

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592231

研究課題名(和文) 転写抑制因子 Blimp1 によるエピジェネティック制御を介した破骨細胞分化制御機構

研究課題名(英文) Regulation of osteoclastogenesis by transcriptional repressor Blimp1 via epigenetic regulation

研究代表者

宮内 芳輝 (Miyuchi, Yoshiteru)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：90445411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞は骨吸収能を有する生体唯一の細胞であることから、その制御は骨粗鬆症等の治療標的となり得る。我々は転写抑制因子である B lymphocyte induced maturation protein 1 (Blimp1) が破骨細胞分化促進に必須であること、また、Blimp1 欠損マウスは胎生致死であるが、アダルトにおいて Cre/loxP system により Blimp1 を欠損させた場合は、致命的な副作用は認めず、破骨細胞分化の著しい抑制と骨量の増大を認めた。このことから、Blimp1 はアダルトにおいて骨量減少性疾患の良い治療標的となり得ることが明らかとなった (J Biol Chem 2012)。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts are unique bone resorbing cells, and thus are therapeutic targets to treat bone diseases such as osteoporosis. We found that B lymphocyte induced maturation protein 1 (Blimp1), a transcriptional repressor, was required for osteoclastogenesis. Although Blimp1-null mutant mice are embryonic lethal, Blimp1 conditional knockout at an adult stage by a Cre/loxP system did not promote lethal adverse effects in mice, while resulted in significant inhibition of osteoclast formation with increased bone mass. Thus, Blimp1 was considered as a therapeutic target to treat skeletal diseases such as osteoporosis (J Biol Chem 2012).

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：破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨の恒常性は、骨を形成する骨芽細胞と、骨を吸収する破骨細胞との絶妙なバランスの上に規定されており、そのバランスの破綻によっては骨粗鬆症等の疾患が発症する。閉経後の骨粗鬆症では、破骨細胞の活性が骨芽細胞に対して相対的に優位になるため、骨量が減少する。このことから、破骨細胞は骨粗鬆症治療の重要な標的となる。破骨細胞分化は、分化に必須のサイトカインである receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) の発見以降、急速に進んだものの、以前不明な点も多いのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、破骨細胞分化について転写抑制因子である B Lymphocyte Induced Maturation Protein 1 (Blimp1) を介した破骨細胞分化の制御機構ならびに治療標的としての可能性について解析することを目的とする。Blimp1 の遺伝子欠損マウスは胎生致死であることから、アダルトにおける Blimp1 の骨における役割についても明らかにする。

3. 研究の方法

Blimp1 の flox マウスと、全身性に、かつ誘導性に Cre を発現する Mx Cre マウスを交配し Blimp1 cKO マウスを作製する (Mx Cre/Blimp1 cKO)。このことにより、コンベンショナルなノックアウトでは胎生致死になることを避け、アダルトにおける Blimp1 の機能を解析できる。Mx Cre/Blimp1 cKO は *in vivo* においては 8 週令において polyIpolyC の連続注射により Mx プロモーターの活性化から Cre の発現を誘導することで、Blimp1 をアダルトにおいてノックアウトする。このマウスの骨の表現系を DEXA 法による骨密度解析や骨形態計測、組織解析等によってアダルトにおける Blimp1 の機能解析を行う。また、*In vitro* においては 8 週令の Mx Cre/Blimp1 cKO の骨髓細胞を採取し、macrophage colony stimulating factor (M-CSF) で 3 日間培養することで破骨細胞の前駆細胞を誘導する。この際、インターフェロンを添加することで Mx プロモーターの活性化から Cre の発現を誘導することで、Blimp1 をノックアウトする。この破骨細胞前駆細胞を回収し、M-CSF と RANKL で培養することにより破骨細胞分化を誘導し、TRAP 染色および破骨細胞特異的分子群 (nuclear factor of activated T cells 1, NFATc1; Cathepsin K; dendritic cell specific transmembrane protein, DC-STAMP) に対する realtime PCR で分化を評価する。

4. 研究成果

in vivo でアダルトにおいて Blimp1 を欠損させると、骨密度が有意に上昇した。この際、組織的解析ならびに骨形態計測による解析を行ったところ、bone volume per tissue volume (BV/TV)、trabecular thickness (Tb.

Th)、trabecular number (Tb.N) などの骨量増加を示すパラメーターがいずれも有意に上昇し、number of osteoclast per bone perimeter (N.Oc/B.Pm)、osteoclast surface per bone surface (Oc.S/BS)、eroded surface per bone surface (ES/BS) などの破骨細胞の分化や骨吸収のパラメーターは著しく抑制されていた。一方で、Blimp1 のコンベンショナルなノックアウトから想定される致死的な副作用等は認めなかった。また、Blimp1 は B 細胞が抗体産生細胞である形質細胞へと分化する際に必須の機能を発揮することが報告されていたが、Mx Cre/Blimp1 cKO は Blimp1 のノックアウト後においても B 細胞における IgM の産生には影響を見いださなかった。このことから、発達期においてはノックアウトによって致死となる Blimp1 もアダルトにおいては、極めて骨に特異的な機能を有することが明らかとなり、骨量増加のための治療標的となることが明らかとなった。

また、Blimp1 の破骨細胞分化における機能については *in vitro* の分化解析によって、Mx Cre/Blimp1 cKO 由来の破骨細胞前駆細胞において Blimp1 を欠損させると著しい破骨細胞分化障害を来すことが明らかとなった。ちなみに、Col1a1 Cre マウスを使って、骨芽細胞特異的に Blimp1 を欠損マウスを作製したところ、骨密度には変化を認めなかったことから、Blimp1 は骨芽細胞ではなく、破骨細胞において機能し、その分化調節から骨量を調整していることが明らかとなった。

以上の解析から、Blimp1 が骨量を増加する上で極めて有望な治療標的であることが明らかとなった。また、コンベンショナルなノックアウトマウスが致死となることで、アダルトにおける治療標的として考えにくかった分子群も、アダルトにおける治療標的となり得ることも示すことができた。

Blimp1 がアダルトにおける骨量減少疾患の新たな治療標的となり得ることは、世界に先駆けて報告できた内容であり、今後は Blimp1 を抑制する低分子化合物などによる創薬化が期待される。

以上の内容は、日本骨代謝学会における口頭発表の他、Journal of Biological Chemistry 誌に論文として報告している。

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 7 件)

1. Miyauchi Y, Sato Y, Kobayashi T, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Miyamoto K, Tando T, Morioka H, Matsumoto M, Chambon P, Johnson RS, Kato S, Toyama Y, Miyamoto T. HIF1 α is required

- for osteoclast activation by estrogen deficiency in postmenopausal osteoporosis. Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 110, 2013: 16568-73. 査読あり . doi: 10.1073/pnas.1308755110.
2. Miyamoto H, Katsuyama E, Miyauchi Y, Hoshi H, Miyamoto K, Sato Y, Kobayashi T, Iwasaki R, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Fujie A, Hao W, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T. An essential role for STAT6-STAT1 protein signaling in promoting macrophage cell-cell fusion. J Biol Chem. vol. 287, 2012: 32479-84. 査読あり. doi: 10.1074/jbc.M112.358226.
 3. Miyauchi Y, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Hoshi H, Miyamoto K, Sato Y, Kobayashi T, Akiyama H, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T. Conditional inactivation of Blimp1 in adult mice promotes increased bone mass. J Biol Chem. vol. 287, 2012: 28508-17. 査読あり . doi: 10.1074/jbc.M112.356634.
 4. Yoshida S, Iwasaki R, Kawana H, Miyauchi Y, Hoshi H, Miyamoto H, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Nakagawa T, Miyamoto T. PDGFBB promotes PDGFR α -positive cell migration into artificial bone in vivo. Biochem Biophys Res Commun. vol. 421, 2012: 785-9. 査読あり. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.084.
 5. Hoshi H, Hao W, Fujita Y, Funayama A, Miyauchi Y, Hashimoto K, Miyamoto K, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Kitagawa K, Nakayama KI, Kawamoto T, Sano M, Fukuda K, Ohsawa I, Ohta S, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Miyamoto T. Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. J Bone Miner Res. vol. 27, 2012: 2015-23. 査読あり . doi: 10.1002/jbmr.1634.
 6. Miyamoto H, Suzuki T, Miyauchi Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Hoshi H, Hashimoto K, Yoshida S, Hao W, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Takeya M, Toyama Y, Miyamoto T. Osteoclast stimulatory transmembrane protein and dendritic cell-specific transmembrane protein cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells. J Bone Miner Res. vol. 27, 2012: 1289-97. 査読あり. doi: 10.1002/jbmr.1575.
 7. Miyamoto K, Yoshida S, Kawasumi M, Hashimoto K, Kimura T, Sato Y, Kobayashi T, Miyauchi Y, Hoshi H, Iwasaki R, Miyamoto H, Hao W, Morioka H, Chiba K, Kobayashi T, Yasuda H, Penninger JM, Toyama Y, Suda T and Miyamoto T. Osteoclasts are dispensable for haematopoietic stem cell maintenance and mobilization. J Exp Med. vol. 208, 2011: 2175-81. 査読あり. doi: 10.1084/jem.20101890.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 宮内芳輝、戸山芳昭、宮本健史、転写抑制因子 Blimp1 は骨代謝制御の分子標的である、第 29 回日本骨代謝学会学術集会、平成 23 年 7 月 28~30 日、大阪国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日：
国内外の別：

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
特になし

6．研究組織

(1)研究代表者
宮内 芳輝 (MIYAUCHI YOSHITERU)
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号：90445411