

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10501

研究課題名(和文) 骨メカニカルストレス応答における骨細胞-破骨細胞の細胞間制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) p130Cas is involved in osteocyte's mechanosensory function in bone homeostasis

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

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)：メカニカルストレスで重要な役割を果たすp130Casを骨細胞特異的にノックアウトマウスした(Cas cKO)を作製し、右下肢の坐骨神経・大腿神経切離を行い、片方の下肢のみに力学的負荷のかからないunloading実験を行なった。unloadingを行った下肢では、コントロールマウスでもCas cKOマウスでも、対側と比較して、骨量が著明に減少した。コントロールマウスで骨吸収パラメーターの著明な促進がみられたものの、Cas cKOマウスでは骨吸収パラメーターの促進が抑制されていた。この結果から、unloadingによる骨量低下/骨吸収促進は骨細胞のCasが重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Osteocytes are recognized as mechanosensory cells, although it is largely unknown how bone metabolism is mechanically modulated. Here, we report that p130Cas (Cas) plays a major role in osteocyte mechanosensing to subsequently support bone homeostasis. Osteocyte-specific Cas knockout (Cas cKO) mice exhibit osteopenia. We used a mouse bone-unloading model, in which one of the hindlimbs of each individual mouse was subjected to sciatic and femoral nerve resection. Unloaded femurs exhibited a significant reduction of bone volume as compared with their contralateral controls. Unloaded bones of Casflox/flox mice exhibited significant reduction of bone volume with significantly increased bone resorption parameters. In contrast, bone resorption parameters remained unaltered upon unloading in Cas cKO mice, although they showed a tendency of unloading-induced decrease in bone volume. These results suggest that Cas in osteocytes is involved in the mechanosensory function in bone.

研究分野：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：メカニカルストレス 骨細胞

1. 研究開始当初の背景

地表で生息する全ての生物の身体組織は、たえず受ける重力に適応するため、周囲の物理的環境・条件を感知し、細胞内生化学シグナルなどの生体情報に変換するメカノセンシング機能を備えている。そこで、生体には物理的刺激、すなわちメカニカルストレスによって制御される恒常性維持機構が存在すると考えられる。高血圧、肥満、関節不安定性などによってもたらされる過度のメカニカルストレスや、身体不活動、無重力(宇宙滞在)にともなうメカニカルストレスの欠失・不足は、老化・炎症の増悪因子となる。一方、適度な運動や理学療法など、老化・炎症に抑制的に作用し、認知・精神・心血管・代謝・運動機能の維持・改善効果を有する「正のメカニカルストレス」も存在する。しかし、このような「正のメカニカルストレス」のシグナル分子機構はほぼ全く分っていない。また、日本はかつてない高齢社会を迎え、なかでも老化にともなう骨、関節、筋など運動器の機能低下に附随して生じる問題は、神経系の障害と共に高齢者の生活の質を著しく損なうため、大きな社会問題となっている。本研究では、運動などによるメカニカルストレスから、骨細胞を介して、骨量維持につながるメカニズムの詳細な解明を目指す。

骨基質中に存在する骨細胞は、力学刺激の感知センサーとして働き、その情報を周囲の細胞に伝達することで、リモデリング活動を調整していると考えられている。メカニカルストレスに応答する組織は運動骨格系に限らず生体内に広く分布し、循環器系とくに血管や内皮細胞については多くの研究がある。これらの細胞がメカニカルストレスに応答する機序には普遍性があると考えられるが、どの組織についてもその詳細は想像の域を出ない。本研究では、メカニカルストレスの受容から、細胞内シグナルへの変換過程で重要な役割を果たしている分子である p130Cas に注目する。

p130Cas は、細胞接着斑の構成成分で、Src ファミリーキナーゼの基質タンパク質であり、p130Cas のノックアウトマウスは心筋形成の異常により胎性致死となる。非リン酸化 p130Cas では中央部の基質結合領域 (SD: substrate domain) は折りたたまれた構造をとっており、細胞が物理的な力を受けた

時、p130Cas 分子も N 末端と C 末端に力を受けて引き延ばされ、C 末に結合した Src ファミリーチロシンキナーゼにより SD 領域がリン酸化され、シグナルを伝達するというものである (Sawada [本申請連携研究者] et al. *Cell* 127, 1015-1026, 2006)。

2. 研究の目的

我々は骨細胞特異的 p130Cas コンディショナルノックアウト (Cas cKO) マウスを作製し、コントロール (Cas^{flox/flox}) に比して、骨量が低下していることを明らかにした (投稿中)。骨形態計測で破骨細胞機能が亢進していること、また p130Cas ノックダウン MLO-Y4 細胞 (骨細胞樹立株) では、RANKL の発現が有意に上昇していることも発見しており、骨細胞のメカノセンサー p130Cas が RANKL の発現を介し、破骨細胞機能を調節している可能性を明らかにしつつある。

メカニカルストレスは、骨基質において骨芽細胞と骨細胞の無数に張りめぐらされた細胞性ネットワークにより感受される機構が推測されている。さらに、*in vivo* において骨小腔-骨細管中の組織液の流れ (液流動、fluid flow) を介して感受される可能性もある。細胞膜の伸展に対する stress-sensing protein である p130Cas が骨細胞でどのようなメカニズムを担っているか非常に興味をもたれるところである。

本研究では、骨細胞特異的 p130Cas ノックアウトマウスの右下肢の坐骨神経・大腿神経切離により、片方の下肢のみに力学的負荷のかからない unloading の状態をつくりだし、坐骨神経・大腿神経切離をおこなっていない対側の下肢をコントロールとして比較することにより、メカニカルストレス感知と骨細胞 p130Cas の関連、さらには骨細胞から破骨細胞機能調節に関わるメカニズムについて検討する。

3. 研究の方法

骨細胞特異的 p130Cas 欠損マウスの作製

p130Cas は細胞接着斑の構成成分で 130kDa の Src 型チロシンキナーゼシグナル伝達経路のアダプターであり、そのノックアウトマウスは心筋形成の異常により胎性致死となる。p130Cas は異なった組織や時期において多様な役割を果たし、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、骨細胞特異的な不活化を Cre-loxP システムを用いて行う。Cre 酵素を骨細胞特異的に発現させる方法としては、骨細胞特異的 dentin matrix protein 1 (Dmp1) 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 (*J Dent Res* 86:320-325, 2007)。この Dmp1-Cre マウスと p130Cas 遺伝子領域を挟みこむように loxP 配列を導入したマウス (p130Cas^{flox/flox} マウス) を用いて、Dmp1-Cre^{+/+} p130Cas^{flox/flox} マウス (p130Cas コンディショナルノックアウトマウス: Cas cKO マウス) を作製する。

Unloading (坐骨神経・大腿神経切離) の実験系の確立

Cas cKO マウスは貴重なので、まず、Cas cKO マウスのバックグラウンドである C57BL/6 マウス (7 週齢~8 週齢) を用いて、坐骨神経・大腿神経切離後、何週間で最もマイクロ CT 計測で骨量が低くなるのか、また骨吸収パラメーターが何週間後に高値を示すのか、さらには何週間後に骨形成パラメーターが低値を示すのかを予備実験として行う。坐骨神経・大腿神経切離後、何週間で評価するのが明らかとなったら、Cas cKO マウスと Cas^{flox/flox} マウスを用いて、右下肢に対して坐骨神経・大腿神経切離を行い、unloading による Cas cKO マウスの反応を検討する。

unloading を行った骨細胞特異的 Cas ノックアウトマウスの解析

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、マイクロ CT あるいは 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。骨量、類骨量、類骨面、類骨の厚さ、骨芽細胞面%、吸収面%、破骨細胞数、破骨細胞面%、骨石灰化速度、骨形成速度、などをコントロールと比較する。

4. 研究成果

(1) 骨細胞特異的 Cas cKO マウスの作製

Cas cKO マウスは、メンデルの法則にしたがって生まれ、外見上大きな問題なく成長した。

(2) 坐骨神経・大腿神経切離

C57BL/6 マウス (8 週齢) を用いて、坐骨神経・大腿神経切離後、2 週間でマイクロ CT 計測で骨量が低くなることを確認できた (左

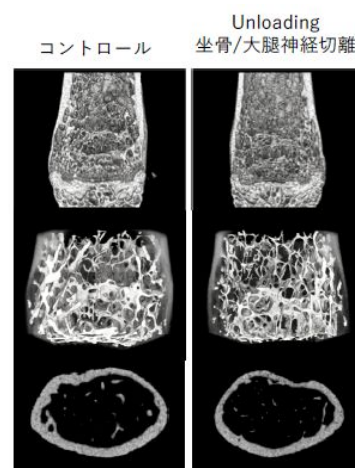
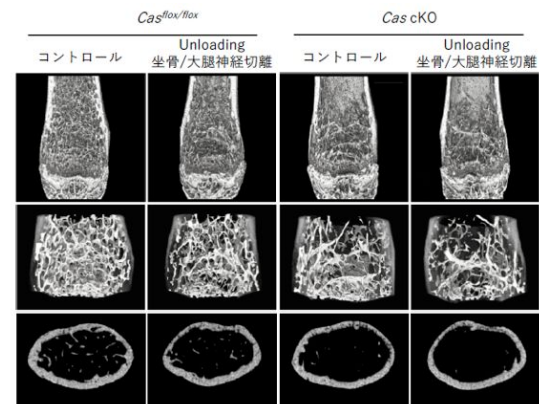


図)。また破骨細胞の機能亢進を示す骨吸収パラメーターが 2 週間で高値を示すことを確認した。

(3) Cas cKO マウスに対する

unloading 試験

この結果を踏まえて、Cas cKO マウスと Cas^{flox/flox} マウスを用いて、右下肢に対して坐骨神経・大腿神経切離を行い、2 週間後に sacrifice した。Cas cKO マウスにおいても unloading による骨量減少がみられた (下図)。



興味深いことに、Cas^{flox/flox} マウスの unloading による骨吸収マーカー (ES/BS, OcN/BS, Oc.S/BS) の低下が、Cas cKO マウスでは抑制されていた。

これらのことから、メカノセンサー p130Cas がメカニカルストレスに関わる骨代謝において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、骨細胞に細胞伸展ストレスやシェアストレスを加えたところ、RANKL の発現に有意な変化を認めた。今後、p130Cas と RANKL の間をつなぐシグナル伝達経路の詳細を明らかにしていく予定である。

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8件)

- 1) Akira Koshiishi, Fumiaki Tokimura, and Tsuyoshi Miyazaki: Revision with locking plate and sliding inlay bone graft for hypertrophic nonunion after combined treatment of Ender nails and teriparatide for atypical femoral stress fracture: A unique case report. J Orthop Rheumatol. 2017 December; Volume: 4, Issue: 2 (2017; 4(2): 6) doi: 10.13188/2334-2846.1000034 **査読有**
- 2) Ando Y, Tokimura F, Miyazaki T: Very rare variant of popliteal artery entrapment syndrome due to an enlarged fabella associated with severe knee osteoarthritis: first case report. J Orthop Sci. 2017 Jan;22(1): 164-168. doi: 10.1016/j.jos.2015.06.025. **査読有**
- 3) 木幡一博、山田浩司、松本卓也、時村文秋、田尻康人、岡崎裕司 清潔骨折手術で手術部位によってSSI%は異なるか? ~多施設共同SSIデータベース中間解析結果~ 骨折 38(1): 1-5 2016 <https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=dp6fract&ye=2016&vo=38&issue=1> **査読無**
- 4) 山田浩司、佐々木了、松本卓也、山川聖史、竹下祐次郎、安部博昭、金井宏幸、時村文秋、田中栄、松下和彦 人工関節置換術後感染のエビデンスに基づく予防 臨床整形外科 Vol151: 317-321、2016 <http://medicalfinder.jp/toc/1408/2016/51/4> **査読無**
- 5) 木下 健太、山田 浩司、岡崎 裕司、土屋明大、佐々木 了、飯島 準一、秋山 宏一郎、金井 宏幸、時村 文秋、石井 桂輔 下肢手術は清潔骨折手術後30日目の継続入院率が高い 多施設共同SSIデータベース中間解析結果 骨折 Vol. 38: 1083-1087, 2016 <https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=dp6fract&ye=2016&vo=38&issue=4> **査読無**
- 6) Muraki S, Akune T, Teraguchi M, Kagotani R, Asai Y, Yoshida M, Tokimura F, Tanaka S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Yoshimura N: Quadriceps muscle strength,

radiographic knee osteoarthritis and knee pain: the ROAD study. J Orthop Sci. 2015 Jun 29. pii: S0949-2658(15)00027-5. doi:

10.1016/j.jos.2015.06.025. **査読有**

- 7) Muraki S, Akune T, En-Yo Y, Yoshida M, Suzuki T, Yoshida H, Ishibashi H, Tokimura F, Yamamoto S, Tanaka S, Nakamura K, Kawaguchi H, Oka H, Yoshimura N: Joint space narrowing, body mass index, and knee pain: the ROAD study (OAC1839R1). Osteoarthritis Cartilage. 2015 Jun;23(6):874-81. doi: 10.1016/j.joca.2015.01.011. **査読有**
- 8) 宮崎剛: 骨粗鬆症と骨改造 臨床免疫・アレルギー科 2015 64(2):127-132 <http://www.kahyo.com/item/M201508-642> **査読無**

[学会発表](計13件)

- 1) Koji Yamada, Koji Nakajima, Kazuhiro Kohata, Fumiaki Tokimura, Tsuyoshi Miyazaki, Tatsuro Karita, Hiroyuki Oka, Yasuhito Tajiri, Hiroshi Okazaki. Spinal instrumentation surgery, a well-known but neglected orthopaedic procedure deserving more attention on perioperative care. the 2018 Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. New Orleans, Louisiana, USA. 2018.3.6-10
- 2) Miyazaki T, Tokimura F, Sawada Y. Oseocyte-specific Cas knockout mice exhibit decreased bone mass through RANKL expression. 20th International Conference on Enzymology and Molecular Biology. London, UK. 2018.3.5-7.
- 3) Yamada K, Miyazaki T, Shinozaki T, Oka H, Tokimura F, Tajiri Y, Okazaki H. Spinal instrumentaion surgery, a well-known but neglected orthopaedic procedure deserving more attention on perioperative care. 36th Annual Meeting of the European Bone and Joint Infection Society. Nantes, France. 2017.9.7-9
- 4) 長沼英俊、宮崎剛、時村文秋、穴水依人、濱路博、金高正和、金子奏一郎、上園茂仁: エンダー釘とテリパラチド投与による治療後にロッキングプレートと骨移植による再手術を行った非定型大腿骨骨折の 1

- 例 第 30 回日本臨床整形外科学会学術集会, 東京, 2017.7.16-17
- 5) 中嶋香児、木幡一博、桃山現、**宮崎剛**、山川聖史、金井宏幸、竹下祐次郎、原由紀則、山田浩司、吉井祥二、安部博昭 清潔整形外科手術の術後 30 日以内再入院のリスク ~ 8912 件の解析結果 ~ 第 90 回 日本整形外科学会学術総会 2017.5.18-21 仙台
- 6) 中元 秀樹、中嶋 香児、大庭 紗希、佐藤敏秀、**宮崎 剛**、秋山 宏一郎、桃山 現、金井 宏幸、田中 栄、山田 浩司 清潔整形外科手術の手術部位感染リスク ~ 若年者・高齢者の相違 ~ 第 90 回 日本整形外科学会学術総会 2017.5.18-21 仙台
- 7) **Miyazaki T, Tokimura F**, Azuma S, Harada I, **Sawada Y**. Oseocyte-specific Cas knockout mice exhibit decreased bone mass through RANKL expression. 4th International Conference on Geriatrics and Gerontology. London, UK. 2016.10.3-4.
- 8) **Miyazaki T**, Azuma S, Harada I, **Sawada Y**. Oseocyte-specific Cas knockout mice exhibit decreased bone mass through increased bone resorption. The 2016 Ageing Summit. London, UK. 2016.2.10-12.
- 9) 中嶋香児、山田浩司、**時村文秋**、佐々木了、田尻康人、山川聖史、木幡一博 清潔整形外科手術で手術部位感染の臨床所見は感染の深達度で異なるか? 第 39 回 日本骨関節感染症学会 2016.7.8 岡山
- 10) 木幡一博、山田浩司、佐々木了、田尻康人、山川聖史、**時村文秋**、中嶋香児、苅田達郎 高齢者の清潔整形外科手術後尿路感染のリスクについて ~ 多施設共同 SSI データベース解析結果 ~ 第 39 回日本骨関節感染症学会 2016.7.9 岡山
- 11) 木幡 一博, 松本 卓也, 石井 桂輔, **時村 文秋**, 佐々木 了, 田尻 康人, 岡崎裕司, 山田 浩司 大腿骨近位部骨折における手術待機期間と術後合併症の関係 第 39 回 日本骨関節感染症学会 2016.7.9 岡山
- 12) Koji Yamada, Sakae Tanaka, Hiroshi Okazaki, Yasuhito Tajiri, Karita Tatsuro, **Tokimura Fumiaki**, Hiroyuki Kanai, Yoji Mikami, Kiyofumi Yamakawa, Takuya Matsumoto, Satoru Sasaki The

- Epidemiology and Prevention of Periprosthetic Joint Infection (PJI) 第 89 回 日本整形外科学会学術総会 JOA/AAOS combined symposium 2016.5.14 横浜
- 13) 戸澤 慧一郎、山田浩司、苅田達郎、竹下祐次郎、佐藤敏秀、金井宏幸、穂積高弘、**時村文秋**、田尻康人、岡崎裕司、松本卓也 清潔整形外科手術の手術部位感染リスク ~ 若年者・高齢者の相違 ~ 第 89 回 日本整形外科学会学術総会 2016.5.15 横浜

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

時村 文秋 (TOKIMURA FUMIAKI)
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: 80242147

(3) 連携研究者

澤田 泰宏 (SAWADA YASUHIRO)
国立障害者リハビリテーションセンター (研究所)・研究所 運動機能系障害研究部・部長
研究者番号: 50313135