

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20057

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答因子ATF6の骨代謝制御の解明

研究課題名(英文)The role of bone metabolism of ATF6 as UPR transcription factor.

研究代表者

森本 雅俊(MORIMOTO, Masatoshi)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：20748701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ATF6ノックアウトマウスの解析で骨密度は増加することを確認した。骨密度増加の原因が、骨形成能の増加か骨吸収能の低下を調べた。骨代謝マーカーや組織学的検討でも、骨形成能が増加していることを示唆する結果を得た。培養細胞の実験では、マウスの頭蓋骨から採取した前骨芽細胞に対しBMP-2で分化誘導をかけたところ、ATF6ノックアウト細胞で骨芽細胞への分化能が亢進していた。さらに、経時的に遺伝子発現を確認したところ、骨形成マーカーはATF6ノックアウト細胞でより増加していた。細胞での染色でも、同様の結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that the bone mineral density was increased in ATF6 knockout mouse. We investigated the increase in bone formation capacity or the decrease in bone resorption ability as the cause of the increase in bone density. Bone metabolism markers and histological examination also gave results suggesting that osteogenic formation increased. In vitro, the differentiation of osteoblast induced with BMP-2 was performed in the osteoblastic cells collected from the skull of mice, and the ability to differentiate into osteoblasts was enhanced in ATF6 knockout cells. Furthermore, the bone formation marker was more increased in ATF6 knockout cells. Similar results were obtained by staining with cells.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 小胞体ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

全ての細胞では、小胞体ストレス応答と呼ばれる適応機構によってタンパク質の品質管理が行われている。小胞体に折りたたみ不全のタンパク質が蓄積すると小胞体膜に存在するセンサーからシグナルが発せられ、以下の応答により小胞体ストレスを軽減している (1). 新たなタンパク質の合成を停止し小胞体の負担を軽減する翻訳抑制 (2). タンパク質の折りたたみを助ける分子シャペロンの誘導 (3). 異常に折りたたまれたタンパク質をユビキチン-プロテアソーム系で分解する小胞体関連分解 (4). これらで対応不能になった場合にはアポトーシスが誘導される。

この小胞体ストレス応答にはたんぱく質の品質管理といった古典的な働き以外にも様々な働きがあることが近年明らかにされてきた。しかしながら、骨代謝における小胞体ストレス応答については十分にわかっていないため、本研究で明らかにすることとした。

### 2. 研究の目的

われわれは、小胞体ストレス応答を制御しているタンパク質の中の1つである ATF6 のノックアウトマウスで骨密度が上昇することを新たに見出した。ATF6 はタンパク質の折りたたみを助ける分子シャペロンの誘導に深く関わっていることが知られている。骨密度増加の原因が、この分子シャペロン誘導によるものなのか、他の作用によるものかを明らかにし、さらに骨形成機能の亢進がみられているこのノックアウトマウスを利用し、骨折や骨粗鬆症モデルマウスの実験基盤を構築することを目的とする。

### 3. 研究の方法

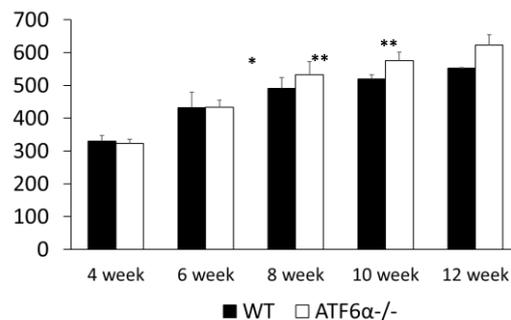
骨密度増加の原因が、骨形成に関わる骨芽細胞の機能亢進による影響か、骨吸収に関わる破骨細胞の機能低下によるものかを明らかにする。

(1). *in vivo* の解析: 野生型マウスと ATF6 ノックアウトマウスの骨密度の計測、血清の骨代謝マーカーの測定、大腿骨 RT-qPCR で骨形成マーカーの遺伝子発現の評価、組織学的な評価を行う。

(2). *in vitro* の解析: ノックアウトマウス由来の骨芽細胞を用いて機能解析を行う。

### 4. 研究成果

(1). ATF6 ノックアウトマウスの骨密度 (大腿骨) (図 1)



大腿骨の骨密度は、8 週齢マウス以降で増加していた。

(2). 骨形成能の評価

骨形成マーカーである osteocalcin を測定したところ、ATF6 ノックアウトマウスで増加していた (図 2)。さらに、大腿骨から精製した mRNA で、qPCR を行ったところ、Col1a-1 や Osteonectin・Osteocalcin といった骨形成マーカーの遺伝子発現が増加していた (図 3)。

図 2. 血清中の osteocalcin 量

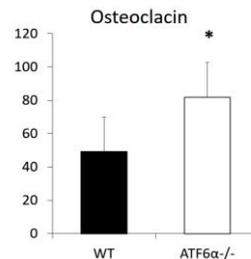
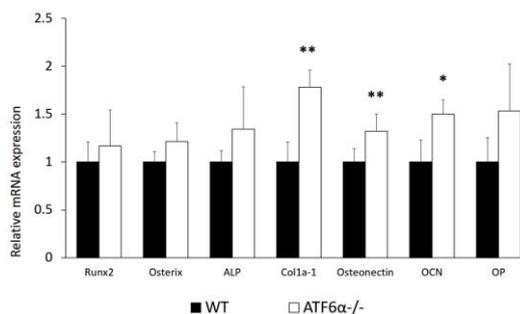


図 3. 大腿骨 RT-qPCR



組織学的評価として、カルセインを腹腔内に間隔をあけ注射し、骨にラベリングを行いその2本のラベルの間の距離から石灰化速度を比較した (図 4)。ATF6 のノックアウトマウスの方が、ラベリングされた間隔は広がっており、骨形成能が亢進していたこと。さらに、ALP 染色では ATF6 ノックアウトマウスで強染色されており、骨形成能が高まっていることが分かった (図 5)。

図4 カルセインラベリング

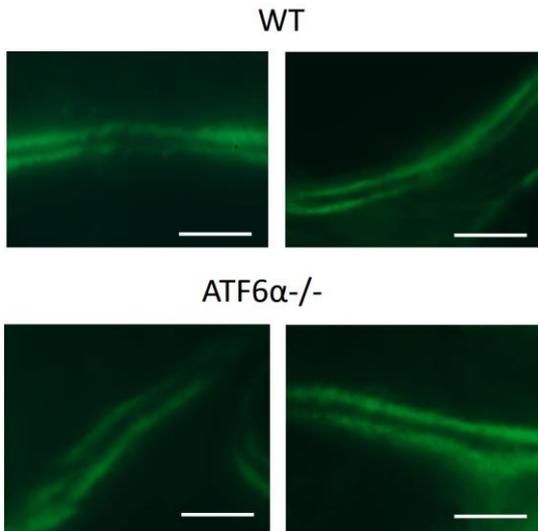
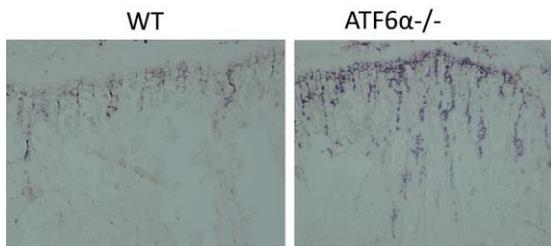


図5 ALP 染色



### 3. 骨芽細胞分化の評価

Day0 マウスの頭蓋骨から前骨芽細胞を採取し、BMP-2 を投与し骨芽細胞分化を促し、アリザリンレッド染色および von Kossa 染色を行い、分化の程度を比較した。ATF6 ノックアウトでは、骨芽細胞分化が亢進しており、いずれの染色でも強染されていた (図6)。また、分化1週間目のALP活性を測定したところ、ATF6 ノックアウトで増加していた (図7)。

図6 骨芽細胞分化

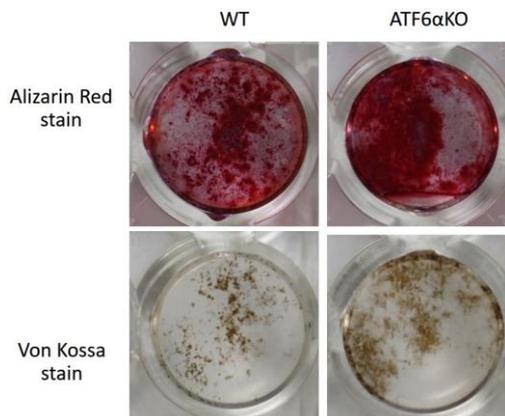
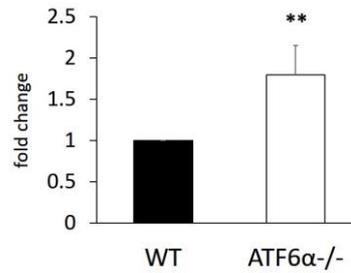
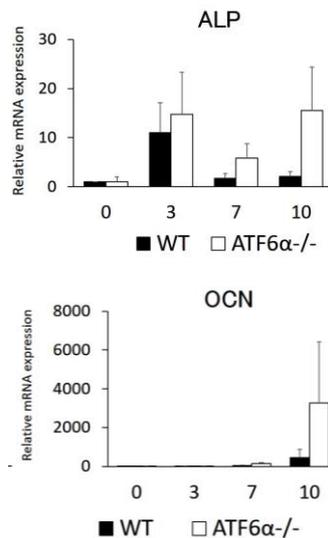


図7 ALP 活性



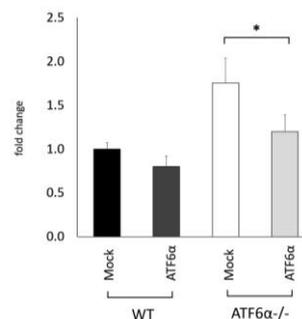
骨形成マーカーを経時的 (day0, 3, 7, 10) に評価した。ALPおよびOsteocalcinともに、ATF6 ノックアウト細胞で遺伝子発現は増加していた (図8)。以上より、ノックアウトマウスでみられた骨形成能の亢進と矛盾なく、培養細胞においても、ATF6 ノックアウト細胞で骨芽細胞分化は亢進していることが明らかになった。

図8 ALP および OCN の遺伝子発現の評価



ATF6 ノックアウト細胞に対し、Retrovirus を用い ATF6 を再導入し、これまでと同様に骨芽細胞の分化実験を行いALP活性の測定を行った (図9)。すると、ATF6 ノックアウトで更新していたALP活性は、ATF6 を再導入した細胞では野生型を変わらない値となっていた。このことから、ATF6 は骨芽細胞分化に抑制的に働いていることが明らかになった。

図9 ATF6 再導入後のALP活性



## 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 3 件)

① Miyake M, Kuroda M, Kiyonari H, Takehana K, Hisanaga S, Morimoto M, Zhang J, Oyadomari M, Sakaue H, Oyadomari S. Ligand-induced rapid skeletal muscle atrophy in HSA-Fv2E-PERK transgenic mice. PLoS One. 査読有 2017 Jun 23;12(6):e0179955. doi: 10.1371

② Morimoto M, Takahashi Y, Kubo T, Sugiura K, Tamaki Y, Toki S, Suganuma K, Inoue K, Adachi K, Chikawa T, Sairyō K, Nagamachi A. Prognostic value of dynamic MRI positive enhancement integral color mapping in osteosynthesis of undisplaced femoral neck fractures. 査読有 J Orthop Sci. 2017 Jul;22(4):722-725. doi: 10.1016

③ Morimoto M, Higashino K, Katoh S, Fumitake T, Yamashita K, Hayashi F, Takata Y, Sakai T, Nagamachi A, Sairyō K. A Rare Case of Progressive Palsy of the Lower Leg Caused by a Huge Lumbar Posterior Endplate Lesion after Recurrent Disc Herniation. Case Rep Orthop. 2016;2016:5963924. doi: 10.1155

[学会発表] (計 2 件)

① Masatoshi Morimoto, Fumio Hayashi, Yoichiro Takata, Toshinori Sakai, Kosaku Higashino, Akihiro Nagamachi, Koichi Sairyō. ER stress aggravates the hypertrophy of the Ligamentum flavum. ORS 2018 Annual Meeting, 2018.3.11. Hyatt Regency New Orleans (New Orleans, LA, USA)

② Masatoshi Morimoto, Fumitake Tezuka, Fumio Hayashi, Kazuta Yamashita, Yoichiro Takata, Toshinori Sakai, Kosaku Higashino, Akihiro Nagamachi, MD, PhD, 1 Koichi Sairyō, Ryosuke Sato, Masato Miyake, Seichi Oyadomari. ER STRESS AGGRAVATES THE HYPERTROPHY OF THE LIGAMNTUM FLAVUM. ISSLS Meeting 2017.6.1. Dino Samartzis and Dimitris Kletsas. (Athens, Greece.)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森本 雅俊 (MORIMOTO, Masatoshi)

徳島大学・病院・医員

研究者番号 : 20748701