

## 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 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791771

研究課題名（和文）：アポトーシス抑制遺伝子 Bcl-X<sub>L</sub> の骨の形成及び維持における機能解明研究課題名（英文）：The role of anti-apoptotic Bcl-X<sub>L</sub> in bone formation and maintenance of bone mass

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）：

本研究において、骨芽細胞特異的にBcl-X<sub>L</sub>を過剰発現させたマウスは骨芽細胞のアポトーシス抑制により、10週齢時で骨量が増加し、老齢期では長管骨海綿骨骨量減少の抑制による骨量維持が認められた。近年の高齢化社会では、骨粗鬆症による骨量減少が大きな社会問題になっているが、将来的にはBcl-X<sub>L</sub>が骨粗鬆症治療に対するターゲットになることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we generated transgenic mice with osteoblasts that express anti-apoptotic BCL-X<sub>L</sub>. In BCL-X<sub>L</sub> transgenic mice, bone volume was increased at 10 weeks of age and recognized maintenance of the bone volume at aging mice. In the recent aging society, bone volume decrease by the osteoporosis becomes the big social problem, therefore Bcl-X<sub>L</sub> may become the target for the osteoporosis treatment in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：骨芽細胞, アポトーシス, Bcl-X<sub>L</sub>, 骨形成

## 1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞は、間葉系幹細胞から分化した後、成熟しながら骨基質蛋白を産生、自ら産生した骨基質に取り込まれ骨細胞へと最終分化する。この間、骨芽細胞の50-70%がアポトーシスによって死滅すると推定されている(Jilka, R.L et al. J. Bone Miner. Res. 13: 793-802, 1998.)。また、性ホルモンの欠乏・

グルココルチコイドの過剰投与・加齢による骨量の減少は、骨芽細胞のアポトーシスが原因であることや(Kousteni S, et al. Cell 104(5): 719-730, 2001. O' Brien CA, et al. Endocrinology 145(4):1835-1841, 2004)、PTH(parathyroid hormone)やビスフォスフォネート、カルシトニンは骨芽細胞のアポトーシスを抑制することによって骨量を増加させることが報告されている(Stanislaus D,

et al. Bone 27(2): 209-218, 2000. Gohel A, et al. Endocrinology 140(11): 5339-5347, 1999. Plotkin LI, et al. J Clin Invest 104(10): 1363-1374, 1999. )。アポトーシスの促進あるいは抑制に関しては様々な因子が報告されており、アポトーシスを抑制する因子としてBcl-2(B-cell lymphoma 2), Bcl-X<sub>L</sub>(B-cell lymphoma-extra large), Mcl-1(myeloid cell leukemia sequence 1)が知られている。

## 2. 研究の目的

近年の高齢化社会では骨粗鬆症による骨折が健康寿命を縮め、医療・介護費の増大や家族内の介護問題等、大きな社会問題となっている。私は、骨芽細胞のアポトーシスを抑制し骨量の増加を図る目的で本研究を構想した。そこで、6週齢野生型マウス長管骨骨芽細胞分画からtotal RNAを抽出し、アポトーシス抑制に関するBcl-X<sub>L</sub>とBcl-2の発現レベルをRealtime PCRで比較すると、Bcl-X<sub>L</sub>の発現レベルがBcl-2より10倍高値であった。さらに、骨芽細胞系細胞MC3T3-E1におけるRNAプロテクションアッセイの結果、Bcl-2よりBcl-X<sub>L</sub>の方が内在性の発現レベルが高く、dexamethasone投与でMC3T3-E1にアポトーシスを誘導すると、Bcl-2の発現はほとんど変化せずBcl-X<sub>L</sub>の発現が上昇すると報告されている(C. C. Chua et al. Biochimica et Biophysica acta 1642: 79-85, 2003)。これらの結果より、骨芽細胞ではBcl-X<sub>L</sub>がアポトーシス抑制として主に働いていることが示唆されたため、私は骨芽細胞におけるBcl-X<sub>L</sub>のgain of functionとloss of functionの両モデルマウスの表現型解析を行い、Bcl-X<sub>L</sub>の骨の形成及び維持における機能を解明し、骨芽細胞におけるBcl-X<sub>L</sub>の骨形成・維持における役割を明らかにする目的で本研究を推進した。

## 3. 研究の方法

骨芽細胞におけるBcl-X<sub>L</sub>のgain of functionとloss of functionの両モデルマウスの、骨芽細胞の増殖・分化・アポトーシス、骨基質産生、骨形成・吸収、破骨細胞数について表現型解析を行った。gain of functionのモデルマウスは、成熟骨芽細胞に発現する2.3kb Coll1a1プロモータ直下にヒトBcl-X<sub>L</sub>翻訳領域のcDNAを結合したものを過剰発現させたマウス(以下Bcl-X<sub>L</sub> tgと表記する)であり、このマウスは当講座で作製されている。loss of functionのモデルマウスは、骨芽細胞特異的Bcl-X<sub>L</sub>コンディショナルノックアウトマウス(以下、Bcl-X<sub>L</sub> cKOと表記する)であり、

Bcl-X<sub>L</sub> flox/floxマウス(以下Bcl-X<sub>L</sub> flox/floxと表記する)と骨芽細胞特異的Cre過剰発現マウス(以下2.3kb Coll1a1 Cre tgと表記する)を交配させることによって得ることが出来る。これらのマウスも当講座において樹立されている。

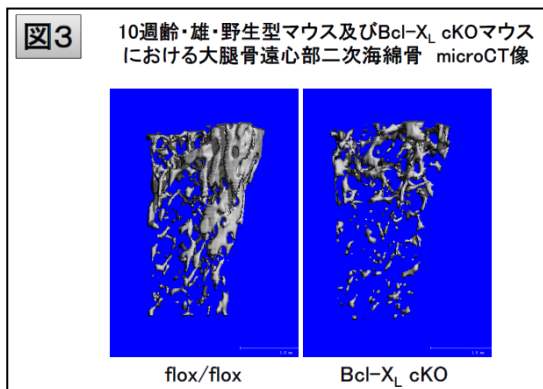
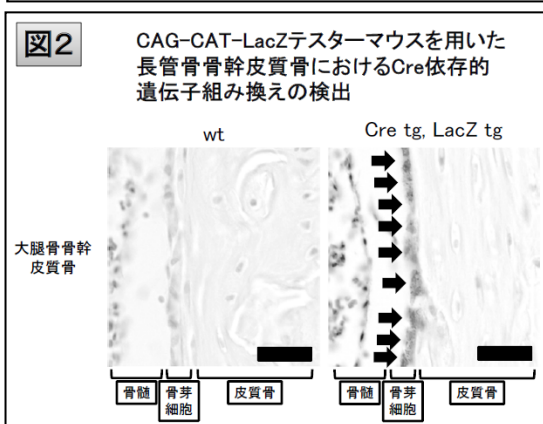
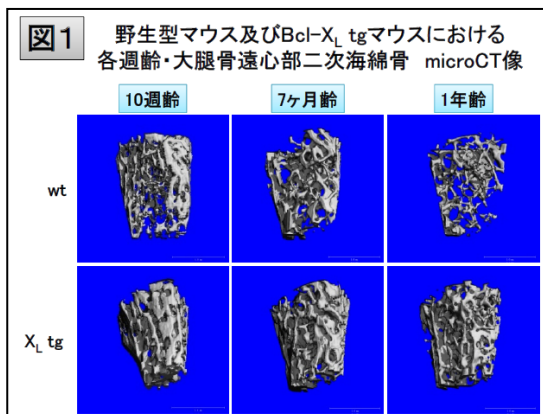
さらに、Bcl-X<sub>L</sub> tgおよびBcl-X<sub>L</sub> cKOの新生仔頭蓋冠由来初代骨芽細胞の培養を行い、増殖・分化を検討するとともに、初代骨芽細胞と野生型マウスの骨髓細胞との共培養により破骨細胞誘導能を検討した。これらのin vivo、in vitroの結果を総合し、Bcl-X<sub>L</sub>の骨形成・維持における役割を明らかにした。

## 4. 研究成果

平成22年度はマウスの表現型解析を主に行った。Bcl-X<sub>L</sub> tgの大腿骨においてmicroCT解析を行った結果、Bcl-X<sub>L</sub> tgでは10週齢より大腿骨遠心部の海綿骨骨量が野生型マウスと比較し有意に増加しており、7ヶ月齢および1年齢においてもその骨量は維持されていた(図1)。Bcl-X<sub>L</sub> cKOは、Bcl-X<sub>L</sub> flox/floxと2.3kb Coll1a1 Cre tgを交配させることによって得られる。Creリコンビナーゼの発現部位を検討するために、2.3kb Coll1a1 Cre tgをCAG-CAT-LacZテスターマウスと交配させ、得られた2.3kb Coll1a1 Cre tg, CAG-CAT-LacZ tgのダブルtgマウスの長管骨をβ-gal染色すると、骨芽細胞特異的にβ-galの染色が認められ、Creリコンビナーゼは骨芽細胞特異的に発現していることが認められた(図2)。Bcl-X<sub>L</sub> cKOは野生型マウスと比較し体長や体重は変わらないにもかかわらず、microCT解析において大腿骨遠心部の海綿骨骨量が有意に減少していた(図3)。

Bcl-X<sub>L</sub> tg, Bcl-X<sub>L</sub> cKOにおける骨量の増減がどのような機序で起こっているのか解析するために(1)BrdU染色およびTUNEL法による2週齢大腿骨遠心部一次海綿骨領域骨芽細胞の増殖及びアポトーシスの検討(2)in situ hybridizationによるI型コラーゲン、オステオポンチン、オステオカルシン、Runx2、Osterix等のmRNAの発現局在の検討(3)10週齢大腿骨における骨形態計測、について検討を行った。その結果、Bcl-X<sub>L</sub> tgは骨芽細胞のアポトーシスが野生型マウスと比較して有意に抑制されていた。骨形態計測では骨量が増加していたが、骨芽細胞の機能に関しては野生型マウスと変わらなかった。破骨細胞の数や吸収能も野生型マウスと変わらず、Bcl-X<sub>L</sub> tgは骨芽細胞のアポトーシスの抑制により骨芽細胞数が増加し、骨量が増加・維持されるものと考えられた。それに対し、Bcl-X<sub>L</sub> cKOは骨芽細胞のアポトーシスが野生型マウスと比較して有意に増加しており、骨

形態計測では骨量の減少が認められた。骨芽細胞の機能に関しては野生型マウスと変わらなかったが、破骨細胞の数や吸収能が野生型マウスと比較して亢進しており、Bcl-X<sub>L</sub> cKOでは、骨芽細胞数の減少と吸収の亢進によって骨量が減少するものと考えられた。



平成 23 年度はBcl-X<sub>L</sub> tgの新生仔頭蓋冠由来初代骨芽細胞の解析を主に行った。またBcl-X<sub>L</sub> cKOは、産まれてくる新生仔のうちcKOマウスの割合が低い上にCreリコンビナーゼの発現が低かったため、Bcl-X<sub>L</sub>を欠損した十分な数の新生仔頭蓋冠由来初代骨芽細胞を得ることが難しかった。そのため、Bcl-X<sub>L</sub> flox/floxマウスの新生仔頭蓋冠由来初代骨芽細胞にアデノウィルスを用いてCreリコンビナーゼを発現させることにより、野生型に

対してBcl-X<sub>L</sub>の発現レベルが3割程の細胞を得た。Bcl-X<sub>L</sub> tgの新生仔頭蓋冠由来初代骨芽細胞は培養下で分化誘導を行うと、野生型に対して、分化誘導開始から3日後でアルカリフォスファターゼの染色性が若干亢進しており、1週間後にKossa染色を行うと石灰化結節が多かった。この結果より、培養下ではBcl-X<sub>L</sub> tgの骨芽細胞はアポトーシスが抑制されることによって細胞密度が亢進し、分化が促進することが考えられた。Bcl-X<sub>L</sub> flox/floxマウスの新生仔頭蓋冠由来初代骨芽細胞にアデノウィルスでCreリコンビナーゼを発現させ、培養下で観察を行うと、アルカリフォスファターゼの染色性が低下し、Kossa染色による石灰化結節の数も減少していた。これらの結果から、培養条件下ではBcl-X<sub>L</sub>の発現の多寡により骨芽細胞の分化に影響が出ることが認められた。

平成 22 年度、平成 23 年度の結果を総合すると、骨芽細胞に発現するBcl-X<sub>L</sub>はアポトーシスを抑制し骨芽細胞の生存に重要な役割を果たしていることが考えられた。本研究において骨芽細胞特異的にBcl-X<sub>L</sub>を過剰発現させたマウスでは、10週齢時で骨量が増加し、老齢期では長管骨海綿骨骨量減少の抑制による骨量維持が認められたことから、将来的にはBcl-X<sub>L</sub>が骨粗鬆症治療に対するターゲットになることが考えられた。

## 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 6 件)

1. OBIF, an osteoblast induction factor, plays an essential role in bone formation in association with osteoblastogenesis. Mizuhashi K, Kanamoto T, Ito M, Moriishi T, Muranishi Y, Omori Y, Terada K, Komori T, Furukawa T. Dev Growth Differ. 2012 Mar 15. doi: 10.1111/j.

2. SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. Yoshida CA, Komori H, Maruyama Z, Miyazaki T, Kawasaki K, Furuichi T, Fukuyama R, Mori M, Yamana K, Nakamura K, Liu W, Toyosawa S, Moriishi T, Kawaguchi H, Takada K, Komori T. PLoS One. 2012;7(3):e32364. Epub 2012 Mar 2.

3. Overexpression of Bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and induces osteocyte apoptosis. Moriishi T, Maruyama Z, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Kitaura H, Ohnishi H, Furuichi T, Kawai Y,

Masuyama R, Komori H, Takada K, Kawaguchi H, Komori T. PLoS One. 2011;6(11):e27487. Epub 2011 Nov 17.

4. Early onset of Runx2 expression caused craniosynostosis, ectopic bone formation, and limb defects. Maeno T, Moriishi T, Yoshida CA, Komori H, Kanatani N, Izumi S, Takaoka K, Komori T. Bone. 2011 Oct;49(4):673-82. Epub 2011 Jul 23.

5. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 induces bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis. Wang Y, Liu W, Masuyama R, Fukuyama R, Ito M, Zhang Q, Komori H, Murakami T, Moriishi T, Miyazaki T, Kitazawa R, Yoshida CA, Kawai Y, Izumi S, Komori T. Bone. 2012 Jan;50(1):409-19. Epub 2011 Jul 23.

6. Comparative morphology of the osteocyte lacunocanalicular system in various vertebrates. Cao L, Moriishi T, Miyazaki T, Iimura T, Hamagaki M, Nakane A, Tamamura Y, Komori T, Yamaguchi A. J Bone Miner Metab. 2011 Nov;29(6):662-70. Epub 2011 Apr 19.

[学会発表] (計2件)

1. c f m 1, 2はマウス椎間板の発達維持に必須である 日本分子生物学会年会プログラム・要旨集 (Web) 巻:34th 頁:WEB ONLY 1P-0122 2011

2. 骨芽細胞分化における抗アポトーシス分子 Bcl-2 の役割 第28回日本骨代謝学会学術集会学術集会プログラム抄録集, p209 2010

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし