

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670161

研究課題名(和文)骨が記憶力・知能を制御することの証明と解明

研究課題名(英文)The investigation of the role of bone in the regulation of neuron.

研究代表者

古賀 貴子 (Koga, Takako)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90451905

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)：マウス胎児の頭蓋冠から採取した細胞を、骨芽細胞分化培養培地で21日間培養して得た、骨芽細胞培養上清から、神経系細胞に作用を持つ因子を単離した。PC-12細胞を用いて、骨芽細胞培養上清にPC-12細胞の神経突起伸長を誘導する活性を顕微鏡にて観察した。骨芽細胞分化誘導7日、14日、21日で検討した結果、培養上清を濃縮した場合に生理活性を有する濃縮培養上清がえられた。これをMS解析にて分析した結果、多数の分泌因子が同定され、このうち9つの因子が神経細胞に関与する因子であることが分かった。これについて、遺伝子をノックダウンさせたり過剰発現させたりして、培養上清を調整し、活性の有無について検討した。

研究成果の概要(英文)：The osteoblast-culture medium were confirmed to have the effect of induction of neurite elongation of PC-12 cell lines. Such putative molecules in the osteoblast-culture medium were purified and analysed by MS protein analyzation. Numerous secreted proteins were identified, but 9 of these molecules are known to be regulators of neurite outgrowth. Therefore, these 9 molecules are analyzed whether these molecules have such effect by gain-of-function or loss-of-function experiments.

研究分野：骨免疫学

キーワード：骨芽細胞 生理活性 神経細胞 突起伸長

1. 研究開始当初の背景

最近、中高年者を対象に、1年間にわたるウォーキングやストレッチが記憶や空間学習能力を司る海馬の体積の退縮を防ぎ、更には増加させることが明らかにされた(PNAS, 108, 3017, 2011)。また、アルツハイマー病のモデルマウスに高脂肪食を与えて認知症を悪化させる系に対して、自発的な運動をさせると、高脂肪食を与えない食事両方よりも効果的に認知機能を改善させることが報告された(J. Biol. Chem. 287, 23024, 2012)。疫学的にも実験的にも“運動が認知症の改善に効果的である”ことが報告され始めている。果たして運動の結果、何がこの効果を生み出すのか？現在のところ、責任細胞も分子メカニズムも不明である。

骨は、生体を支持し、運動を可能にする力学的中枢機能を果たす組織である。骨は、脊椎動物が重力を感知して、生存に最適な形と強度を造り替えながら形成される(Wolffの法則)。一旦形成された後も、劣化した骨を吸収し新しい骨で作り返すという骨リモデリングを繰り返して、骨の機能と恒常性を維持している。骨組織において骨の吸収は破骨細胞が、形成は骨芽細胞が担い、骨基質中の骨細胞が力学的負荷を感知して骨リモデリングを制御することが証明された(Nature Med. 17, 1231, 2011, & Nature Med. 17, 1235, 2011)。申請者はこれまでに、破骨細胞と骨芽細胞の双方向の相互作用から、骨代謝制御の分子メカニズムを解明し、骨粗鬆症の治療分子基盤を提唱してきた(Koga et al., Nature, 2004; Koga et al., Nature Med, 2005; Shinohara, Koga et al., Cell, 2008 他)。特に最近、神経系制御因子Sema4D/PlexinB1が骨組織細胞間インタラクションを制御することを発見し、骨形成促進剤への応用に結び付けた(Negishi-Koga et al., Nature Med, 2011)。以上の学術的背景と申請者の研究成果をもとに、“骨による脳・神経制御の解明”という着想に至った。

2. 研究の目的

高齢化が進展する中、激増する認知症やアルツハイマー病、骨粗鬆症による寝たきり状態が増悪させる認知症が増加し、QOLの著しい低下だけでなく介護負担の重さも大きな社会問題となっている。これに対して、“認知症の予防・改善に運動が効果的である”と提唱され始めている。医療費や介護負担の問題をも解消する方法である。本研究は、“運動は記憶力・知能を改善させるか？”という命題を、**骨による脳・神経系の発達・機能制御**という視点からアプローチする。骨組織構成細胞(骨細胞を含む骨芽細胞系細胞、破骨細胞)が産生する脳・神経系の新たな制御因子・制御機構を分子レベルで証明・解明し、認知症を始めとす

る神経系疾患に対する治療戦略の分子基盤を提唱する。同時に骨粗鬆症・認知症を同時に制御する治療戦略の可能性に繋ぐ。

具体的には、運動による負荷刺激を受けた骨組織の細胞がある液性因子Xを分泌し、脳や神経系にエンドクラインに働きかけることを想定し、この因子Xを同定して標的神経・脳細胞における細胞内シグナル伝達機構を解明する。また、因子Xの生理的意義を遺伝子改変マウスを用いて証明し、因子Xによる神経系関連疾患や記憶・知能の改善効果を検証する。

3. 研究の方法

本研究において明らかにすべきことは次の3点である。1) 骨組織構成細胞が液性因子(以後Xとする)を分泌して、脳・神経系の機能を制御するか。2) Xの正体は何か。3) Xの生理的意義と分子メカニズムはどのようなものか。従って、1) に対しては、骨組織構成細胞の存在しないマウスの行動・認知能力異常、視覚・聴覚を含む間隔異常を解析し、生体レベルでの骨神経制御機構の有無を示す。また、*in vitro*で神経突起伸長活性を持つ骨組織構成細胞由来因子Xを探す。2) に対しては、生理活性を基に、Xを質量分析等により同定する。3) に対しては、因子Xの欠損マウスを作成し、脳・神経系の異常確認、および因子Xの投与による表現型回復実験を行う。また、プロテオーム・トランスクリプトーム解析を基に、因子Xの標的分子・シグナル伝達を解明する。

(1) *in vitro* 神経突起伸長に対する生理活性を基に骨組織構成細胞が分泌する因子Xを探す。

マウス海馬由来の神経細胞やマイクログリアおよび神経分化モデル細胞株PC12に対し、骨組織構成細胞(骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞)の培養上清を作用させ、神経の突起伸長に変動をもたらす因子Xと、それによって神経細胞内で発動する細胞内シグナル伝達(作用点)を明らかにする。骨細胞は皮質骨を酵素処理して得られる細胞を、骨芽細胞はマウス胎仔の頭蓋冠由来細胞を、破骨細胞は骨髄単球・マクロファージを、それぞれ*in vitro*で培養・分化誘導して培養上清を得る。特に、メカノセンサーである骨細胞については、ゲル内三次元培養細胞に繰返引張刺激を付加して得られる培養上清を用いる。これにより、力学的刺激によって産生される因子を探索できる。

神経突起制御因子Xの探索と同定

骨組織構成細胞の培養上清を、サイズ排除クロマトグラフ・によって粗分画し、培養神経細胞の突起伸長変動を指標に生理活性を持つ分画を得る。以後、陽イオン交換カラム、陰イオン交換カラム、疎水性カラム等を適宜用いて活性分画

を濃縮・精製する。申請者は既に、骨芽細胞培養上清の粗分画および濃縮精製した分画中に、神経細胞突起を伸長させる生理活性が存在することを見出している（右写真、未発表）。因子 X の同定は、質量分析法(LC-MS/MS)により実施する。

神経突起制御因子 X の作用点、細胞内シグナル伝達・標的分子の同定

因子 X による神経細胞内における作用点を下記の実験にて明らかにする。タンパク発現・修飾制御：精製因子 X を作用させた神経細胞とさせなかったコントロール神経細胞から抽出したタンパク質を、それぞれ異なる iTRAQ 標識し、AB SCIEX 社製 Triple TOF™ (LC-MS/MS)にてプロテオーム解析を行う。iTRAQ 法では、標識ペプチドにより MS/MS スペクトルに違いが生じ、その結果、質量分析と同時に比較定量解析と、リン酸化やユビキチン化等の修飾解析が可能となる。遺伝子発現制御：上記の両群の神経細胞から RNA を回収し、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行う。と KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) PATHWAY

(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.htm> 1) および GSEA (Gene Set Enrichment Analysis, Subramanian *et al*, 2005)といった、バイオインフォマティクスデータベースから得られる情報を基に、因子 X によって変動する細胞内シグナル伝達・標的分子を明らかにする。

(2) in vivo 脳・神経系への作用点から骨構成細胞由来分泌因子 X を探す。

上記実験 1)で同定される因子 X の個体レベルでの意義・作用機序については、以降の実験計画で説明する予定だが、2)の実験計画では、骨芽細胞系列細胞や破骨細胞を除去したマウスを用いることによって、個体レベルで生理作用を持つ骨組織由来因子 X の同定を目的とする。

各骨組織細胞除去マウスの作成と脳・神経系への作用点の同定

骨構成細胞特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウス (Tg) と、Cre 存在下でウィルス由来のチミンジキナーゼを発現する Tg との交配により、細胞特異的にチミンジキナーゼを発現する Tg を作成する。このマウスにガンシクロビルを投与し、骨構成細胞を選択的に死滅させる。各骨構成細胞特異的 Cre Tg マウスとしては、以下の細胞特異的遺伝子のプロモーターを用いた Cre Tg マウスを用いる。【骨芽細胞特異的遺伝子：I 型コラーゲン(*Colla1*)やオステリクス(*Osx*)；骨細胞特異的遺伝子：Dmp1；破骨細胞特異的遺伝子：RANKL (*Tnfrsf11*)

やカテプシン K(*Ctsk*)】。骨組織細胞除去マウスと正常マウスに回し車による運動をさせ、脳全体、特に海馬からタンパク質と RNA を調整し、実験計画(1-2)に従って、細胞内シグナル伝達の変動を解析する。(ヒト大理石骨病に失明や難聴が併発することを考慮し、破骨細胞分化障害により重度の大理石骨病を呈する c-Fos 欠損マウスや RANKL 欠損マウスの視神経、聴覚神経におけるシグナル伝達変動も合わせて解析する。)

脳・神経系での作用点に着目した骨組織由来因子 X の同定 実験 (2-1)によって明らかになった、脳・神経細胞内のシグナル伝達分子の活性化を指標に、骨組織構成細胞の培養上清から因子 X を同定する。たとえば、脳・神経細胞内において特定の遺伝子群の発現量が変動するならば、それを制御する転写因子の活性化レベルをモニターするレポーターアッセイ系を確立する。これを評価系とし、比活性の上昇または低下を指標に培養上清の中から、活性物質 X の精製を行う。以後、X の同定は実験 (1-1)に準ずる。

骨組織細胞除去マウスの神経系表現型の解析

作成したマウスについて、中枢神経または末梢神経の異常を解析する。マウスの行動異常の有無を観察するほか、ホットプレートテストやテールフリックテストによる感覚神経の機能試験、Morris 水迷路による記憶試験を実施する。また中枢および末梢神経の組織切片を、H&E 染色、ニューロフィラメントなどの神経細胞マーカータンパク質を指標とした免疫染色法により神経系の形成を組織学的に評価する。

(3) 骨組織構成細胞が分泌する脳・神経制御因子 X の生体レベルでの意義を証明する。

同定したタンパク分子 X をコードする遺伝子の欠損マウス、または因子が小分子化合物である場合はその合成酵素をコードする遺伝子の欠損マウスを作成する。作出した欠損マウスを用いて以下の実験を実施する。・行動異常の観察、・組織学的解析による標的脳・神経の形成異常解析、・タンパク質・遺伝子発現の変動解析

骨組織細胞除去マウス、大理石骨病マウスなど、脳・神経系に表現型をもつことが判明したマウス、またはアルツハイマーモデルマウス (APP マウス) に精製下因子 X を投与し、表現型が回復するか否か検討することにより、治療への可

能性に結び付ける。

4. 研究成果

マウス胎児の頭蓋冠から採取した細胞を、骨芽細胞分化培養培地で21日間培養して得た、骨芽細胞培養上清から、神経系細胞に作用を持つ因子を単離した。PC-12細胞を用いて、骨芽細胞培養上清にPC-12細胞の神経突起伸長を誘導する活性を顕微鏡にて観察した。骨芽細胞分化誘導7日、14日、21日で検討した結果、培養上清を濃縮した場合に生理活性を有する濃縮培養上清がえられた。これをMS解析にて分析した結果、多数の分泌因子が同定され、このうち9つの因子が神経細胞に關与する因子であることが分かった。これについて、遺伝子をノックダウンさせたり過剰発現させたりして、培養上清を調整し、活性の有無について検討した。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

古賀 貴子(Tkako Koga)

東京大学・大学院医学系研究科免疫学・特任助教

研究者番号: 90451905

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: