

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10482

研究課題名(和文) 増殖および抗アポトーシス因子の骨芽細胞特異的過剰発現マウスを用いる骨量増加の試み

研究課題名(英文) A study of increase bone volume using transgenic mice with osteoblasts that express proliferation and anti-apoptotic factors

研究代表者

森石 武史 (MORIISHI, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：20380983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞は、その分化過程で60-80%の細胞がアポトーシスで死ぬと考えられている。アポトーシス抑制遺伝子BclXLはBaxに拮抗し、ミトコンドリアからのシトクロームCの放出を妨げアポトーシスを抑制する。本研究では骨量維持におけるBclXLの役割を解明するため、BclXLを骨芽細胞特異的に過剰発現させたマウス(tgマウス)を作成した。tgマウスは骨芽細胞におけるBrdUの取り込みの亢進とアポトーシスの抑制が認められ、正常な骨構造の海綿骨・皮質骨が増加し、骨力学的強度も上昇していた。そして、生涯を通して高骨量が維持されていた。したがって、BclXLは骨粗鬆症治療のターゲット分子となり得る。

研究成果の概要(英文)：Osteoblast apoptosis plays an important role in bone development and maintenance. It is estimated that 60% to 80% of osteoblasts that originally assembled at the resorption pit die by apoptosis. We generated BCLXL (BCL2L1) transgenic mice using the 2.3 kb Col1a1 promoter to investigate BCLXL functions in bone development and maintenance. BrdU-positive osteoblastic cell numbers were increased, TUNEL-positive osteoblastic cell numbers were reduced in BCLXL transgenic mice. The three-point bending test indicated that femurs were stronger in BCLXL transgenic mice than in wild-type mice. Increased trabecular and cortical bone volumes were maintained during aging in male and female mice. These results indicate that BCLXL overexpression in osteoblasts increased the trabecular and cortical bone volumes with normal structures and maintained them majorly by preventing osteoblast apoptosis, implicating BCLXL as a therapeutic target of osteoporosis.

研究分野：骨・軟骨代謝学

キーワード：アポトーシス 骨芽細胞 BCLXL 過剰発現マウス 骨形成 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、加齢や閉経・生活習慣病・ステロイドの長期服用等によって引き起こされ、骨量が減少し骨が脆くなる病気である。骨粗鬆症はそれ自体が生命を脅かす病気ではないが、骨粗鬆症による骨折から要介護状態となることが多く、QOL(生活の質)を著しく下げってしまうことから、より効果的な治療薬の開発が近年の高齢化社会において急務である。骨粗鬆症の治療では、骨吸収を抑制する薬としてビスフォスフォネート製剤や RANKL 抗体が用いられている。一方、骨形成促進剤として副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone: PTH)製剤(テリパラチド)が、連日皮下投与あるいは週1回皮下投与されている。PTH製剤は、骨密度を有意に増加させるとともに骨微細構造を改善することによって、骨折のリスクを減少させる。PTH 間歇投与による骨量増加の機序は、骨芽細胞数の増加と骨細胞を介したスクレロステチン発現抑制による骨芽細胞の機能促進と考えられている。骨芽細胞数の増加について、前骨芽細胞数が増加するという報告(Luiz de Freitas PH, et al. J Bone Miner Res. 24: 1586-1597 (2009))や、Bcl-2 を介した骨芽細胞のアポトーシス抑制といった報告(Nagase Y, et al. Ann NY Acad Sci. 1192: 330-337 (2010), Yamashita J, et al. J Bone Miner Res. 23: 621-632 (2008))があり、増殖とアポトーシスの関与が示唆されている。

2. 研究の目的

我々は、骨芽細胞数を増やし骨量を増加させる目的で、骨芽細胞特異的 2.3kb Col1a1 プロモーターを用い、アポトーシス抑制遺伝子である BclXL、細胞周期の G1 期から S 期への進行に重要な役割を担っている Cyclin D1、Cyclin D1 と複合体を形成することによって活性化する CDK6(cyclin-dependent kinase 6)を発現させたトランスジェニック(tg)マウスをそれぞれ作製し解析した。

3. 研究の方法

(1) 2.3kb Col1a1 プロモーターを用い、骨芽細胞特異的に CDK6、Cyclin D1、BclXL それぞれを発現させた tg マウスおよび CDK6/Cyclin D1 ダブル tg マウス、CDK6/Cyclin D1/BclXL トリプル tg マウスについて、2 週齢マウス大腿骨で BrdU の取り込みとアポトーシスの検討を行った。

(2) 各 tg マウスについてマイクロフォーカスおよびマイクロ CT を用いて、10 週齢時の大腿骨遠心部海綿骨の解析を行った。

(3) (1)および(2)の結果から(結果は 4. 研究成果に示す)骨芽細胞特異的 BclXLtg マウスについて、以下の解析を行った。

【導入遺伝子発現レベル解析】

2, 6, 10 週齢、7 ヶ月齢、1 年齢の野生型マウスおよび tg マウスの後肢長管骨骨芽細胞を歯間ブラシで回収し、RNA を抽出した。得られた total RNA より Realtime-RT PCR 法で導入遺伝子の発現レベルを検討した。

【海綿骨および骨幹皮質骨のマイクロ CT 解析および骨組織形態計測】6, 10 週、7 ヶ月、1 年齢の野生型オスマウスおよび tg オスマウスにカルセインを 2 回投与後、大腿骨を摘出し、70%エタノールで固定した。固定後、摘出大腿骨のマイクロ CT 撮影を行い、海綿骨および骨幹皮質骨の 3D 骨梁解析や骨塩量解析を行った。その後、大腿骨遠心部の非脱灰樹脂切片を作製し海綿骨の骨組織形態計測を行い、骨幹部は樹脂包埋後、研磨標本作製し、皮質骨の骨組織形態計測を行った。10 週齢および 6 ヶ月齢の野生型メスマウスおよび tg メスマウスについても同様の解析を行った。

【組織解析】2, 6, 10 週齢、6 ヶ月齢、1 年齢のマウスを、4% PFA で灌流固定し、通常に従い後肢長管骨の脱灰パラフィン切片を作製した。2, 6 週齢マウスは BrdU を腹腔内投与しておいた。これらのパラフィン切片を用い HE 染色、BrdU 染色、TUNEL 染色、TRAP 染色、免疫染色、鍍銀染色、偏光顕微鏡によるコラーゲン配向性解析を行った。また、10 週齢マウスを 1/2 カルノフスキー固定液で灌流固定を行い、後肢長管骨の脱灰エポンプロックより切片を作製。骨芽細胞および骨細胞の微細構造を透過電子顕微鏡で観察した。さらに 1/2 カルノフスキー固定の長管骨を Hcl-コラーゲナーゼで処理することによって皮質骨の骨細胞と骨細胞突起を露出させ、SEM で骨細胞ネットワークを観察した。

【血清中の骨形成・骨吸収マーカーの解析】2, 6, 10 週齢、6 ヶ月齢、1 年齢のマウスを灌流固定する前に、血液を回収し、血清を分離した。血清中の骨形成マーカーとしてオステオカルシン(OC)、骨吸収マーカーとして酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ-5b(TRACP-5b)を測定した。

【骨強度試験】14 週齢の野生型オスマウス、tg オスマウスの大腿骨について、3 点曲げ試験機を用い力学的解析を行った。

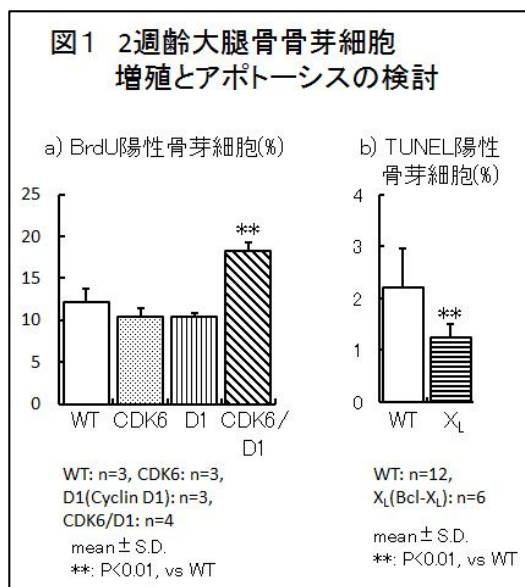
【生体組織における遺伝子発現解析】新生児頭蓋冠および 2 週齢大腿骨より RNA を抽出した。得られた total RNA より Realtime-RT PCR 法でアポトーシス関連遺伝子 *TP53*, *Bim*, *Bax*, *Noxa*, *Bik*, *Bad*, *Fas*, *Bnip3*, *Tnfsf10* 骨芽細胞分化関連遺伝子 *Col1a1*, *Spp1*, *Bglap2*, *Runx2*, *Sp7* の発現を検討した。

【頭蓋冠由来初代骨芽細胞の培養】0.1% コラーゲナーゼ・0.2% ディスパーゼ混合溶液を用

い、野生型マウスおよび tg マウス新生仔の頭蓋冠より初代骨芽細胞を採取し、48 well プレートに播種密度を変えたものを培養し（低密度培養 ($2.5 \times 10^4/cm^2$) および高密度培養 ($1 \times 10^5/cm^2$)）分化誘導を行った。分化誘導後3日後、7日後に固定しALP染色、Kossa染色などを行った。またRNAを抽出し、得られた total RNA より Realtime-RT PCR 法で *BclXL*, *Alpl*, *Runx2*, *Sp7*, *Col1a1*, *Spp1*, *Bglap2* の発現を解析した。さらに野生型マウスおよび tg マウス頭蓋冠由来初代骨芽細胞をチャンバースライドで培養後、TUNEL 染色を行いアポトーシスの頻度を算出した。

4. 研究成果

(1)骨芽細胞特異的 2.3kb *Col1a1* プロモーターを用い、アポトーシス抑制遺伝子である *BclXL*、細胞周期の G1 期から S 期への進行に重要な役割を担っている *Cyclin D1*、*Cyclin D1* と複合体を形成することによって活性化する *CDK6* (cyclin-dependent kinase 6) を発現させたトランスジェニック (tg) マウスを作成し、2 週齢マウス大腿骨で BrdU の取り込みとアポトーシスの検討を行ったところ、*CDK6*、*Cyclin D1* の単独 tg マウスは野生型と比較して骨芽細胞の BrdU の取り込みは変わらなかったが、*CDK6*、*Cyclin D1* のダブル tg マウスでは有意に BrdU の取り込みが増加していた (図 1 a)。また、*Bcl-XL* tg マウスでは骨芽細胞のアポトーシスの割合が有意に低下しており、アポトーシスが抑制されていた (図 1 b)。



(2) 10 週齢大腿骨を X 線撮影すると、*BclXL* tg マウスでは野生型と比較し海綿骨の増加が認められたが、意外にも *CDK6/Cyclin D1* ダブル tg マウスは海綿骨の増加を認めず、むしろ、X 線透過度が亢進していた。そして、*CDK6/Cyclin D1/BclXL* のトリプル tg マウスでは著明に海綿骨が増加し、野生型では海綿骨が認められない骨幹部領域まで海綿骨で

占められていた (図 2)。マイクロ CT で BV/TV (骨量)、Tb.Th (骨梁厚)、Tb.N (骨梁数) を解析したところ、*BclXL* tg マウスおよび *CDK6/Cyclin D1/BclXL* のトリプル tg マウスは野生型と比較し全ての項目で有意に増加していた。また、*BclXL* tg マウスと *CDK6/Cyclin D1/BclXL* のトリプル tg マウスを比較すると、全ての項目においてトリプル tg マウスが有意に増加していた。そして、*CDK6/Cyclin D1* ダブル tg マウスは野生型と比較し、骨量が低い傾向にあり、Tb.N (骨梁数) は有意に少なかった。このことから、骨芽細胞特異的に増殖を亢進させても、骨量は増加せず、アポトーシス抑制が骨量増加を図る為に重要であることが示唆された。

図 2 10週齢大腿骨 -マイクロフォーカス像-

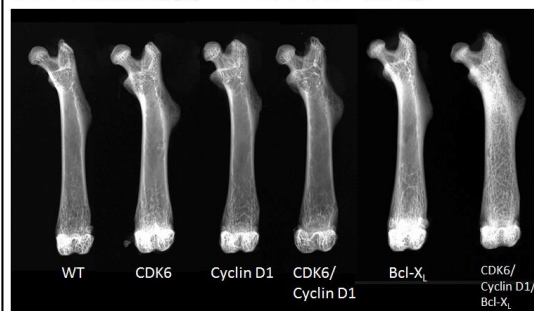
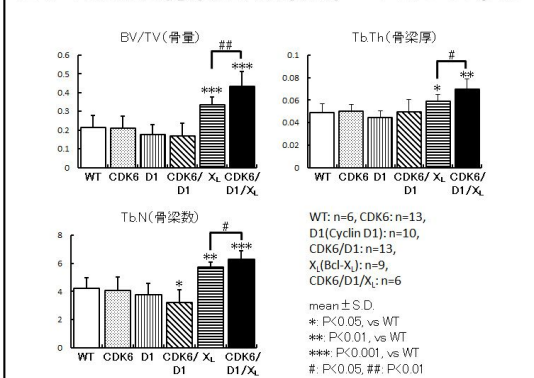


図 3 10週齢大腿骨遠心部海綿骨 -マイクロCT解析-

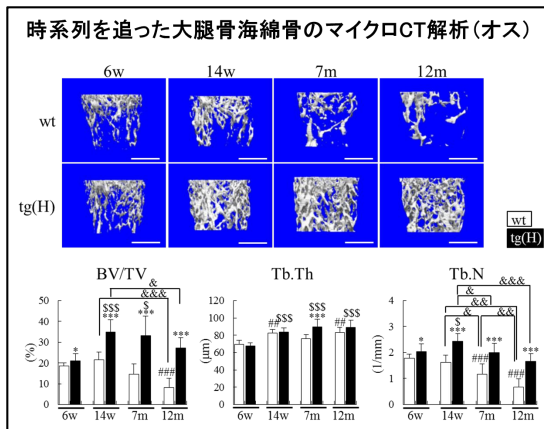


(3) (1) および (2) の結果から、骨芽細胞特異的に増殖を亢進させても、骨量は増加せず、アポトーシス抑制が骨量増加を図る為に重要であることが示唆されたため、骨芽細胞特異的 *BclXL* tg マウスについて詳細な解析を行った。

2, 6, 10 週齢、7 ヶ月齢、1 年齢の野生型マウスで導入遺伝子の発現レベルを解析した結果、*BclXL* tg マウスは 7 ヶ月齢まで野生型マウスと比較し有意に *BclXL* の発現が高く、1 年齢では野生型マウスと同レベルの発現になっていた。

時系列を追った野生型オスマウスおよび *BclXL* tg オスマウスの海綿骨および骨幹皮質骨のマイクロ CT 解析の結果、*BclXL* tg オスマウスの海綿骨骨量は 6, 10 週齢、7 ヶ月齢で有意に増加しており、導入遺伝子の発現が

低下した 1 年齢でも骨量が維持され、Tb.Th (骨梁厚) Tb.N (骨梁数) も有意に増加していた。



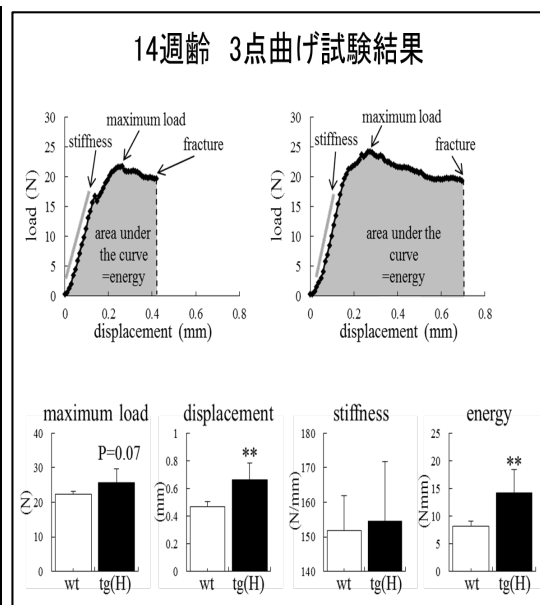
骨幹皮質骨におけるマイクロ CT 解析でも、Bcl1Xl tg オスマウスは 14 週齢より皮質骨厚、外周長、内周長が野生型オスマウスに対し有意に増加していた。10 週齢および 6 ヶ月齢のメスマウスの解析においても、Bcl1Xl tg メスマウスは野生型メスマウスと比較し、海綿骨骨量、皮質骨厚の有意な増加を認めた。海綿骨および皮質骨の骨組織形態計測により、Bcl1Xl tg マウスは石灰化面や骨形成速度が上昇し骨形成の亢進が認められた。

2 週齢および 6 週齢の Bcl1Xl tg マウスの骨組織で BrdU 染色と TUNEL 染色を行うと、骨芽細胞の BrdU 取り込みの亢進と、アポトーシスの抑制が認められた。10 週齢の骨組織で HE 染色、BrdU 染色、TUNEL 染色、TRAP 染色、鍍銀染色、偏光顕微鏡によるコラーゲン配向性解析を行っても、Bcl1Xl tg マウスは野生型マウスと同様の形態を示し、違いが認められなかった。

Bcl1Xl tg マウスは血清オステオカルシンの濃度も上昇し、骨組織形態計測の結果と合わせても、骨形成が亢進していることが示唆された。

14 週齢の骨強度試験の結果、Bcl1Xl tg マウスは野生型マウスと比較して、最大荷重 [N] 破断変位 [mm] Stiffness [N/mm]、エネルギー [N・mm] が有意に増加し、骨力学強度が亢進していた。(次段落)

Bcl1Xl tg マウスは、新生児頭蓋冠サンプルで p53 およびそのアポトーシス関連ターゲット遺伝子の発現が低下し、野生型マウスと比較し骨芽細胞のアポトーシスが抑制されていることが示され、2 週齢の大腿骨において骨芽細胞分化関連遺伝子の発現レベルは野生型マウスと変わらなかった。



新生児頭蓋冠由来初代骨芽細胞で播種密度を変えて、骨芽細胞のアポトーシスと分化の検討を行った結果、Bcl1Xl tg マウス由来の骨芽細胞では、アポトーシス抑制による骨芽細胞密度増加により骨芽細胞分化が促進されており BCLXL は骨芽細胞のアポトーシス抑制により、骨形成を促進していると考えられた。

以上の結果より、骨芽細胞特異的 BCLXL 過剰発現マウスでは、骨芽細胞の形態や機能に影響することなく、アポトーシス抑制により正常な骨構造の海綿骨・皮質骨が増加し、かつ生涯にわたって高骨量が維持されていた。したがって、BCLXL は骨粗鬆症治療のターゲット分子となり得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Yang M, Komori T, Moriishi T, Mizoguchi T (他 10 名, 小守 7 番目, 森石 8 番目): Osteogenic factor Runx2 marks a subset of leptin receptor-positive cells that sit atop the bone marrow stromal cell hierarchy. Sci Rep. 10;7(1):4928, 2017. (査読有)

2. Moriishi T, Fukuyama R, Miyazaki T, Furuichi T, Ito M, Komori T: Overexpression of BCLXL in osteoblasts inhibits osteoblast apoptosis and increases bone volume and strength. J Bone Miner Res, 31 (7): 1366-1380, 2016. (査読有)

3. 森石武史, 小守壽文: 動物モデルからみたステロイド骨粗鬆症のメカニズム -骨細胞のアポトーシスと骨芽細胞の分化抑制, リ

ウマチ科, 55(2): 240-244, 2016 (査読無)

4. Miyazaki T, Baba T.T, Mori M, Moriishi T, Komori T: Microtubule-associated protein tau (Mapt) is expressed in terminally differentiated odontoblasts and severely down-regulated in morphologically disturbed odontoblasts of Runx2 transgenic mice. Cell Tissue Res. 361 (2): 457-466, 2015. (査読有)

5. Qin X, Jiang Q, Matsuo Y, Kawane T, Komori H, Moriishi T, Komori T (他 5 名, 森石 6 番目, 小守 12 番目): Cbfb regulates bone development by stabilizing Runx family proteins. J Bone Miner Res, 30 (4): 706-714, 2015. (査読有)

[学会発表](計 7 件)

1. Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Fukuyama R, Komori H, Moriishi T, Ito K, Komori T: Elucidation of the functions of Runx2 in differentiated osteoblasts. 21st international RUNX conference, university of pennsylvania, USA, Nov, 2017.

2. 姜晴, 小守壽文: Funcions of Runx family transcription factors and Cbfb in skeletal development, 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 長崎, 3 月, 2017.

3. 社領 美紀, 佐藤 淳, 宇佐美 悠, 廣瀬 勝俊, 大家 香織, 小守 壽文, 豊澤 悟: ゼレドロン酸投与が骨細胞マーカー Dmp1 に及ぼす影響について, 第 59 回歯科基礎医学会学術集会, 長野, 9 月, 2017.

4. 森田純晴, 松永智, 森石武史, 阿部伸一, 山口朗: アフリカツメガエル長管骨の造血は骨芽細胞性ニッチ優位に維持されている。第 37 回日本骨形態計測学会, 大阪, 6 月, 2017.

5. Qin X, Jiang Q, Matsuo Y, Kawane T, Komori H, Moriishi T, Taniuchi I, Ito K, Kawai Y, Rokutanda S, Izumi S, Komori T: Cbfb plays important roles in bone development through the stabilization of Run family proteins. The RUNX Transcription Factors in Development and Disease, Rehovot, Israel, Oct, 2015

6. 宮崎敏博、馬場友巳、小守壽文: タウ蛋白質は最終分化した象牙芽細胞に特異的に発現する, 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 2015 年 9 月

7. 川根徹也、森石武史、小守寿人、小守壽文: 軟骨細胞における Glant3 の過剰発現は

ムチン型 0-グリカンを増加させグリコサミノグリカンを減少させることによって dwarfism を起こす, 第 33 回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2015 年 7 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森石 武史 (MORIISHI, Takeshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)
・助教
研究者番号: 20380983

(2) 研究分担者

福田 理香 (FUKUDA, Rika)
活水女子大学・健康生活学部・教授
研究者番号: 30312838

(3) 連携研究者

小守 壽文 (KOMORI, Toshihisa)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)
・教授
研究者番号: 00252677

宮崎 敏博 (MIYAZAKI, Toshihiro)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)
・准教授
研究者番号: 10174161