

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893182

研究課題名(和文)骨芽細胞におけるBcl-xLの役割

研究課題名(英文)Role of anti-apoptotic Bcl-xL in osteoblasts

研究代表者

河井 洋祐 (KAWAI, Yosuke)

長崎大学・病院(歯学系)・助教

研究者番号：50423629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、2.3kb Col1a1 Cre transgenic mouseを用いて骨芽細胞特異的にBclxLをノックアウトさせたマウスはアポトーシス亢進がみられた。また骨芽細胞でのBCL-XLの発現が破骨細胞へも影響を及ぼし、結果として破骨細胞形成が亢進し、骨吸収が促進することにより10週齢で骨量の減少が認められた。骨芽細胞でのBCL-XLの発現維持は破骨細胞形成の抑制が期待され、将来的には骨粗鬆症などの骨量減少に対する治療としてのターゲット遺伝子になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we generated conditional knockout mice with osteoblasts that express anti-apoptotic BCL-XL by using 2.3kb Col1a1 promoter Cre transgenic mice. In BCL-XL conditional knockout mice, apoptosis was increased in osteoblasts. Expression of BCL-XL in osteoblasts affected osteoclastogenesis. As a results, bone volume was decreased at 10 weeks of age because osteoclast formation was increased. These results show that BCL-XL may become the target for the osteoporosis treatment in the future.

研究分野：外科系歯学

キーワード：骨芽細胞 アポトーシス BclxL

1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞におけるアポトーシスは骨形成において重要であり、骨粗鬆症治療において現在臨床利用されている副甲状腺ホルモン(テリパラチド)・ビスフォスフォネート製剤は骨芽細胞のアポトーシス抑制への関与が示唆されている。アポトーシス誘導により骨芽細胞では Bcl-xL が有意に発現上昇することからも骨芽細胞の生存に Bcl-xL は重要であると思われるが、これまで骨芽細胞特異的にノックアウトされたマウスは報告されていない。私のこれまでの結果は、骨芽細胞内の Bcl-xL が破骨細胞分化・活性化にも作用していることを示唆しており、Bcl-xL の骨芽細胞における役割を明らかにすることにより、骨量調節メカニズムの一端を明らかにできると考えている。さらに、Bcl-xL をターゲットとすることにより、骨量を増加させることが可能であり、将来的には骨粗鬆症治療薬開発への貢献も期待できる。

2. 研究の目的

骨芽細胞は骨細胞へ最終分化する過程でアポトーシスにより数が減少すると考えられている。これまでにアポトーシス関連因子が骨芽細胞の生存調節だけでなく、骨芽細胞分化に関連するファクターにも影響を及ぼし、骨形成、骨量などに変化をもたらすということが報告されている。本研究ではアポトーシス抑制遺伝子である Bcl-xL に着目し、骨芽細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスを用いて、Bcl-xL の骨形成・維持における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

骨芽細胞における Bcl-xL の働きを調べる

ため骨芽細胞特異的 Bcl-xL コンディショナルノックアウトマウス(以後 cK0)を作製することとした。そこで Bcl-xL flox/flox マウスに対して、骨芽細胞特異的に Bcl-xL を欠失させるために、2.3kb Type collagen(以後 Col1a1)プロモータ-下流に Cre recombinase を組み込んだ 2.3kb Col1a1 promoter Cre トランスジェニックマウス(以後 Cre tg マウス)を交配させた。

大腿骨あるいは脛骨を用いて骨芽細胞の増殖・分化、アポトーシス、骨形成・骨吸収、破骨細胞数などの表現型解析を行った。

さらに Bcl-xL cK0 の新生仔頭蓋冠から初代骨芽細胞を分離、培養を行い骨増殖・分化を検討するとともに、初代骨芽細胞と野生型マウスの骨髄細胞との共培養による破骨細胞形成を検討した。

4. 研究成果

<平成 25 年度>

in vivo 実験を行った。10 週齢において Bcl-xL cK0 は野生型マウスに比べてマイクロ CT および骨形態計測の解析から骨量の減少が認められた。骨芽細胞の増殖およびアポトーシスに関して 2 週齢マウスを用いて BrdU 染色、TUNEL 染色を行った。BrdU 染色では有意差は認められなかったが、TUNEL 染色では有意差が認められ、このことから Bcl-xL が欠失することにより増殖には影響を与えず、アポトーシスが亢進していることが示唆された。しかしながら骨形態計測では骨芽細胞数に有意差はみられなかった。

骨芽細胞分化については、6、10 週齢マウスの長管骨から total RNA を抽出し、骨芽細胞分化マーカーである Runx2、Osterix、Col1a1、オステオポンチン、オステオカルシンの発現を real-time RNA で解析を行った。

Bcl-xL cKO は野生型マウスに比べていずれの遺伝子においてもわずかに発現が亢進している傾向が見られた。

また、破骨細胞に影響を与える RankL、OPG の発現を real-time PCR で解析したところ、RankL/OPG 比が Bcl-xL cKO は野生型マウスに比べて有意な上昇がみられた。このことは破骨細胞分化亢進に関連しており、骨形態計測においても骨吸収面が有意に上昇していたことと一致する。

以上のことから骨芽細胞数には影響を与えず、骨芽細胞分化に影響を与えている可能性があること、また破骨細胞への影響により骨量の減少が引き起こされるものと推察される。

<平成 26 年度>

in vitro での実験を行った。新生仔頭蓋冠由来骨芽細胞を用いて実験を行った。初代骨芽細胞において Bcl-xL cKO の Bcl-xL の発現は 2～3 割程度であった。この骨芽細胞を使用して、骨分化誘導培地を用いて分化実験を行った。骨芽細胞分化マーカーである Runx2、Osterix、Col1a1、オステオポンチン、オステオカルシンの発現を real-time RNA で解析を行った。その結果、in vivo での結果と同様にいずれの遺伝子においても上昇傾向がみられた。

また ALP stain、Kossa stain においても、Bcl-xL cKO において濃染を認めた。

初代骨芽細胞と野生型マウスの骨髄細胞との共培養による破骨細胞形成を検討した。共培養後 7 日目で TRAP stain を行ったところ、Bcl-xL cKO では破骨細胞形成が促進しており、また dentin slice による吸収能の比較を行ったところ、吸収面積が Bcl-xL cKO において有意に上昇していた。

現在、さらに in vivo においても骨芽細胞

の mRNA の発現、また破骨細胞が形成促進を引き起こすメカニズムに関して検討を引き続き行っていくこととしている。

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 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:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]
ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河井 洋祐 (KAWAI , Yosuke)

長崎大学・病院 (医学系) ・助教

研究者番号 : 50423629

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし