

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591965

研究課題名（和文） ATP・活性酸素産生系による骨関節破壊制御に関する分子疫学的研究

研究課題名（英文） Molecular epidemiological study of the regulation of bone and joint destruction through intracellular ATP and ROS levels

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

破骨細胞骨吸収におけるミトコンドリアの役割を検討すべく、ミトコンドリアで重要な役割をはたしているATP産生を維持するTfam（mitochondrial transcription factor A）に注目し、Tfam破骨細胞特異的ノックアウト(cKO)マウスを作製し、その骨破壊メカニズムを解析した。Tfam cKO破骨細胞の生存期間が短くなるにもかかわらず、骨吸収機能は亢進していた。Tfam cKO破骨細胞では、細胞内ATP量が低下していたため、破骨細胞アポトーシスが亢進していると考えられた。一方、細胞内ATPから細胞外へリリースされたATPは、逆に破骨細胞骨吸収に阻害的に働いていることを明らかにした。細胞内ATP濃度と細胞外ATP濃度のバランスが、破骨細胞の延命・骨吸収機能に影響を与えていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Osteoclasts have two conflicting tendencies: lower capacity to survive and higher capacity to execute energy-consuming activities like bone resorption. Here, we report that mature mitochondria-rich osteoclasts have lower intracellular ATP compared to their precursors. Severe ATP depletion caused by disrupting the gene of mitochondrial transcription factor A (Tfam) leads to increased bone-resorbing activity despite accelerated apoptosis. The release of ATP from intracellular stores negatively regulates bone-resorbing activity through an autocrine/paracrine feedback loop by altering cytoskeletal structures. Thus, our study provides evidence for a mechanism by reciprocal changes in intracellular and extracellular ATP, which regulate the negative correlation between osteoclast survival and bone resorption.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨関節破壊、破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は免疫異常を基礎とす

る全身性の炎症性疾患であるが、その標的臓器は主として関節であり、慢性に経過した場

合、最終的には関節の屈曲、変形、高度の運動障害などが見られるようになる。非ステロイド性抗炎症薬、ステロイド剤および疾患修飾性抗リウマチ薬の進歩により、疼痛や炎症に関してはある程度までコントロールが可能になってきたが、現在でも RA 治療における最大の課題が、骨軟骨破壊からくる疼痛と関節機能障害のコントロールであることに変わりはない。RA における骨破壊の進展においては、骨吸収を直接担う唯一の細胞と考えられている破骨細胞が重要な役割を果たしている (Takayanagi et al. *J Clin Invest.* 104:137-46, 1999; *Arthritis Rheum* 43:259-269, 2000)。

これまでに我々は、破骨細胞内のシグナル伝達経路の機能解析を行ってきた。1)  $\alpha_v\beta_3$  インテグリンの下流で c-Src が細胞骨格の制御を通じて骨吸収を制御していること (Miyazaki et al., *J Biol Chem.*;279:17660-6, 2000; Miyazaki et al., *J Bone Miner Res.* 15:41-51, 2000; Miyazaki et al., *Mod Rheumatol* 16: 68-74, 2006)、2) RANKL, MCSF, IL-1 刺激により ERK が活性化され、Bcl-2 family member である Bim の degradation を介して破骨細胞の survival を延長していること (Miyazaki et al., *J. Cell Biol.* 148:333-42, 2000; Akiyama et al., *EMBO J.* 22:6653-64, 2003)、3) 破骨細胞内にミトコンドリアが多量に存在し、ミトコンドリア内に存在する c-Src が ATP エネルギー産生に関与している cytochrome c oxidase の活性を制御していること (Miyazaki et al., *J Cell Biol.* 160:709-18, 2003)などを明らかにしてきた。ミトコンドリアは、電子伝達系による酸化リン酸化による ATP エネルギー生産とアポトーシス責任器官という2つの異なる役割が指摘されている。そこで我々は、破骨細胞による骨吸収・骨破壊を制御する鍵がミトコンドリアにあるのではないかと注目した。

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%を誤ってスーパーオキシドという物質にしてしまう。これらは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ので、活性酸素 (ROS) と呼ばれている。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、ミトコンドリア内に存在するミトコンドリア DNA(mtDNA)に障害をもたらす、さらにその結果として、さらなる活性酸素を産生するという悪循環になる。したがって、mtDNA を質的・量的に保つことが、ミトコンドリア由来の酸化ストレスが関与しているとされる疾患の新たな治療ターゲットになりえる。ATP エネルギー産生において主要

な役割を果たすミトコンドリア転写因子 A (Tfam) は核でコードされるタンパクであるが、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。

## 2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリアで重要な役割をはたしている遺伝子 (ATP 産生を維持する Tfam) に注目する。この遺伝子の破骨細胞特異的ノックアウトマウスを作製し、その骨破壊メカニズムを解析することにより、RA 骨破壊制御への新たな筋道を見つけることを目的とする。

## 3. 研究の方法

Tfam 遺伝子は ATP エネルギー産生において重要な役割を果たし、単純なノックアウトでは、胎生致死である。Tfam は、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の転写因子として、Fisher らによって最初にクローニングされたタンパクで、結合することにより mtDNA を維持・安定化させる機能をもつ。Tfam 遺伝子の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法を用いる。破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 酵素を破骨細胞特異的に発現させる方法としては、破骨細胞特異的のカテプシン K 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 (Nakamura et al. *Cell* 2007)。このカテプシン K-Cre (CatK-Cre) マウスと Tfam flox マウスを用いて、Tfam flox/flox CatK-Cre +/- マウス (コンディショナルノックアウトマウス: cKO マウス) を作製する。さらには、大腿骨や脛骨を取り出して、X 線撮影を行う。骨密度の測定は DEXA (dual-energy x-ray absorptiometry) 法によって行う。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。類骨の厚さ、骨芽細胞面%、吸収面%、破骨細胞数、破骨細胞面%などをコントロールと比較する。

#### 4. 研究成果

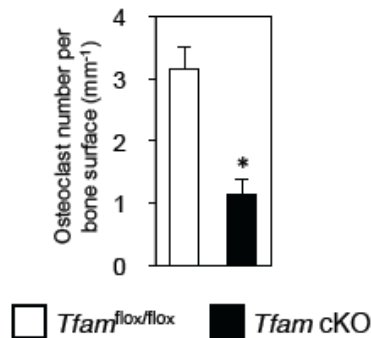
##### (1) 破骨細胞特異的Tfamノックアウトマウスの作製

ATPエネルギー産生において重要な役割を果たしているTfamを破骨細胞特異的にノックアウトしたマウス (Tfam<sup>flox/flox</sup> CatK-Cre<sup>+</sup> マウス: Tfam cKOマウス) の作製に成功した。Tfam cKOマウスは、コントロールであるTfam<sup>flox/flox</sup>マウスと比較して有意に体のサイズが小さかった (17.72 ± 0.99 versus 22.57 ± 1.91 g, p < 0.01)。さらに、大腿骨長も、Tfam cKOマウスはTfam<sup>flox/flox</sup>マウスと比較して有意に短かった (13.29 ± 0.09 versus 15.31 ± 0.12 mm, p < 0.01)。しかしながら、レントゲン検査およびマイクロCT検査では、骨量に有意な差はでなかった。

##### (2) 破骨細胞特異的Tfamノックアウトマウスの骨組織の解析

レントゲン検査およびマイクロCT検査では、骨量に有意な差はでなかったが、マウスの脛骨の組織標本を用いて、破骨細胞が赤く染まるTRAP染色を行うと、Tfam cKOでは破骨細胞数に劇的な減少がみられた (図1)。

図1

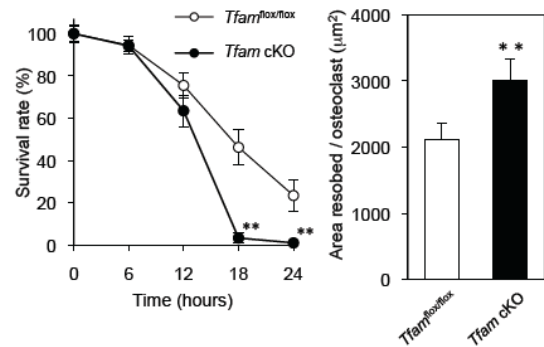


興味深いことに、骨形態計測においていくつかの骨形成パラメーターが低下しており、これは破骨細胞-骨芽細胞カップリングメカニズムにより生じている可能性があり、そのためTfam cKOマウスにおいて成長障害が認められたものと考えられる。

##### (3) Tfam cKO 破骨細胞の機能解析

Tfam 欠損による破骨細胞の延命と骨吸収機能を解析するために、Tfam cKOマウスからTfam cKO破骨細胞を作製し、その解析に用いた。Tfam cKO破骨細胞では自発的アポトーシスが亢進しているにもかかわらず、骨吸収機能は上昇していた (図2)。Tfam 発現低下により、Tfam cKO破骨細胞では細胞内ATP濃度が低下しているにもかかわらず、骨吸収機能が亢進しているのは、何らかの複雑なメカニズムが関与しているのではないかと考えられた。

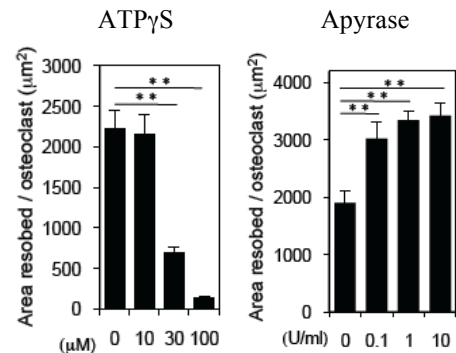
図2



##### (4) 細胞外ATPは骨吸収機能に阻害的に働く

細胞内ATPが上昇しているBcl-xL過剰発現破骨細胞では細胞外ATP濃度が上昇しており、逆に細胞内ATPが低下しているTfam cKO破骨細胞では細胞外ATP濃度が低下していた。細胞内ATPが細胞外へリリースされるメカニズムには不明な点が多いが、細胞内ATP濃度が細胞外へのATPリリースに影響を及ぼす可能性があると考えられた。そこで、細胞外ATPが破骨細胞機能に与える影響を解析した。加水分解抵抗性のATP (ATP<sub>γ</sub>S) を添加すると、破骨細胞の骨吸収機能は有意に阻害された。逆に、細胞外ATPを分解するApyraseを添加すると破骨細胞の骨吸収機能は有意に上昇した (図3)。

図3



これらの結果から、細胞内ATPから細胞外へリリースされたATPは、逆に破骨細胞骨吸収に阻害的に働いていることが示唆され、細胞内ATP濃度と細胞外ATP濃度のバランスが、破骨細胞の延命・骨吸収機能に影響を与えていると考えられた。

#### 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9件)

1. Iwasawa M, Miyazaki T, Nagase Y, Akiyama T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Yasui T, Matsumoto T, Nakamura T, Kato S,

- Hennighausen L, Nakamura K, **Tanaka S**: The antiapoptotic protein Bcl-xL negatively regulates the bone-resorbing activity of osteoclasts in mice. *J Clin Invest*. 査読有 2009 Oct;119(10):3149-59. DOI: 10.1172/JCI39819.
2. Yuho Kadono, **Sakae Tanaka**, Jinju Nishino, Keita Nishimura, Ichiro Nakamura, **Tsuyoshi Miyazaki**, Hiroshi Takayanagi, Kozo Nakamura: Rheumatoid Arthritis associated with osteopetrosis. *Mod Rheumatol* 査読有 2009;19(6): 687-90. Epub 2009 Aug 6. DOI: 10.1007/s10165-009-0208-7
  3. Shigemoto K, Kubo S, Mori S, Yamada S, **Miyazaki T**, Akiyoshi T, Maruyama N: The Immunopathogenesis of Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis induced by Autoantibodies against Muscle-specific kinase. *Myasthenia Gravis* 査読有 2009, 305-324 (Linus Publications, Inc) DOI: 10.1196/annals.1405.002
  4. Toru Doi, **Tsuyoshi Miyazaki**, Jinju Nishino, **Sakae Tanaka**, Toshihiro Matsui, Akiko Komiya, Seizo Yamamoto, Fumiaki Tokimura, Toshihito Mori, Keita Nishimura, Narutaka Katoh, Jun Hasegawa, Yasunori Omata, Takashi Matsushita, Shigetoh Tohma: Neutrophil CD64 expression as a diagnostic marker for local infection and crystal-induced arthritis *Mod Rheumatol* 査読有 2010 Dec;20(6):573-9. DOI: 10.1007/s10165-010-0322-6
  5. **Tsuyoshi Miyazaki** and **Sakae Tanaka**: Regulation of apoptosis and activity of the osteoclast *Immun., Endoc. & Metab. Agents in Med. Chem.* 査読有 2010 10(2):100-107 DOI:http://dx.doi.org/10.2174/187152210793176974
  6. Shigemoto K, Kubo S, Mori S, Yamada S, Akiyoshi T and **Miyazaki T**: Muscle weakness and neuromuscular junctions in aging and disease. *Geriatr Gerontol Int* 査読無 2010; 10: 137-147. DOI: 10.1111/j.1447-0594.2010.00608.x
  7. Hidetoshi Nojiri, Yoshitomo Saita, Daichi Morikawa, Keiji Kobayashi, Chizuru Tsuda, **Tsuyoshi Miyazaki**, Mitsuru Saito, Keishi Marumo, Ikuho Yonezawa, Kazuo Kaneko, Takuji Shirasawa, and Takahiko Shimizu: Cytoplasmic Superoxide Causes Bone Fragility Owing to Low-Turnover Osteoporosis and Impaired Collagen Cross-Linking *J Bone Miner Res* 査読有 2011 Nov; 26(11):2682-94. DOI: 10.1002/jbmr.489.
  8. Mori S, Kishi M, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, **Miyazaki T**, Konishi T, Maruyama N, Shigemoto K. 3,4-Diaminopyridine improves neuromuscular transmission in a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 査読有 2012 Apr;245(1-2): 75-8. Epub 2012 Mar 11. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2012.02.010
  9. Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, **Miyazaki T**, Hotta H, Desaki J, Kishi M, Konishi T, Nishino Y, Miyazawa A, Maruyama N, Shigemoto K. Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis. *Am J Pathol*. 査読有 2012 Feb;180(2):798-810. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.10.031. ISSN: 0002-9440.
- [学会発表] (計 16 件)
1. **Tsuyoshi Miyazaki**, Mitsuyasu Iwasawa, Yuichi Nagase, Yuho Kadono, Lothar Henninghausen, Takashi Nakamura, Shigeaki Kato, Kozo Nakamura, **Sakae Tanaka**: Anti-apoptotic Molecule Bcl-xL regulates osteoclastic bone resorption via extracellular matrix component expression. The 26<sup>th</sup> NAITO Conference on Osteobiology Awaji Yumebutai, Hyogo, Japan, 2009.11.4-7
  2. 西野仁寿、松井利浩、小宮明子、**田中榮**、門野夕峰、中村正樹、**宮崎剛**、當間重人：骨関節感染症における好中球上 CD64 分子発現の発現計測の有用性—第二報告— 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会。東京、2009.4.23-25
  3. 木村直樹、**宮崎剛**、杉原毅彦：関節リウマチにおける結晶アルギニンデイミナーゼ 4 (PAD4) 及び抗 PAD4 抗体の検討 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会。東京、2009.4.23-25
  4. 滝田泰人、西野仁寿、濱路博、**宮崎剛**、松井利浩、小宮明子、**田中榮**、時村文秋、當間重人：結晶性関節炎と感染性関節炎の鑑別における好中球 CD64 値の有用性 第 82 回日本整形外科学会学術総会。博多、2009.5.14-17
  5. **宮本恵成**、濱路博、**宮崎剛**、穴水依人、時村文秋、石橋英明、山本精三：高齢者 TKA における mini-mental state examination を用いた術前認知機能評価の有用性 第 82 回日本整形外科学会学術総会。博多、2009.5.14-17
  6. 森秀一、久保幸穂、秋吉沢諭、山田茂、**宮崎剛**、重本和宏：MuSK は神経筋シナプスの維持に重要である—研究モデル動物の確立— 日本基礎老化学会第 32 回大会。横浜、2009.6.18-20
  7. **宮崎剛**：Bcl-xL regulates osteoclastic bone resorption via extracellular matrix component protein. 第 4 回 Bone Research Seminar。東京、

2010.2.19-20

8. Yoshitomo Saita, Hidetoshi Nojiri, Chizuru Tsuda, **Tsuyoshi Miyazaki**, Daichi Morikawa, Kazuo Kaneko, Takahiko Shimizu : Mouse lacking in intracellular superoxide dismutase increased reactive oxygen species in osteoblasts and suppressed osteoblastic ability leading to osteoporotic phenotypes in bone. IOF World Congress on Osteoporosis & 10th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis Italy, 2010.5.5-8
9. Yoshitomo Saita, Hidetoshi Nojiri, Chizuru Tsuda, **Tsuyoshi Miyazaki**, Daichi Morikawa, Kazuo Kaneko, Takahiko Shimizu: Intracellular superoxide dismutase deficiency decreased bone mass *in vivo* by impairment of cell viability and redox balance in osteoblasts. Thirty-second Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Toronto, Canada 2010.10.15-19
10. 森秀一、久保幸穂、秋好沢論、山田茂、**宮崎剛**、重本和宏：筋は逆行性シグナルにより筋・運動神経を維持する 日本基礎老化学会大33回大会。名古屋、2010.6.17-18
11. 岩澤三康、永瀬雄一、**宮崎剛**、中村耕三、**田中栄**：破骨細胞特異的ノックアウトマウスによる抗アポトーシス分子Bcl-xLの機能解析—Bcl-xLは破骨細胞の骨吸収に抑制的に働く— 第84回日本整形外科学会学術総会。横浜、2011.5.12-15 (学会奨励賞受賞)
12. 森川大智、野尻英俊、斎田良和、小林慶司、**宮崎剛**、齋藤充、丸毛啓史、金子和夫、清水孝彦：細胞質酸化ストレスの増加は骨量および骨質の低下を引き起こす 第84回日本整形外科学会学術総会。横浜、2011.5.12-15
11. 重本和宏、森秀一、山田茂、久保幸穂、**宮崎剛**、秋好沢論、岸雅彦、小西哲郎：抗MuSK抗体による重症筋無力症の動物モデル作製と病態機序の解明 第52回日本神経学会学術大会。名古屋、2011.5.18-20
12. 野尻英俊、斎田良知、森川大智、小林慶司、**宮崎剛**、齋藤充、丸毛啓史、金子和夫、清水孝彦：スーパーオキシドディスムターゼ1 (SOD1) 欠損は低代謝回転型骨量減少と加齢性コラーゲン架橋変化を引き起こし骨脆弱化する 第29回日本骨代謝学会学術集会。前橋、2011.10.19-21
13. 斎田良知、野尻英俊、森川大智、**宮崎剛**、麻生義則、金子和夫、清水孝彦：スーパーオキシドディスムターゼ1 (SOD1) による骨代謝制御機構の解析 第26回日本整形外科学会基礎学術集会。大阪、2011.7.28-30
14. Mori S, Kubo S, Yamada S, **Miyazaki T**, Shigemoto K. Distinct mechanisms between divalent and monovalent MuSK antibodies

involved with dysfunction of MuSK leading to myasthenia gravis. 第34回日本神経科学学会大会, 2011, 9/15 横浜.

15. Mori S, Kubo S, Yamada S, **Miyazaki T**, Shigemoto K. Distinct mechanisms between divalent and monovalent MuSK antibodies involved with dysfunction of MuSK leading to myasthenia gravis. Society for Neuroscience 2011.11.13-18 Washington, D.C. USA
16. **Tsuyoshi Miyazaki**, Shuuichi Mori, Kazuhiro Shigemoto, Nils-Goran Larsson, Takeshi Nakamura, Shigekaki Kato, Tomoki Nakashima, Hiroshi Takayanagi, Sakae Tanaka: Maintenance of mitochondrial DNA copy number is essential for osteoclast survival and bone resorption. 1<sup>st</sup> Bio-Rheumatology International Congress Tokyo 8<sup>th</sup> GARN meeting Tokyo. Maihama, 2011.11.14-16

[図書] (計0件)

[産業財産権] (計0件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

宮本 恵成 (MIYAMOTO YOSHINARI)

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：10345217

### (3) 研究分担者

田中 栄 (TANAKA SAKAE)

東京大学・医学部附属病院・整形外科・教授

研究者番号：50282661