

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462393

研究課題名(和文) 骨細胞におけるミトコンドリア転写因子Tfamの機能解析

研究課題名(英文) Mitochondrial transcription factor A in osteocytes is involved in bone metabolism by regulating osteoclastic bone resorption

研究代表者

時村 文秋 (Tokimura, Fumiaki)

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：80242147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ATP産生において重要な役割を果たしているTfam(ミトコンドリア転写因子A)とメカニカルストレスの受容を担う骨細胞に焦点をあて、in vivoでの解析を行うために、Tfam floxマウスと骨細胞特異的にCreを発現するDmp1-Creマウスを交配させることにより、骨細胞特異的にTfamを欠損させ、骨の解析を行った。骨細胞特異的Tfam欠損マウスを10週齢にて解析したところ、有意に骨量が減少していた。興味深いことに、骨形成パラメーターは大きな変化がなかったものの、骨吸収パラメーターは増加していた。ミトコンドリアのTfamが骨代謝において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial transcription factor A (Tfam) is necessary for mtDNA maintenance in mammals and regulates mtDNA copy number by directly binding and coating mtDNA. In addition, Tfam is absolutely required for transcription initiation at mtDNA promoters.

To investigate the role of Tfam in bone metabolism, we generated osteocyte-specific Tfam conditional knockout (cKO) mice by mating Tfamflox/flox mice with Dmp1-Cre transgenic mice, in which the Cre recombinase gene was specifically expressed in osteocytes. Tfam cKO mice exhibited a remarkable decrease in bone volume. Histomorphometric analysis of Tfam cKO mice revealed a significant increase in the eroded surface/bone surface ratio, osteoclast surface, and osteoclast number. However, the bone formation parameters were equivalent to those in normal Tfamflox/flox littermates. Collectively, these findings suggest that the bone loss in Tfam cKO mice was caused by increased bone-resorbing activity, rather than by decreased bone formation.

研究分野：整形外科学

キーワード：ミトコンドリア 骨細胞 破骨細胞 骨吸収

1. 研究開始当初の背景

日本はかつてない高齢社会を迎え、なかでも老化にともなう骨、関節、筋など運動器の機能低下に附随して生じる問題は、神経系の障害と共に高齢者の生活の質を著しく損なうため、大きな社会問題となっている。近年、高齢化社会を見据えて、健康寿命を少しでも長くしようと、運動器症候群：ロコモティブシンドロームという概念の定着を目指して様々な広報活動が行われている。さらに、ロコモーションチェック、ロコモーショントレーニングを学会でも推奨しているが、メタボリックシンドローム(内臓脂肪症候群)に比較すると、その科学的知見が少ないことが弱点となり、“ロコモ”は“メタボ”ほど一般社会に浸透していない。本研究では、運動などによるメカニカルストレス(力学的刺激)から骨量維持につながる詳細なメカニズムの解明を目指す。

生物は地球に住んでいる限り、重力に曝されている。この重力が効果を最大に発揮するのは、地上で生物が行動する場合である。水中では約1/6程度に減少し、睡眠や休息状態にあるときは、さらに重力の効果は減少する。寝たきり状態やギブスによる固定など、いわゆる、不動化状態が続く場合には、筋肉や骨格など運動にかかわる組織の主要部分に対する重力の効果は実質的にゼロに近くなるといわれている。すなわち、無重力に近い状況が作り出されていることになる。このような状態では、筋肉・骨ともに萎縮する。宇宙飛行士の骨量が宇宙滞在中に減少し、帰還一定期間後にはほぼ回復することもよく知られている。このことから、メカニカルストレスの持続的負荷が一定期間内に繰り返されることが、骨の構造と機能の維持に必要であることが示唆される。骨量は、骨吸収と骨形成のバランスにより維持されているが、メカニカルストレスの減少による骨萎縮(骨量減少・骨質低下)の詳細は不明な点が多い。

骨基質中に存在する骨細胞は、力学刺激の感知センサーとして働き、その情報を周囲の細胞に伝達することで、リモデリング活動を調整していると考えられている。メカニカルストレスに応答する組織は運動骨格系に限らず生体内に広く分布し、循環器系とくに血管や内皮細胞については多くの研究がある。これらの細胞がメカニカルストレスに応答する

機序には普遍性があると考えられるが、どの組織についてもその詳細は想像の域を出ない。本研究では、メカニカルストレスの受容から、細胞内シグナルへの変換過程で重要な役割を果たしている骨細胞のミトコンドリア機能に注目する。

2. 研究の目的

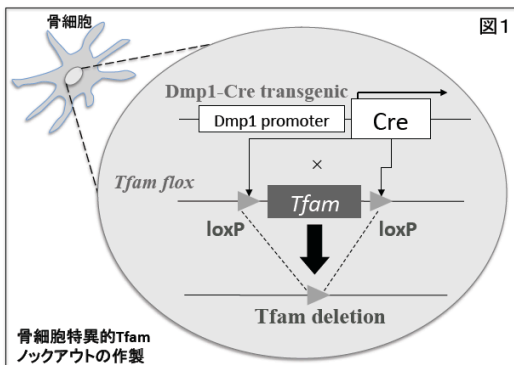
我々の最近の解析で(Miyazaki et al. 2012 *J Biol Chem.* 287, 37808-23, 2012)、骨組織内の微小環境下で、細胞外 ATP が骨吸収に阻害的に働く可能性を示した一方で、骨形成においては細胞外 ATP が促進的に働くという報告がなされている(Panupinthu et al. 2008 *J. Cell Biol.* 181, 859-871, Katz et al. 2011 *Arch. Biochem. Biophys.* 513, 144-152)。これらの報告から、骨髄腔・骨組織内の微小環境における細胞外 ATP が、「骨吸収<骨形成」へと傾くことにより、骨量維持にプラスに働くことが予想される。最近、骨細胞が RANKL の発現を介して破骨細胞形成を促進し、骨を作りかえる指令を出していることが明らかにされた。また、細胞外 ATP のソースは、細胞からの ATP リリースのメカニズムに未だ不明な点が多いが、一般に細胞内 ATP とされている。そこで今回は、骨基質中に多数存在し、細い突起を出して互いに連結している骨細胞が、細胞外 ATP 濃度をコントロールすることによって、骨形成・骨吸収のバランスをとっているのではないかという仮説を検討する。

細胞はミトコンドリアという細胞内器官で酸素を用いたエネルギー生産を行うが、このとき用いた酸素のうち1~2%を誤って、過激な酸化活性をもち、遺伝子、膜脂質、タンパク質などを酸化してこわしてしまう活性酸素(ROS)を生じさせてしまう。さらに、ROSにより電子伝達系の機能が障害された場合にはエネルギー産生が低下するのみならず、より多くの ROS が産生され、組織障害・mtDNA 障害をもたらし、さらなる活性酸素を産生するという悪循環になる。ATP エネルギー産生において主要な役割を果たす Tfam は、近年 mtDNA の転写・複製だけでなく、結合することにより mtDNA を維持・安定化する機能を持ち、ROS による mtDNA 障害を抑制する働きを持つことが示唆されている。

本研究では、骨細胞におけるミトコンドリア・Tfam の重要性と骨細胞による骨量維持システムの詳細について検討を行う。

3. 研究の方法

Tfam はすべての細胞・組織において重要な役割を果たし、単純なノックアウトでは、骨組織におけるその機能を解析しきれないので、本研究ではコンディショナルジーンターゲットング法を用いる。骨細胞特異的な不活化を Cre-loxP システムを用いて行う。Cre はバクテリオファージ P1 由来の 38kDa 蛋白で、リコンビナーゼの Int (Integrase) ファミリーに属する。この酵素は 34bp の loxP サイトを認識して特異的にこの部位で DNA のリコンビネーションを起こす。Cre 酵素を骨細胞特異的に発現させる方法としては、図 1 のように骨細胞特異的 dentin matrix protein 1 (Dmp1) プロモーターの制御下に Cre 酵素を発現させたトランスジェニックマウスを用いることにより可能となる (*J Dent Res* 86:320-325, 2007)。この Dmp1-Cre マウスと Tfam 遺伝子領域を挟みこむように loxP 配列を導入したマウス (Tfam flox マウス) を用いて、Tfam flox/flox Dmp1-Cre +/- マウス (Tfam コンディショナルノックアウトマウス : Tfam cKO マウス) を作製する (図 1 参照)。



大腿骨や脛骨を取り出して、X 線撮影を行う。骨の代謝機能を評価するために骨組織形態計測を行う。非脱灰薄切標本を用いて、骨構造に関するパラメーター、骨形成に関するパラメーター、骨吸収に関するパラメーターを計測する。計測には、脛骨近位部、大腿骨遠位部を用いる。骨量、類骨量、類骨面の厚さ、骨芽細胞面%、吸収面%、破骨細胞数、破骨細胞面%、骨石灰化速度、骨形成速度、などをコントロールマウスと比較する。

4. 研究成果

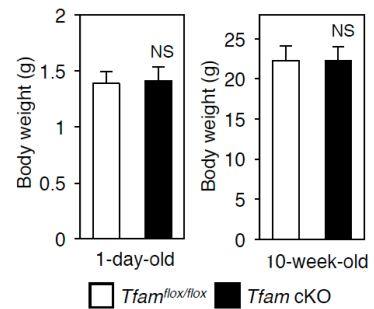
(1) 骨細胞特異的 Tfam cKO マウスの作製

Tfam cKO マウスは、メンデルの法則にしたがって生まれ、外見上大きな問題なく成長した。右図のように、1 日齢でも、10 週齢でもコントロールマウス (Tfam flox/flox) との間に体重差はなかった。また、生殖能力も維持していた(図 2)。

実際に

図 2

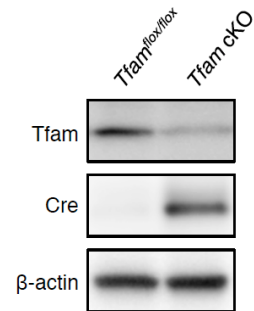
Tfam の発現が抑制されているかを確認するために、下肢の骨を採取し、骨髄腔をフラッシュアウト



したあと、小さな歯間ブラシを用いて骨髄腔を掃除したあとの皮質骨から採取したタンパク質を電気泳動し、ウエスタンブロッティングを行ったところ、

図 3

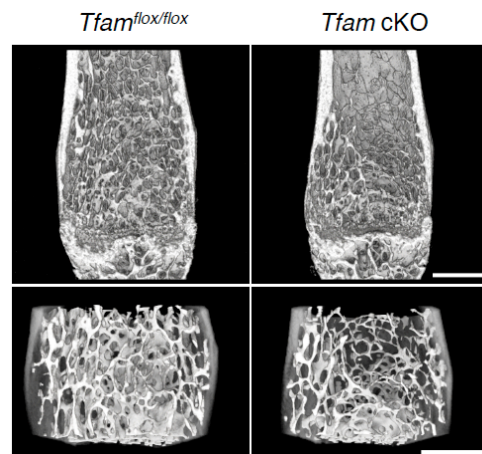
Tfam cKO マウスから採取した皮質骨からは、Cre の発現が見られ、逆に Tfam の発現はコントロールマウス (Tfam flox/flox) と比較して低下していた (図 3)。



(2) 大腿骨の解析

Tfam cKO マウスから下腿の骨を採取し、レントゲン撮影を行ったところ、大腿骨遠位部にて、骨量の低下が観察された。マイクロ CT では、図 4 のように、さらに骨梁の減少

図 4



が明らかとなった。興味深いことに、骨形成パラメーターは大きな変化がなかったものの、骨吸収パラメーターは増加していた。

さらに、マイクロ CT にて皮質骨解析を行ったところ、Tfam cKO マウスにて皮質骨幅の低下や porosity (多孔性) の増加が見られ、皮質骨でも骨吸収の増加を示唆する結果がみられた。

これらのことから、ミトコンドリア転写因子 Tfam が骨代謝において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。Tfam cKO マウスの皮質骨から採取した mRNA を用いた解析により、RANKL の発現に有意な変化があったため、骨細胞においてミトコンドリア-Tfam の下流で RANKL の発現が制御されることがわかってきた。今後、ミトコンドリアと RANKL の間をつなぐシグナル伝達経路の詳細を明らかにしていく予定である。

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 15 件)

- 1) Muraki S, Akune T, Teraguchi M, Kagotani R, Asai Y, Yoshida M, Tokimura F, Tanaka S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Yoshimura N: Quadriceps muscle strength, radiographic knee osteoarthritis and knee pain: the ROAD study. *J Orthop Sci*. 2015 Jun 29. pii: S0949-2658(15)00027-5. doi: 10.1016/j.jos.2015.06.025. 査読有
- 2) Muraki S, Akune T, En-Yo Y, Yoshida M, Suzuki T, Yoshida H, Ishibashi H, Tokimura F, Yamamoto S, Tanaka S, Nakamura K, Kawaguchi H, Oka H, Yoshimura N: Joint space narrowing, body mass index, and knee pain: the ROAD study (OAC1839R1). *Osteoarthritis Cartilage*. 2015 Jun;23(6):874-81. doi: 10.1016/j.joca.2015.01.011. 査読有
- 3) Muraki S, Akune T, Nagata K, Ishimoto Y, Yoshida M, Tokimura F, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, Oka H, Yoshimura N: Does osteophytosis at the knee predict health-related quality of life decline? A 3-year follow-up of the ROAD study. *Clin Rheumatol*. 2015 Sep;34(9):1589-97. doi: 10.1007/s10067-014-2687-y. 査読有
- 4) Ando Y, Miyazaki T: Very rare variant of popliteal artery entrapment syndrome due to an enlarged fabella associated with severe knee osteoarthritis: first case report. *J Orthop Sci* 2015 in press 査読有
- 5) Hiroshi Kiyomatsu, Yusuke Oshima, Takashi Saitou, Tsuyoshi Miyazaki, Atsuhiko Hikita, Hiromasa Miura, Tadahiro Iimura, and Takeshi Imamura: Quantitative SHG imaging in osteoarthritis model mice, implying a diagnostic application. *Biomedical Optics Express*. 2015 Jan 8;6(2):405-20. doi: 10.1364/BOE.6.000405. eCollection 2015 Feb 1. 査読有
- 6) A review of denosumab for the treatment of osteoporosis. Miyazaki T, Tokimura F, Tanaka S. Patient Prefer Adherence. 2014 Apr 8;8:463-71. doi: 10.2147/PPA.S46192. eCollection 2014. Review. 査読有
- 7) Muraki S, Akune T, Nagata K, Ishimoto Y, Yoshida M, Tokimura F, Tanaka S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Yoshimura N: Association of knee osteoarthritis with onset and resolution of pain and physical functional disability: the ROAD study. *Mod Rheumatol*. 2014 Nov;24(6):966-73. doi: 10.3109/14397595.2014.883055. 査読有
- 8) Akune T, Muraki S, Oka H, Tanaka S, Kawaguchi H, Tokimura F, Yoshida H, Suzuki T, Nakamura K, Yoshimura N: Association of physical activities of daily living with the incidence of certified need of care in the long-term care insurance system of Japan: the ROAD study. *J Orthop Sci*. 2014 May;19(3):489-96. doi: 10.1007/s00776-014-0537-z. 査読有

- 9) Akune T, Muraki S, Oka H, Tanaka S, Kawaguchi H, **Tokimura F**, Yoshida H, Suzuki T, Nakamura K, Yoshimura N: Incidence of certified need of care in the long-term care insurance system and its risk factors in the elderly of Japanese population-based cohorts: the ROAD study. Incidence of certified need of care in the long-term care insurance system and its risk factors in the elderly of Japanese population-based cohorts: the ROAD study. 査読有
- 10) 澤田泰宏、**宮崎剛**、原田伊知郎：骨代謝を制御する「善玉」メカニカルストレスと「悪玉」メカニカルストレス 実験医学 2014 Vol. 32 No. 7 (増刊) 1093-1099. 査読無
- 11) 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. 査読有
- 12) 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 査読有
- 13) **宮崎剛**：ミトコンドリアによる破骨細胞機能制御 Clin Calcium. 2013 Nov;23(11):1577-83. doi: CliCa131115771583. 査読無
- 14) **宮崎剛**、澤田泰宏：骨粗鬆症研究と治療法の進歩 日本老年医学会雑誌 2013 50:130-134 査読無
- 15) **宮崎剛**、森秀一、重本和宏：サルコペニア発症のメカニズム 腎と骨代謝 2013 26:99-107. 査読無

[学会発表] (計3件)

- 1) **Miyazaki T**, Azuma S, Harada I, Sawada Y. Osteocyte-specific Cas knockout mice exhibit decreased bone mass through

increased bone resorption. The 2016 Ageing Summit. London, UK. 2016.2.10-12.

- 2) **Miyazaki T**, Harada I, Sawada Y. MECHANOSENSOR PROTEIN P130CAS IN OSTEOCYTES IS IMPORTANT FOR BONE METABOLISM. The 2015Ageing Summit. London, UK. 2015.2.11-13.
- 3) Hiroshi Kiyomatsu, Takeshi Imamura, Atsuhiko Hikita, Tadahiro Iimura, **Tsuyoshi Miyazaki**, Yusuke Ohsima, Takashi Saitou, Hiromasa Miura. Evaluation of cartilage based on second harmonic generation microscopy. Thirty-sixth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Houston, Texas, USA. 2014.9.12-15

6. 研究組織

(1) 研究代表者

時村 文秋 (TOKIMURA FUMIAKI)

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：80242147

(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