

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24604002

研究課題名(和文)骨細胞ネットワークを介したメカニカルストレス応答遺伝子の探索

研究課題名(英文)A study of mechanical stress response genes via osteocyte network

## 研究代表者

森石 武史(MORIISHI, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：20380983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：当講座で樹立した骨芽細胞特異的Bcl-2 tgマウスは、骨細胞ネットワークが破綻し、非荷重実験で骨量が減少せず破骨細胞の誘導が起こっていなかった。非荷重下で骨細胞により骨芽細胞に誘導される因子を探索したところ、解糖系の酵素Pdk4およびグルコシルチコイドレセプターに結合するシャペロン複合体の1構成分子であるFkbp5を同定した。Pdk4 KOマウスは、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Ranklの発現誘導も認められなかった。現在、Fkbp5 KOマウスの解析を行っている。

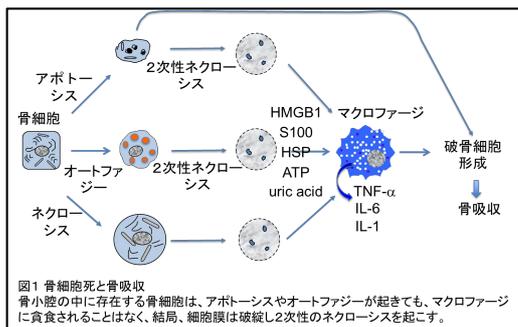
研究成果の概要(英文)：We established human Bcl-2 transgenic mice under the control of mouse 2.3 kb Col1a1 promoter. Osteocyte processes were reduced depending on the expression levels of the transgene. We identified a novel mechanical stress-responsible genes, pyruvate dehydrogenase kinase 4 (Pdk4), FK506 binding protein 5 (Fkbp5), whose expression was upregulated in osteoblasts at the unloaded condition, using Bcl-2 transgenic mice with the disrupted osteocyte function. The bone of the Pdk4 KO mice normally developed. At unloading, however, bone volume was reduced due to enhanced osteoclastogenesis and Rankl expression in wild-type mice but not in Pdk4 KO mice. These findings indicate that Pdk4 plays an important role in bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis. We analyze Fkbp5 KO mice now.

研究分野：細胞生物学

キーワード：骨細胞ネットワーク メカニカルストレス 骨芽細胞 骨形成 骨吸収

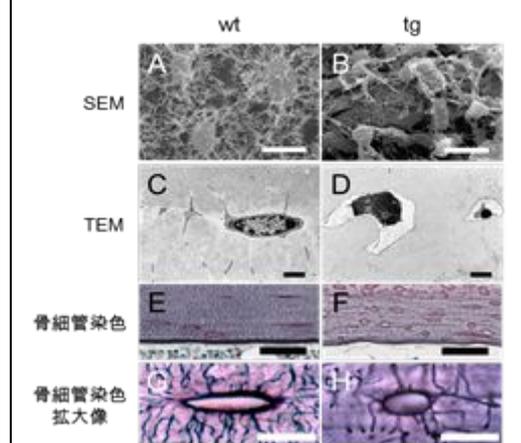
1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化社会において、長期臥床により骨量が減少すること(不動態骨粗鬆症)が大きな問題になっている。不動態骨粗鬆症では、骨形成は低下、骨吸収は亢進しており、骨に対する力学的負荷が骨量の維持に必須であると考えられている。骨における主要な細胞は、骨細胞・骨芽細胞・破骨細胞であり、なかでも骨細胞は力学的負荷を感知し、骨細胞突起および骨細管中の細胞外液を通してシグナルを骨芽細胞・破骨細胞に伝達することによって骨量の調節を行っていると考えられている。骨細胞が、メカニカルストレスの感知・伝達機構を担っていることを証明するには、骨細胞機能を欠損させたモデル動物が必要である(Eur J Pharmacol. 2015.)。これまで、骨細胞を死滅させたマウスあるいは骨細胞のギャップ結合構成分子コネキシン 43 を欠失させたマウス等が作製された。骨細胞は、ギャップ結合および骨細管網を通して、血管および骨髄から酸素、栄養、生存シグナルを得ているため、コネキシン 43 ノックアウト(ko)マウスでも骨細胞死が起こる。しかし、骨細胞がアポトーシスを起こしても、マクロファージによって貪食されず、2次性ネクローシスを起こす。そして、破骨細胞の分化・活性化が促進され、骨吸収が促進される(図1)。



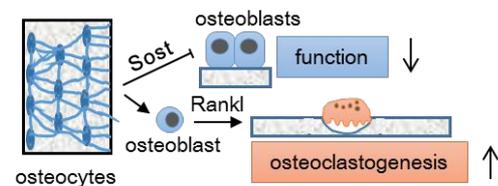
私の所属する講座で作製された Bcl2 トランズジェニック(tg)マウスでは、Bcl2 がゲルゾリンによるアクチン切断活性を抑制、これにより細胞突起の減少をきたし、骨細胞死が起こる(図2)。

図2. 骨細胞の形態学的観察

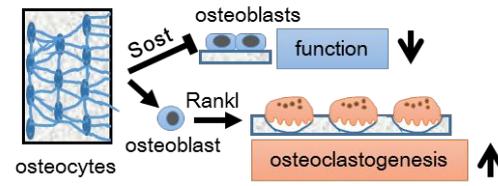


しかし、骨細管も著減しているため細胞内の免疫刺激分子が骨表面に放出されず、破骨細胞の分化・活性化が起こらない。すなわち、Bcl2 tg マウスは、骨細胞ネットワークは完全に破綻しているが、その修復機構としての骨吸収が起こらず、現時点で骨細胞機能を見ることが出来る唯一のマウスと考えられる(PLoS One 6:e27487, 2011. PLoS One 7:e40143, 2012.)

A. 荷重時(生理的状态)



B. 非荷重時



PLoS One. 2012; 7(6):e40143より引用改変

2. 研究の目的

骨細胞ネットワークが破綻する Bcl-2 tg マウスは、骨細胞から骨芽細胞・破骨細胞へ至る骨細胞ネットワークの機能を検討するモデルマウスになると考え、力学的負荷受容細胞としての骨細胞から応答細胞としての骨芽細胞・破骨細胞へのシグナル伝達経路の解明を目的として

本実験を遂行した。

### 3. 研究の方法

マイクロアレイを用いた解析および候補遺伝子の絞り込み

1) [尾部懸垂実験の計画および骨芽細胞回収方法]

4ヶ月齢・雄・野生型マウスと Bcl-2 tg マウスをそれぞれ『対象群』と『尾部懸垂群』に分け、尾部懸垂群は3日間の尾部懸垂を行う。実験終了後、マウスの後肢長管骨の骨端を切断し、骨髄を PBS で洗い流した後、歯間ブラシを用い、内骨膜骨芽細胞を分離する。分離した骨芽細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイで発現を比較した。

2) [候補遺伝子の再現性の確認]

マイクロアレイの結果より、野生型マウスの対照群骨芽細胞分画 vs 懸垂群骨芽細胞分画で発現が変動した遺伝子のうち、Bcl-2 tg マウス対照群骨芽細胞分画 vs 懸垂群骨芽細胞分画で変化を認めない遺伝子を選択した。尾部懸垂実験サンプルおよびトレッド・ミル(夏目製作所 RM-5)で運動負荷をかけたサンプルでリアルタイム PCR を行い、発現の再現性を確認した。

3) [候補遺伝子の絞り込み]

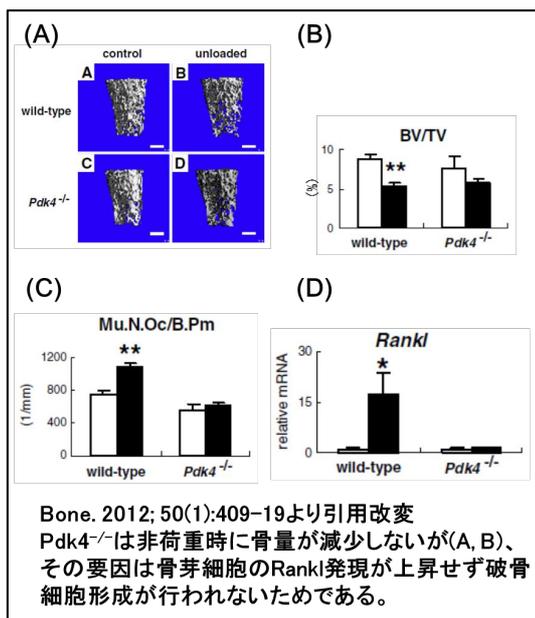
リアルタイム PCR で発現の再現性が得られ骨芽細胞系細胞に発現が認められた遺伝子について、培養骨芽細胞を用いた機能解析を行い、骨細胞により骨芽細胞に誘導される、破骨細胞分化・活性化因子を同定した。

### 4. 研究成果

マイクロアレイ解析で、非荷重時に野生型マウスの後肢長管骨で発現誘導され、骨細胞ネットワークの破綻した Bcl-2 tg マウスの後肢長管骨では発現誘導されない遺伝子を探索、Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (Pdk4)と FK506 binding protein 5 (Fkbp5)を同定した。Pdk4 ノックアウト(ko)マウスは、生理的条件下(荷重時)では正常

に発達し、骨量も正常に維持されていた。しかし、非荷重時に骨吸収が亢進せず、骨量が減少しなかった。詳細な解析により Pdk4 が非荷重時の Rankl 発現誘導および破骨細胞分化の促進に重要な役割を果たすことを明らかにした。

(Bone. 2012; 50(1):409-19)



Fkbp5 は、グルココルチコイドレセプター(GR)に結合する HSP90 を中心とするシャペロン複合体の1構成分子で GR の核移行を抑制することが報告されている。これまで、Fkbp5 に関してストレス応答に関する解析は行われているが、骨における機能は、全く報告されていない。Fkbp5 KO マウスの解析は進行中であり、これまで以下の結果が得られている。

[生理的条件下の野生型マウスと Fkbp5 ko マウスの比較]

体重、マイクロ CT による骨量評価、血清の形成・吸収マーカー、骨芽細胞・骨細胞マーカー遺伝子発現、破骨細胞関連遺伝子の発現に、両者の間に差を認めなかった。

[非荷重実験] 野生型マウスで尾部懸垂実験を行い、骨芽細胞分画と骨細胞分画で Fkbp5 の発現を検討した結果、両分画で Fkbp5 の有意な発現上昇を認めた。8週齢の雄あるいは雌の

野生型マウスとFkbp5 ko マウスで1週間の尾部懸垂実験を行い、骨量をマイクロCTで比較した。雄マウスでは、Fkbp5 ko マウスでのみ非荷重時の骨量減少を認めた。雌マウスでは、両者に非荷重時の骨量減少を認めたが、Fkbp5 ko マウスでより強度の低下を認めた。

〔徐放性プレドニゾロンペレット移植実験〕7週齢の野生型マウスおよびFkbp5 ko マウスの背部皮下に、徐放性プレドニゾロンペレット(低容量1.25mg/kg/day、高容量3.2 mg/kg/day)あるいはプラセボペレットを植え込み、4週間後に屠殺、体重、筋重量、血中グルコース、中性脂肪、コレステロール、アルブミン、LDH、CPK、コリンエステラーゼを測定するとともに、マイクロCTで骨量を比較した。高容量では、野生型マウスの30%が死亡、Fkbp5 ko マウスでは全例が3週間以内に死亡した。低用量では、体重、筋重量ともにFkbp5 ko マウスは野生型マウスより強度に低下した。血中グルコース、中性脂肪は、Fkbp5 ko マウスでのみ上昇、コレステロールは両者で上昇したが、Fkbp5 ko マウスでより強度であった。マイクロCT解析では、海綿骨は野生型マウスでのみ増加、皮質骨は野生型マウスで軽度低下、Fkbp5 ko マウスで強度の低下を認めた。今後、非荷重時の骨量減少をFkbp5 が抑制する分子機構および、グルココルチコイド投与時の骨形成抑制および骨吸収促進の分子機構について、Fkbp5 KO マウスを用いて解析を行っていく。

## 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 9件)

1. Miyazaki T, Baba TT, Mori M, Moriishi T, Komori T. Microtubule-associated protein tau (Mapt) is expressed in terminally differentiated odontoblasts and severely down-regulated in

morphologically disturbed odontoblasts of Runx2 transgenic mice. Cell Tissue Res. 2015 [Epub ahead of print] (査読有)

2. Qin X, Jiang Q, Matsuo Y, Kawane T, Komori H, Moriishi T, Taniuchi I, Ito K, Kawai Y, Rokutanda S, Izumi S, Komori T. Cbfb regulates bone development by stabilizing Runx family proteins. J Bone Miner Res. 30(4):706-14. 2015 doi: 10.1002/jbmr.2379. (査読有)
3. Yoshida CA<sup>#</sup>, Kawane T<sup>#</sup>, Moriishi T<sup>#</sup>, Purushothaman A, Miyazaki T, Komori H, Mori M, Qin X, Hashimoto A, Sugahara K, Yamana K, Takada K, Komori T. Overexpression of Galnt3 in Chondrocytes Resulted in Dwarfism Due to the Increase of Mucin-type O-Glycans and Reduction of Glycosaminoglycans. J Biol Chem. 289(38):26584-96. 2014 #: same contribution doi: 10.1074/jbc.M114.555987. (査読有)
4. Kawane T, Komori H, Liu W, Moriishi T, Miyazaki T, Mori M, Matsuo Y, Takada Y, Izumi S, Jiang Q, Nishimura R, Kawai Y, Komori T. Dlx5 and mef2 regulate a novel runx2 enhancer for osteoblast-specific expression. J Bone Miner Res. 29(9):1960-9. 2014 doi: 10.1002/jbmr.2240. (査読有)
5. Moriishi T, Kawai Y, Komori H, Rokutanda S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Asahina I, Komori T. Bcl2 deficiency

- activates FoxO through Akt inactivation and accelerates osteoblast differentiation. PLoS One. 9(1):e86629. 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0086629. (査読有)
6. Mizuhashi K, Kanamoto T, Moriishi T, Muranishi Y, Miyazaki T, Terada K, Omori Y, Ito M, Komori T, Furukawa T. Filamin-interacting proteins, Cfm1 and Cfm2, are essential for the formation of cartilaginous skeletal elements. Hum Mol Genet. 23(11):2953-67. 2014 doi: 10.1093/hmg/ddu007. (査読有)
7. Ito K, Maruyama Z, Sakai A, Izumi S, Moriishi T, Yoshida CA, Miyazaki T, Komori H, Takada K, Kawaguchi H, Komori T. Overexpression of Cdk6 and Ccnd1 in chondrocytes inhibited chondrocyte maturation and caused p53-dependent apoptosis without enhancing proliferation. Oncogene. 33(14):1862-71. 2014 doi: 10.1038/onc.2013.130. (査読有)
8. Moriishi T, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Maeno T, Kawai Y, Komori H, Komori T. Osteocyte network; a negative regulatory system for bone mass augmented by the induction of Rankl in osteoblasts and Sost in osteocytes at unloading. PLoS One. 7(6):e40143. 2012 doi: 10.1371/journal.pone.0040143. (査読有)
9. 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. 50(1):409-19. 2012 doi: 10.1016/j.bone.2011.07.012. (査読有)
- 〔学会発表〕(計 2件)
- 森石武史: Bcl-2 ノックアウトマウスでは Akt の不活性化により FoxO が活性化し、骨芽細胞分化が促進する, 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 ポスター、2014 年 7 月 24 日、大阪府大阪市
- 森石武史: 骨細胞ネットワーク破綻マウスを用いた骨細胞機能解析, 第 31 回日本骨代謝学会学術集会 ワークショップ、2013 年 5 月 30 日、兵庫県神戸市
- 〔図書〕(計 0件)
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)
- 名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：
- 取得状況(計 0件)
- 名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：

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

森石 武史 (MORIISHI, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科

(歯学系)・助教

研究者番号：20380983

### (2)研究分担者

福田 理香 (FUKUDA, Rika)

活水女子大学・健康生活学部・食生活健康学

科・教授

研究者番号：30312838

小守 壽文 (KOMORI, Toshihisa)

長崎大学・医歯薬学総合研究科

(歯学系)・教授

研究者番号：00252677

宮崎 敏博 (MIYAZAKI, Toshihiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科

(歯学系)・准教授

研究者番号：10174161