xianghe, Nishioka Kenichi, Matsuhisa Fumikazu, Kitajima Shuji, Kukita Toshio, Murayama Masatoshi, Urano Yasuteru, Miyamoto Hiroshi, Mawatari Masaaki, Kukita Akiko	4. 巻 -
2. 論文標題 PMEPA1 and NEDD4 control the proton production of osteoclasts by regulating vesicular trafficking	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001795r	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Badawy T, Kyumoto-Nakamura Y, Uehara N, Zhang J, Sonoda S, Hiura H, Yamaza T, Kukita A, Kukita T.	4. 巻 99
2. 論文標題 Osteoblast lineage-specific cell-surface antigen (A7) regulates osteoclast recruitment and calcification during bone remodeling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 866-884.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-018-0179-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shiraki M, Xu X, Iovanna JL, Kukita T, Hirata H, Kamohara A, Kubota Y, Miyamoto H, Mawatari M, Kukita A.	4. 巻 33
2. 論文標題 Deficiency of stress-associated gene Nupr1 increases bone volume by attenuating differentiation of osteoclasts and enhancing differentiation of osteoblasts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 8836-8852.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201802322RR.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kamohara A, Hirata H, Xu X, Shiraki M, Yamada S, Zhang JQ, Kukita T, Toyonaga K, Hara H, Urano Y, Yamashita Y, Miyamoto H, Kukita A.	4. 巻 32
2. 論文標題 IgG immune complexes with Staphylococcus aureus protein A enhance osteoclast differentiation and bone resorption by stimulating Fc receptors and TLR2.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 89-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1602035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Funakubo Noboru, Xu Xianghe, Kukita Toshio, Nakamura Seiji, Miyamoto Hiroshi, Kukita Akiko	4. 巻 233
2. 論文標題 Pmepa1 induced by RANKL-p38 MAPK pathway has a novel role in osteoclastogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 3105-3118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.26147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiratori Takuma, Kyumoto-Nakamura Yukari, Kukita Akiko, Uehara Norihisa, Zhang Jingqi, Koda Kinuko, Kamiya Mako, Badawy Tamer, Tomoda Erika, Xu Xianghe, Yamaza Takayoshi, Urano Yasuteru, Koyano Kiyoshi, Kukita Toshio	4. 巻 200
2. 論文標題 IL-1 Induces Pathologically Activated Osteoclasts Bearing Extremely High Levels of Resorbing Activity: A Possible Pathological Subpopulation of Osteoclasts, Accompanied by Suppressed Expression of Kindlin-3 and Talin-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 218-228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1602035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Xu Xianghe, Hirata Hirohito, Shiraki Makoto, Kamohara Asana, Nishioka Kenichi, Miyamoto Hiroshi, Kukita Toshio, Kukita Akiko	4. 巻 33
2. 論文標題 Prostate transmembrane protein androgen induced 1 is induced by activation of osteoclasts and regulates bone resorption	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 4365-4375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201801573R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 平田寛人、村山雅俊、白木誠、久木田敏夫、馬渡正明、久木田明子
2. 発表標題 Pmepa1は小胞輸送に関わり骨吸収中の破骨細胞で酸の分泌を制御する
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田寛人, 村山雅俊, 白木誠, 久木田敏夫, 久木田明子, 馬渡正明
2. 発表標題 Pmepa1は骨吸収中の破骨細胞で小胞輸送に関わり酸の分泌を制御する
3. 学会等名 第35回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirohito Hirata, Xianghe Xu, Masatoshi Murayama, Makoto Shiraki, Toshio Kukita, Mawatari Masaaki, Akiko Kukita
2. 発表標題 Prostate transmembrane protein androgen induced-1 Is Localized to Lysosome with Nedd4 and Vacuolar ATPase subunits in Osteoclasts, and Regulates Bone Resorption
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research(ASBMR) 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田寛人, 徐祥赫, 白木誠, 蒲原麻菜, 久木田敏夫, 馬渡正明, 久木田明子
2. 発表標題 Pmepa1は破骨細胞でNedd4とLAMP 2 と共局在し骨吸収を制御する
3. 学会等名 第37回 日本骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiraki M, Xu X, Iovanna JL, Kukita T, Hirata H, Kamohara A, Kubota Y, Miyamoto H, Mawatari M, Kukita A.
2. 発表標題 Deficiency of stress-associated gene Nupr1/p8 increased bone volume by enhancing differentiation of osteoblasts
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H.Hirata, X. Xu, M. Shiraki, M. Murayama, A. Kamohara, K. Nishioka, F. Matsuhisa, S. Kitajima, Y. Urano, H. Miyamoto, T. Kukita, M. Mawatari, A. Kukita
2. 発表標題 Prostate transmembrane protein androgen induced-1 is localized to lysosome with Nedd4 in osteoclasts, and regulates bone resorption
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久木田明子
2. 発表標題 Prostate transmembrane protein androgen induced-1 and nuclear protein play novel roles in bone methabolism
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会 Satellite symposium:Cutting Edge of Bone and Minerak Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蒲原 麻菜, 徐 祥赫, 白木 誠, 平田 寛人, 久木田敏夫, 久木田明子
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌のプロテインAとIgG複合体による骨破壊促進機構
3. 学会等名 第34回 日本骨代謝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tamer Badawy, Yukari Kyumoto - Nakamura, Norihisa Uehara, Jingqi Zhang, Hidenobu Hiura, Akiko Kukita, Toshio Kukita
2. 発表標題 Novel osteoblast-lineage specific cell-surface antigen possibly regulateing osteoclastogenesis and calcification
3. 学会等名 第34回 日本骨代謝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久木田明子, 蒲原 麻菜, 久木田敏夫,
2. 発表標題 ラット破骨細胞培養系により明らかになった破骨細胞の骨吸収を制御する新たなタンパク質
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto Shiraki, Hiroto Hirata, Asana Kamohara, Juan Iovanna, Toshio Kukita, Masaaki Mawatari, Akiko Kukita
2. 発表標題 Deletion of the gene encoding Nupr1/p8, a regulator of autophagy, attenuates osteoclastogenesis but increases trabecular bone mass by enhancing osteoblast differentiation
3. 学会等名 41th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asana Kamohara, Xianghe Xu, Makoto Shiraki, Hiroto Hirata, Toshio Kukita, Akiko Kukita
2. 発表標題 IgG complex with protein A of Staphylococcus aureus enhance the differentiation and bone resorption of osteoclasts.
3. 学会等名 41th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asana Kamohara, Xianghe Xu, Kenji Toyonaga, Hiromitsu Hara, Yoshio Yamashita, Akiko Kukita
2. 発表標題 IgG complex with protein A of Staphylococcus aureus enhance the differentiation and bone resorption of osteoclasts.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	馬渡 正明 (Mawatari Masaaki) (80202357)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	
研究 分担者	久木田 敏夫 (Kukita Toshio) (70150464)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	白木 誠 (Shiraki Makoto)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	国立衛生医学研究所			