

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791976

研究課題名（和文） 骨代謝における JunD の作用とその分子機構の探索

研究課題名（英文） The research about the molecular function of JunD in bone metabolism

研究代表者

川俣 綾（KAWAMATA AYA）

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60527018

研究成果の概要（和文）：JunD は骨のリモデリングにかかわる転写因子の一つであるが、生体内で JunD が骨形成に対して抑制的に働くそのメカニズムについてはこれまでのところ十分に説得的な仮説は提唱されていない。そこで今回の研究の目的は、JunD が骨代謝制御に關与する際のメカニズムを細胞学的・組織学的に検討し解明し、JunD による骨量制御關する分子メカニズムの一部を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：JunD is one of the transcription factor that regulate the bone metabolism. But the function of JunD in skeletal system is still not fully understood. To elucidate the role of JunD in the regulation of bone metabolism, we analyzed JunD by cytological and histological methods. And we reveal the part of the molecular mechanisms of JunD in bone.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔顎顔面再建外科学

1. 研究開始当初の背景

口腔癌によって、顎骨の区域切除を余儀なくされた場合、下顎骨再建が必要となる。通常はチタンプレートによる再建術が選択されるが、これは患者の QOL を著しく損なう方法と言わざるを得ない。最近では肩甲骨を用いた下顎骨の再建も行われているが、侵襲が

大きく、患者に大きな負担を強いることになる。また、人工骨をもちいた再建術も施行されるようになってきているが、これも骨のリモデリングに時間がかかることが問題となっている。そこで、骨のリモデリングにかかわる因子の解明は重要な課題であると考え、骨のリモデリングにかかわる転写因子の一

つである JunD に着目した。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、骨代謝制御に関与する遺伝子について *in vivo*における機能解析をおこない、JunDが骨代謝回転を抑制し、骨量減少に働く因子であるという興味深い知見を得ることに成功してきた。しかし、JunDが実際どのように骨代謝に関与しているか、詳細は不明なままであった。そこで、今回JunD KOマウスを用いて、細胞学的、組織学的検討を行うことを検討した。JunD KOマウスより採取した骨芽細胞および破骨細胞の機能を解析することによって、それぞれの細胞におけるJunDの機能について明らかにするとともに、それらが、骨代謝制御においてどのようなバランスをもっているかについて、それにかかわる分子機構を培養細胞を用いた実験系により検証し、さらに *in vivo*の骨組織中で実際にそのような分子機構が関与することについても検証を進めることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

骨代謝に関与する骨芽細胞・破骨細胞それぞれにおける JunD の機能の解明を目的とし、以下のごとく研究を行った。

(1) 高齢および若齢マウスを用いて野生型および JunD KO マウスの骨量解析を行い、JunD がどの時点で生体に作用しているかを模索する。

(2) JunD の骨組織内での発現細胞を免疫組織学的に解析し、JunD がどの細胞に作用しているかを検討する。

(3) 破骨細胞分化への影響を調べるために、

JunD KO マウス由来の骨髄および脾臓細胞より破骨細胞を誘導し、その分化能を検討する。

(4) JunD KO マウスの骨芽細胞の分化過程における骨芽細胞分化マーカー発現量の変化を調べるために、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞を培養し、経時的に発現量の変化を測定する。

(5) JunD がいかに骨形成に関与するかについて調べるために、JunD の発現ベクターとマウス頭蓋骨由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いて JunD の過剰発現系および発現抑制系を作製する。この系で骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)の発現量を測定する。

(6) 野生型および JunD KO マウスを用いてその切片を作製し、解析を行う。骨芽細胞について ALP を指標として免疫組織学的な染色を行い、JunD KO マウスにおいて骨芽細胞数の上昇が見られるかどうかを検討する。

(7) 骨芽細胞が産生・分泌するオステオカルシン遺伝子の発現調節に JunD が AP-1 としてどのように関与しているかを調べるために、JunD/cFos および cJun/cFos の組み合わせで導入し、レポーター活性を測定する。

4. 研究成果

上記研究の結果およびそこから得られた知見を以下に示す。

(1) 生体内で JunD がどの時期から骨代謝に作用するかを見るために、高齢および若齢マウスの海綿骨量の定量を行ったところ、いずれにおいても JunD KO マウスで骨量増加を認め、JunD が若年時に骨形成を抑制する可能性と

老年時に骨吸収を促進する可能性のどちらとも考え得る結果となった。

(2) JunD の発現細胞を見るべく免疫染色を施行し、JunD が骨芽細胞・破骨細胞のどちらにも発現していることを確認した。

(3) JunD が破骨細胞分化に与える影響を調べるため、JunD 欠損マウスと野生型マウスの骨髄及び脾臓細胞から破骨細胞を誘導し、その細胞数を測定したところ、野生型マウスに比べ、JunD 欠損マウスで TRAP 染色陽性細胞数が多い傾向があった。本結果はすでに報告している JunD 欠損マウスの骨組織において破骨細胞が多いとする *in vivo* のデータと符合するものとなった。

(4) JunD KO マウス頭蓋骨由来骨芽細胞の分化過程において、骨芽細胞分化マーカーである *runx2* の発現量を経時的に定量したところ、分化後期における発現量が野生型よりも低下していることが分かった。このため、JunD は *in vitro* では骨芽細胞の分化に対して促進的に働いていることが示された。

(5) 骨芽細胞分化における JunD の機能を調べるため、MC3T3-E1 細胞を用いて JunD 過剰発現系および発現抑制系を作製し解析を行ったところ、JunD 過剰発現系では ALP の mRNA 発現量が増加し、siRNA を用いた JunD 発現抑制系では ALP の mRNA 発現量が減少した。

(6) JunD の骨芽細胞に対する作用を調べるためにマウス骨組織の ALP 陽性細胞数を測定したところ、JunD KO マウスでは骨芽細胞数が増加していることが示され、JunD が骨芽細胞増殖を抑制する可能性が示唆された。

以上(3)～(6)の結果より、JunD は *in vitro* では、骨芽細胞の分化に対して促進的に働くのに対して、生体内では骨芽細胞の分化・増殖を抑制する方向に作用していることが分かる。この一見矛盾しているように見える結果は、生体内では他の因子が JunD に作用していることによるものと考え、より生体内での現象に近づけるべく、以下のごとく JunD が構成するダイマーである AP-1 の機能を分析することを試みた。

(7) オステオカルシン遺伝子に対する JunD の作用を調べるためにルシフェラーゼレポーターアッセイにてその転写活性を測定したところ、JunD-cFos よりも cJun-cFos を導入した方が活性は上昇した。これにより Jun 遺伝子の中で、cJun に比べて JunD は骨芽細胞の分化に対して抑制的に働くことが示された。生体内では、Jun タンパクが Jun タンパク同士ホモダイマーや Fos タンパクとのヘテロダイマーを形成し AP-1 として機能していることが知られており、JunD 自体も骨芽細胞の分化を促進させるが、JunD KO マウスでは代償的に cJun が増加するという間接的な作用によって、さらなる骨量増加をもたらしている可能性が示唆された。

以上のように JunD KO マウスにおいて骨量が増加するというイベントについて、生体内でどのような変化が起こっているかを検証するために、骨芽細胞および破骨細胞のそれぞれの分化・機能における変化、およびそれぞれの細胞間の関連性の変化について複合的に比較解析を行った。これらの実験結果より、JunD は骨芽細胞・破骨細胞のどちらにも作用しており、単独では骨芽細胞には促進的に、破骨細胞には抑制的に機能していることが分かった。しかしながら、実際の生体内では

JunD は骨芽細胞分化に抑制的に働いており、これには他の AP-1 構成因子の関与が示唆されるという知見を得た。今後、この生体内で JunD にたいして間接的に作用する因子についてはさらなる解明を要する。

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)

[学会発表] (計 1 件)

A. Kawamata, H.Yokoyama, Y. Izu, T. Hayata, E.F. Wagner, K. Nakashima, Y. Ezura, M. Noda, T. Amagasa: OVARECTOMY INDUCED BONE LOSS WAS PREVENTED BY THE DEFICIENCY OF JUND WHICH DETERMINES OSTEOLASTIC ACTIVITY AND BASAL LEVELS OF BONE MASS: 9th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery: 25 - 28 November 2010, Kuala Lumpur Convention Centre, Kuala Lumpur, Malaysia

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川俣 綾 (Aya Kawamata)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号 : 60527018