

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4月25日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659331

研究課題名（和文）：骨細胞ネットワークによる骨量調節の分子メカニズム

研究課題名（英文）：The molecule mechanism of the bone mass regulation by a bone cell network

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

骨細胞はその突起および骨細管を介して、骨中にネットワークを形成している。これまで、骨細胞は骨形成を促進あるいは抑制、骨吸収を抑制すると報告されてきた。しかし、これは骨細胞死によって起こる骨変化から推測されてきたものであり、ネクローシスによる微小環境下の炎症反応を考慮しなければならない。また、その解剖学的特徴から、骨細胞はメカニカルストレスのセンサー・トランスデューサーとして働くと考えられている。意外にも、*BCL2* を骨芽細胞に特異的に発現させたトランスジェニックマウスでは、トランスジーンが発現が低下した骨細胞でアポトーシスが起り、4ヶ月齢になると75%の骨細胞は死滅し、骨細胞ネットワークは破綻していた。アポトーシスは骨細胞突起が減少するために起こると考えられた。マイクロアレイにて、野生型マウスで非荷重により誘導され、*BCL2* トランスジェニックマウスでは誘導されない遺伝子を探索した。その結果、解糖系の酵素 Pdk4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4) を同定した。Pdk4 ノックアウトマウスを作製したが、生理的条件下では表現型を認めなかった。しかし、このマウスでは、非荷重時の骨量減少が認められず、野生型マウスで見られる骨芽細胞での非荷重時の Rank1 の発現誘導も認められなかった。M-CSF, RANKL 存在下で、Pdk4 KO マウスの骨髄由来単核球/マクロファージ系細胞 (BMMs) の破骨細胞分化は抑制されていた。Pdk4 KO マウスの骨芽細胞と野生型マウスの BMMs との共培養でも、破骨細胞分化が阻害された。逆に Pdk4 発現ベクターの導入は破骨細胞分化を促進させた。また、Pdk4 ノックアウトマウスの骨芽細胞では、Rank1 のプロモーター活性が低下しており、Pdk4 発現ベクターの導入はそれを亢進させた。したがって、Pdk4 は、破骨細胞形成を促すことによって、非荷重時の骨量低下に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Osteocytes form a network through processes and canaliculi throughout bone. Osteocytes have been reported to stimulate or inhibit bone formation and to inhibit bone resorption. As these functions have been estimated from the bone changes after osteocyte death, however, an inflammatory reaction in the microenvironment after necrosis has to be considered. The osteocyte network is thought to be a mechanosensor and mechanotransduction system due to its ideal anatomical feature. We established two lines of osteoblast-specific *BCL2* transgenic mice. Unexpectedly, overexpression of *BCL2* in osteoblasts eventually caused osteocyte apoptosis. Osteocytes, which had a reduced number of processes, gradually died with apoptotic structural alterations, and dead osteocytes reached 75% at 4 months of age. We identified a novel mechanical stress-responsible molecule, pyruvate dehydrogenase kinase 4 (Pdk4), whose expression was upregulated in osteoblasts at the unloaded condition, using *BCL2* transgenic mice with the disrupted osteocyte function. Bone in *Pdk4*^{-/-} mice developed normally and was maintained. At unloading, however, bone mass was reduced due to enhanced osteoclastogenesis and *Rank1* expression in wild-type mice but not in *Pdk4*^{-/-} mice. Osteoclast differentiation of *Pdk4*^{-/-} bone marrow-derived monocyte/macrophage lineage cells (BMMs) in the presence of M-CSF and RANKL was suppressed, and osteoclastogenesis was impaired in the coculture of wild-type BMMs and *Pdk4*^{-/-} osteoblasts,

in which *Rankl* expression and promoter activity were reduced. Further, introduction of *Pdk4* into *Pdk4^{-/-}* BMMs and osteoblasts enhanced osteoclastogenesis and *Rankl* expression and activated *Rankl* promoter. These findings indicate that Pdk4 plays an important role in bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	300,000	3,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）

1. 研究開始当初の背景

骨量は運動によって増加し、長期の臥床、神経損傷による不動、宇宙での微小重力状態環境下では減少し、いわゆる廃用性骨粗鬆症を呈する。このような力学的負荷あるいは非荷重をいかに感知し、骨量が制御されるかが長年議論されてきた。骨細胞は、骨の中で骨細管中を通る骨細胞突起によって連結し、神経細胞のネットワークのように、骨全体に骨細胞ネットワークを形成している。また、骨表面の骨芽細胞にも骨細胞突起で連結している。このため、古くから骨細胞ネットワークが、力学的負荷を感受し、それを伝達するシステムとして考えられてきた。しかし、骨細胞は骨の中に埋まっているために、その機能を解析することが困難であり、生体内の骨細胞の表現型を培養系で再構築させることも難しく、その機能は多くの間接的な観察から推測されてきた。これまで、骨細胞は生理的条件下で、骨形成を促進するという報告 (Cell Metab. 5, 464, 2007) と抑制するという報告 (Bone 31, 709, 2002; Bone 33, 753, 2003) があり一貫していない。骨細胞の骨吸収に関する作用は、一貫して抑制すると報告されている。それは、骨細胞死が起こると、引き続きその部位に骨吸収が起こることによる (J. Bone Miner. Res. 15, 60-67, 2000; J. Bone Miner. Res. 22, 1492, 2007; Cell Metab. 5, 464, 2007)。しかし、これらの多くは、骨の中に埋め込まれ、アポトーシスを起こしても貪食されない骨細胞が、二次性のネクローシスを起こした結果を観察していると考えられる。アポトーシスを抑制する分

子 Bcl2 を骨芽細胞に特異的に発現させたトランスジェニックマウスでは、トランスジェニックの発現が低下する骨細胞がアポトーシスで死滅した。

2. 研究の目的

BCL2 トランスジェニックマウス (tg) が骨細胞のアポトーシスを起こす理由を明らかにするとともに、骨細胞死が骨芽細胞および破骨細胞分化・機能、そして骨量に及ぼす影響を明らかにする。さらに、骨細胞ネットワークが破綻した BCL2 トランスジェニックマウスを用いて、骨細胞ネットワークの生理的条件下の機能、非荷重条件下での機能を明らかにする。そして、骨細胞ネットワークによる骨量調節の分子機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Col1a1 (I型コラーゲンプロモーター) を用いて、骨芽細胞特異的 BCL2 tg (高発現マウスおよび低発現マウス) を樹立した。BAC クローンをを用いてターゲティングベクターを作製、Pdk4 ノックアウトマウスを作製した。

(2) マウスの全身、大腿骨、椎骨等の X 線解析を行い、固定後、脱灰パラフィン切片や非脱灰樹脂切片を作製し、HE 染色、TRAP 染色を行い、骨形成を比較検討した。

(3) カルセイン 2 回投与後、非脱灰樹脂標本を作製、骨組織形態計測を行った。また、マイクロ CT 解析により骨量、海綿骨数、海綿骨厚を測定した。

(4) 長管骨より得た RNA を用いたリアルタイム RT-PCR 法でアポトーシス関連遺伝子、骨芽細胞マーカーおよび OPG、RANKL 等の発現を比較検討した。

(5) Western blot によりアポトーシス関連分子の発現を検討した。

(6) マウス長管骨を固定・脱灰後、塩酸-コラゲナーゼ処理で骨基質を溶かし、通法に従い SEM (Scanning Electron Microscope: 走査電子顕微鏡) 用資料を作成し、露出した骨細胞および細胞突起を観察した。

(7) マウス長管骨を固定・脱灰した後、通法に従い TEM (Transmission Electron Microscope: 透過電子顕微鏡) 用資料を作製、骨芽細胞や骨細胞の微細構造を観察した。

(8) BrdU を投与し組織切片を作製、免疫組織染色により増殖細胞の頻度を算出した。また月齢を追って TUNEL 染色により、骨芽細胞・骨細胞のアポトーシスを検出、頻度を算出した。

(9) 初期培養骨芽細胞を用いて、*in vitro* での骨芽細胞分化を検討した。初期培養骨芽細胞と骨髄由来単核球/マクロファージ系細胞 (BMMs) の共培養による破骨細胞分化を検討した。M-CSF, RANKL 存在下で、BMMs の破骨細胞分化を検討した。

(10) 骨細胞ネットワークにより骨芽細胞および破骨細胞の機能を調節する遺伝子を探索する目的で、BCL2 tg で尾部懸垂を行い、長管骨より抽出した RNA でマイクロアレイ解析を行った。野生型マウスの非荷重群で発現が上昇し BCL2 tg の非荷重群で発現が上昇しない遺伝子を探索した。

4. 研究成果

BCL2 tg 表現型

(1) 骨芽細胞の成熟抑制

BCL2 tg は、トランスジェンの発現レベルに応じ弱発現マウスと強発現マウスを樹立した (以下、tg(L), tg(H)と記載する)。10 週齢 tg(L), tg(H)の骨形態計測を行った結果、tg(H)において野生型マウス (以下、wt と記載する) と比較し有意に骨量 (BV/TV) の減少が認められた。そして、tg(L), tg(H)において骨芽細胞面 (N. Ob/B. Pm) および一定面

積あたりの骨細胞数 (Osteocyte/Ar) が有意に増加していた。さらに tg(H)では類骨厚

(O. Th) が有意に少なく、骨石灰化面 (MS/BS) が減少傾向にあり、骨形成速度 (BFR/BS) が有意に低下していた。新生仔頭蓋冠由来初代骨芽細胞の培養実験を行うと、tg(H)の骨芽細胞は wt に比べてアルカリフォスファターゼの染色性および石灰化結節の形成が悪かった。一方、tg(L)では、軽度の骨芽細胞機能の抑制が見られた。これらの結果より、BCL2 tg は骨芽細胞が増えるにもかかわらず、個々の細胞の機能が低下しており、トランスジェンの発現レベルに比例して骨芽細胞の成熟が抑制されていることが示唆された。

(2) BCL2 tg の骨細胞死

BCL2 tg は若齢時に骨芽細胞が増加し骨細胞も増えていたが、成長するにしたがい骨細胞が死ぬという非常に特異的な表現型を呈した。BCL2 tg の長管骨を詳細に解析したところ、TEM 像において骨細胞の形態は wt と比較し幼若な形態を示し、その一部にアポトーシスに特徴的なアポトーシス小体が認められた。鍍銀染色で骨細管を染めると、骨細管が少なく、SEM で骨細胞を観察すると、骨細胞突起が少なかった。また、長管骨皮質骨より蛋白を抽出しアポトーシス関連因子についてウェスタンブロットを行うと、BCL2 tg ではアポトーシス誘導因子である p53, Bax, Bim, t-Bid の発現が上昇し、アポトーシス実行因子である cleaved caspase 3 の発現も上昇していた。また、低酸素により誘導される HIF1- α の発現も上昇していた。BCL2 tg の骨細胞は、骨細胞同士の連絡または骨髄・血管からの連絡が乏しいことによる低酸素や栄養飢餓といった環境のため徐々に死んでいくものと考えられた。TUNEL 法による免疫染色を行うと、死んでいる骨細胞や空包化した骨小腔が陽性を呈し、週齢を経るごとに TUNEL 陽性骨細胞の割合が増加していた。そして、BCL2 tg は 10 週齢時で皮質骨の骨細胞が 60%程 TUNEL 陽性を示すにもかかわらず、骨形態計測において骨吸収の促進は認められなかった。つまり、BCL2 tg の骨細胞死は急激に生じているのではなく、成長過程で徐々に蓄積されていることを示唆している。また、骨細管の減少が、骨細胞が死んだ後の炎症惹起物質の放出を阻害している可能性がある。

(3) マイクロアレイによるメカニカルストレス応答分子の検索

BCL2 tg の骨細胞死は海綿骨より皮質骨に多く認められ、4 か月齢になると骨細胞死の割合が 70-80%に達していたが、海綿骨および皮質骨で骨形成が促進され、皮質骨で破骨細胞の数は減少し、骨吸収は低下、骨量は海綿骨、皮質骨ともに増加していた。そのため、骨細胞ネットワークにより骨芽細胞および破骨細胞の機能を調節する遺伝子を探索する目的で、BCL2 tg で尾部懸垂を行い、長管骨より抽出した RNA でマイクロアレイ解析を行った。wt の非荷重群で発現が上昇し BCL2 tg の非荷重群で発現が上昇しない遺伝子を探索、Pdk4 を同定した。

(4) Pdk4 KO マウスの非荷重実験

Pdk4 KO マウスを作製したが、生理的条件下(荷重状態)では正常に発達し、骨量も正常に維持されていた。しかし、非荷重状態において、Pdk4 KO マウスでは骨吸収の促進が認められず骨量が減少しなかった。Pdk4 は骨芽細胞および骨細胞に発現し、非荷重時にどちらの細胞でも発現が上昇するが、骨芽細胞でより発現が上昇していた。M-CSF, RANKL 存在下で、Pdk4 KO マウスの BMMs の破骨細胞分化は抑制されていた。Pdk4 KO マウスの骨芽細胞は RANKL の発現が低下しており、Pdk4 KO マウスの骨芽細胞と野生型マウスの BMMs との共培養でも、破骨細胞分化が阻害された。したがって、Pdk4 は、破骨細胞前駆細胞および骨芽細胞の両方で破骨細胞分化に関与すると考えられた。また、非荷重時には、Pdk4 は骨細胞ネットワークを介して骨芽細胞に発現誘導され、破骨細胞形成に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

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 7 件)

① Mizuhashi K, Kanamoto T, Ito M, Moriishi T, Muranishi Y, Omori Y, Terada K, Komori T, Furukawa T、OBIF, an osteoblast induction factor, plays an essential role in bone formation in association with osteoblastogenesis、Development, growth and differentiation、査読有、2012

② Yoshida CA, Komori H, Maruyama Z, Miyazaki T, Kawasaki K, Furuichi T, Fukuyama R, Mori M, Yamana K, Nakamura K, Liu W, Toyosawa S, Moriishi T, Kawaguchi

H, Takada K, Komori T、SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice、PLoS One、査読有、7 巻、2012

③ 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, Komori T、Pyruvate dehydrogenase kinase 4 induces bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis、Bone、査読有、50 巻、2012、409-419

④ Moriishi T, Maruyama Z, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Kitaura H, Ohnishi H, Furuichi T, Kawai Y, Masuyama R, Komori H, Takada K, Kawaguchi H, Komori T、Overexpression of bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and induces osteocyte apoptosis、PLoS One、査読有、6 巻、2011

⑤ Maeno T, Moriishi T, Yoshida CA, Komori H, Kanatani N, Izumi S, Takaoka K, Komori T、Early onset of Runx2 expression caused craniosynostosis, ectopic bone formation, and limb defects、Bone、査読有、49 巻、2011、673-682

⑥ Cao L, Moriishi T, Miyazaki T, Iimura T, Hamagaki M, Nakane A, Tamamura Y, Komori T, Yamaguchi A, Comparative morphology of the osteocyte lacunocanalicular system in various vertebrates、Journal of bone and mineral metabolism、査読有、29 巻、2011、662-670

⑦ Mikasa M, Rokutanda S, Komori H, Ito K, Tsang YS, Date Y, Yoshida CA, Komori T、Regulation of Tcf7 by Runx2 in chondrocyte maturation and proliferation、Journal of bone and mineral metabolism、査読有、29 巻、2011、291-299

[学会発表] (計 2 件)

① 小守 壽文、Regulation of bone mass at unloaded condition by osteocyte network、1st Bio-rheumatology international congress、2011 年 11 月 15 日、ヒルトン東京ベイ

② 王宇英、PDK4 は骨粗鬆症の破骨細胞分化を促進する、第 53 回歯科基礎医学学会学術大会・総会、2011 年 10 月 2 日、長良川国際会議場

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：荷重感知遺伝子

発明者：小守壽文

権利者：長崎大学

種類：特許

番号：特願 2011-138935

出願年月日：H23 年 6 月 22 日

国内外の別：国内

○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

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

(2) 研究分担者

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

なし