

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659910

研究課題名(和文)代謝性骨疾患においてオートファジーが果たす役割

研究課題名(英文)Possible roles of autophagy in bone remodeling

研究代表者

山城 隆 (Yamashiro, Takashi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70294428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーとは、細胞内のバルク分解を担う系であり、異常タンパク質を分解することで、様々な生命現象に関与している。しなしながら、骨形成におけるオートファジーの関与は検討されることがなかった。一方、Atg5^{-/-}マウスは出生直後致死であるため骨組織の*in vivo*の解析は不可能であった。そこで、骨芽細胞を含む間葉系組織において特異的にAtg5を機能不全にするために、Twist2 (Dermo1) 特異的なAtg5 KOマウスを作成した。しかしながら、Atg5ミュータントは骨梁における表現型を示さなかった。オートファジーが骨代謝に関与することが近年、報告されており、結果の違いを考察する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is a vesicle and lysosome-mediated catabolic mechanism that is essential for cell degradation of unnecessary or dysfunctional cellular components through the actions of lysosomes. This mechanism plays a wide variety of physiological and pathophysiological roles conserved. However, the physiological significance of autophagy has not yet been clarified in the process of bone metabolism. Conventional knockout of Atg5 alleles leads to lethal at or shortly after birth. In this study, we created a conditional knockout allele of the Twist2 (Dermo1) gene employing the Cre-loxP system. This promoter is active in the bone forming osteoblasts in skeletal development. From the gross appearance, Atg5 mutant did not show any significant differences in morphology. Micro CT analysis neither found bone phenotypes in the mutants. Although recent studies demonstrated that autophagy is involved in bone formation, bone specific Atg5 deficiency did not demonstrated bone phenotypes.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：オートファジー 骨代謝 Atg5 Twist2

1. 研究開始当初の背景

オートファジーとは、細胞内のバルク分解を担う系であり、異常タンパク質を分解することで、様々な生命現象に関与している。また、オートファジーによるタンパク除去機構の破綻は、パーキンソン病、アルツハイマー病、脂肪肝などの発症に関与することが報告されている。一方、骨芽細胞は骨基質を多量に分泌し、その際に生じた不正なタンパクを除去する機構が発達している細胞である。そのため、オートファジーが異常なタンパク除去機構に何らかの関与がある可能性が高い。しかし、骨形成における骨芽細胞のオートファジーの関与はこれまで検討されたことがなかった。

我々は、基盤研究(B) 21390547 において、オートファジーの機能不全 ($Atg5^{-/-}$) マウスを用いて顎顔面形成におけるオートファジーの役割を検討してきた。その結果、骨芽細胞においてオートファジーは基質産生の際に生じる小胞体ストレスから細胞を保護していることを見出した。 $Atg5^{-/-}$ の骨芽細胞では p62 陽性の封入体が蓄積することも見出し、オートファジーがユビキチンシステムによるタンパク分解にも関与していることを見出した。一方、骨芽細胞の寿命は3か月と長く、異物タンパクの蓄積の影響を見るには長期の骨組織の観察が必要であるが、 $Atg5^{-/-}$ (オートファジー不活化) マウスは出生直後致死のため、骨組織完成後の骨代謝に果たす役割を検討できない。そこで本研究では、薬剤投与時のみオートファジーが阻害されるコンディショナルノックアウトマウスを作成し、オートファジーが骨代謝に果たす役割を検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、全く新しいアプローチによって、老化に伴う骨組織脆弱化のメカニズムを解明することである。これまで我々は骨

代謝とオートファジーの関連性についての研究を進めてきた。そしてその研究成果から、オートファジーは骨形成時よりむしろ骨組織完成後の品質維持に関連が深いことがわかった。しかし現在まで、オートファジーが骨代謝疾患に関わるという報告は存在していない。

我々は、成体まで正常に成長した後に骨組織特異的にオートファジーを不活化できるマウスを作製することで、骨組織完成後の品質維持におけるオートファジーの役割を解明する。

今回のわれわれの研究は、小胞体ストレス誘導性オートファジーが、微小環境下において基質を産生する骨芽細胞の細胞死の抑制に関与するという全く新しい概念を提案するものである。本マウス実験モデルによって、オートファジー不全が骨代謝に影響を及ぼすのかが明らかとなる。その基盤が確立されれば、今後の代謝性骨疾患の理解やその治療に向けた臨床応用も期待される。

本実験で確立を試みるコンディショナルノックアウトマウスにおいて骨の表現型が明らかになれば、この実験モデルはオートファジーが関与する骨代謝性疾患を検討するための新たなマウス実験モデルとなる。このマウスを用いて、オートファジーが骨代謝を制御する分子機構の詳細が明らかにされることが期待される。また、オートファジーに起因する疾患の分子診断や治療の基盤となることも期待される。

この実験モデルから得られる所見は加齢による骨代謝の影響を考えたうえでの基盤となるとも期待される。

3. 研究の方法

本研究では、骨形成におけるオートファジーの役割と制御を検討する。 $Atg5^{-/-}$ マウスは出生直後致死であるため骨組織の *in vivo* の

解析は不可能である。この問題を解決するために、Cre-LoxP システムを用いて、骨組織特異的かつ薬剤の投与中のみ Atg5 の機能を阻害する Atg5 コンディショナルノックアウトマウスを作成する。このマウスを用いることで、他の臓器等でのオートファジー機能不全による影響や、出生後致死等の問題点を回避する。

1) Atg5 コンディショナルノックアウトマウスの作成と解析

Atg5^{flox/flox} マウスはエクソンが loxP で挟まれているマウスである。一方、骨芽細胞を含む間葉系組織において特異的に Atg5 を機能不全にするために、Cre リコンビナーゼ (Cre) が Twist2 (Dermo1) 下に挿入された Twi2-Cre マウスを本研究では用意する。

Atg5^{flox/flox} マウスと Twi2-Cr マウスを交配させることで、コンディショナルノックアウトマウスを作成する (Twist2-Cre ; Atg5^{flox/flox} マウス)。このマウスは、Twist2 発現下 (骨組織) において Atg5 の機能が阻害される。

2) コンディショナルノックアウトマウスの組織学的解析ならびに分子解剖

コンディショナルノックアウトマウスの骨組織における表現型を解析する。全体像や、骨梁の状態は microCT で解析する。また、組織像でその詳細を検討する。石灰化の状態は、Von kossa 染色等により解析を行う。また、骨成分分析は外部委託により行う。

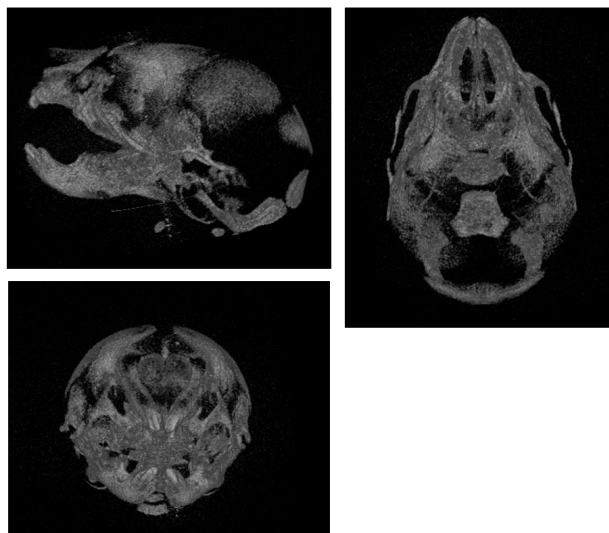
4 . 研究成果

Atg5 ノックアウトマウスは胎生致死であるものの、今回作成した間葉組織特異的 Atg5 コンディショナルノックアウトマウスは胎生致死ではなかった。

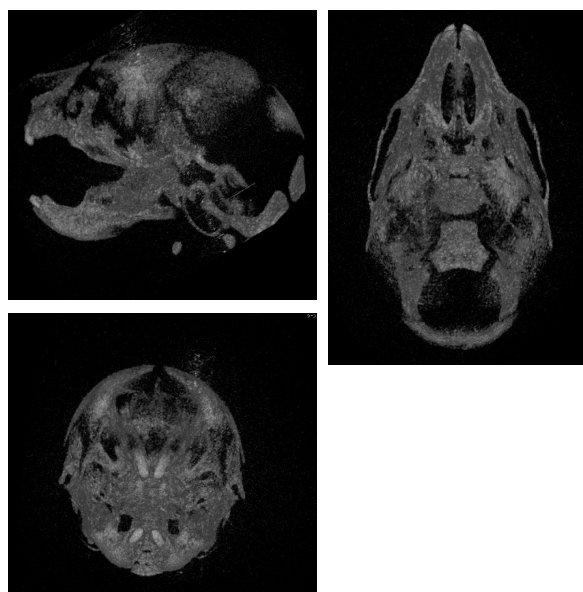
生後 5w の頭蓋冠および下肢の長管骨の骨梁を micro CT および組織切片にて、微細な骨の構造の変化を検討した。その結果、Atg

ミュータントにおいて、骨梁における表現型は観察できなかった。

Twist2Cre;ATG5^{f/f}



control



一方、ミシガン大学のグループは、オートファジー関連遺伝子である FIP200 のノックダウンによって、骨の分化が抑制されるとともに、骨形成不全が生じることを明らかにしている。そのため、我々の仮説は正しかったと考えられる。

今回、本マウスでは骨に表現型認められなかったものの、加齢による影響も考慮して、老齢マウスにおける解析を行うことを検討する。

5 . 主な発表論文等

特になし。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山城 隆 (YAMASHIRO TAKSHI)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号 : 70294428

(2)研究分担者

柳田剛志 (YANAGITA TAKESHI)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号 : 90534793