

平成 22 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間： H19 ～ H21

課題番号： 19592159

研究課題名 (和文) カスパーゼ 3 の骨代謝に及ぼす影響に関する研究

研究課題名 (英文) EFFECT OF CASPASE 3 ON BONE METABOLISM

研究代表者

天野 均 (AMANO HITOSHI)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号： 90212571

研究成果の概要 (和文) : アポトーシスとは、細胞の縮小や断片化、核の凝集と断片化といった形態的な特長を呈するあらかじめプログラムされた細胞死のことで、様々な分子間のシグナル伝達によるコントロールを受けている。そのなかでも、カスパーゼ 3 はシステインプロテアーゼの一種で、刺激により活性化されると、PARP (ADP-リボースポリメラーゼ)をはじめとするさまざまな細胞内基質を分解し、アポトーシスを誘導すると考えられている。骨形成を担う骨芽細胞は、骨細胞となり骨内に埋め込まれる際にその半数はアポトーシスすると考えられている。また、破骨細胞も骨吸収終了後に骨面から離れアポトーシスすることが示されている。骨系細胞のアポトーシスは骨組織における重要な代謝機構のひとつと考えられ、その調節を担うカスパーゼ 3 は何らかの関与をする可能性がある。そこで今回、カスパーゼ 3 遺伝子欠損マウスを用い、その役割を検索した。8 週齢マウス頭蓋骨について肉眼観察及び X 線撮影を行ったところ、遺伝子欠損型マウスの頭蓋冠はドーム状を呈し、眼耳平面と後頭蓋底前後径との交線は野生型に比べて鈍角となり、頭蓋の成長抑制が認められた。さらに、遺伝子欠損型では加齢に伴い頭蓋骨の膜性骨化の亢進と下顎前突症の所見が認められた。新生仔脛骨を通常に従い固定、脱灰後、パラフィン包埋による組織切片とし、TRAP 染色を施したのち、顕微鏡にて破骨細胞の数を計測したところ、遺伝子欠損型では破骨細胞数の減少が認められた。この減少が骨芽細胞からの支持能減少に伴うものかどうかを検討するためにカルバリアより骨芽細胞を調整し、OPG mRNA の発現を検討した。遺伝子欠損型の骨芽細胞では野生型に比べ培養開始から、その発現量の増加が見られた。また遺伝子欠損型骨芽細胞の *in vitro* における石灰化亢進も認められた。アポトーシスを制御するカスパーゼ 3 の遺伝子欠損マウスでは、石灰化亢進を伴う頭蓋形成異常と、成熟破骨細胞数の減少を認めた。これらのことから、カスパーゼ 3 遺伝子は、骨芽細胞と破骨細胞のアポトーシス制御という面から、骨形成と骨吸収の微妙なバランスを保ち、正常な頭蓋の成長発育などを調整していることが示された。

研究成果の概要 (英文) : Apoptosis is defined as programmed cell death, which is characterized by cell contraction and fragmentation, and nuclear aggregation and fragmentation. Various types of molecular signaling control Apoptosis. Caspase3, a type of cysteine protease, can be activated by stimulus, leading to degradation of a broad range of intracellular substances such as PARP and to induction of apoptosis. Approximately one-half of osteoblasts involved in bone formation undergo apoptosis during the process of transformation into osteocytes when embedded within the bone. In addition, osteoclasts are known to enter apoptosis away from the bone surface after bone resorption. Apoptosis in bone-related cells is considered an essential metabolic system in bone structure; moreover, Caspase3 may play a significant role in this process. We investigated the role of Caspase3 via utility of mice carrying a Caspase3 gene deficiency. Following completion of visual observation and x-ray photography of mouse skulls (8 weeks of age), skullcaps from mice

with the gene deficiency exhibited quaquaversal (dome-like) formation characterized by an obtuse angle between the eye-ear plane and the anteroposterior diameter of the occipital skull-base in comparison with the wild type; consequently, growth suppression of the skull was apparent. Moreover, in mice with the gene deficiency, increased membranous ossification and mandibular prognathism were detected with increasing age. Newborn tibias, following fixation as tissue sections by conventional fixation, were decalcified, embedded in paraffin. Mice with the gene deficiency displayed elevated osteoblast OPG mRNA expression in comparison to the wild type. Increased calcification in osteoblasts carrying the gene deficiency was also demonstrated in vitro. There was no significant difference in osteoclast formation between Caspase 3^{-/-} mice and their littermate. In contrast, caspase3^{-/-} osteoclast increased bone resorbing activity. This study confirmed abnormal skull formation with increased bone formation and resorption in mice lacking the Caspase3 gene, which controls apoptosis. Caspase3 gene maintains a delicate balance between bone formation and bone resorption; moreover, it adjusts normal skull development via control of apoptosis in osteoblasts and osteoclasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H19年度	2,300,000	690,000	2,990,000
H20年度	700,000	210,000	910,000
H21年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研ひの分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：カスパーゼ3、破骨細胞、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

骨組織は骨形成と骨吸収はバランスよくカップリングし、常に新しい組織に置換されていること。骨芽細胞は骨形成のための骨基質を作り終えると、骨細胞となる以外の50-70%の細胞はアポトーシスすること。また造血幹細胞から分化した破骨細胞も骨吸収を行うと、たとえ十分な生存因子の存在下においても、その寿命を果たしてしまうことがわかった。つまり生理的な骨リモデリング現象が細胞レベルでのアポトーシスによって調節されていることと、この破綻が生じたときには、なんらかの骨疾患が発症に大きく関与する可能性を示されている。

2. 研究の目的

本研究では、DNAaseを活性化することにより、アポトーシスを最終制御しているカスパーゼ3に着目し、骨芽細胞及び破骨細胞の分化・活性調節と細胞死の関連性を解析することが主目的である。そのために、細胞のアポトーシスに関わる生存因子やミトコンドリア

経路の役割を明確にする。また生理的な骨リモデリング現象が、細胞レベルでのアポトーシスによって調節されるか否かをカスパーゼ3遺伝子欠損マウスを用いて確認する。そして、この破綻が骨格性下顎前突症の発症に大きく関与する可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 骨芽細胞による破骨細胞支持能に関する影響の検討
マウス新生児より頭頂骨を摘出し、酵素液(0.1%Collagenase、0.2%Dispase)にて消化し、初代骨芽細胞を回収する。カスパーゼ3の有無が骨芽細胞分化に及ぼす影響を見るために24穴マイクロプレートに、1ウェルあたり 1.0×10^5 個の野生型及び遺伝子欠損型の骨芽細胞をそれぞれまき、その上から 5.0×10^5 個の野生型骨髄細胞をまいて、 α -MEM (pH 7.0) + Dexamethasone (10^{-7} M) + α , 25(OH)2D3 (10^{-8} M) 培地で一週間共存培養する。培養終了後、固定、洗浄し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色する

ことで誘導される破骨細胞数を計測することでカスパーゼ活性と細胞分化能の相関性について検討する。

2) RGD ペプチドによるカスパーゼ 3 活性誘導実験

不活性型状態のカスパーゼには相補的な RGD 結合部位があり、細胞質内で RGD ペプチドが結合すると活性化カスパーゼ 3 になり、DNA 分解酵素活性化・アポトーシスを誘導する。そこで、野生型とカスパーゼ 3 遺伝子欠損マウス由来の破骨細胞に CSF-1, RANKL 共添加により、RGD ペプチドを取り込ませ、細胞死する細胞数を比較する。また骨基質には RGD 領域をもつオステオポンチン等のマトリックスが存在するので骨吸収能の比較も検討する。

3) ミトコンドリア経路誘導アポトーシスにおけるカスパーゼ 3 の役割の検討

骨髄細胞から破骨細胞を誘導し、ミトコンドリア画分中の Bim 発現を野生型および Bim と結合して拮抗作用をする Bcl2 遺伝子を欠損するマウスにおける破骨細胞の生存能と吸収能を比較検討した。

4) 初代骨芽細胞分化におけるカスパーゼ 3 の役割の検討

マイクロプレートに、1 ウェルあたり 2.5×10^4 個の野生型、遺伝子欠損型の骨芽細胞をまき、アスコルビン酸 ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) 及び β -グリセロリン酸ナトリウム (10 mM) を含む培地で培養する。 $10^{-8} \text{ M } 1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ または PTH を添加した群を 10 日間培養した後、さらに経時的に 6 日ごとに培養を続け、p-ニトロフェノールを基質として ALP 活性を測定する。石灰化能の検討を行う。control 群、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 添加群、PTH 添加群の、野生型及び遺伝子欠損型における石灰化能の変化を Von Kossa 染色と画像解析法にて比較検討した。

5) カスパーゼ 3KO マウスの骨組織のマクロの形態学的観察

表現型として現れる下顎前突症及び石灰化異常を検討するために、経時的にソフト X 線撮影を行う。撮影像はヒトのセファロ分析の項目にしたがって、頭蓋・上顎骨の成長抑制及び下顎骨の過大成長の有無を検討する。また μCT による骨密度の測定や立体構造の違いを野生型・遺伝子欠損型で比較検討した。

4. 研究成果

1) 骨芽細胞による破骨細胞支持能に関する影響の検討

骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系に活性型ビタミン D3 で破骨細胞誘導を行った結果、カスパーゼ 3 は破骨細胞形成には影響を直

接与えないが、破骨細胞の活性化を亢進させ、結果的に骨吸収を亢進させることが示唆された。

2) RGD ペプチドによるカスパーゼ 3 活性誘導実験

RGD ペプチドをコーティングしたビーズを破骨細胞に取り込ませ、細胞死する細胞数をカスパーゼ 3 遺伝子欠損株と野生型と比較した。カスパーゼ 3 遺伝子欠損した破骨細胞ではアポトーシスに対して抵抗性を持つことが示唆された。また吸収窩形成が亢進し、骨吸収能が高くなることが明らかになった。

3) ミトコンドリア経路誘導アポトーシスにおけるカスパーゼ 3 の役割の検討

カスパーゼ 3 発現の有無に関わらず、骨髄細胞から誘導される破骨細胞数にも変化は認められなかった。このことから破骨細胞分化には、カスパーゼ 3 の有無は直接的な関与が無いことが明らかになった。しかしながら、誘導された破骨細胞の骨吸収能は亢進されていること。破骨細胞はアポトーシスに対して抵抗性を持つことが示唆された。このアポトーシス抵抗性の機序は、ミトコンドリア経路に関与する Bim タンパクの degradation をカスパーゼ 3 が関与しているためであることも明らかにした。

4) 初代骨芽細胞分化におけるカスパーゼ 3 の役割の検討

骨芽細胞からの破骨細胞支持能減少の原因を検索するためにカルバリアより骨芽細胞を調整し、OPG mRNA の発現を検討したところ、OPG mRNA の発現亢進を認められた。また骨芽細胞の石灰化に関してはカスパーゼ 3 発現の有無に相関性は無かった。

5) カスパーゼ 3KO マウスの骨組織のマクロの形態学的観察

8 週齢マウス頭蓋骨について肉眼観察及び X 線撮影を行ったところ、遺伝子欠損型マウスの頭蓋冠はドーム状を呈し、眼耳平面と後頭蓋底前後径との交線は野生型に比べて鈍角となり、頭蓋の成長抑制が認められた。さらに、遺伝子欠損型では加齢に伴い頭蓋骨の膜性骨化の亢進と下顎前突症の所見が認められた。

以上の結果を総括すると、骨吸収は引き続き骨形成を誘導すること。このようなカップリング現象という骨吸収と骨形成の微妙なバランスを保たせることで、生体では正常な骨成長もあわせて行われていた。ところが、カスパーゼ 3 遺伝子欠損マウスではこのバランスが崩れて、破骨細胞の生存延長と骨吸収亢進、併せて骨形成の促進（特に軟骨性骨化）が生じることで下顎骨の過成長を示し、下顎

前突症発症の要因となっていた。
また本研究の成果は、ビスフォスホネート製剤投与による異常な破骨細胞特異的なアポトーシスが顎骨壊死を引き起こす機序の解明に光を当てるような研究に繋がると確信した。

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 16 件)

Karakawa A, Fukawa Y, Okazaki M, Takahashi K, Sano T, Amano H, Yamamoto M, Yamada S. Diclofenac sodium inhibits NFkappaB transcription in osteoclasts. J Dent Res. 査読有 88 巻 2009, 1042-1047

Chang E-J, Tanaka S, Kim H-H 他 14 名. Brain-type creatine kinase has a crucial role in osteoclast-mediated bone resorption. Nature medicine, 査読有 14 巻 966-972, 2008.

Oshima Y, Wakeyama H, Tanaka S, et al.. Pivotal role of Bcl-2 family proteins in the regulation of chondrocyte apoptosis. J Biol Chem. 査読有 283 巻 2008, 26499-26508

Yamoah K, Amano H, Abe E, et al. High-mobility group box proteins modulate tumor necrosis factor-alpha expression in osteoclastogenesis via a novel deoxyribonucleic acid sequence. Mol Endocrinol. 査読有 22 巻 2008, 1141-1153
Wakeyama H, Takahashi K, Amano H, Tanaka S. 他 9 名

Negative feedback loop in the Bim-caspase-3 axis regulating apoptosis and activity of osteoclasts. J Bone Miner Res. 査読有 22 巻 2007, 1631-1639

[学会発表] (計 33 件)

天野 均

骨代謝と創薬-アップデート 第 83 回日本薬理学会年会 2010/3/18 大阪

Tanaka S.

Regulation of osteoclast apoptosis and function 3rd NEW YORK SKELETAL BIOLOGY AND MEDICINE (2009.5.1) New York,

Amano H, Karakawa A, Yamada S, et. al. EFFECT OF CASPASE 3 ON BONE METABOLISM 2nd International Conference on Osteoimmunology 2008/6/9 ギリシャ国ロードス島

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 均 (AMANO HITOSHI)
昭和大学・歯学部・准教授
研究者番号 : 90212571

(2) 研究分担者

田中 栄 (TANAKA SAKAE)
東京大学・医学部・准教授
研究者番号 : 50282661

高橋 勝彦 (TAKAHASHI KATSUHIKO)
星薬科大・薬学部・准教授
H19 年→H20, H21 : 連携研究者
研究者番号 : 80307066

(3) 連携研究者