

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 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790815

研究課題名（和文）骨粗鬆症・血管石灰化の発症並びに病態の進展における老化制御因子の関与

研究課題名（英文）Involvement of anti-aging factor in the pathogenesis of senile osteoporosis and vascular calcification

研究代表者 木戸 慎介 (KIDO SHINSUKE)

徳島大学・大学院ヘルスケアサイエンス研究部・特任助教

研究者番号：30437652

研究成果の概要（和文）：

末期腎不全患者である長期透析患者では、カルシウム・リンの貯蔵庫としての骨機能が障害され、「骨不全」とも称される骨のミネラル保持能力低下により、高い頻度で軟部組織に異所性石灰化が起こり、患者の生命予後を左右する重要な問題となっている。骨粗鬆症あるいは血管石灰化は加齢と共に発症する老年病であり、両者はしばしば合併する。これら二つの病態に対する関連性を示唆するエビデンスが蓄積されてきており、その発症並びに病態の進展に老化制御因子が関与する可能性が示唆されている。申請者はこれまでに末期腎不全患者に見られる異所性石灰化、および骨粗鬆症と血管石灰化の発症機能を繋ぐ因子を検索し、「骨不全」と「血管石灰化」を結ぶ新しい老化制御転写因子 MBF1 を同定した。本研究ではこの MBF1 の分子基盤の確立をおこなうことにより、新しいミネラル老化学を解明する。

研究成果の概要（英文）：

Oxidative stress reduces osteoblast number and suppresses bone formation, leading to the age-related loss of bone. We have demonstrated that anti-adipogenic cytokine, IL-11, is expressed in osteoblasts in an AP-1-dependent manner, and that DNA binding activity of JunD was reduced without change in its protein level in aged mice. Therefore, there is a possibility that reduced JunD activity may be caused by post-translational modification of JunD by an age-related increase in oxidative stress. In the present study, we showed that MBF1 protein was expressed in all tissues examined, whereas the amount of MBF1 decreased in many tissues including bone of aged mice. Besides, DNA precipitation assay demonstrated that MBF1 forms complex with JunD on an AP-1 site of IL-11 promoter via binding to a basic region of JunD. MBF1 binding to JunD also enhanced AP-1-dependent IL-11 gene transcription even in the presence of hydrogen peroxide. It is suggested that reduced MBF1 protein expression in osteoblasts may play a role in age-related impairment of osteoblast differentiation by suppressing IL-11 transcription via a reduction in JunD activity, and that MBF1 can be a new target against age-related loss of bone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：老化、腎不全、骨不全、血管石灰化、骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症の発症を考える上で、間葉系幹細胞の分化は重要なヒントを与えてくれる。間葉系幹細胞は骨芽細胞の他に脂肪細胞、血管内皮細胞、筋肉細胞、軟骨細胞、あるいは線維芽細胞へと分化する。加齢にともない骨芽細胞分化は低下し骨形成が抑制される一方、脂肪細胞分化は亢進し脂肪髄形成が見られる。申請者は加齢に伴い脂肪細胞分化抑制・骨芽細胞分化促進作用を有する Interleukin-11 の発現が低下し骨形成低下と脂肪髄化が惹起されること、生理的骨形成促進因子である力学的負荷により Δ FosB が増加し JunD と二量体を形成し IL-11 の転写を AP-1 依存的に促進すること (JBC 279:49795,2004)、老化マウスでは JunD の活性低下による IL-11 の転写抑制が見られることを明らかにしている (JBMR18:1461,2003)。しかしこの JunD の活性抑制の原因並びにその機序については不明のままである。一方、骨と血管系の連関については間葉系幹細胞が血液循環を介して動脈硬化病変部に達して平滑筋細胞に分化し、病変の形成に重要な役割を果たすことが証明されている (Sata M, Nat Med 8:403;2002)。

1)骨粗鬆症と動脈硬化症。血管石灰化との関連：骨粗鬆症と動脈硬化症はしばしば合併する。最近になって動脈石灰化の程度と骨密度や骨折危険性との間に相関があることが明らかになってきた。特に骨のカルシウム量の低下と動脈硬化による血管へのカルシウム沈着量が負の相関関係を示すことが明らかにされ、骨と血管との間には密接な相互関係が存在する可能性が示唆されている。また両者は加齢により症状が進行すると共にそれぞれの進行度が相関することも知られている。

2)加齢に伴う過酸化脂質の蓄積と骨・血管疾患の発症・進展との関わり：血管石灰化は動脈硬化の終末像ではなく、血管壁の炎症による異所性の骨・軟骨形成反応と理解されている (Demer LL, Int Epidemiol 31:737,2002)。またこの過程は加齢によって生じた過酸化脂質が血管壁に対して酸化ストレスを惹起することにより、骨芽細胞系への分化を促進することによりもたらされると考えられている。一方、骨芽細胞では加齢に伴い生じた酸化ストレスにより分化並びに生理的石灰化が抑制されることが知られているが、血管と同様に過酸化脂質が骨芽細胞の分化を直接抑制する可能性についても明らかにされつつある。従って骨・血管相関において認められる骨の生理学的石灰化の低下と血管の病的石灰化の上昇というパラドックスは、加齢により生じた過酸化脂質によりもたらされる酸化ストレスにより説明可能であると考えられる。

3)レド

ックス制御による転写因子の活性調節：AP-1 は酸化修飾により活性が低下するが、転写共役因子である MBF1 は AP-1 に直接結合することで AP-1 の酸化修飾を防ぎその活性を保持することが知られている。ショウジョウバエの mbf1 変異株は酸化ストレス環境下で短命である (Jindra M, EMBO J 23:3538, 2004)ことから、MBF1 は寿命制御に関わる可能性が示唆されるが、ヒトを含めた高等真核生物においても同様の機能を有するか否かについては不明である。MBF1 のヒトホモログである EDF1 は血管内皮細胞の分化や PPAR γ 等の核内受容体の転写調節に関与すること、老化細胞あるいは静止期細胞では Ubiquitin 化による分解制御を受けることが報告されていることから、ほ乳類細胞でも加齢に伴う様々な生理現象に MBF1 が関与している可能性が示唆されるが、確たる証拠はない。

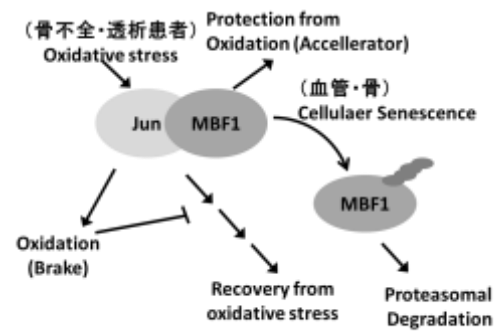


図:酸化ストレス防御におけるMBF1の役割

2. 研究の目的

末期腎不全患者である長期透析患者では、カルシウム・リンの貯蔵庫としての骨機能が障害され、「骨不全」とも証される骨のミネラル保持能力低下により、高い頻度で軟部組織に異所性石灰化が起こり、患者の生命予後を左右する重要な問題となっている。最近、Klotho 遺伝子の研究により、新しいミネラル代謝学が登場し、老化学の基盤を支える腎臓・骨・血管石灰化を結ぶ新しい経路が解明されつつある。これら二つの病態 (末期腎不全および骨粗鬆症) に対する関連性を示唆するエビデンスが蓄積されてきており、その発症並びに病態の進展に老化制御因子が関与する可能性が示唆されている。申請者はこれまでに末期腎不全患者に見られる異所性石灰化、および骨粗鬆症と血管石灰化の発症機構を繋ぐ因子を検索し、「骨不全」と「血管石灰化」を結ぶ新しい老化制御転写因子 MBF1 (multiprotein bridging factor-1) を同定した。本研究ではこの MBF1 の分子基盤の確立をおこなうことにより、新しいミネラル

老化学を解明する。

3. 研究の方法

1)骨粗鬆症と動脈硬化・結果石灰化との関連:加齢に伴う骨粗鬆症と骨髄の脂肪化、並びに血管石灰化が個体老化あるいは細胞老化に起因したものであるか否かについて、老化促進モデルマウスあるいは通常の老齢マウスを用いて検討する。**2)加齢に伴う過酸化脂質の蓄積と骨・脚気な疾患の発症・進展との関わり:**加齢に伴う過酸化脂質増加の有無をモデル動物で解析すると共に、実際に生じた過酸化脂質が血管壁での骨芽細胞様細胞の出現並びに骨での骨芽細胞の分化抑制・脂肪細胞の分化促進に関与するか否かを解析する。**3)レドックス制御による転写因子の活性調節:**加齢に伴うこれら病態の発症・進展と MBF1 との関与を検証するため、まず各組織における MBF1 発現量が加齢に応じて減少するか否か、また減少する場合はそれが Ubiquitin 分解経路依存性であるかについて確認する。次に各組織における MBF1 の標的分子について検討をおこなう。骨・骨髄では JunD を有力候補とし、両者の相互作用、並びに標的遺伝子である IL-11 の転写に対する影響について検討する。一方、血管細胞においては MBF1 と相互作用しうる候補分子の検索を試みる。

4. 研究成果

1)骨及び血管における MBF1 の発現解析
MBF1 がほ乳類動物の各組織、とりわけ骨・骨髄あるいは血管組織において機能的な分子 (MBF1 タンパク) を発現するか、またその発現が加齢によって変化するか否かを明らかにするため、(1)老化促進モデルマウス (SAMP6; 対照群は SAMR1)、及び(2)正常老齢マウス (対照群として正常若齢マウス) との間でそれぞれ比較検討をおこなった。また MBF1 の発現解析に際して、マウス特異的抗体を作成した。はじめに老化促進モデルマウス (SAMP6) 並びに対象群 (SAMR1) の骨及び血管組織における MBF1 の発現を比較した。その結果、mRNA レベルは双方大きな差は認められなかったが、MBF1 特異的抗体を用いた Western blot 解析より、SAMP6 の骨並びに血管組織において、著しい発現低下を認めた。この現象がモデル動物特有の物であるか否かを明らかにするため、通常老齢マウスを用いた検討を加えた。C57BL/6J 系の雄性老齢マウス (32 週齢) と若齢マウス (7 週齢) の各組織における MBF1 mRNA 並びにタンパクの発現を比較検討した。その結果、MBF1 mRNA は今回解析を試みた全ての組織で発現を認め (大脳、脾臓、肝臓、心臓、肺、骨格筋、骨髄、骨、皮膚、胃、小腸、および精巣) だが、週齢による著しい差異は認めなかった。一方

タンパク発現については程度の差はあるが、殆どの組織において老齢マウスでは若齢マウスに比べて低下していた。次に MBF1 タンパクの発現調節に関わる機序の解析について初代培養骨芽細胞を用いた *in vitro* の系で試みた。新生児マウス頭蓋骨より単離した骨芽細胞 (mPOBs) を用いて MBF1 タンパクの発現を解析した。その結果、mPOBs は内因性に MBF1 を発現するがその発現レベルは非常に低いことが分かった。一方、当該細胞を Ubiquitin-Proteasome 経路阻害薬 (MG132, Lactacystin) で処理することで MBF1 タンパク量が著しく増加することを見いだした。同様の結果はヒト血管内皮細胞初代培養系においても認められた。以上の結果から、MBF1 はマウスのほぼ全ての組織に発現するが、その発現は恐らくは Ubiquitin 分解経路依存性的な調節を受け、加齢に伴い減少することを見いだした。

2)骨芽細胞系における MBF1 の機能解析

骨芽細胞は脂肪細胞とともに間葉系幹細胞を共通の起源とする細胞系列であり、両者の分化の振り分けは生理的な骨形成促進過程に重要な役割を担う。そこで次に、MBF1 が骨芽細胞の分化あるいは機能に果たす役割について検討を試みた。なお本検討では、骨芽細胞・脂肪細胞双方への分化能を有するマウス骨髄間質細胞株 (ST2) を用いた。まず ST2 細胞を用いて、内因性 MBF1 発現が骨芽細胞分化に及ぼす影響を調べる為、siRNA を用いた knockdown 実験をおこなった。対象群 (scrambled siRNA 導入細胞) では骨形成誘導因子である BMP-2 刺激により Alkaline phosphatase (ALP) 陽性細胞数の増加、すなわち骨芽細胞への分化促進が観察されたが、内因性 MBF1 発現を knockdown した細胞 (MBF1 siRNA 導入細胞) では ALP 陽性細胞数の著しい減少が認められた。次に MBF1 が骨芽細胞あるいは脂肪細胞系への分化に及ぼす影響を調べる為、ST2 細胞株に MBF1 を恒常的に発現する細胞株 (ST2/MBF1) を樹立した。なお ST2 細胞は骨芽細胞並びに脂肪細胞への分化能を有する細胞株である。また対象群として LacZ を恒常的に発現する細胞株 (ST2/LacZ) を作成した。得られた両細胞株 (ST2/MBF1 および ST2/LacZ) を骨芽細胞誘導因子 (BMP-2) あるいは脂肪細胞分化誘導因子 (PPAR γ -ligand; Troglitazone) 存在下で 7 日間培養し、骨芽細胞・脂肪細胞への分化をそれぞれ ALP 染色、あるいは Oil-Red O 染色にて評価した。その結果、MBF1 安定発現株では BMP-2 刺激下での骨芽細胞分化が対象株 (ST2/LacZ) に比して著明に亢進していた。一方で、Troglitazone 誘導性脂肪細胞分化は対象株に比して抑制されていた。以上の結果から、MBF1 は骨芽細胞分化促進並びに脂肪細胞分化抑制作用を有すること、その作用点とし

て MBF1 は両者の分化を振り分けを制御する可能性が示唆された。これは我々が MBF1 の標的候補と考えている IL-11 の有する生理作用とも合致する。そこで次に MBF1 が骨芽細胞における IL-11 遺伝子の転写に及ぼす影響について検討を加えた。

3) IL-11 遺伝子の転写調節における MBF1 の役割

MBF1 が AP-1 (JunD) の活性促進を介して IL-11 遺伝子の転写を促進するとの作業仮説を検証するため、mouse IL-11 promoter 安定発現株 (Kido S et al. Bone 2009;45(6):1125-32) を用いて JunD 並びに MBF1 を強制発現した際の転写促進効果について検討した。その結果、MBF1 は JunD との共発現により IL-11 遺伝子の転写を強く促進することが明らかとなった。MBF1 と JunD との結合様式について検証を加えた。両者の相互作用を GST-pull down 法により検討したところ、MBF1 は JunD の basic region (BR) 領域付近に結合することが明らかとなった。以上の結果から、MBF1 は JunD との結合を介して IL-11 遺伝子の転写を促進する可能性が示唆された。そこで次に酸化ストレスが骨芽細胞に及ぼす影響に対する MBF1 の関与について調べた。対象株 (ST2/LacZ) は過酸化水素処理により高濃度では細胞死を、低濃度であっても骨芽細胞分化 (ALP 活性) の抑制がみられた。この現象は siRNA による内因性 MBF1 の発現抑制 (knockdown) により増強した。一方、MBF1 安定発現株 (ST2/MBF1) では対象株に比してより高濃度の過酸化水素刺激下でも生存可能であった。そこでこの MBF1 の過剰発現によって得られた効果が IL-11 に依存したものであるか否かについて検証を加えた。

4) 酸化ストレス下での IL-11 の発現変化に及ぼす MBF1 の役割

ショウジョウバエにおいては、酸化ストレスは AP-1 (JunD) の酸化修飾 (S-Cystenyl cytenylation) を介してその活性抑制がみられることから、酸化ストレス下では骨芽細胞において MBF1 の活性抑制に伴う IL-11 の発現抑制が見られ、これが骨芽細胞分化の抑制並びにアポトーシスの促進などを引き起こす可能性が予測される。そこでまず骨芽細胞を過酸化水素で処理した際の IL-11 の発現変化を検討した。その結果、過酸化水素処理後の骨芽細胞では IL-11 mRNA 発現の著しい低下が見られ、また TUNEL 陽性で示されるアポトーシス細胞数の増加が確認された。そこでこの発現抑制機序を調べるべく、IL-11 遺伝子の promoter 領域を用いた解析を加えた。その結果、骨芽細胞における IL-11 promoter 活性は酸化ストレス負荷により減弱するが、これは JunD と MBF1 の共発現により一部回復することを見いだした。なお JunD 単独の発

現では同作用は認められなかった。また JunD の basic region 内に存在する酸化修飾付加部位とされるシステイン残基をセリンに置換した変異体では、過酸化水素刺激下においても IL-11 promoter 活性を促進した。以上の結果から、MBF1 は酸化ストレスから JunD を保護し、AP-1 依存的な IL-11 の転写を促進することが示された。そこで次に IL-11 が骨芽細胞アポトーシスを抑制するかについて検討を試みた。

5) 骨芽細胞アポトーシス誘導における IL-11 の関与

初めに IL-11 がアポトーシス抑制作用を有するか否かについて検証した。培養骨芽細胞を前述の如く過酸化水素で刺激したところ、TUNEL 陽性アポトーシス細胞数の増加が見られたが、これは IL-11 組換え体 (mrIL-11) の添加により用量依存的に抑制された。一方、過酸化水素刺激によるアポトーシス細胞数は siRNA による内因性 IL-11 発現の抑制 (knockdown) により亢進した。以上、MBF1 はマウスなどの高等真核生物においてもショウジョウバエと同様に機能的分子を発現し、細胞を酸化ストレス刺激から防御する機能を有することが示された。また MBF1 は IL-11 の誘導を介して、骨芽細胞・脂肪細胞の分化の振り分けを骨芽細胞側へとシフトさせること、また分化後の骨芽細胞に対してはアポトーシス抑制作用を介してその機能を維持し、骨芽細胞の生存並びに分化を正に調節している可能性が示唆された。

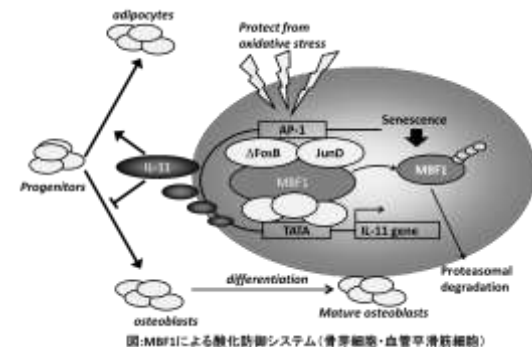


図: MBF1による酸化防御システム(骨芽細胞・血管平滑筋細胞)

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 13 件)

1. Matsumoto T, Kuriwaka-Kido R, Kido S et al., Regulation of osteoblast differentiation by interleukin-11 via AP-1 and Smad signaling. *Endocr J*, 査読有、2012; 59(2): 91-101, doi:10.1507/endocrj.EJ11-0219

2. Kido S, Kuriwaka-Kido R, Matsumoto T et al., Mechanical stress activates Smad pathway through PKC δ to enhance interleukin-11 gene transcription in osteoblasts. PLoS One、査読有、2010; 5(9): e13090,doi:10.1371/journal.pone.0013090
3. Taniguchi T, Kido S, Taniguchi H et al., Induction of endosomal/lysosomal pathways in differentiating osteoblasts as revealed by combined proteomic and transcriptomic analysis. FEBS Lett、査読有、2010; 584(18): 3969-3974, doi:10.1016/j.febslet.2010.07.055
4. Aranami F, Kido S, Miyamoto K et al., Fibroblast growth factor 23 mediates the phosphaturic actions of cadmium. J Med Invest、査読有、2010; 57(1): 95-108, doi:10.2152/jmi.57.95
5. Kido S, Kuriwaka-Kido R, Matsumoto T et al., Mechanical stress induces Interleukin-11 expression to stimulate osteoblast differentiation. Bone、査読有、2009; 45(6): 1125-32, doi:10.1016/j.bone.2009.07.087

[学会発表] (計 10 件)

1. 木戸慎介、糖尿病に併存する腎障害・骨障害の発症及び進展における FGF23 の関与、第 15 回日本病態栄養学会学術集会、2012.1.14、京都市 (国立京都国際会館)
2. 木戸慎介、イタイイタイ病に見られる骨障害の発症・進展における FGF23 の関与、第 29 回日本骨代謝学会、2011.7. 28、大阪市 (大阪国際会議場)
3. 木戸慎介、糖尿病性骨症の発症機序の解析：ユビキチン化分解経路に及ぼす AGEs の影響、第 13 回日本病態栄養学会、2010.1. 9、京都市 (国立京都国際会館)
4. 木戸慎介、加齢に伴う骨形成低下のメカニズム：酸化ストレスの関与、第 63 回日本栄養・食糧学会大会、2009.5. 20、長崎市 (ブリック)

[図書] (計 5 件)

1. 木戸慎介、他、日本メディカルセンター、FGF23 の作用と作用機序、腎と骨代謝、2012, vol.25, No.1. P.25-31
2. 木戸慎介、他、日本メディカルセンター、リンバランスとその調節機構、CKD-MBD ハンドブック、2009, P25-30

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木戸 慎介 (KIDO SHINSUKE)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・特任助教
研究者番号：30437652

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：