

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592240

研究課題名(和文)代謝センサー分子AMPKに着目した破骨細胞性骨吸収の機能制御

研究課題名(英文)Regulation of osteoclast function by AMPK activity

研究代表者

穴水 依人(Yorito, Anamizu)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：70302693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、破骨細胞骨吸収のAMPK活性との関連性を検討した。AMPK 1, 2のリン酸化サイトに変異を入れると(T172A)、ドミナントネガティブ型(DN型)として働く。また、リン酸化サイトに加えて、C末端領域を削ると恒常的活性化型(CA型)として働く。これらの変異型遺伝子を組み込んだアデノウイルスを破骨細胞に感染させ、AMPKの直接の基質であるACCのリン酸化を評価したところ、DN型にてACCのリン酸化の低下、CA型にてリン酸化の上昇を認めた。しかしながら、複数のCA型、DN型のAMPKを導入した破骨細胞において、延命も骨吸収も大きな変化はなかった。

研究成果の概要(英文)：AMPK is a metabolic master switch that mediates the adaptation of the cell to variations in the nutritional environment. Its activity is stimulated by increases in the intracellular AMP/ATP ratio in response to stresses such as exercise, hypoxia, and glucose deprivation. To test whether modulating AMPK activity would affect osteoclast function, we used adenovirus vectors containing dominant negative (a1DN, a2DN) or constitutively active (a1CA, a2CA) forms of AMPK catalytic subunits (a1 and a2). The phosphorylation level of acetyl-CoA carboxylase at Ser-79, a direct target of AMPK, was modulated by adenovirus-mediated expression of the AMPK mutants. Modulation of AMPK activity did not affect osteoclast survival or bone resorption, indicating that AMPK is not involved in ATP depletion-induced bone resorption.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：シグナル伝達 破骨細胞

### 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム(内臓脂肪症候群)は、今日の健康ブームとも相まって、近年、大変な関心を呼んでいる。現在、肥満および糖尿病は、患者数が急増している深刻な病気である。これらの病気は他の生活習慣病の危険因子ともなり、早期での治療により合併症を予防することができ大幅な医療費削減につながるものと期待されている。肥満および糖尿病に関与する代謝調節に関わるシグナル伝達経路を探索し、生活習慣病の治療や予防の基礎となる研究も盛んに行われている。

近年のエネルギー代謝や加齢に関する研究、あるいは肥満や糖尿病発症に関わる分子メカニズムの解明において、AMPK (AMP-activated protein kinase)は、それらに関わる重要なシグナル伝達分子として注目されている。AMPKはAMPで活性化されるタンパクリン酸化酵素である。細胞内のエネルギーが欠乏し、AMP/ATPの比率が高まると活性化される。活性化されたAMPKはエネルギー浪費経路を遮断し、反対に産生経路の効率高める方向に作用する。エネルギー浪費経路とは、細胞増殖やそれに必要なタンパク・脂質合成経路である。エネルギー産生経路とは、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化経路で、AMPKは糖や脂質の燃焼を増加させる。そのため、肥満および糖尿病に対してはAMPKを活性化させることが1つの戦略として考えられている。

しかし、エネルギー欠乏状態では生体そのものはエネルギー(食物)摂取の方向へ傾く。そのため、摂食中枢ではAMPKの活性化が食欲を増加させる。臓器特異的なAMPKの活性制御法の確立が重要と考えられる。

最近、我々は、抗アポトーシス分子であるBcl-xLの破骨細胞特異的ノックアウトマウスの解析から、Bcl-xLが破骨細胞の延命を強力に促進するにもかかわらず、骨吸収機能を低下させるという矛盾した機能を持つこと(Iwasawa et al. *J Clin Invest.* 119:3149-59, 2009)を明らかにした。抗アポトーシス分子であるBcl-xLを破骨細胞に過剰発現させると、Bcl-xLが破骨細胞内ATP濃度を強力に上昇させ、さらにその延命を強力に促進するにもかかわらず、骨吸収機能を低下させるという矛盾した結果から、AMPKが破骨細胞の骨吸収機能制御において重要な役割を果たしている可能性がある。AMPKの活性を制御することによって、破骨細胞骨吸収におけるAMPKの、さらには骨代謝と肥満および糖尿病に関与する代謝調節に関わるシグ

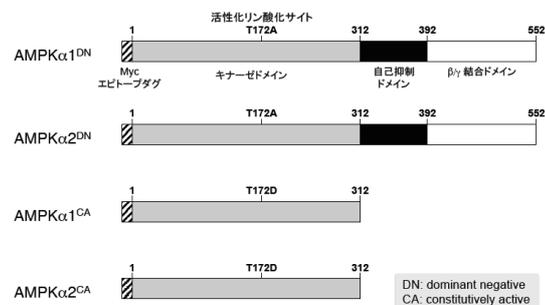
ナル伝達経路の関連について検討する。

### 2. 研究の目的

[内臓の病気であるメタボリックシンドローム]と[運動器の障害が原因でおこるロコモティブシンドローム]の関連性を明らかにすることにより、これらシンドロームによる健康寿命の短縮を総合的に予防することを最終目標とする。我々は、運動器の中でも特に骨代謝において重要な役割を果たしている破骨細胞性骨吸収におけるミトコンドリア機能/細胞内ATP濃度の役割を解析してきた。最近、細胞内エネルギーが欠乏しAMP/ATP比率が高まると活性化されるAMPKの制御が、肥満および糖尿病に対する1つの重要な戦略となっている。本研究では、破骨細胞のAMPK活性をコントロールすることにより、破骨細胞性骨吸収とメタボリックシンドロームとの関連性を検討し、健康寿命延長への総合的かつ新たな筋道を見つけることを目的とする。

### 3. 研究の方法

AMPKは3つの異なるサブユニット( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )からなるヘテロ3量体からなる。AMPK $\alpha$ は触媒サブユニットで、N末端側にセリン/スレオニンキナーゼドメインがあり、AMPKの酵素活性としての機能を担っている。このキナーゼドメインにはリン酸化サイト(Thr172)が存在し、この部位のリン酸化状態の変化がキナーゼの活性に大きな影響を与える。また自己抑制ドメインやC末端側には $\beta$ サブユニットとの結合ドメインが存在する。AMPK $\alpha1$ ,  $\alpha2$ のリン酸化サイトに変異を入れると(T172A)、ドミナントネガティブ型(DN型)として働く。また、リン酸化サイトに加えて、C末端領域を削ると恒常的活性化型(CA型)として働く。本研究では、これらの遺伝子(下図参照)を組み込んだアデノウイルスを作製する。



AMPK $\alpha1$ ,  $\alpha2$  変異型遺伝子を組み込んだアデノウイルスを感染させ、AMPKのキナーゼ活性の制御によって破骨細胞の機能が変化するかどうかを検討する。まず、これら破骨細

胞内の AMPK 活性を AMPK の下流に存在し、直接リン酸化される ACC (Acetyl-CoA Carboxylase) のリン酸化レベルを phospho-ACC 抗体を用いたウエスタンブロットにより評価する。破骨細胞の骨吸収機能は、象牙質 (dentine slice) 上に破骨細胞を培養し、破骨細胞が dentine slice 表面の吸収した面積 (吸収窩) を測定することにより評価する。また破骨細胞の自発的アポトーシスへの影響を Survival assay にて評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1) AMPK $\alpha 1^{DN}$ , $\alpha 2^{DN}$ , $\alpha 1^{CA}$ , $\alpha 2^{CA}$ を組み込んだアデノウイルスの作製

我々はレポーター遺伝子である GFP を組み込んだアデノウイルスベクターをコントロールウイルスとして用いた場合、GFP 陽性の破骨細胞の割合は、感染させたアデノウイルスの量に比例し、MOI (multiplicity of infection = 1 細胞あたりの感染粒子数) :100 で 85% 程度の破骨細胞が GFP 陽性であった。Myc-tag をつけた AMPK $\alpha 1^{DN}$ ,  $\alpha 2^{DN}$ ,  $\alpha 1^{CA}$ ,  $\alpha 2^{CA}$  を組み込んだアデノウイルスを MOI:100 で感染させた破骨細胞において十分量の目的タンパクの発現を確認することができた (図 1 の上から 3 番目のパネル)。

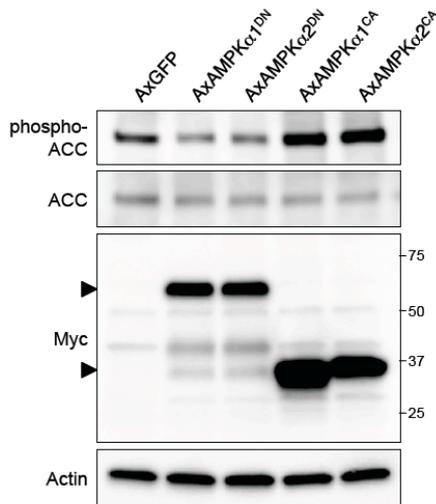


図 1. AMPK $\alpha 1^{DN}$ ,  $\alpha 2^{DN}$ ,  $\alpha 1^{CA}$ ,  $\alpha 2^{CA}$  の破骨細胞での発現

これら破骨細胞内の AMPK 活性を AMPK の下流に存在し、直接リン酸化される ACC (Acetyl-CoA Carboxylase) のリン酸化レベルを phospho-ACC 抗体を用いたウエスタンブロットにより評価したところ、AxAMPK $\alpha 1^{DN}$ ,  $\alpha 2^{DN}$  にて ACC のリン酸化の低下、AxAMPK $\alpha 1^{CA}$ ,  $\alpha 2^{CA}$  にて ACC のリン酸化の上昇を認め、AxAMPK $\alpha 1^{DN}$ ,  $\alpha 2^{DN}$ ,  $\alpha 1^{CA}$ ,  $\alpha 2^{CA}$  により、破骨細胞内の AMPK 活性を制御することに成功したことを確認した。(図 1 の上から 1 番目のパ

ネル)

##### (2) AMPK 活性の変化は破骨細胞の生存に影響を及ぼさない

我々は次に AMPK $\alpha 1^{DN}$ ,  $\alpha 2^{DN}$ ,  $\alpha 1^{CA}$ ,  $\alpha 2^{CA}$  の感染が、破骨細胞の生存に与える影響を調べた。AxGFP, AxAMPK $\alpha 1^{DN}$ ,  $\alpha 2^{DN}$ ,  $\alpha 1^{CA}$ ,  $\alpha 2^{CA}$  を MOI:100 で感染させた破骨細胞を 0.1% コラゲナーゼ/0.2% ディスパーゼ処理にて骨芽細胞を除去することにより純化し、さらに 10% FBS を含む  $\alpha$ MEM でインキュベートすることにより破骨細胞の生存率を評価した。骨芽細胞除去後、AxGFP を感染させた細胞と 4 つの変異型 AMPK (AMPK $\alpha 1^{DN}$ ,  $\alpha 2^{DN}$ ,  $\alpha 1^{CA}$ ,  $\alpha 2^{CA}$ ) を発現させた細胞では、経時的な生存率に大きな差がなかった (図 2)。このことから、破骨細胞の生存においてミトコンドリアの形態変化が重要な役割を果たしていないことが示唆された。

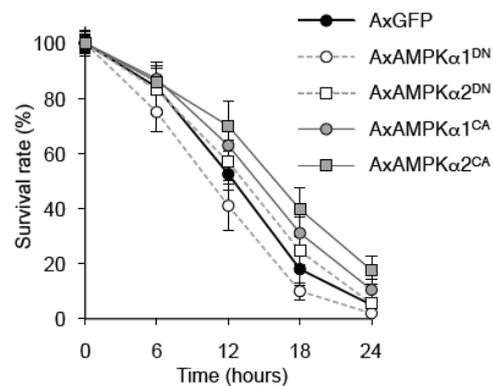


図 2. AxAMPK $\alpha 1^{DN}$ ,  $\alpha 2^{DN}$ ,  $\alpha 1^{CA}$ ,  $\alpha 2^{CA}$  を感染させた破骨細胞の延命曲線

##### (3) AMPK 活性の変化は破骨細胞の骨吸収機能活性化に影響を及ぼさない

我々は次に AMPK 活性の変化が破骨細胞の骨吸収機能において重要な役割を果たしているかどうかを検討した。破骨細胞の骨吸収機能は象牙切片上に形成された吸収窩の面積を計測することにより定量化した。吸収窩アッセイを 12 時間で行い、破骨細胞 1 個あたりの吸収窩面積を算出することにより比較検討した。図 3 に見られるように、破骨細胞の骨吸収機能は、4 つの変異型 AMPK (AMPK $\alpha 1^{DN}$ ,  $\alpha 2^{DN}$ ,  $\alpha 1^{CA}$ ,  $\alpha 2^{CA}$ ) の発現により大きな変化は見られなかった。AMPK 活性の変化が骨吸収を制御するシグナルに関与していないことが示唆された。

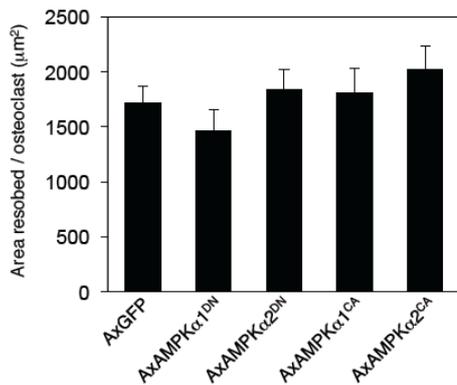
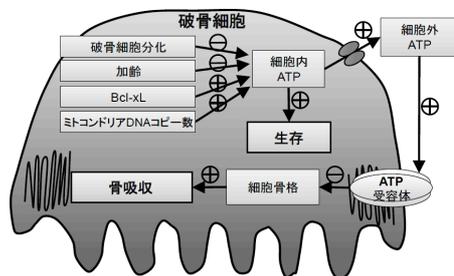


図3. AxAMPKα1<sup>DN</sup>, α2<sup>DN</sup>, α1<sup>CA</sup>, α2<sup>CA</sup>を感染させた破骨細胞の骨吸収機能アッセイ

最後に

我々が発見した細胞内ATPレベルが破骨細胞骨吸収機能に対して負の影響を及ぼしているという奇妙なパターンを説明することは、AMPKが骨吸収機能に重要な役割を演じているのではないかという仮説が、本研究により当てはまらないことが分かった。しかしながら、細胞内からリリースされた細胞外ATPは、破骨細胞の細胞骨格と骨吸収に対し、阻害的に働き、細胞内および細胞外ATPの微妙なバランスが破骨細胞機能を規定することを明らかにした（下図参照）。



## 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) Masuda H, Hirose J, Omata Y, Tokuyama N, Yasui T, Kadono Y, Miyazaki T, Tanaka S: Anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 regulates cell viability and bone-resorbing activity of osteoclasts. *Bone*. 2014 Jan;58:1-10. doi: 10.1016/j.bone.2013.09.020. Epub 2013 Oct 2.
- 2) Ishigami A, Uchida Y, Miyazaki T, Handa S, Choi EK, Kim YS, Kasahara Y, Maruyama N: Two novel sandwich ELISAs identify

PAD4 levels and PAD4 autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2013 23:794-803. Doi: 10.1007/s10165-0120-0748-0

- 3) Miyazaki T, Iwasawa M, Nakashima T, Mori S, Shigemoto K, Nakamura H, Katagiri H, Takayanagi H, Tanaka S: Intracellular and extracellular ATP coordinately regulate the inverse correlation between osteoclast survival and bone resorption. *J Biol Chem*. 2012 Nov 2;287(45):37808-23. doi: 10.1074/jbc.M112.385369.
- 4) Mori S, Kishi M, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Konishi T, Maruyama N, Shigemoto K: 3,4-Diaminopyridine improves neuromuscular transmission in a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2012 245:75-8. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2012.02.010
- 5) Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Hotta H, Desaki J, Kishi M, Konishi T, Nishino Y, Miyazawa A, Maruyama N, Shigemoto K: Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis. *Am J Pathol*. 2012 180:798-810. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.10.031. ISSN: 0002-9440.
- 6) Nojiri H, Saita Y, Morikawa D, Kobayashi K, Tsuda C, Miyazaki T, Saito M, Marumo M, Yonezawa I, Kaneko K, Shirasawa T, and Shimizu T: Cytoplasmic Superoxide Causes Bone Fragility Owing to Low-Turnover Osteoporosis and Impaired Collagen Cross-Linking. *J Bone Miner Res*. 2011 26:2682-94. DOI: 10.1002/jbmr.489.
- 7) Miyazaki T, Tokimura F, Tanaka S: A review of denosumab for the treatment of osteoporosis. *Patient Prefer Adherence*. 2014 8:463 - 471. DOI: http://dx.doi.org/10.2147/PPA.S46192

[学会発表] (計6件)

- 1) 福永大地、森秀一、久保幸穂、中山亮、村瀬尚哉、宮崎剛、樋上賀一、重本和宏：老齡マウスの筋繊維タイプ特異的な筋萎縮の病態解明 第32回日本基礎老化学会大会。千葉県船橋、2012.7.26-27

- 2) Mori, S., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Hotta, H., Desaki, J., Kishi, M., Konishi, T., Maruyama, N. and Shigemoto, K. : A novel murine model of myasthenia gravis with MuSK antibodies. 12th International conference on myasthenia gravis and related disorders, New York, 2012. 5. 21-23
- 3) Mori, S., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Hotta, H., Desaki, J., Kishi, M., Konishi, T., Maruyama, N. and Shigemoto, K. : Examination of the treatment of myasthenia gravis with anti-MuSK antibodies using an experimental autoimmune animal model. 12th International conference on myasthenia gravis and related disorders, New York, 2012. 5. 21-23
- 4) Fukunaga, T., Kubo, S., Mori, S., Miyazaki, T., Higami, Y. and Shigemoto, K. : Muscle fiber type specific pathology in aging mouse. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012. 12. 11-14
- 5) Miyazaki T., Mori S, Shigemoto K, Larsson N, Nakamura T, Kato S, Nakashima T, Takayanagi H, Tanaka S: Maintenance of mitochondrial DNA copy number is essential for osteoclast survival and bone resorption. 1<sup>st</sup> Bio-Rheumatology International Congress Tokyo 8<sup>th</sup> GARN meeting Tokyo. Maihama, 2011. 11. 14-16
- 6) 岩澤三康、永瀬雄一、宮崎剛、中村耕三、田中栄: 破骨細胞特異的ノックアウトマウスによる抗アポトーシス分子Bcl-xLの機能解析—Bcl-xLは破骨細胞の骨吸収に抑制的に働く— 第84回日本整形外科学会学術総会。横浜、2011. 5. 12-15

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

穴水 依人 (ANAMIZU YORITO)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号 : 70302693

### (2) 研究分担者

宮崎 剛 (MIYAZAKI TSUYOSHI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号 : 50376480

田中 栄 (TANAKA SAKAE)

東京大学・医学部附属病院・整形外科・教授

研究者番号 : 50282661