

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 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：25670635

研究課題名(和文) Bcl-2 family 蛋白 Mcl-1 による破骨細胞制御機構の解明

研究課題名(英文) Bcl-2 family protein Mcl-1 regulates osteoclastogenesis by the anti-apoptotic function

研究代表者

大島 寧 (Oshima, Yasushi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50570016

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)：破骨細胞は生体内で唯一骨吸収能を有する細胞である。生体内の骨代謝は骨形成と骨吸収のバランスによって保たれているが、このバランスが崩れることで骨粗鬆症、炎症性疾患における関節破壊、人工関節の緩みなどが引き起こされる。これまでに破骨細胞の生存・骨吸収にはアポトーシスのミトコンドリア経路に関与する Bcl-2 ファミリーが重要な働きをしていることが報告されている。今回申請者は、Bcl-2 ファミリー蛋白の1つである Mcl-1 の破骨細胞における働きについて研究を行った。Mcl-1 は破骨細胞の細胞生存能の延長に強く働いている一方、骨吸収能には抑制の働きを持つことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Osteoclast is a multinuclear, bone eating cell. The metabolism of bone is maintained by a subtle balance of bone formation and resorption. The collapse of this bone metabolism causes osteoporosis, arthritis and then joint destruction. It's known that Bcl-2 family which has a function of mitochondria process in apoptosis makes essential effect on osteoclast. We examined the unknown function of Mcl-1 in osteoclast which is one of Bcl-2 family protein. We elucidated that Mcl-1 has functions of positive effect on survival rate of osteoclast and negative effect on the resorption.

研究分野：骨代謝学

キーワード：破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

当研究室では破骨細胞に関しての研究を行っており、特に破骨細胞のアポトーシスにおける Bcl-2 ファミリー蛋白の制御機構に関してこれまでいくつかの報告を行っている。秋山らは Bcl-2 ファミリーの中で BH-3 グループに属する Bim の破骨細胞における働きについて研究を行い、Bim は破骨細胞の細胞生存能を負に制御しているにもかかわらず、破骨細胞の骨吸収能に対しては正に制御を行っていることを明らかとした。永瀬らは Bcl-2 ファミリーのうち anti-apoptotic グループに属する Bcl-2 の破骨細胞における働きについて研究を行い、Bcl-2 は破骨細胞の細胞生存能・骨吸収能を両方とも正に制御していることを報告している。岩澤らは同じグループの Bcl-X_L が破骨細胞生存能は正に、破骨細胞骨吸収能は負に制御することを報告している。Mcl-1 は、Bcl-2 や Bcl-X_L と同様に Bcl-2 ファミリーの中で anti-apoptotic な作用を持つグループに属する。他の細胞における Mcl-1 の働きに関する研究が継続的に報告され、その働き的重要性も明らかになってきているにもかかわらず、破骨細胞における Mcl-1 に関する報告は非常に少ないのが現状で、本研究においてその機能について明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

Mcl-1 は他の Bcl-2 ファミリーと同様に様々な細胞で発現を確認されているが、上皮組織においては同じ anti-apoptotic Bcl-2 ファミリーに属する Bcl-2 や Bcl-X_L が分化の少ない基底層側の細胞に多く発現しているのに対し、Mcl-1 はより分化の進んだ表層側の細胞に強く発現が見られるという発現局在の相違がみられる。この発現局在の相違や、他の anti-apoptotic Bcl-2 ファミリーと比べて短い半減期を持つということより、Mcl-1 が他の anti-apoptotic Bcl-2 ファミ

リーとは異なった特有の働きを持つ可能性が示唆されている。

さまざまな細胞種において Mcl-1 の働きが非常に重要であることが報告されている。Bcl-2 ノックアウトマウスとは異なり、Mcl-1 ノックアウトマウスは胎生致死であることから生体の発生・分化・維持に Mcl-1 が重要であることが明らかとなっている。

破骨細胞における Mcl-1 の働きについて言及している報告は、渉猟しえる範囲では 2 編のみであった。いずれも破骨細胞における Mcl-1 発現量と破骨細胞のアポトーシス抑制が関連していることを報告しているが、実際に Mcl-1 発現がどのように制御され、いかなるメカニズムで破骨細胞の生存能を調節しているかについては言及されておらず、破骨細胞における Mcl-1 の働きはいまだ明確であるとは言えない。

本研究の目的は破骨細胞における anti-apoptotic Bcl-2 ファミリー蛋白 Mcl-1 の動態、および Mcl-1 の破骨細胞生存・骨吸収能への関与について調べることである。

3. 研究の方法

破骨細胞分化過程における Mcl-1 mRNA 発現量の推移の評価を行った。DDY マウスより骨髓細胞を採取し、M-CSF/RANKL 系培養において成熟破骨細胞形成を誘導した。RANKL を添加してから 24 時間ごとに mRNA を採取し、それぞれにおいて RT-PCR を行い Mcl-1 mRNA 量の定量を行った。続いて破骨細胞における蛋白発現量の経時的変化の評価を行った。DDY マウスより骨髓細胞を採取し、共存培養によって成熟破骨細胞を得たところでコラゲナーゼ+ディスパーゼ処理を行い、骨芽細胞を除去し破骨細胞を純化した。培養中 2 時間毎に蛋白を回収し、western blotting を行うことで破骨細胞における蛋白発現量の経時的変化を評価した。さらに遺伝子導入によって Mcl-1

over-expression, knockdown された破骨細胞の細胞分化、細胞骨格、細胞生存能、骨吸収能の評価を行った。RxMcl-1 を感染させた破骨細胞から蛋白を回収し、western blotting にて Mcl-1 強制発現の成否をはじめに確認した。RANKL を加えてから 3 日目、4 日目の時点で TRAP 染色を行い、Mcl-1 強制発現による破骨細胞分化への影響を評価した。4 日目において細胞骨格形成を検討するためにアクチン骨格染色である rhodamine phalloidin 染色を行った。Mcl-1 over-expression が破骨細胞生存能へ与える影響を評価するために、経時的に細胞を固定し TRAP 染色を行い、生存破骨細胞数を計算した。破骨細胞の骨吸収能検査 (pit formation assay) はその手技から、コラーゲンゲル上での破骨細胞培養が必須である。コラーゲンゲル上で培養した破骨細胞へのレトロウイルス感染は非常に困難であり、アデノウイルスを用いた遺伝子導入が必要である。成熟破骨細胞となる 24 時間前に AxMcl-1 を感染させることで Mcl-1 強制発現破骨細胞を作製し、western blotting にて強制発現の成否の確認を行った。このようにして作製された破骨細胞をデンチン上に移し、pit formation assay を行い骨吸収能の評価を行った。次に Mcl-1 ノックアウト破骨細胞の細胞分化、細胞生存能、骨吸収能の評価を行った。Mcl-1 ノックアウトマウスは胎生致死であるため、生体における Mcl-1 の役割を解明するためには、組織特異的ノックアウトマウスが必要となる。Mcl-1 flox マウスより骨髓細胞を採取し、RxCre を用いて Cre 遺伝子の導入を行うことで Cre-loxP システムを作動させ、Mcl-1 遺伝子をノックアウトした破骨細胞を作製し実験に用いた。このようにして作製された Mcl-1 ノックアウト破骨細胞の細胞分化、細胞生存能を上記と同様の方法で評価した。

4 . 研究成果

破骨細胞の分化過程において Mcl-1 の mRNA 発現量がどのように推移するかの検討を行った。骨髓細胞が破骨細胞前駆細胞を経て成熟破骨細胞へと分化するに伴い、破骨細胞分化マーカーであるカテプシン K の mRNA 発現量の増加がみられる一方、Mcl-1 mRNA 発現量はほぼ一定であり、破骨細胞の分化過程において Mcl-1 mRNA は恒常的に発現していることが明らかとなった。破骨細胞における Mcl-1 蛋白の代謝について検討したところ、anti-apoptotic Bcl-2 ファミリーに属する Bcl-X_L の蛋白発現量が長時間保たれているのに対し、Mcl-1 蛋白の発現は減少しており Bcl-X_L に比べ Mcl-1 は急速な蛋白代謝を受けることが明らかとなった。

破骨細胞における M-CSF シグナル伝達には PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) /Akt 経路と Ras/Raf/MEK/Erk 経路の 2 つの経路が関与している。これまでに 2 つのシグナル伝達経路のうち PI3K/Akt 経路は破骨細胞の細胞生存能・骨吸収能・細胞骨格の構築を制御し、Ras/Raf/MEK/Erk 経路は細胞生存能を制御していることが報告されている。破骨細胞生存能は双方のシグナル伝達経路から制御を受けているが、より強く制御を行っているのは Ras/Raf/MEK/Erk 経路であることも併せて明らかとなっている。アデノウイルスを用いた遺伝子導入により、Mcl-1 がこの 2 つのシグナル伝達経路からどのように制御を受けているかを検討した。AxMEK^{CA} を感染させた破骨細胞では、感染させたアデノウイルスの量に従って MEK の下流の Erk のリン酸化が確認され、その phospho-Erk の蛋白発現量と相関して Mcl-1 の蛋白発現が亢進していた。逆に AxRas^{DN} を感染させた破骨細胞では、感染させたアデノウイルスの量に従って Ras の下流の MEK のリン酸化が抑制された。phospho-MEK の発現量が減少するのに相

関して Mcl-1 の蛋白発現も減少しており、Ras/Raf/MEK/Erk 経路が Mcl-1 の発現に関与していることが明らかとなった。もう一方のシグナル伝達経路である PI3K/Akt 経路を活性化するために AxAkt^{CA} を感染させた破骨細胞では、感染させたアデノウイルスの量に従って phospho-Akt の発現量が増加したが、Mcl-1 の発現量は phospho-Akt の発現量とは全く相関を見せず、PI3K/Akt 経路に関しては Mcl-1 発現への関与は見られなかった。以上のことより、破骨細胞においては Mcl-1 発現は PI3K/Akt 経路ではなく Ras/Raf/MEK/Erk 経路によって制御されていることが明らかとなった。

Mcl-1 flox マウスから採取した破骨細胞に RxCre を感染させることで *in vitro* において Cre-loxP システムを作動させることで Mcl-1 ノックアウト破骨細胞を作製し、その破骨細胞の細胞分化、細胞生存能の評価を行った。RxCre 感染に伴う Cre 遺伝子の発現に伴い Mcl-1 の発現は消失しており、Mcl-1 を欠損した破骨細胞の作製に成功したことが確認された。このようにして作製された Mcl-1 ノックアウト破骨細胞の分化は control のものと有意な差は見られなかった。Mcl-1 ノックアウト破骨細胞の骨吸収能を評価するために Mcl-1 flox マウスから採取した破骨細胞に AxCre を感染させることで Mcl-1 ノックアウト破骨細胞を作製し、その細胞の骨吸収能を評価した。破骨細胞において AxCre 感染から Cre-loxP システムが作動し、Mcl-1 ノックアウト破骨細胞となるまで 36-48 時間の培養が必要であることが明らかとなった。Mcl-1 ノックアウト破骨細胞はその短い生存期間にもかかわらず control 破骨細胞より有意に骨吸収能が亢進していた。

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1件)

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. 査読有, 58 巻 2014 年, 1-10, doi: 10.1016/j.bone.2013.09.020. Epub 2013 Oct 2.,

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 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 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

大島 寧 (Yasushi Ohshima)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 50570016

(2) 研究分担者

田中 健之 (Takeyuki Tanaka)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 00583121

(3) 連携研究者

()

研究者番号: