

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 25 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：2010～2012

課題番号：22591698

研究課題名（和文） 破骨細胞骨吸収におけるミトコンドリア形態変化の機能解析

研究課題名（英文） Functional and morphological analysis of mitochondria in osteoclastic bone resorption

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

骨吸収のメカニズムとミトコンドリア形態変化の関係を明らかにするため、ミトコンドリアの分裂・融合に関与するGTPaseであるDrp1の活性をコントロールすることにより、破骨細胞性骨吸収におけるミトコンドリアの分裂・融合反応の意義を検討した。ミトコンドリア形態変化を制御する分子であるDrp1の野生型およびドミナントネガティブ型変異体Drp1^{K38A}をアデノウイルスを用いて破骨細胞に過剰発現させたところ、Drp1^{K38A}を過剰発現させた破骨細胞において、延命に明らかな変化はみられなかったものの、細胞骨格の変化が見られ、骨吸収機能が低下傾向となった。ミトコンドリアの分裂・融合のバランスが、破骨細胞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）：

To explore the relationship between osteoclastic bone resorption and mitochondrial morphology, we constructed adenoviruses carrying wild type Drp1 or dominant negative form of Drp1 (Drp1^{K38A}, a point mutation at Lys-38 to Ala). Infection of AxDrp1^{K38A} did not have any effect on osteoclast survival. However, the expression of Drp1^{K38A} caused cytoskeletal disorganization of osteoclasts and suppressed pit-forming activity of the cells in vitro. These results suggest a potential application of mitochondrial fission to control osteoclastic bone resorption.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3500000	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)、4) 抗アポトーシス分子であるBcl-xLの破骨細胞特異的ノックアウトマウスの解析から、Bcl-xLが破骨細胞の延命を強力に促進するにもかかわらず、骨吸収機能を低下させるという矛盾した機能を持つこと(Iwasawa et al. J Clin Invest. 119:3149-59, 2009)、などを明らかにしてきた。

最近、Bcl-xLの下流にミトコンドリアを分裂させるダイナミン様タンパクDrp1 (Dynamin-related protein 1)が存在しており(Li et al. PNAS 2008)、さらにはBcl-xLがミトコンドリア量 (Mitochondrial Biomass)を増加させる(Berman et al. JCB 2009)とい

う知見も報告された。破骨細胞の延命を強力に促進するにもかかわらず、骨吸収機能を低下させるという矛盾したBcl-xLの機能の分子メカニズムを解く鍵がミトコンドリアの分裂・融合・バイオマスの変化にあるのではないかと注目した。

2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリア形態変化を制御する分子であるDrp1の野生型 (wild type: WT) の遺伝子を非増殖型アデノウイルスに組み込む。さらにはポイントミューテーションでドミナントネガティブ型とした変異体 (Drp1^{K38A}) もアデノウイルスに組み入れ、これらアデノウイルスを用いて破骨細胞に過剰発現させ、それらの分子が実際に破骨細胞の骨吸収機能を制御しているかどうかを確認する。ミトコンドリアと骨吸収メカニズムの関連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

ミトコンドリアの形態調節に関与するDrp1, Mfn1, Mfn2は、分子内に共通してGTP加水分解能を持つドメイン(GTPase)を有し、その加水分解時に獲得されるエネルギー差を利用し、形態の調節に機能していると考えられている。その根拠として、これらGTPase活性部位に突然変異が導入されると、表現型としてミトコンドリアの形態異常が確認されている。Drp1, Mfn1, Mfn2のGTPase結合部位に変異を入れると、ドミナントネガティブ型として働く。本研究では、これら遺伝子の野生型 (Drp1^{WT}) のみならず、点変異でドミナントネガティブ型としたDrp1^{K38A}を組み込んだアデノウイルスを作製する。Drp1^{WT} およびDrp1^{K38A}を組み込んだアデノウイルスを感染させ、ミトコンドリアの分裂促進あるいは分裂抑制によって破骨細胞の機能が変化するかどうかを検討する。マウスから採取した破骨細胞の骨吸収機能は、象牙質(dentine slice)上に破骨細胞を培養し、破骨細胞がdentine slice表面の吸収した面積(吸収窩)を測定することにより評価する。カラーゲンゲル上で骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養を行い、十分量の破骨細胞を形成させ、検討を行う。これら破骨細胞のミトコンドリアの形態をMitoGreen染色により評価する。その他、これら破骨細胞を用いて、細胞骨格の評価をアクチン染色にて、また破

骨細胞の自発的アポトーシスへの影響を Survival assay にて評価する。

4. 研究成果

(1) Drp1^{WT} および Drp1^{K38A} を組み込んだアデノウイルスの作製

我々はレポーター遺伝子である GFP と目的遺伝子をそれぞれ独立に発現する GFP-trackable アデノウイルスベクターに myc-tagged Drp1^{WT} および myc-tagged Drp1^{K38A} を組み込んだ。このアデノウイルスシステムを用いた場合、GFP 陽性の破骨細胞の割合は、感染させたアデノウイルスの量に比例し、MOI (multiplicity of infection = 1 細胞あたりの感染粒子数) :100 で 85% 程度の破骨細胞が GFP 陽性であった。Ax Drp1^{WT}、AxDrp1^{K38A} を MOI:100 で感染させた破骨細胞において十分量の目的タンパクの発現を確認することができた (図 1)。

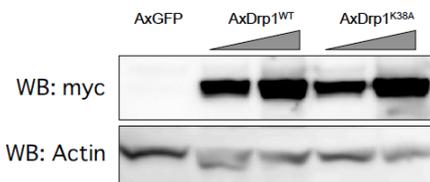


図 1. AxDrp1^{WT} および AxDrp1^{K38A} の破骨細胞での発現

(2) ミトコンドリアの携帯変化は破骨細胞の生存に影響を及ぼさない

我々は次に Drp1^{WT}、AxDrp1^{K38A} の感染が、破骨細胞の生存に与える影響を調べた。AxGFP、AxDrp1^{WT}、あるいは AxDrp1^{K38A} を MOI:100 で感染させた破骨細胞を 0.1% コラゲナーゼ/0.2% ディスパーゼ処理にて骨芽細胞を除去することにより純化し、さらに 10% FBS を含む α MEM でインキュベートすることにより破骨細胞の生存率を評価した。骨芽細胞除去後、AxGFP を感染させた細胞と AxDrp1^{K38A} を発現させた細胞では、経時的な生存率に大きな差がなかった (図 2)。AxDrp1^{WT} では、survival に延長傾向がみられたが、それほど dramatic ではなかった。このことから、破骨細胞の生存においてミトコンドリアの形態変化が重要な役割を果たしていないことが示唆された。

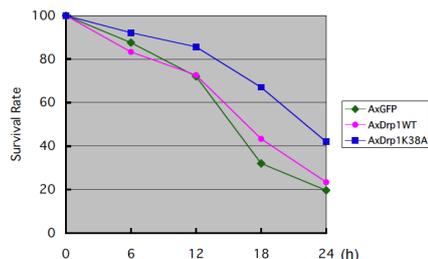


図 2. AxDrp1^{WT} および AxDrp1^{K38A} を感染させた破骨細胞の延命曲線

(3) ミトコンドリア形態変化は破骨細胞の骨吸収機能活性化に影響を及ぼす

我々は次にミトコンドリア形態変化が破骨細胞の骨吸収機能において重要な役割を果たしているかどうかを検討した。破骨細胞の骨吸収能は象牙切片上に形成された吸収窩の面積を計測することにより定量化した。吸収窩アッセイを 12 時間で行い、破骨細胞 1 個当たりの吸収窩面積を算出することにより比較検討した。図 3 に見られるように、OCL の骨吸収機能は、AxDrp1^{K38A} によりコントロールの 25% ほどに有意に抑制され、ミトコンドリア形態が骨吸収を制御するシグナルに重要な役割を果たしていると考えられた。

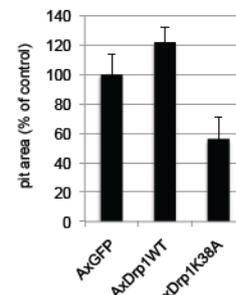


図 3. AxDrp1^{WT} および AxDrp1^{K38A} を感染させた破骨細胞の骨吸収機能アッセイ

現在、AxMfn1 および AxMfn2 を作製し、ミトコンドリア融合の面から、ミトコンドリア形態と骨吸収機能の関係を解析中である。

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 18 件)

- 1) Muraki S, Tokimura F (他8名、7番目): Incidence and risk factors for radiographic lumbar spondylosis and lower back pain in Japanese men and women: the ROAD study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Jul;20(7):712-8. 査読有 doi: 10.1016/j.joca.2012.03.009
- 2) Muraki S, Tokimura F (他8名、7番目): Physical performance, bone and joint diseases, and incidence of falls in Japanese men and women: a longitudinal cohort study. *Osteoporos Int*. 2012 Mar 21. [Epub ahead of print] 査読有 doi: 10.1007/s00198-012-1967-0
- 3) Muraki S, Tokimura F (他8名、7番目): Incidence and risk factors for

- radiographic knee osteoarthritis and knee pain in Japanese men and women: a longitudinal population-based cohort study. *Arthritis Rheum.* 2012 May;64(5):1447-56. 査読有 doi: 10.1002/art.33508
- 4) Miyazaki T, Iwasawa M (他7名、1番目): Intracellular and extracellular ATP coordinately regulate the inverse correlation between osteoclast survival and bone resorption. *J Biol Chem.* 2012 Nov 2;287(45):37808-23. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M112.385369
- 5) Ishigami A, Miyazaki T (他6名、3番目): Two novel sandwich ELISAs identify PAD4 levels and PAD4 autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2012 Sep 18. [Epub ahead of print] 査読有
- 6) Mori S, Miyazaki T (他7名、6番目): 3,4-Diaminopyridine improves neuromuscular transmission in a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 2012 245:75-8. 査読有 DOI: 10.1016/j.jneuroim.2012.02.010
- 7) Mori S, Miyazaki T (他11名、5番目): Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis. *Am J Pathol.* 2012 180:798-810. 査読有 DOI: 10.1016/j.jneuroim.2012.02.010
- 8) Yoshimura N, Tokimura F (他 12 名、12 番目): Reference values for hand grip strength, muscle mass, walking time, and one-leg standing time as indices for locomotive syndrome and associated disability: the second survey of the ROAD study. *J Orthop Sci.* 2011 Nov;16(6):768-77. 査読有 doi: 10.1007/s00776-011-0160-1
- 9) Yamada K, Tokimura F (他 3 名、3 番目): Are bone and serum cefazolin concentrations adequate for antimicrobial prophylaxis? *Clin Orthop Relat Res.* 2011 Dec;469(12):3486-94. 査読有 doi: 10.1007/s11999-011-2111-8
- 10) Muraki S, Tokimura F (他 11 名、9 番目): Independent association of joint space narrowing and osteophyte formation at the knee with health-related quality of life in Japan: a cross-sectional study. *Arthritis Rheum.* 2011 Dec;63(12):3859-64. 査読有 doi: 10.1002/art.30641
- 11) Muraki S, Tokimura F (他 12 名、10 番目): Health-related quality of life in subjects with low back pain and knee pain in a population-based cohort study of Japanese men: the Research on Osteoarthritis Against Disability study. *Spine* 2011 Jul 15;36(16):1312-9. 査読有 doi: 10.1097/BRS.0b013e3181fa60d1
- 12) Nojiri H, Miyazaki T (他 11 名、6 番目): Cytoplasmic Superoxide Causes Bone Fragility Owing to Low-Turnover Osteoporosis and Impaired Collagen Cross-Linking. *J Bone Miner Res* 2011 26: 2682-94 査読有 DOI: 10.1002/jbmr.489
- 13) Muraki S, Tokimura F (他 12 名、10 番目): Association of radiographic and symptomatic knee osteoarthritis with health-related quality of life in a population-based cohort study in Japan: the ROAD study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010 Sep;18(9):1227-34. 査読有 doi: 10.1016/j.joca.2010.06.001
- 14) Muraki S, Tokimura F (他 12 名、10 番目): Impact of knee and low back pain on health-related quality of life in Japanese women: the Research on Osteoarthritis Against Disability (ROAD). *Mod Rheumatol.* 2010 Oct;20(5):444-51. 査読有 doi: 10.1007/s10165-010-0307-5
- 15) Mori S, Tokimura F (他 8 名、4 番目): Cooperative effect of serum 25-hydroxyvitamin D concentration and a polymorphism of transforming growth factor-beta1 gene on the prevalence of vertebral fractures in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Metab.* 2010 Jul;28(4):446-50. 査読有 doi: 10.1007/s00774-009-0147-6
- 16) Doi T, Miyazaki T (他 13 名、2 番目): Neutrophil CD64 expression as a

diagnostic marker for local infection and crystal-induced arthritis. *Mod Rheumatol* 2010;20(6):573-9. 査読有り doi: 10.1007/s10165-010-0322-6

- 17) Miyazaki T and Tanaka S (1 番目): Regulation of apoptosis and activity of the osteoclast. *Immun., Endoc. & Metab. Agents in Med. Chem.* 2010 10:100-107 査読有り DOI:http://dx.doi.org/10.2174/187152210793176974
- 18) Shigemoto K, Miyazaki T. (他 3 名、ラスト): Muscle weakness and neuromuscular junctions in aging and disease. *Geriatr Gerontol Int* 2010; 10: 137 - 147. 査読有り DOI: 10.1111/j.1447-0594.2010.00608

[学会発表] (計 15 件)

- 1) Fukunaga, T., Kubo, S., Mori, S., Miyazaki, T., Higami, Y. and Shigemoto, K. : Muscle fiber type specific pathology in aging mouse. 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012. 12. 11-14
- 2) 福永大地, 森秀一, 久保幸穂, 中山亮, 村瀬尚哉, 宮崎剛, 樋上賀一, 重本和宏: 老齢マウスの筋繊維タイプ特異的な筋萎縮の病態解明 第 32 回日本基礎老化学会大会。千葉県船橋, 2012. 7. 26-27
- 3) Mori, S., Kubo, S., Akiyoshi, T., Yamada, S., Miyazaki, T., Hotta, H., Desaki, J., Kishi, M., Konishi, T., Maruyama, N. and Shigemoto, K. : A novel murine model of myasthenia gravis with MuSK antibodies. 12th International conference on myasthenia gravis and related disorders, New York, 2012. 5. 21-23
- 4) Miyazaki T, Mori S, Shigemoto K, Larsson N, Nakamura T, Kato S, Nakashima T, Takayanagi H, Tanaka S: Maintenance of mitochondrial DNA copy number is essential for osteoclast survival and bone resorption. 1st Bio-Rheumatology International Congress Tokyo 8th GARN meeting Tokyo. Maihama, 2011. 11. 14-16
- 5) 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

- 6) 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: スーパーオキシサイドディスムターゼ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
- 7) 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.
- 8) 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: スーパーオキシサイドディスムターゼ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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 森川大智, 野尻英俊, 斎田良知, 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
- 12) Saita Y, Nojiri H, Tsuda C, Miyazaki T, Morikawa D, Kaneko K, Shimizu T: 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

- 13) 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
- 14) Saita Y, Nojiri H, Tsuda C, Miyazaki T, Morikawa D, Kaneko K, Shimizu T: 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
- 15) 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

2010年度のみ（2011～12年連携研究者）

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

(3) 連携研究者

2011～12年年度（2010年のみ研究分担者）

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