

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659707

研究課題名（和文）微小管制御による破骨細胞骨吸収分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of bone-resorption in osteoclasts through microtubule regulation

研究代表者

田中 栄 (TANAKA SAKAE)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：50282661

研究成果の概要（和文）：Akt による微小管制御を介した成熟破骨細胞の骨吸収分子メカニズムを解析した。Akt 阻害剤により破骨細胞の sealing zone 形成が阻害され、骨吸収活性が低下した。Akt 阻害剤は正常な微小管構造を破断し、安定した微小管を反映するアセチル化チューブリンを減少させた。一方、Akt の恒常活性では正反対の効果を得られた。Akt の恒常活性は EB1、APC、dynactin などの微小管結合蛋白の微小管結合を促進した。破骨細胞における Akt1 および Akt2 の欠損は APC と EB1 の結合を減少させ、sealing zone 形成の阻害と骨吸収活性の低下をもたらした。これらの変化は GSK-3 β の阻害剤で回復した。破骨細胞特異的 Akt1&Akt2 ダブルノックアウトマウスは骨吸収の低下による骨硬化を示した。これらの結果は、Akt が微小管結合蛋白の制御によって微小管の安定化に関与し、破骨細胞の骨吸収活性を調節していることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of Akt, a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase, in bone-resorbing activity of mature osteoclasts. Treatment with a specific Akt inhibitor disrupted sealing zone formation and decreased the bone-resorbing activity of osteoclasts. The normal microtubule structures were lost and the Akt inhibitor reduced the amount of acetylated tubulin, which reflects stabilized microtubules, whereas forced Akt activation by adenovirus vectors resulted in the opposite effect. Forced Akt activation increased the binding of the microtubule-associated protein APC, the APC-binding protein end-binding protein 1 (EB1) and dynactin, a dynein activator complex, with microtubules. Depletion of *Akt1* and *Akt2* resulted in a disconnection of APC/EB1 and a decrease in bone-resorbing activity along with reduced sealing zone formation, both of which were recovered upon the addition of LiCl, a GSK-3 β inhibitor. The *Akt1* and *Akt2* double knock-out mice exhibited osteosclerosis due to reduced bone resorption. These findings indicate that Akt controls the bone-resorbing activity of osteoclasts by stabilizing microtubules via a regulation of the binding of microtubule associated proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症や関節リウマチなどの疾患は破骨細胞による骨吸収の亢進が病態であり、破骨細胞の骨吸収の制御メカニズムの解明が、これら疾患に対する治療戦略の構築には不可欠である。

近年、破骨細胞におけるアクチン骨格の構成が微小管によってコントロールされることが明らかとなってきた (Jurdic P, et al. : *Eur J Cell Biol* 2006:195-202) が、破骨細胞における微小管制御メカニズムに関する研究は近年緒に就いたばかりであり、明らかとなっていない部分が多い。

我々のグループが並行して行っている研究 (代表者が分担者として参加している科学研究費補助金による研究: 基盤研究 (C) 22591679 「ビスフォスフォネートによる破骨細胞の細胞死誘導および骨吸収抑制メカニズムの解明」平成 22 年度、3 年間) において、Akt が破骨細胞の骨吸収において中心的な役割を果たしていることが示唆された。Akt は破骨細胞のアクチン骨格のみならず微小管構築に影響を与えており、微小管制御を介した骨吸収活性制御機構の存在が示唆された。

2. 研究の目的

Akt を中心とした破骨細胞の微小管骨格制御による骨吸収メカニズムを明らかにすることを目的とする。具体的なメインテーマは以下である。

- (1) 破骨細胞における微小管の細胞膜アンカリング機構関連因子の同定
- (2) 破骨細胞特異的 Akt1&Akt2 ダブルノックアウトマウスの解析

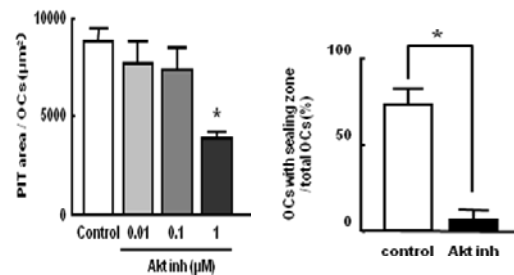
3. 研究の方法

- (1) Akt の微小管制御メカニズムに注目し、*in vitro* において破骨細胞の微小管の動態解析や、微小管結合蛋白の解析を行う。
- (2) *In vitro* において破骨細胞特異的 Akt1&Akt2 ダブルノックアウトマウス由来の破骨細胞の骨吸収活性、細胞骨格の解析を行う。
- (3) 破骨細胞特異的 Akt1&Akt2 ダブルノックアウトマウスの骨解析を行い、*in vivo* での成熟破骨細胞における Akt の働きを解析する。

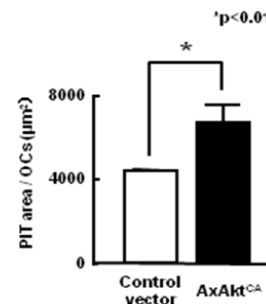
4. 研究成果

- (1) 成熟破骨細胞への Akt 阻害剤の投与は破骨細胞の sealing zone 形成を阻害し、骨

吸収活性を低下させた。このとき成熟破骨細胞に特異的な微小管の整列した配列構造は破断され、安定化した微小管を反映するアセチル化チューブリンの発現は低下していた。これらの結果は、Akt が破骨細胞の微小管骨格の構成と安定化に重要な役割を果たしていることを示唆した。



- (2) アデノウイルスを用いた遺伝子導入によって Akt を恒常的に活性化させると、破骨細胞の微小管骨格の安定化とともに、骨吸収活性の増加が生じた。



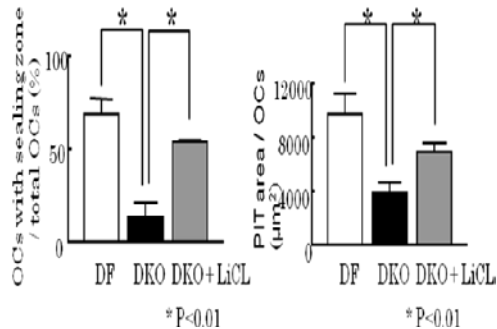
- (3) Akt の下流因子である GSK3 β の阻害薬 (LiCl, SB216763) 投与によって、微小管の安定化が生じた。

- (4) 微小管の脱重合剤であるノコダゾールで処置した破骨細胞の微小管骨格の再生過程をタイムラプスで観察した。Akt 阻害剤の存在下では微小管骨格の再構築の遅延が生じ、GSK3 β の阻害剤 LiCl の存在下では微小管骨格の再構築の促進が生じた。これらの結果は、微小管骨格の構築が Akt-GSK3 β 経路を介して制御されることを示唆した。

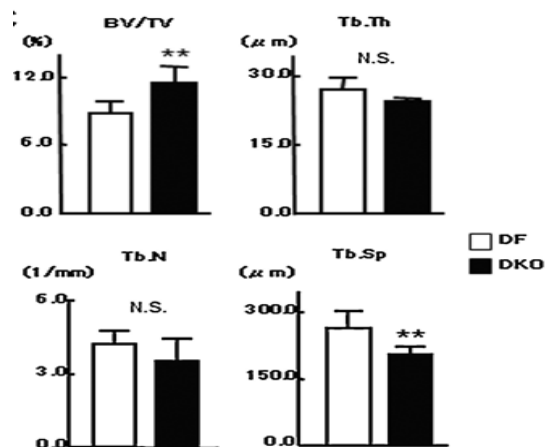
- (5) アデノウイルスを用いた遺伝子導入によって Akt を恒常的に活性化させ、微小管結合蛋白 (MAPs) の微小管との結合の変化を解析した。Akt を恒常的に活性化さ

せた破骨細胞ではコントロールと比較して、EB1、APC、p150GluedなどのMAPsの微小管結合の増加が生じた。また免疫沈降法により、Aktの恒常活性によってEB1とAPCの結合が増加することがわかった。

- (6) 破骨細胞特異的Akt1&Akt2ダブルノックアウトマウス由来の破骨細胞では、EB1とAPCの結合が低下していた。Sealing zone形成の減少と骨吸収活性の低下が生じたが、LiClの添加によって有意な回復が見られた。



- (7) 破骨細胞特異的Akt1&Akt2ダブルノックアウトマウスを作成し、12週令でマイクロCTによる骨解析および骨形態計測を行った。コントロール群と比較してノックアウトマウスでは、低代謝回転型の骨量増加を示した。ノックアウトマウスでは組織学的には骨表面から遊離した丸みを帯びた破骨細胞の増加が特徴であった。



以上の結果より、Aktが微小管結合蛋白の制御によって微小管の安定化に関与し、破骨細胞の骨吸収活性を調節していることが示唆された。

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1件)

(1) Matsumoto T, Nagase Y, Hirose J, Tokuyama N, Yasui T, Kadono Y, Ueki K, Kadowaki T, Nakamura K, Tanaka S
Regulation of bone resorption and sealing zone formation in osteoclasts occurs through protein kinase b-mediated microtubule stabilization.
J Bone Miner Res. 2013 May; 28(5): 1191-202
doi: 10.1002/jbmr.1844.

[学会発表] (計1件)

(1) Tanaka S, Tokuyama N, Matsumoto T, Kadono Y
Regulation of bone resorption and sealing zone formation in osteoclasts occurs through protein kinase b-mediated microtubule stabilization
Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research 2012, Minneapolis, Minnesota, USA

[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]

(1) ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 栄 (TANAKA SAKAE)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：50282661

(2) 研究分担者

門野 夕峰 (KADONO YUHO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70401065

安井 哲郎 (YASUI TETSURO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30583108

(3) 連携研究者

()

研究者番号：