

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592290

研究課題名(和文)骨代謝におけるメカノセンサー分子 p130Cas の機能解析

研究課題名(英文)Mechanosensor protein p130Cas in osteocytes is important for bone metabolism

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メカニカルストレスの受容から細胞内シグナルへの変換を担う分子であるp130Casに焦点をあて、in vivoでの解析を行うために、p130Cas floxマウスと骨細胞特異的にCreを発現するDmp1-Creマウスを交配させることにより、骨細胞特異的にp130Casを欠損させ、骨の解析を行った。骨細胞特異的p130Cas欠損マウスを10週齢にて、有意に骨量が減少していた。興味深いことに、骨形成パラメーターは大きな変化がなかったものの、骨吸収パラメーターは増加していた。メカノセンサーCasが骨代謝において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The adaptor molecule p130Cas, which is phosphorylated at focal adhesions upon extracellular matrix engagement, is involved in various cellular processes including migration, survival, transformation, and invasion.

To investigate the role of Cas in bone metabolism, we generated osteocyte-specific Cas conditional knockout (cKO) mice by mating Casflox/flox mice with Dmp1-Cre transgenic mice, in which the Cre recombinase gene was specifically expressed in osteocytes. The resulting Cas cKO mice exhibited a remarkable decrease in bone volume. Histomorphometric analysis of Cas cKO mice revealed a significant increase in the eroded surface/bone surface ratio, osteoclast surface, and osteoclast number. However, the bone formation parameters were equivalent to those in normal Casflox/flox littermates. Collectively, these findings suggest that the bone loss in Cas cKO mice was caused by increased bone-resorbing activity, rather than by decreased bone formation.

研究分野：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：メカニカルストレス 骨細胞

1. 研究開始当初の背景

日本はかつてない高齢社会を迎え、なかでも老化にともなう骨、関節、筋など運動器の機能低下に附随して生じる問題は、神経系の障害と共に高齢者の生活の質を著しく損なうため、大きな社会問題となっている。近年、高齢化社会を見据えて、健康寿命を少しでも長くしようと、運動器症候群：ロコモティブシンドロームという概念の定着を目指して様々な広報活動が行われている。さらに、ロコモーションチェック、ロコモーショントレーニングを学会でも推奨しているが、メタボリックシンドローム(内臓脂肪症候群)に比較すると、その科学的知見が少ないことが弱点となり、“ロコモ”は“メタボ”ほど一般社会に浸透していない。本研究では、運動などによるメカニカルストレス(力学的刺激)から骨量維持につながる詳細なメカニズムの解明を目指す。

生物は地球に住んでいる限り、重力に曝されている。この重力が効果を最大に発揮するのは、地上で生物が行動する場合である。水中では約1/6程度に減少し、睡眠や休息状態にあるときは、さらに重力の効果は減少する。寝たきり状態やギブスによる固定など、いわゆる、不動化状態が続く場合には、筋肉や骨格など運動にかかわる組織の主要部分に対する重力の効果は実質的にゼロに近くなるといわれている。すなわち、無重力に近い状況が作り出されていることになる。このような状態では、筋肉・骨ともに萎縮する。宇宙飛行士の骨量が宇宙滞在中に減少し、帰還一定期間後にはほぼ回復することもよく知られている。このことから、メカニカルストレスの持続的負荷が一定期間内に繰り返されることが、骨の構造と機能の維持に必要であることが示唆される。骨量は、骨吸収と骨形成のバランスにより維持されているが、メカニカルストレスの減少による骨萎縮(骨量減少・骨質低下)の詳細は不明な点が多い。

骨基質中に存在する骨細胞は、力学刺激の感知センサーとして働き、その情報を周囲の細胞に伝達することで、リモデリング活動を調整していると考えられている。メカニカルストレスに応答する組織は運動骨格系に限らず生体内に広く分布し、循環器系とくに血管や内皮細胞については多くの研究がある。これらの細胞がメカニカルストレスに応答する

機序には普遍性があると考えられるが、どの組織についてもその詳細は想像の域を出ない。本研究では、メカニカルストレスの受容から、細胞内シグナルへの変換過程で重要な役割を果たしている分子であるp130Casに注目する。

2. 研究の目的

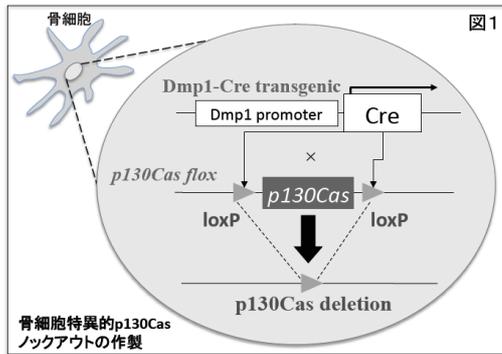
p130Casは、細胞接着斑の構成成分で、Srcファミリーキナーゼの基質タンパク質であり、p130Casのノックアウトマウスは心筋形成の異常により胎性致死となる。非リン酸化p130Casでは中央部の基質結合領域(SD: substrate domain)は折りたたまれた構造をとっており、細胞が物理的な力を受けた時、p130Cas分子もN末端とC末端に力を受けて引き延ばされ、C末に結合したSrcファミリーチロシンキナーゼによりSD領域がリン酸化され、シグナルを伝達するというものである(Sawada et al. *Cell* 127, 1015-1026, 2006)。

メカニカルストレスは、骨基質において骨芽細胞と骨細胞の無数に張りめぐらされた細胞性ネットワークにより感受される機構が推測されている。さらに、*in vivo*において骨小腔-骨細管中の組織液の流れ(液流動、fluid flow)を介して感受される可能性もある。細胞膜の伸展に対するstress-sensing proteinであるp130Casが骨細胞でどのような機能を担っているか非常に興味をもたれるところである。本研究では、メカニカルストレス感知と骨細胞p130Casの関連、さらには骨細胞から骨形成・骨吸収調節に関わる細胞間シグナルに関して検討する。

3. 研究の方法

p130Casは異なった組織や時期において多様な役割を果たし、単純なノックアウトでは、骨組織におけるその機能を解析しきれないので、本研究ではコンディショナルジーンターゲット法を用いる。骨細胞特異的な不活化をCre-loxPシステムを用いて行う。CreはバクテリオファージP1由来の38kDa蛋白で、リコンビナーゼのInt(Integrase)ファミリーに属する。この酵素は34bpのloxPサイトを認識して特異的にこの部位でDNAのリコンビネーションを起こす。Cre酵素を骨細胞特異的に発現させる方法としては、図1のように骨細胞特異的dentin matrix protein 1(Dmp1)プロモーターの制御下に

Cre 酵素を発現させたトランスジェニックマウスを用いることにより可能となる(*J Dent Res* 86:320-325, 2007)。この Dmp1-Cre マウスと p130Cas 遺伝子領域を挟みこむように loxP 配列を導入したマウス (p130Cas flox マウス) を用いて、p130Cas flox/flox Dmp1-Cre +/- マウス (p130Cas コンディショナルノックアウトマウス: p130Cas cKO マウス) を作製する (図1 参照)。

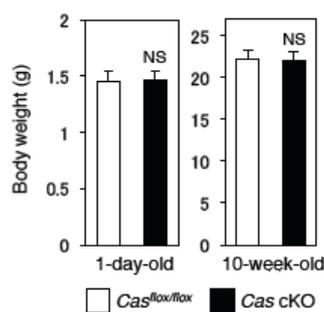


大腿骨や脛骨を取り出して、X線撮影を行う。骨の代謝機能を評価するために骨組織形態計測を行う。非脱灰薄切標本を用いて、骨構造に関するパラメーター、骨形成に関するパラメーター、骨吸収に関するパラメーターを計測する。計測には、脛骨近位部、大腿骨遠位部を用いる。骨量、類骨量、類骨面、類骨の厚さ、骨芽細胞面%、吸収面%、破骨細胞数、破骨細胞面%、骨石灰化速度、骨形成速度、などをコントロールマウスと比較する。

4. 研究成果

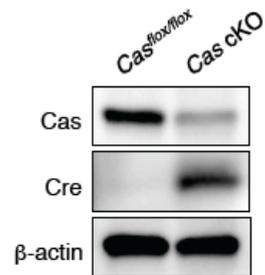
(1) 骨細胞特異的 Cas cKO マウスの作製

Cas cKO マウスは、メンデルの法則にしたがって生まれ、外見上大きな問題なく成長した。右図のように、1日齢でも、10週齢でもコントロールマウス (Cas^{flox/flox}) との間に体重差はなかった。また、生殖能力も維持していた。



実際に Cas の発現が抑制されているかを確認するために、下肢の骨を採取し、骨髓腔をフラッシュアウトしたあと、小さな歯間ブラシを用いて骨髓腔を掃除したあとの皮質骨から採取したタンパク質を電気泳動し、ウェスタンブロッティングを行ったところ、Cas

cKO マウスから採取した皮質骨からは、Cre の発現が見られ、逆に p130Cas の発現はコントロールマウス (Cas^{flox/flox}) と比較して低下していた (右図)。



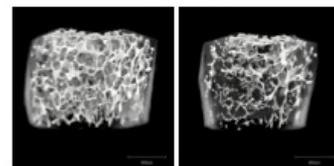
(2) 大腿骨の解析

Cas cKO マウスから下腿の骨を採取し、レントゲン撮影を行ったところ、大腿骨遠位部にて、骨量の低下が観察された。マイクロCTでは、右図のように、

骨細胞特異的
対照マウス Cas KOマウス



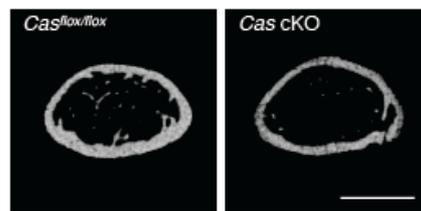
X線写真



マイクロCT

さらに骨梁の減少が明らかとなった。興味深いことに、骨形成パラメーターは大きな変化がなかったものの、骨吸収パラメーターは増加していた。

さらに、マイクロCTにて皮質骨解析を行ったところ、Cas cKO マウスにて皮質骨幅の低下や porosity (多孔性) の増加が見られ、皮質骨でも骨吸収の増加を示唆する結果がみられた。



これらのことから、メカノセンサーCasが骨代謝において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらには、骨細胞に細胞伸展ストレスやシェアストレスを加えたところ、RANKL の発現に有意な変化があったため、骨細胞においてメカノセンサー p130Cas の下流で RANKL の発現が制御されることがわかってきた。今後、p130Cas と RANKL の間をつなぐシグナル伝達経路の詳

細を明らかにしていく予定である。

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 12 件)

- 1) Ando Y, Miyazaki T: Very rare variant of popliteal artery entrapment syndrome due to an enlarged fabella associated with severe knee osteoarthritis: first case report. *J Orthop Sci* 2015 in press 査読有
- 2) Hiroshi Kiyomatsu, Yusuke Oshima, Takashi Saitou, Tsuyoshi Miyazaki, Atsuhiko Hikita, Hiromasa Miura, Tadahiro Iimura, and Takeshi Imamura: Quantitative SHG imaging in osteoarthritis model mice, implying a diagnostic application. *Biomedical Optics Express*. 2015 Jan 8;6(2):405-20. doi: 10.1364/BOE.6.000405. eCollection 2015 Feb 1. 査読有
- 3) A review of denosumab for the treatment of osteoporosis. Miyazaki T, Tokimura F, Tanaka S. Patient Preference Adherence. 2014 Apr 8;8:463-71. doi: 10.2147/PPA.S46192. eCollection 2014. Review. 査読有
- 4) 澤田泰宏、宮崎剛、原田伊知郎: 骨代謝を制御する「善玉」メカニカルストレスと「悪玉」メカニカルストレス 実験医学2014 Vol.32 No.7 (増刊) 1093-1099. 査読無
- 5) Masuda H, Hirose J, Omata Y, Tokuyama N, Yasui T, Kadono Y, Miyazaki T, Tanaka S: Anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 regulates cell viability and bone-resorbing activity of osteoclasts. *Bone*. 2014 Jan;58:1-10. doi: 10.1016/j.bone.2013.09.020. Epub 2013 Oct 2. 査読有
- 6) Ishigami A, Uchida Y, Miyazaki T, Handa S, Choi EK, Kim YS, Kasahara Y, Maruyama N: Two novel sandwich ELISAs identify PAD4 levels and PAD4 autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2013 23:794-803. Doi: 10.1007/s10165-0120-0748-0 査読有
- 7) 宮崎剛: ミトコンドリアによる破骨細胞機能制御 Clin Calcium. 2013 Nov;23(11):1577-83. doi: CliCa131115771583. 査読無
- 8) 宮崎剛、澤田泰宏: 骨粗鬆症研究と治療法の進歩 日本老年医学会雑誌 2013 50:130-134 査読無
- 9) 宮崎剛、森秀一、重本和宏: サルコペニア発症のメカニズム 腎と骨代謝 2013 26:99-107. 査読無
- 10) Miyazaki T, Iwasawa M, Nakashima T, Mori S, Shigemoto K, Nakamura H, Katagiri H, Takayanagi H, Tanaka S: 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. doi: 10.1074/jbc.M112.385369. 査読有
- 11) Mori S, Kishi M, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Konishi T, Maruyama N, Shigemoto K: 3,4-Diaminopyridine improves neuromuscular transmission in a MuSK antibody-induced mouse model of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2012 245:75-8. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2012.02.010 査読有
- 12) Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Hotta H, Desaki J, Kishi M, Konishi T, Nishino Y, Miyazawa A, Maruyama N, Shigemoto K: 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. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.10.031. ISSN: 0002-9440. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- 1) Miyazaki T, Harada I, Sawada Y. MECHANOSENSOR PROTEIN P130CAS IN OSTEOCYTES IS IMPORTANT FOR BONE METABOLISM. The 2015Ageing Summit. London, UK. 2015.11-12.
- 2) Hiroshi Kiyomatsu, Takeshi Imamura,

Atsuhiko Hikita, Tadahiro Iimura,
Tsuyoshi Miyazaki, Yusuke Ohsima,
Takashi Saitou, Hiromasa Miura.
Evaluation of cartilage based on second
harmonic generation microscopy.
Thirty-sixth Annual Meeting of the
American Society for Bone and Mineral
Research. Houston, Texas, USA.
2014.9.12-15

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

宮本 恵成 (MIYAMOTO YOSHINARO)

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：10345217