

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25年4月19日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22616006

研究課題名（和文）メカニカルストレス応答遺伝子 Fbxo32 の骨量調節における機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of a mechanical stress responsible gene Fbxo32 on bone volume regulation

研究代表者

和泉 伸一（IZUMI SHINICHI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40264246

研究成果の概要（和文）：

Fbxo32 ノックアウトマウスの解析を中心に、メカニカルストレスによる骨量調節の分子メカニズムの一端を明らかにした。即ち、マウスの尾部懸垂実験を行い骨形態計測で解析した結果、Fbxo32 は骨芽細胞において尾部懸垂後の骨形成（骨密度よりも骨量）に関与していた。また、野生型マウスおよび Fbxo32 ノックアウトマウスにイソプロテノロールを投与し骨形態計測にて解析した結果、それぞれの大腿骨の計測値の動態は同様であり、交感神経刺激による骨量減少に Fbxo32 は関与しないと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We clarified a part of molecular mechanisms on bone volume regulation by analyzing Fbxo32 knockout mice. By bone morphometric analysis after mouse tail suspension experiments, it appeared that Fbxo32 gene expression in osteoblasts was associated with the bone volume but not bone density in the bone formation. Further, wild type mice and Fbxo32 knockout mice were administered isoproterenol, similar morphometric value between the femurs was recognized, indicating that Fbxo32 was not involved in a sympathetic nerve-stimulated decrease of bone volume.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：メカノバイオロジー

キーワード：メカニカルストレス、遺伝子、骨量、細胞・組織、発生・分化、Fbxo、Runx2

1. 研究開始当初の背景

骨細胞は骨の中で互いの突起および突起が通る骨細管で連絡している。さらに骨細胞はその突起と骨細管を介して骨表面の骨芽細胞と連絡し、骨全体にネットワークを形成している。その組織学的特徴から、これまで、骨におけるメカニカルストレスの感知には

骨細胞が重要な役割を果たすと考えられてきたが、その分子機構は解明されていない。我々は、骨量維持における骨芽細胞アポトーシスの意味を探るべく、骨芽細胞特異的 I 型コラーゲンプロモーター下で Bcl-2 を過剰発現させたトランスジェニックマウス（tg マウス）を作製した。Bcl-2 は本来アポトーシ

ス抑制因子であるが、意外なことに Bcl-2 tg マウスでは、導入遺伝子の発現が低下する骨細胞においてアポトーシスが認められ、4ヶ月齢マウスでは、8割の骨細胞が死滅した。この4ヶ月齢の Bcl-2 tg マウスを利用し、尾部懸垂で後肢を非荷重にする実験により、メカニカルストレスにおける骨細胞の機能を解析した。Bcl-2 tg マウスでは、尾部懸垂後に骨量の低下を認めず、骨細胞が非荷重時の骨量減少に深く関わっていることを明らかにした。さらに、骨細胞は、生理的条件下（荷重状態）で骨芽細胞機能を抑制、破骨細胞分化を促進し、骨量を負に制御していること、そして非荷重時にはその作用を増強することを明らかにした。さらにその分子メカニズムを明らかにすべく、野生型マウスと Bcl-2 tg マウスの、コントロール群、尾部懸垂群および再荷重群からの骨 RNA を用いて、マイクロアレイで比較した。その結果、野生型マウスで非荷重時に発現誘導され、再荷重時に発現が低下する遺伝子で、その変化が Bcl-2 tg マウスでは見られない遺伝子として Fbxo32 を同定した。

F-box モチーフを持つユビキチンリガーゼ Fbxo32 は、非荷重時や、神経切断時に筋組織に誘導され、廃用性筋萎縮の原因遺伝子と考えられている。Fbxo32 は、筋組織のみならず骨組織にも発現を認めたため、ノックアウトマウス (ko マウス) を米国より入手した。ko マウスに挿入されている β -galactosidase 遺伝子を用いて、Fbxo32 の骨における発現を確認したが、骨芽細胞に発現を認めた。したがって、Fbxo32 は、メカニカルストレスを感じた骨細胞からのシグナルによって、骨芽細胞に発現誘導されたと考えられる。野生型マウスと Fbxo32 ko マウスで1週間の尾部懸垂を行い、骨量をそれぞれのコントロール群（非懸垂群）と比較したが、野生型マウスでは、著明な骨量減少が尾部懸垂群で認められるのに対し、Fbxo32 ko マウスでは、その減少が軽度であった。我々が解明を進めている骨細胞ネットワークを介したメカニカルストレス応答機構の中で、本研究は、Fbxo32 ko マウスの解析を中心に、メカニカルストレスによる骨量調節の分子メカニズムの一端を明らかにする。

2. 研究の目的

(1) Fbxo32 が、骨芽細胞分化・機能を調節するか、骨芽細胞を介して破骨細胞分化・機能を調節するか明らかにする。

(2) Fbxo32 が交感神経刺激や副腎皮質ホルモンによる骨量減少に関与するか明らかにする。

(3) 骨芽細胞において、Fbxo32 がユビキチン化する分子を同定する。これらにより、Fbxo32 が非荷重時の骨量減少に関わる分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Fbxo32 ko マウスの尾部懸垂実験

すでに尾部懸垂を1週間行い、マイクロ CTでの骨量、海綿骨数、海綿骨厚等の解析は終了しているが、さらに骨組織形態計測にて、骨形成・骨吸収パラメーターを解析し、Fbxo32 が尾部懸垂後の骨形成に関与するか、骨吸収に関与するか明らかにする。

(2) Fbxo32 ko マウスへのカテコールアミン、デキサメサゾン投与

① 4ヶ月齢の野生型マウスおよび Fbxo32 ko マウスに $6\mu\text{g/g}$ 体重のイソプレテノロールを10日間投与、マイクロ CT、骨組織形態計測にて解析する。

② 4ヶ月齢の野生型マウスおよび Fbxo32 ko マウスに 1.4 mg/kg/day で放出される徐放性プレドニンペレットを皮下に移植する。移植後27日目に屠殺、マイクロ CT、骨組織形態計測にて解析する。

尾部懸垂実験は、マウスに大きなストレスを与えるため、負荷以外にも交感神経刺激や過剰な副腎皮質ホルモン分泌が骨量減少に影響を与えている可能性がある。①、②の実験を行うことにより、交感神経刺激や副腎皮質ホルモンによる骨量減少に Fbxo32 が関与するか明らかにする。

(3) *in vitro* における骨芽細胞・破骨細胞の分化、機能解析

③野生型マウスおよび Fbxo32 ko マウスの頭蓋冠由来前骨芽細胞を用い、アルカリホスファターゼ染色、アリザリンレッド染色を行い、骨芽細胞分化、石灰化を検討する。また、培養4, 8, 12, 16日目に RNA を抽出、real time RT-PCRにより、Runx2、Osterix、骨基質蛋白質 (I型コラーゲン、オステオポンチン、オステオカルシン) の発現を測定、骨芽細胞分化・機能レベルを検討する。

④Fbxo32 を発現するアデノウイルスベクターおよび F-box を欠失させた Fbxo32 Δ Fb を発現するアデノウイルスベクターを作製する。IRES-EGFP を付加し、EGFP を発現マーカーとして用いる。野生型マウスの頭蓋冠由来前骨芽細胞に Fbxo32-IRES-EGFP アデノウイルスベクターあるいは EGFP アデノウイルスベクターを感染させ、③と同様に、骨芽細胞分化、石灰化を調べるとともに、Runx2、Osterix、骨基質蛋白質の発現を検討する。

⑤野生型マウスおよび Fbxo32 ko マウスの頭蓋冠由来骨芽細胞と野生型マウスの骨髄細胞を共培養する。多核の TRAP 陽性細胞数の

計測および象牙片を用いた Pit assay により、破骨細胞分化・機能に対する作用を検討する。(1)、(3)の実験により、Fbxo32 が骨芽細胞分化・機能に作用するか、骨芽細胞を介して破骨細胞分化・機能に作用するか、明らかにする。

(4) Fbxo32 のターゲット基質蛋白質の同定
⑥Fbxo32 の全長 cDNA あるいはその cDNA 断片を LexA (DNA 結合ドメインとして使用) に結合させ、Western blot により bait としての融合蛋白質の安定性を調べる。初期培養骨芽細胞より cDNA ライブラリーを構築、B42 (転写活性化ドメインとして使用) を含む prey ベクターに挿入する。酵母を用いた two hybrid system により、結合蛋白質を同定する。結合は、pull down assay で確認する。
⑦Fbxo32 は、Skp1、Cul1、Roc1 と E3 リガーゼ (SCF 複合体) を形成する。まず、GST-Fbxo32 融合蛋白質および⑥で同定した蛋白質の GST 融合蛋白質を精製する。tag を付けた T7-Skp1、Myc-Cul1、HA-Roc1 を COS-7 細胞に導入、アガロース G ビーズ上の抗 Myc 抗体で免疫沈降させ、Skp1、Cul1、Roc1 を得る。E2 としては、すでに報告されている UbcH3 を用いる。E1、E2、GST-Fbxo32、Skp1、Cul1、Roc1、ビオチン標識したユビキチン、標的蛋白質を加え、反応後、Western blot にて標的蛋白質のユビキチン化を調べる。

4. 研究成果

(1) マウスの尾部懸垂実験を行い骨形態計測で解析したところ、大腿骨の骨量が野生型マウスの尾部懸垂群では対照群に比べ減少していたが、Fbxo32 ノックアウトマウスでは差はなかった。しかし骨密度は野生型マウスでも Fbxo32 ノックアウトマウスでも懸垂群では対照群に比べ減少していた。したがって、Fbxo32 は骨芽細胞において尾部懸垂後の骨形成 (骨密度よりも骨量) に関与することが明らかになった。また、Fbxo32 ノックアウトマウスと野生型マウスの体重の増加曲線は、雄では生後の週で尾部懸垂群と対照群との間に有意な差は認められなかった。雌は雄より増加傾向は低いと同様に尾部懸垂群と対照群との間に有意な差は認められなかった。Fbxo32 が影響を及ぼす適切な週令があるのか、また Fbxo32 が筋芽細胞に影響を及ぼすか否かも含め、Fbxo32 が骨芽細胞の分化と石灰化に変化を起こすかを明らかにする必要がある。
(2) Fbxo32 ko マウスへのカテコールアミンまたはデキサメサゾンとの投与
尾部懸垂実験はマウスに大きなストレスを与えるため、負荷以外にも交感神経刺激や過剰な副腎皮質ホルモン分泌が骨量減少に影響

を与えている可能性がある。そこで、①、②の実験を行うことにより、交感神経刺激や副腎皮質ホルモンによる骨量減少に Fbxo32 が関与するか明らかにする実験を行った。

① 4ヶ月齢の野生型マウスおよび Fbxo32 ノックアウトマウスにイソプレテノロールを 10 日間投与、骨形態計測にて解析した。その結果、Fbxo32 ノックアウトマウスの大腿骨の計測値と野生型マウスの計測値の動態は同様であった。したがって、交感神経刺激による骨量減少に Fbxo32 は関与しないと考えられた。

② 4ヶ月齢の野生型マウスおよび Fbxo32 ノックアウトマウスに徐放性プレドニンペレットを皮下に移植し、移植後 27 日目に屠殺し、マイクロ CT、骨形態計測での解析は検討中である。プレドニンペレットを移植したマウスの多くは死んでしまうため、投与条件を検討している。マウスはヒトに比べてプレドニンに対する感受性がかなり高いようである。

(3) Fbxo32 は in vivo ならびに in vitro において骨芽細胞に分布していて、Fbxo32 ノックアウトマウスの頭蓋冠由来骨芽細胞ではコッサ染色が野生型に比較して強く、MC3T3E1 培養細胞に Fbxo32 を発現するアデノウイルスベクターを導入するとコッサ染色が弱く遅延するので、Fbxo32 は骨芽細胞の分化・機能を調節していることが明らかになった。in vitro における破骨細胞の分化と機能の解析する実験により、Fbxo32 が骨芽細胞を介して、破骨細胞分化・機能に作用するかを明らかにする。野生型マウスおよび Fbxo32 ノックアウトマウスの頭蓋冠由来骨芽細胞と野生型マウスの骨髄細胞を共培養した。多核の Trap 染色陽性細胞数の計測により、破骨細胞分化・機能に対する作用を解析進行中である。

(4) Fbxo32 のターゲット基質蛋白質の同定は、検討中であり、成果を公表するに至っていない。

これまで、Fbxo32 は筋組織でのみ注目されてきた。実際 Fbxo32 ko マウスでは、非荷重時および神経切断時に廃用性筋萎縮が起こらない。しかし、骨組織では全く顧みられることはなかった。我々の研究は、Fbxo32 が骨芽細胞にも発現し、非荷重時に発現増強されること、そして、非荷重時の骨量減少に関わることを発見した独創的な研究である。本研究は、さらにその分子メカニズムを解明しようとするものであり学術的意義も高い。現代社会においては、運動量低下による骨量減少が認められ、特に高齢者では、長期臥床により力学的負荷が不足し骨量が減少、骨折が増加することが大きな問題になっている。また、歯科領域においては、歯の喪失とともに力学的負荷が低下し、歯槽骨の著明な減少が認め

られ、人工歯根の適用も困難となる。メカニカルストレス減少時の骨量減少の分子メカニズムの解明は、加齢や歯喪失による骨量減少に対する治療法の開発へとつながり、将来大きな社会貢献が期待できる。

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 4 件)

- ① Wang Y, Liu W, Masuyama R, Fukuyama R, Ito M, Zhang Q, Komori H, Murakami T, Moriishi T, Miyazaki T, Kitazawa R, Yoshida CA, Kawai Y, Izumi S, and Komori T、Pyruvate dehydrogenase kinase 4 induces bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis、Bone、査読有、50、2012、409-419
- ② Maeno T, Moriishi T, Yoshida C, Komori H, Kanatani N, Izumi S, Takaoka K, and Komori T、Early onset of Runx2 expression causes craniosynostosis, ectopic bone formation, and limb defects、Bone、査読有、49、2011、673-682

[学会発表] (計 3 件)

- ① 森石武史、和泉伸一、小守壽文、骨芽細胞分化における抗アポトーシス分子 Bcl-2 の役割、第 28 回日本骨代謝学会学術集会、2010 年 7 月 22 日、京王プラザホテル (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和泉 伸一 (IZUMI SHINICHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40264246

(2) 研究分担者

吉田 カロリナアンドレア
(YOSHIDA CAROLINA ANDREA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：50437828

森石 武史 (MORIISHI TAKESHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・技術職員
研究者番号：20380983

(3) 連携研究者

小守 壽文 (KOMORI TOSHIHISA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00252677

伊東 昌子 (ITO MASAKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：10193517

福山 亮 (FUKUYAMA RYO)
広島国際大学・薬学部・助教
研究者番号：20389117