

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 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

課題番号：22659268

研究期間：2010～2011

研究課題名（和文） Bim, Puma による破骨細胞アポトーシス制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulatory mechanisms of osteoclast apoptosis by Bim and Puma

研究代表者

中川 匠 (Nakagawa Takumi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90338385

研究成果の概要（和文）：

破骨細胞は、骨粗鬆症や炎症性関節炎の骨破壊などで見られる骨吸収を行う唯一の細胞である。その破骨細胞のアポトーシスを制御しているタンパク質、Bcl-2 familyの仲間である Bim, Puma の破骨細胞内の制御機構を解明することで、骨粗鬆症、炎症性関節破壊の病態および治療薬の開発に新たなアプローチを提示する事を目的とし、研究を進めている。Bim ヘテロノックアウトマウス（Bim +/-）と、Puma ヘテロノックアウトマウス（Puma +/-）を掛け合わせによって、Bim ダブルノックアウトマウス（Bim -/-）、Puma ダブルノックアウトマウス（Puma -/-）を作製し、それぞれの骨形態計測をおこなっている。今後はBim Puma ダブルノックアウトマウス（Bim -/- Puma -/-）を作製し、このダブルノックアウトマウスの骨形態計測を行う事で、骨代謝における Bim 及び Puma の相互的な働きを評価する。

Bim -/- マウスより採取した破骨細胞の細胞分化には明らかな変化が見られなかった。細胞生存能は延長していたが、その細胞生存能の延長と相反して骨吸収能は低下しており、破骨細胞において Bim がアポトーシスの亢進、骨吸収の亢進に働いていることが確認された。Bim -/- マウスの骨形態計測において骨量の mild な増加がみられており、in vitro の結果を反映するものであった。Puma -/- マウスに関しては、Bim -/- マウスのような明らかな変化は現在のところ確認されていないが、現在解析中である。今後は、Bim -/- Puma -/- ダブルノックアウトマウスを作製し、骨形態計測及び in vitro の実験を行っていく予定である。

最終的には、それらの結果と既に当研究室で解析済みの Bcl-XL, Bcl-2 の結果を解析することで破骨細胞内における Bcl-2 family の相互的な働きを明らかにすることが可能と考えている。

研究成果の概要（英文）：

The Bcl-2 family proteins are known as key regulators of apoptosis. In osteoclasts, Bcl-2 family proteins were reported to regulate not only cell viability but also bone resorbing activity. To determine the role of pro-apoptotic Bcl-2 family proteins Bim and Puma, we made knock-out mouse and evaluate bone morphometry, osteoclast viability and bone resorbing activity. Bim KO mice showed mild osteosclerosis due to impaired bone resorption, despite their osteoclast survival were extended. Puma KO mouse had no phenotype in bone morphometry. Puma KO osteoclast had extended viability but there were no significant difference in bone resorbing activity.

Making Bim and Puma double knock-out mouse (Bim -/- Puma -/-) are required for further understanding of the co-regulation between Bim and Puma in osteoclast.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000

2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	360,000	3,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：破骨細胞、Bcl-2 family 蛋白、Bim、Puma

1. 研究開始当初の背景

現在の超高齢化社会において骨粗鬆症や関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis; RA) の関節破壊による ADL 低下は大きな社会問題となっている。これらの疾患は破骨細胞による骨吸収が病態の主体であり、したがって破骨細胞の骨吸収活性・アポトーシスの機序を解明することは骨粗鬆症や RA 関節破壊などの疾患の治療戦略に新たなアプローチを提示するものとなる。細胞のアポトーシス制御経路にはミトコンドリアを介する経路 (Mitochondrial Pathway) と介さない経路 (Death Receptor pathway) があり、Bcl-2 (B cell lymphoma 2) family タンパク質はミトコンドリアの膜透過性を調節することによってアポトーシスの促進、抑制を行うことが知られている (Tsumimoto, Y. : J. Cell. Physiol., 195 : 158-167, 2003)。

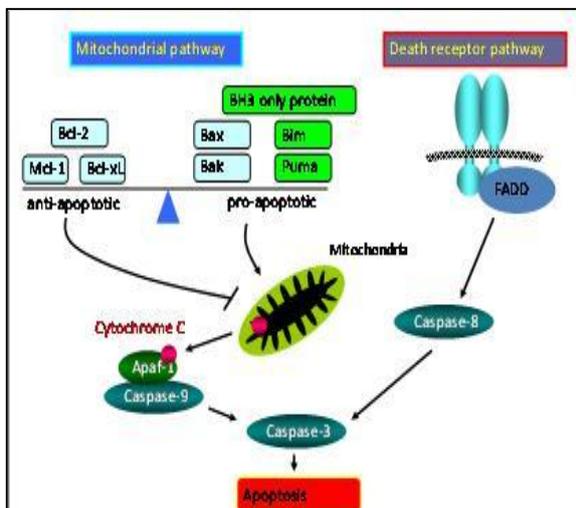


図1 アポトーシス経路

当研究室では Bcl-2 family タンパク質の一つである Bim のノックアウト (Knock out; KO) マウスを用いて、Bim のユビキチン化制御によって破骨細胞のアポトーシスが制御されていることを報告した (Akiyama T, et al. : EMBO Journal, 22 : 6653-6664, 2003)。一方 Puma KO マウスについては、単独では著明な表現型は示さないものの、Bim, Puma のダブルノックアウト (DKO) マウスにおいては、それぞれ

の KO マウスでみられるものより更に強いリンパ球のアポトーシス抑制が確認されている (Erlacher M, et al. : J. Exp. Med., 203 : 2939-2951, 2006)。この報告内に骨代謝に関する記載はないが、破骨細胞においても、各々単独のノックアウトマウスよりも強いアポトーシス抑制がみられると考えられ、その作用機序には Bim と Puma の何らかの相互作用が働いていることが考えられる。このような分子同士の相互作用の作用機序をひとつずつ解明していくことが、その先にある骨粗鬆症、RA 関節破壊、骨 Paget 病、転移性骨腫瘍の病態解明、新たな治療薬の開発に貢献するものと考えている。

2. 研究の目的

破骨細胞は、骨粗鬆症や炎症性関節炎の骨破壊などで見られる骨吸収を行う唯一の細胞である。その破骨細胞のアポトーシスを制御しているタンパク質、Bcl-2 family の仲間である Bim, Puma の破骨細胞内の制御機構を解明することで骨粗鬆症、炎症性関節破壊の病態および治療薬の開発に新たなアプローチを提示する。

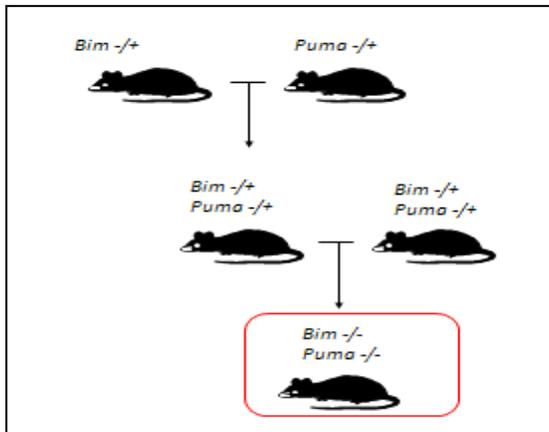
3. 研究の方法

Bim ヘテロ KO マウス、Puma ヘテロ KO マウスを掛け合わせることで Bim と Puma の KO (Bim^{-/-}, Puma^{-/-}) マウスの作製を行った。次に Bim ヘテロ KO (Bim^{+/-}) マウスと Puma ヘテロ KO (Puma^{+/-}) マウスを掛け合わせることで Bim ヘテロ Puma ヘテロ KO (Bim^{+/-} Puma^{+/-}) マウスを作製、この Bim ヘテロ Puma ヘテロ KO マウス同志を掛け合わせることで Bim と Puma の DKO (Bim^{-/-} Puma^{-/-}) マウスの作製を計画した (図2)。

図2 Bim^{-/-} Puma^{-/-} マウスの作製

作製された Bim KO (Bim^{-/-}) マウス、Puma KO (Puma^{-/-}) マウスについて骨形態計測を行った。生後 5 週令のマウスより骨組織を採取し、パラホルムアルデヒドで固定、EDTA にて脱灰し、パラフィン包埋、マイクロームを用いて切片を作製。作製された切片は破骨細胞が同定できるように HE 染色に

加え TRAP 染色を行う。染色された切片を光学顕微鏡で観察し、骨量 (BV/TV)、骨面 (BS/TV)、破骨細胞面 (Oc.S/BS)、破骨細胞数 (Oc.N/BS) の評価を行った。



それぞれの KO (Bim^{-/-}, Puma^{-/-}) マウスの大腿骨遠位を採取し、マイクロ CT を用いて骨梁数 (Tb.N)、骨梁間隙 (Tb.Sp) などの骨構造インデックスを評価した。また、それぞれの KO マウスの大腿骨頸部において DXA 法を用いた骨密度測定を行い比較検討した。さらに骨吸収のパラメーターとしてそれぞれのマウスから採取した血清の CTx 値を測定することによって骨代謝の動的評価を行った。

in vitro の実験系としてそれぞれの KO マウス由来の破骨細胞を形成し、その形態、生存能を評価した。マウス破骨細胞形成は過去に報告された手法を用いて行った (Kadono Y, et al., : EMBO Rep, 6 : 171-176, 2005)。すなわちマウスの長管骨骨髓から造骨幹細胞を採取し、M-CSF 存在下で 4 日間培養し破骨細胞前駆細胞 (bone marrow macrophage, BMM) を得る。この前駆細胞を生存因子 M-CSF と分化因子 RANKL の存在下でさらに 3~4 日間培養することで破骨細胞へと分化させる。破骨細胞の形態は成熟破骨細胞を TRAP 染色、Rhodamin-Phalloidin 染色を行い、光学顕微鏡にてアクチンリングの形成を確認することで評価を行った。生存能は過去に報告された手法を用いて行った (Miyazaki T, et al., : J.Cell Biol., 148 : 333-342, 2000)。成熟破骨細胞になった時点で培養液より M-CSF、RANKL を取り除き一定時間後 (12 時間、24 時間) の生存細胞数をカウントする。各時間の生存細胞数を実験開始時の細胞数で割ったものを生存率として評価した。さらに、それぞれ単独の KO マウスについて骨吸収能の評価もおこなった。骨吸収能の評価には過去に報告された Pit formation assay を用いた (Tanaka S, et al. : J. Bone Miner. Res., 13 : 1714-1720, 1998)。高橋らによって確立された共存培養によってゲルディッシ

ュ上に成熟破骨細胞を形成させ、回収した成熟破骨細胞を象牙切片上に移し、一定時間 (12 時間、24 時間) 後に細胞を除去、残された骨吸収かを光学顕微鏡にて解析した。

4. 研究成果

Bim KO (Bim^{-/-}) マウスを作製し、このマウスにおいて骨形態計測、骨代謝測定を行った。また、この KO マウスから分化させた破骨細胞の細胞骨格、細胞生存能、骨吸収能の計測を行った。Bim^{-/-} マウスの骨形態計測では骨量 (BV/TV) の増加が見られ、これは骨梁数 (Tb.N) の増加と骨梁間隙 (Tb.Sp) の減少に伴うものと考えられた。破骨細胞数 (Oc.N/BS) は増加していたにもかかわらず、破骨細胞面 (Oc.S/BS) は低下しており、これらのことから Bim^{-/-} マウスでは骨代謝の低下によって軽度ではあるが骨硬化の像を呈することが明らかとなった。

この Bim^{-/-} マウスより作成した破骨細胞を用いて細胞分化能、細胞骨格、細胞生存能、骨吸収能を評価したところ、Bim^{-/-} 破骨細胞はその細胞分化能には明らかな異常を認めなかった。成熟した破骨細胞はアポトーシス刺激によってもなかなかアポトーシスに至らず、有意に細胞生存能の亢進が見られた。Bim^{-/-} 成熟破骨細胞は、正常破骨細胞に比べ細胞骨格が障害されており、十分に拡がらない形状を呈していた。細胞生存能とは逆に骨吸収能は有意に低下していた。以上のことより破骨細胞において Bim は、破骨細胞の細胞生存能を負に制御しているにもかかわらず破骨細胞骨吸収能は正に制御していることが明らかとなった。この結果は当研究室の秋山よりされている報告と矛盾しないものであった。

次に Puma ヘテロ KO (Puma^{+/-}) マウスより Puma KO (Puma^{-/-}) マウスを作製し、同様に評価を行った。Puma^{-/-} マウスの骨形態計測では Bim^{-/-} マウスとは異なり、明らかな骨硬化や骨粗鬆症の像は呈さなかった。また、それぞれの骨構造インデックスにおいても有意な差は見られなかった。

Puma^{-/-} マウスから破骨細胞を作製し、この細胞の細胞分化能、細胞骨格、細胞生存能、骨吸収能を評価した。Puma^{-/-} 破骨細胞は細胞生存能亢進を呈していたが、その他の細胞分化能、細胞骨格、骨吸収能に関しては有意な変化はみられなかった。以上のことより破骨細胞において Puma は、破骨細胞の骨吸収能を負に制御しているが、破骨細胞骨吸収能には大きな関与をしていないことが明らかとなり、破骨細胞においては Puma よりも Bim がより重要な働きを担っていることが示唆された。

Bim^{-/+} マウス、Puma^{-/+} マウスを掛け合わせることで Bim Puma ダブルノックアウト

ト(Bim^{-/-} Puma^{-/-}) マウスの作製をおこない、そのマウスの評価を行う計画であるが、現在のところ Bim^{-/-} Puma^{-/-} マウスの作製に成功しておらず、引き続きこのマウスの作製を行い、作製に成功したのちにはこのマウスの *in vivo*, *in vitro* 評価にて Bim, Puma お互いの相互作用を含めた破骨細胞での働きを明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計0件)

〔学会発表〕 (計0件)

〔図書〕 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 匠 (Nakagawa Takumi)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90338385

(2) 研究分担者

田中 栄 (Tanaka Sakae)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：50282662

廣田 仁聡 (Hirota Jinsou)
東京大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30570733