

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20791047  
 研究課題名 (和文) 力学的負荷変動時に、骨細胞で制御される骨芽細胞を介した破骨細胞活性化因子の探索  
 研究課題名 (英文) Study of osteoclast activating factor when mechanical stress changes through osteoblast controlled by osteocyte  
 研究代表者  
 森石 武史 (MORIISHI TAKESHI)  
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・技術職員  
 研究者番号：20380983

研究成果の概要 (和文) : 当講座で樹立した骨芽細胞特異的 Bcl-2 トランスジェニックマウスは、骨細胞の細胞突起形成が悪く、尾部懸垂実験で骨量が減少せず破骨細胞の誘導が起こっていなかったことから、骨細胞により骨芽細胞に誘導される破骨細胞の分化・活性化因子の存在が示唆された。さらに皮質骨中に骨細胞がほとんど存在しないマウス (Type II Runx2 tg) (Dev Biol. 2006 Aug 1;296(1):48-61) を用い、尾部懸垂実験後の皮質骨分画をマイクロアレイで比較することによって、非荷重時に骨細胞で変動する因子の探索を行った。その結果 5322 個の遺伝子が該当した。現在、変動する遺伝子の中に非荷重時に骨細胞より分泌され骨芽細胞に Rankl を誘導し破骨細胞を活性化させる因子が有るものと考え、検討を行っている。

研究成果の概要 (英文) : We established human Bcl-2 transgenic mice under the control of mouse 2.3 kb Colla1 promoter. Osteocyte processes were reduced depending on the expression levels of the transgene and they were sparsely connected with each other in Bcl-2 transgenic mice. At the unloaded condition, bone mass decreased in wild-type mice due to impaired osteoblast function and enhanced osteoclastogenesis through RANKL induction but not in Bcl-2 transgenic mice. These findings show that osteocytes negatively regulate bone mass by inhibiting osteoblast function and activating osteoclastogenesis and these functions are augmented at the unloaded condition. Moreover, osteocyte expression gene analysis using microarray showed that 5322 genes are changed in Runx2 transgenic mice (Dev Biol. 2006 Aug 1;296(1):48-61), at unloaded condition. Our findings will provide the basis for the understanding of the osteocyte network, which plays an important role in the regulation of bone mass.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：力学的負荷、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞活性化因子

## 1. 研究開始当初の背景

長期臥床により、力学的負荷が不足し骨量が減少することが、特に高齢者で大きな問題になっている。これまで、骨における力学的負荷の感知には骨細胞が大きな役割を果たし、骨細胞は力学的負荷を感知し、骨細胞突起および骨細管中の細胞外液を通してシグナルを骨芽細胞・破骨細胞に伝達することによって骨量の調節を行っていると考えられている。現在、力学的負荷によって変動する因子として、骨細胞および骨芽細胞で発現が知られているものは、c-fos, IGF-1, TGF- $\beta$ , COX2(cyclooxygenase2), PGE2(prostaglandin E2), PGI2(prostaglandin I2)があり、これらは *in vivo* および *in vitro* の実験で確認されている(Chow JWM et al. Am J Physiol 1994, Smalt R et al. Am J Physiol 1997, Lean JM et al. Am J Physiol 1996, Raab-Cullen DM et al. Calcif Tissue Int 1995, Glanstching H et al. Eur J Clin Invest 1996, Klein-Nuland J et al. J Bone Miner Res 1997, Neidlinger-Wilke C et al. J Biomech 1995)。しかしながら、骨細胞から破骨細胞へのシグナル伝達因子についての知見は無い。

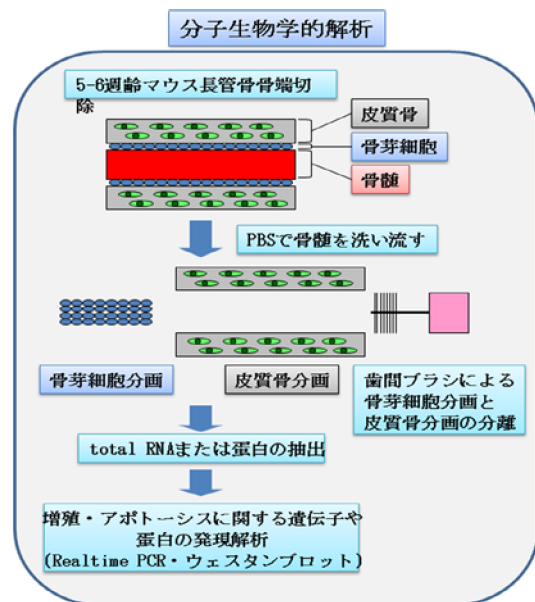
## 2. 研究の目的

当講座で作製された、骨芽細胞特異的 I 型コラーゲンプロモーター下で Bcl-2 を過剰発現させた tg マウスは、トランスジーン発現の低下する骨細胞でアポトーシスが起り、ほとんどの骨細胞が死滅する特異な表現形を呈した。また、若干の骨芽細胞の分化抑制が有る以外は、野生型マウスと全く変わらないことから、骨細胞の機能を検索する良いモデルとなることが考えられた。4ヶ月齢・雄・野生型マウスおよび tg マウスで尾部懸垂実験を行い、力学的負荷軽減による後肢の骨量の変化を検討したところ、野生型マウスでは有意に大腿骨の骨量が減少していたが、tg マウスでは骨量の減少が認められなかった。今回、この骨芽細胞の存在しない Bcl-2 tg マウスを利用し、力学的負荷を受容した骨細胞により骨芽細胞で発現が誘導され、破骨細胞の分化・活性化因子の検索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

研究期間内に  $\mu$  CT、骨形態計測、BrdU 染色、

TUNEL 染色、骨芽細胞分化関連遺伝子の *in situ* hybridization、鍍銀染色、SEM、TEM で tg の骨細胞および骨細管、骨芽細胞を詳細に解析を行った。また、Bcl-2 tg 6 週齢長管骨骨芽細胞分画等において、骨芽細胞分化、アポトーシス、増殖に関する遺伝子・蛋白の発現を Realtime PCR、ウェスタンブロットで比較検討した。さらに Bcl-2 tg の新生児頭蓋冠由来初代骨芽細胞の培養を行い、分化能・石灰化能を比較検討した。

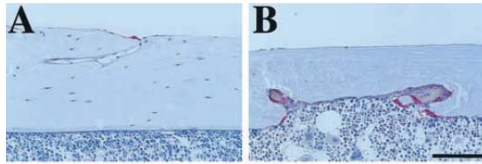


上記の表現形解析と平行して、野生型マウスと Bcl-2 tg マウスで尾部懸垂実験を行った。



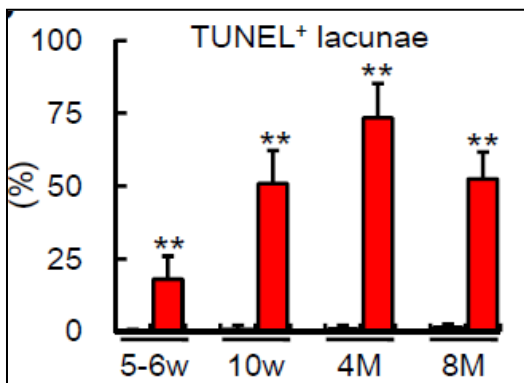
同様に当講座で作製された皮質骨中に骨細

胞がほとんど存在しないマウス (Type II Runx2 tg) (Dev Biol. 2006 Aug 1;296(1):48-61) を用い、野生型マウスと tg マウスの尾部懸垂実験後の皮質骨分画をマイクロアレイで比較することによって、非荷重時に骨細胞で変動する因子の探索を行った。

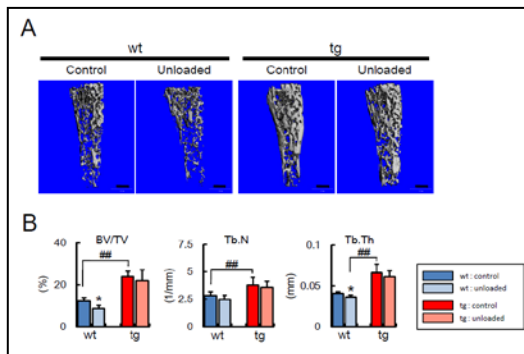


#### 4. 研究成果

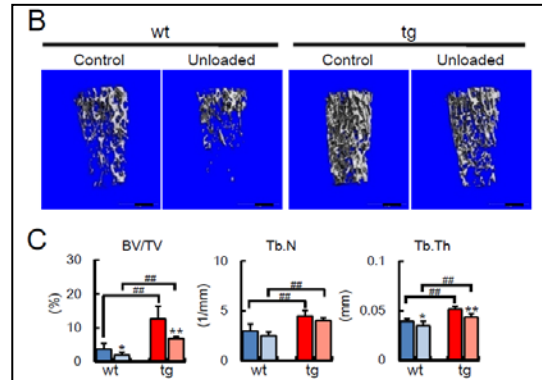
当講座で得られた骨芽細胞特異的 Bcl-2 トランスジェニックマウス (tg マウス) は、骨芽細胞の分化障害により骨細胞の細胞突起の形成が悪く、週齢を経るに従って皮質骨中の 60-80% の骨細胞がアポトーシスにより死滅していた。



生理的な状態で、皮質骨骨細胞死の割合と逆相関して皮質骨内骨膜上の破骨細胞数が減少し、また、4ヶ月齢 tg マウスで尾部懸垂実験を行うと、野生型マウスと比較して大腿骨遠心部二次海綿骨の骨量が減少せず、破骨細胞の誘導が起こっていない。



非荷重時に tg マウスで破骨細胞が誘導されない原因を、(1)骨細胞そのものに異常がある、のか、(2)骨細胞同士の細胞連絡の途絶によって破骨細胞誘導のシグナルが骨細胞から骨芽細胞に伝わっていない、のか突き止めるため、様々な週齢の tg マウスを用い解析を行った。皮質骨中の骨細胞が 10%程しか死んでいない 6 週齢 tg マウスを用いた 1 週間の尾部懸垂実験では、野生型マウスと同様に大腿骨遠心部二次海綿骨の骨量が有意に減少した。



また、これらのマウスの長管骨皮質骨から total RNA を抽出し、骨細胞特異的に発現する遺伝子 (Dmp1, Sost, Phex, Fgf23, Mepe) の比較を行ったところ、野生型マウスと tg マウスの骨細胞でこれらの遺伝子の発現に差異は認められなかった。同様に、4ヶ月齢 tg マウスを用いて 3 日間の尾部懸垂実験を行い、大腿骨および脛骨の骨芽細胞分画・皮質骨分画から total RNA を抽出し、遺伝子発現の解析をおこなったところ、tg マウスの生存骨細胞でも野生型マウスと同様に骨細胞特異的遺伝子の発現が認められた。これらの結果、tg マウスでは『骨細胞同士の細胞連絡の途絶によって破骨細胞誘導のシグナルが骨細胞から骨芽細胞に伝わっていない』事が強く示唆された。

そのため、当講座で作製された皮質骨中に骨細胞がほとんど存在しないマウス

(Type II Runx2 tg) (Dev Biol. 2006 Aug 1;296(1):48-61) を用い、野生型マウスと tg マウスの尾部懸垂実験後の皮質骨分画をマイクロアレイで比較することによって、非荷重時に骨細胞で変動する因子の探索を行った。

その結果「野生型対照群 対 野生型懸垂群」「tg 対照群 対 tg 懸垂群」「野生型対照群 対 tg 対照群」「野生型懸垂群 対

tg 懸垂群」の4種類の比較において2倍以上増加した遺伝子および1/2以下に減少した遺伝子として5322個の遺伝子が該当した。これらの遺伝子から受容体として発現するものと、分泌因子として発現するものを検討したところ、受容体は17遺伝子、分泌因子は24遺伝子が該当した。現在、変動する分泌因子の中に非荷重時に骨細胞より分泌され骨芽細胞にRanklを誘導し破骨細胞を活性化させる因子が有るものと考え、検討を行っている。

#### 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 1件)

1. Miyazaki, T, Moriishi, T, Izumi, S, Baba, T, Komori, T:

Ultrastructural analysis of osteoblasts, osteocytes and odontoblasts in Runx2 transgenic mice. 6th international Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology, Kobe, Japan, Sep 16-18, 2009 {Program and abstract, p. 67}

[学会発表] (計 2件)

1. 骨芽細胞特異的 Bcl-2 過剰発現マウスでは骨芽細胞の分化抑制と骨細胞死が起こる  
森石武史、宮崎敏博、和泉伸一、小守壽文  
第51回歯科基礎医学会、新潟、9月 Journal of Oral Biosciences Vol. 51 Supplement p123 September 2009

2. Miyazaki T, Moriishi T, Izumi S, Baba T, Komori T: Ultrastructural analysis of osteoblasts, osteocytes and odontoblasts in Runx2 transgenic mice. 6th international Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology, Kobe,

Japan, Sep 16-18, 2009 {Program and abstract, p. 67}

#### 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・技術職員

研究者番号：20380983