

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20249064

研究課題名（和文） 運動器機能の統合的制御に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Basic research on the integrated regulation of locomotive function

研究代表者

田中 栄（TANAKA SAKAE）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：50282661

研究成果の概要（和文）：「運動器」は動物の生命維持に必要不可欠な活動である「運動」を担う器官の総称であり、骨、軟骨および筋組織など直接運動に関与する組織、さらにはこれらの働きを調節制御する神経組織をも網羅する概念である。本研究では運動器を担う骨、軟骨、筋、神経の機能制御メカニズムをアポトーシス調節分子である Bcl-2 ファミリー分子の役割を中心に解析した。

研究成果の概要（英文）：“Locomotive organs” regulates the important function of animals, motor function, and include various tissues such as bone, cartilage, muscle and neuron. We here investigated the regulatory mechanism of locomotive organs by focusing on the role of Bcl-2 family proteins, which regulate the apoptosis of the cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	12,100,000	3,630,000	15,730,000
2009 年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
年度			
総計	35,800,000	10,740,000	46,540,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・骨軟骨代謝学

キーワード：骨、軟骨、筋、神経、Bcl-2 ファミリー

## 1. 研究開始当初の背景

「運動器」は動物の生命維持に必要不可欠な活動である「運動」を担う器官の総称であり、骨格、関節および筋組織など直接運動に関与する組織、さらにはこれらの働きを調節制御する神経組織をも網羅する概念である。その構成成分である骨は脊椎動物の形態を維持し、生体のモーターである筋の働きを介して速やかな運動を可能にしているのみならず、カルシウムやリンの貯蔵庫として、生体におけるカルシウム・リン濃度の調節に重要な役割を果たしている。軟骨は成長期には主とし

て骨格の長径成長を担うとともに、成熟した個体においては関節の摺動面を構成することによって円滑な運動を可能とする。また脳や脊髄をはじめとした神経は、他の運動器の司令塔としてこれらのシステムを統合的に制御する。これら運動器の構成成分である各組織は、それぞれが固有の役割を果たすとともに、互いに有機的な連関を保ちながら「運動」という高度な生体機能へと結晶化していくと考えられる。このような意味で「運動」は生体の高次機能の一つとみなすことが可能である。生体の高次機能である「運動」と

それを担う「運動器」の恒常性（ホメオスタシス）の維持は、生体活動のみならず生命維持にとってきわめて根源的な意味を有する。これまでに運動器を構成する個々の組織の恒常性維持機構については多くの研究が行われてきた。これらの発見は個々の細胞や組織、そしてその形成にかかわる分子の役割を明らかにする上で極めて大きな役割を果たした。しかしながらこれまでの研究は、これらの細胞や分子の役割を、構成成分を束ねる「運動器」という大きな枠組みの中で捉え、これらのピースが「運動」というパズルにおいてどのような位置に適合するのかという観点には欠如していた。

## 2. 研究の目的

細胞のアポトーシスを制御することが知られている Bcl-2 ファミリーを取り上げ、運動器における Bcl-2 ファミリーの役割を運動器に属する様々な臓器で明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

Bcl-2 ファミリーの所属する主たる anti-apoptotic molecule である Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 の3つの分子に注目し、これらのノックアウトマウス、臓器特異的ノックアウトマウスの作成を行い、運動器における Bcl-2 ファミリー分子の役割を解析した。Bcl-2 ノックアウトマウスは生後数週間で免疫不全、腎障害などが理由で死亡することが知られている。われわれはこのマウスを pro-apoptotic Bcl-2 ファミリーである Bim のヘテロノックアウトマウスを掛け合わせることで致死的な異常を回避することができることを明らかにした。Bcl-2<sup>-/-</sup>Bim<sup>+/-</sup>マウスと Bcl-2<sup>+/-</sup>Bim<sup>+/-</sup>マウスを比較することによって Bcl-2 の成体における機能解析が可能となる。また Bcl-xL および Mcl-1 については古典的な手法でのノックアウトマウスは胎生致死であり、運動の評価は不可能である。したがってこれらの分子については組織特異的なノックアウトマウスを作成する。組織特異的ノックアウトマウスの作成にはそれぞれの削除するゲノム領域を loxP 配列で挟んだ変異マウスを作製する。さらに組織特異的に発現するプロモーターの下流に DNA 組換え酵素 Cre recombinase を接続したトランスジェニックマウスを作製し、これらを2回交配させると一定の確率でコンディショナルノックアウトマウスが作製した。

## 4. 研究成果

①我々は Cathepsin K-Cre マウスと Bcl-x<sub>f1</sub>/f1 マウスを掛け合わせるにより Bcl-x 遺伝子の破骨細胞特異的ノックアウト

マウスの作成に成功した。このマウスにおいては破骨細胞のアポトーシスが亢進しているが、その機能も更新しており骨粗鬆症を示すことが明らかになった。さらにその分子メカニズムを検討し、Bcl-xL が細胞外マトリックス蛋白の発現調節を行うことにより c-Src チロシンキナーゼ活性を制御していることを明らかにした。

②マウス骨格筋損傷モデルにおいては Bcl-2 の発現が著明に上昇することを見出した。この系を用いて、筋萎縮における Cbl-b 遺伝子の影響を検討した。Cbl-b 遺伝子欠損マウスは、カルディオトキシンによる筋傷害からの再生遅延が認められた。その筋組織中には多数の CD8<sup>+</sup>T 細胞が存在していた。さらに、Cbl-b 遺伝子欠損マウスのマクロファージは、CD8<sup>+</sup>T 細胞の遊走を促進するケモカイン RANTES の発現が亢進しており、RANTES の発現を調節している TLR4 シグナルも活性化していた。RANTES 中和抗体を投与することにより、Cbl-b 遺伝子欠損マウスでみられた筋再生の遅延が改善し、CD8<sup>+</sup>T 細胞の浸潤も抑制された。以上の結果より、Cbl-b 遺伝子欠損は骨格筋の再生過程において、マクロファージからの RANTES 産生の亢進を介して、CD8<sup>+</sup>T 細胞の浸潤の増大、筋再生の遅延を引き起こすことが示唆された。

③シユワン細胞に Bcl2 あるいは BclxL を導入し in vitro で無血清状態での生存カーブを比較したところ、Bcl2 の方が有意に survival 効果が得られることを明らかにした。

④三次元動作解析装置 (VICON) によって小さな対象物に対し動作解析が可能か否かを、ヒトを用いて検討した。成人の足部に多数の赤外線マーカーを貼付して立位動作を解析した結果、前足部と後足部を分離した解析が可能であった。二分脊椎症や脳性麻痺の小児の下肢を対象とした解析では、肉眼では観察しきれないような微細な関節の動きや、治療介入による小さな変化を捉えることができた。

## 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 25 件) ※すべて査読有り

1. Hiraoka N, Takahashi KA, Arai Y, Sakao K, Mazda O, Kishida T, Honjo K, Tanaka S, Kubo T. Intra-articular injection of hyaluronan restores the aberrant expression of matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritic subchondral bone. J Orthop Res. 2011, 29(3):354-360.
2. Ueno T, Ohori Y, Ito J, Hoshikawa S,

- Yamamoto S, Nakamura K, Tanaka S, Akai M, Tobimatsu Y, Ogata T. Hyperphosphorylated neurofilament NF-H as a biomarker of the efficacy of minocycline therapy for spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2011 Mar;49(3):333-336.
3. Yasui T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Matsumoto T, Masuda H, Hirose J, Omata Y, Yasuda H, Imumara T, Nakamura K, Tanaka S. Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF- $\beta$  through molecular interaction between Smad3 and Traf6. *J Bone Miner Res*. 2011 Jul;26(7):1447-1456. doi: 10.1002/jbmr.357.
  4. Ogata T, Ueno T, Hoshikawa S, Ito J, Okazaki R, Hayakawa K, Morioka K, Yamamoto S, Nakamura K, Tanaka S, Akai M. Hes1 functions downstream of growth factors to maintain oligodendrocyte lineage cells in the early progenitor stage. *Neuroscience*. 2011 Mar 10;176:132-141.
  5. Yasui T, Hirose J, Tsutsumi S, Nakamura K, Aburatani H, Tanaka S. Epigenetic Regulation of Osteoclast Differentiation: Possible Involvement of Jmjd3 in the Histone Demethylation of Nfatc1. *J Bone Miner Res*. 2011 Nov;26(11):2665-2671.
  6. Matsumoto T, Nagase Y, Iwasawa M, Yasui T, Masuda H, Kadono Y, Nakamura K, Tanaka S. Distinguishing the pro-apoptotic and anti-resorptive functions of risedronate in osteoclasts: Role of the Akt pathway and the Erk/Bim axis. *Arthritis Rheum*. 2011 Dec;63(12):3908-3917.
  7. Furuya Y, Mori K, Ninomiya T, Tomimori Y, Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Uchida K, Yasuda H. Increased bone mass in mice after a single injection of an anti-RANKL neutralizing antibody: evidence for a bone anabolic effect of PTH in mice with few osteoclasts. *J Biol Chem*. 2011 Oct 21;286(42):37023-31.
  8. Nagase Y, Yasunaga H, Horiguchi H, Hashimoto H, Shoda N, Kadono Y, Matsuda S, Nakamura K, Tanaka S. Risk factors of pulmonary embolism and the effects of fondaparinux after total hip and knee arthroplasty: a retrospective observational study using a national database in Japan. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2011 Dec 21;93(24):e1461-1467.
  9. Yamada K, Matsumoto K, Tokumura F, Okazaki H, Tanaka S. Are bone and serum cefazolin concentrations adequate for antimicrobial prophylaxis? *Clin Orthop Relat Res*. 2011 Dec;469(12):3486-3494.
  10. Hirasaka K, Lago CU, Kenaston MA, Fathe K, Nowinski SM, Nikawa T, Mills EM. Identification of a redox-modulatory interaction between uncoupling protein 3 and thioredoxin 2 in the mitochondrial intermembrane space. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Nov 15;15(10):2645-61.
  11. Kohno S, Ueji T, Abe T, Nakao R, Hirasaka K, Oarada M, Harada-Sukeno A, Ohno A, Higashibata A, Mukai R, Terao J, Okumura Y, Nikawa T. Rantes secreted from macrophages disturbs skeletal muscle regeneration after cardiotoxin injection in Cbl- $\beta$ -deficient mice. *Muscle Nerve*. 2011 Feb;43(2):223-9.
  12. Ohte S, Shin M, Sasanuma H, Yoneyama K, Akita M, Ikebuchi K, Jimi E, Maruki Y, Matsuoka M, Namba A, Tomoda H, Okazaki Y, Ohtake A, Oda H, Owan I, Yoda T, Furuya H, Kamizono J, Kitoh H, Nakashima Y, Susami T, Haga N, Komori T, Katagiri T. A novel mutation of ALK2, L196P, found in the most benign case of fibrodysplasia ossificans progressiva activates BMP-specific intracellular signaling equivalent to a typical mutation, R206H. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Apr 1;407(1):213-8.
  13. Akiyama T, Dass CR, Shinoda Y, Kawano H, Tanaka S, Choong PF. PEDF regulates osteoclasts via osteoprotegerin and RANKL. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 391(1):789-794.
  14. Kadono Y, Yasunaga H, Horiguchi H, Hashimoto H, Matsuda M, Tanaka S, Nakamura S. Statistics in orthopaedic surgery in 2006-2007: data from the Japanese diagnosis procedure combination (DPC) database. *J Orthop Sci*. 2010, 15(2):162-170.
  15. Yasui T, Nishino J, Kadono Y, Matui T, Nakamura K, Tanaka S, Tohma S. Impact of Biologics on the Prevalence of Orthopaedic Surgery in the National Database of Rheumatic Diseases in Japan. *Mod Rheumatol*. 2010, 20(3):233-237.
  16. Nishino J, Tanaka S, Kadono Y, Matsui A, Komiya K, Nishimura K, Tohma S. The usefulness of neutrophil CD64 expression in diagnosis of local infection in patients with rheumatoid arthritis in daily practice. *J Orthop*

- Sci 2010, 15(4):547-552.
17. Doi T, Miyazaki T, Nishino J, Tanaka S, Matsui T, Komiya A, Yamamoto S, Tokimura F, Mori T, Nishimura K, Katho N, Hasegawa J, Omata Y, Matsushita T, Thoma S. Neutrophil CD64 expression as a diagnostic marker for local infection and crystal-induced arthritis. *Mod Rheumatol*. 2010 Dec;20(6):573-579.
  18. Nagase Y, Iwasawa M, Akiyama T, Ogata N, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Yasui T, Matsumoto T, Masuda H, Bouillet P, Nakamura K, Tanaka S. Antiapoptotic molecule Bcl-2 is essential for the anabolic activity of parathyroid hormone in bone. *Ann N Y Acad Sci*. 2010, 1192(1):330-337.
  19. Lin L, Bu G, Mars WM, Reeves WB, Tanaka S, Hu K. tPA activates LDL receptor-related protein 1-mediated mitogenic signaling involving the p90RSK and GSK3beta pathway. *Am J Pathol*. 2010 Oct;177(4):1687-1696.
  20. Iwasawa M, Miyazaki T, Nagase Y, Akiyama T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Yasui T, Nakamura T, Kato S, Henninghausen L, Nakamura K, Tanaka S. Negative regulation of bone-resorbing activity of osteoclasts by anti-apoptotic Bcl-xL protein. *J Clin Invest* 2009, 119:3149-3159.
  21. Kadono Y, Tanaka S, Nishino J, Nishimura K, Nakamura I, Miyazaki T, Takayanagi H, Nakamura K. Rheumatoid arthritis associated with osteopetrosis. *Mod Rheumatol* 2009;19(6):687-690.
  22. Tóth B, Sarang Z, Vereb G, Zhang A, Tanaka S, Melino G, Fésüs L, Szondy Z. Over-expression of integrin beta3 can partially overcome the defect of integrin beta3 signaling in transglutaminase 2 null macrophages. *Immunol Lett*. 2009, 126(1-2):22-28.
  23. Hikita A, Tanaka N, Yamane S, Ikeda Y, Furukawa H, Tohma S, Suzuki R, Tanaka S, Mitomi H, Fukui N. Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Cell Biol*. 2009 Aug;87(4):581-593.
  24. Nagase Y, Iwasawa M, Akiyama T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Yasui T, Matsumoto T, Hirose J, Nakamura H, Miyamoto T, Bouillet P, Nakamura K, Tanaka S. The anti-apoptotic molecule Bcl-2 regulates the differentiation, activation and survival of both osteoblasts and osteoclasts. *J Biol Chem*. 2009, 284(52):36659-36669
  25. Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomo K, Baldwin KM, Kominami E, Higashibata A, Nagano K, Tanaka K, Yasui N, Mills EM, Takeda S, Nikawa T. Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol*. 2009 Sep;29(17):4798-811.
- [学会発表] (計 35 件)
1. 田中栄 第 41 回 日本人工関節学会 (2011.2.25) 東京 シンポジウム1 TKAフィルムレス術前計画について「立体骨モデルを用いた3次元術前計画」
  2. 田中栄 第116回 中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 (2011.4.7) 高知 岡豊セミナー1「新しい作用機序を有する骨粗鬆症治療薬」
  3. 田中栄 第 84 回 日本内分泌学会学術総会 (2011.4.22) 神戸 シンポジウム 8 骨代謝調節研究の進展と臨床展開 「骨吸収抑制薬による骨粗鬆症治療」
  4. 田中栄 第 55 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 (2011.7.18) 神戸 シンポジウム 1 リウマチ性疾患の新たな治療「骨粗鬆症治療の新展開」
  5. 田中栄 第 29 回 日本骨代謝学会学術集会 (2011.7.28-30) 大阪 シンポジウム 3 リウマチと炎症、破壊、修復 「関節リウマチにおける骨脆弱性と骨破壊」
  6. 田中栄 第 29 回 日本骨代謝学会学術集会 (2011.7.28-30) 大阪 ランチョンセミナー9 「エストロゲンの骨作用と SERM による骨粗鬆症治療」
  7. 田中栄 第 26 回 日本整形外科学会基礎学術集会 (2011.10.20) 前橋 シンポジウム 3 炎症と関節破壊 「関節リウマチにおける骨脆弱性と骨破壊」
  8. 田中栄 第117回 中部日本整形外科災害外科学会学術集会 (2011.10.29) 宇部 長州セミナー6「関節リウマチにおける大関節破壊予防戦略」
  9. 田中栄 第 13 回 日本骨粗鬆症学会 (2011.11.3-5) 大阪 シンポジウム1 骨粗鬆症治療薬の新たな展開「カテプシン K 阻害薬」
  10. 田中栄 第 13 回 日本骨粗鬆症学会 (2011.11.3-5) 大阪 イブニングセミナー2 「新しい活性型ビタミン D3 誘導体による骨粗鬆症治療」
  11. 田中栄 第 13 回 日本骨粗鬆症学会 (2011.11.3-5) 大阪 カレントトピックス 基礎から臨床への架け橋「骨粗鬆症治療

- From bench to bedside]
12. 田中栄 第 50 回日本核医学会学術総会 (2010.11.11)さいたま 教育講演 2 関節リウマチに於ける核医学の現状と将来「関節リウマチの最近の分子病態解明の進歩および分子標的薬」
  13. 田中栄 第 39 回日本関節病学会 (2011.11.12, 13) 横浜 ベイサイドセミナー12 「骨吸収抑制薬による骨粗鬆症治療とその作用機序」
  14. 田中栄 第 38 回 日本関節病学会 (2010.11.18)京都 関節病セミナー2「関節破壊を標的にした関節リウマチ治療戦略」
  15. 田中栄 第 40 回日本人工関節学会 (2010.2.27)沖縄 グラバーセミナー LS 11 「整形外科領域における SSI 対策と新しい感染症診断マーカー」
  16. 田中栄 第 403 回日本人工関節学会 (2010.2.27)沖縄シンポジウム4 人工膝関節の術前計画:近未来を科学する「立体骨モデルを用いた3次元術前計画」
  17. 田中栄 日本リウマチ学会(2010.4.22-25)神戸 シンポジウム2 生物学的製剤時代における手術の変遷—画像診断と外科的治療— 関節リウマチ骨破壊の画像評価法～Modified Sharp Score を中心に～
  18. 田中栄 日本リウマチ学会(2010.4.22-25)神戸 ランチョンセミナーLS24 関節疾患の病態・治療と今後の展望
  19. 田中栄 第 83 回日本整形外科学会学術集会 ランチョンセミナー20(2010.5.29)東京 関節リウマチにおける骨粗鬆症と骨破壊
  20. 田中栄 第36回 日本骨折治療学会 ランチョンセミナー(2010.7.3)幕張 薬物による骨粗鬆症脆弱性骨折の予防
  21. 田中栄 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 (2010.7.21)東京 シンポジウム4 関節リウマチと骨代謝 「RANKL を標的にした関節リウマチ治療」
  22. 田中栄 第 12 回日本骨粗鬆症学会 (2010.10.21-23)大阪 シンポジウム1 骨粗鬆症治療薬の今後「Denosumab」
  23. 田中栄 第 12 回日本骨粗鬆症学会 (2010.10.21-23)大阪 シンポジウム 3 関節リウマチ患者の骨の健康を守るために「関節リウマチにみられる細胞レベルでの骨の異常」
  24. 田中栄 第 12 回日本骨粗鬆症学会 (2010.10.21-23)大阪 ランチョンセミナー2 「RANKL/RANK pathway を標的にした骨代謝疾患治療戦略」
  25. 田中栄 第 21 回 日本リウマチ学会 中国・四国支部学術集会(2010.10.23)高松 「関節リウマチにおける骨脆弱性と関節破壊のメカニズム」
  26. 田中栄 第 53 回 日本リウマチ学会総会・学術集会(2009.4.23)東京 サテライトシンポジウム 骨破壊の要因「関節リウマチと骨破壊」
  27. 田中栄 第 53 回 日本リウマチ学会総会・学術集会(2009.4.26)東京 アニュアルコースレクチャー6「関節リウマチ」
  28. 田中栄 第 82 回日本整形外科学会学術総会 教育研修講演 29 (2009.5.16)福岡 「関節リウマチにおける骨破壊機序」
  29. 田中栄 第 1 回 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会(JOSKAS 2009)すずらんセミナーLS10(2009.6.27)札幌 「整形外科領域における静脈血栓塞栓症の診断と予防」
  30. 田中栄 第27回日本骨代謝学会 (2009.7.23-25) 大阪 ランチョンセミナー2「窒素含有型ビスフォスフォネートによる破骨細胞アポトーシスと骨吸収能の制御メカニズム」
  31. 田中栄 第27回日本骨代謝学会 (2009.7.23-25) 大阪 ミニシンポジウム 6 骨粗鬆症治療薬の新展開「カテプシン K 阻害薬」
  32. 田中栄 JCR2009 全国中央教育研修会東京大会(2009.8.23)東京「関節リウマチ手術の適応・成績・合併症—いつどのようなときに整形外科に依頼するか?—」
  33. 田中栄 第 50 回記念 日本組織細胞化学会総会・学術総会(2009.9.27)大津 シンポジウム4 骨を舞台にした基礎と臨床のクロストーク「破骨細胞分化・活性化メカニズムと骨吸収を標的にした骨軟骨疾患治療」
  34. 田中栄 JCR2009 全国中央教育研修会大阪大会(2009.12.13)大阪「関節リウマチ手術の適応・成績・合併症—いつどのようなときに整形外科に依頼するか?—」
  35. 田中栄 第 39 回 日本人工関節学会 (2008.2.13)東京 シンポジウム 4 生物製剤「骨関節感染症診断における CD64 の臨床的有用性」
- 〔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  
特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 栄 (TANAKA SAKAE)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：50282661

### (2) 研究分担者

二川 健 (HIKAWA TAKESHI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号：20263824

緒方 徹 (OGATA TORU)  
国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所・運動機能系障害研究部・室長  
研究者番号：20263824

芳賀 信彦 (HAGA NOBUHIKO)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：80251263

### (3) 連携研究者

なし

