

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659829

研究課題名(和文)非荷重時の破骨細胞形成を調節するPdk4の新規基質の同定および機能解析

研究課題名(英文)Identification and functional analysis of a novel substrate of Pdk4 in the regulation of osteoclastogenesis in the unloaded condition

研究代表者

小守 壽文(Komori, Toshihisa)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00252677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：骨量は運動によって増加し、長期の臥床、神経損傷による不動、宇宙での微小重力状態環境下では減少し、いわゆる廃用性骨粗鬆症を呈する。メカニカルストレスは、骨内に埋め込まれた骨細胞ネットワークが感知し、骨表面の骨芽細胞・破骨細胞にシグナルを伝達し、骨量を調節している。Pdk4は、ミトコンドリアでのエネルギー産生を抑制する酵素であるが、非荷重時に成獣マウスの骨芽細胞・骨細胞に誘導された。Pdk4ノックアウトマウスでは、非荷重時の骨量減少が起こらず、成獣マウスの非荷重時の骨量減少に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Bone mass is increased by exercise and reduced by long-term bed rest, immobilization caused by nerve injury, and microgravity in the space. These non-weight bearing conditions cause disuse osteoporosis. Osteocyte network, which is embedded in bone, is responsible for the sensing of mechanical stress and the transduction of the signal to osteoblasts and osteoclasts in the bone surface, and regulates bone mass. Pdk4, which is a kinase that inhibits energy production in mitochondria, was upregulated in osteoblasts and osteocytes in the unloaded condition of adult mice. Bone loss in the unloaded condition was not caused in Pdk4 adult knockout mice, indicating that Pdk4 is involved in bone loss in the unloaded condition of adult mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨細胞 破骨細胞 廃用性骨粗鬆症 メカニカルストレス Pdk4

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨量は運動によって増加し、長期の臥床、神経損傷による不働、宇宙での微小重力状態環境下では減少し、いわゆる廃用性骨粗鬆症を呈する。廃用性骨粗鬆症は、高齢化に伴う長期臥床患者や脳血管障害による下肢の麻痺患者等の増加により、急激に増加している。骨形成と骨吸収はカップリングし、バランスが保たれているが、非荷重状態では、骨形成は抑制され、骨吸収が亢進し、骨量が減少する。このような力学的負荷あるいは非荷重をいかに感知し、骨量が制御されるかが長年議論されてきた。骨の中でネットワークを形成する骨細胞は、メカニカルストレスの感知および伝達に最も適した構造として考えられてきた。骨細胞は、2つのネットワークを形成している。骨の中で骨細管中を通る骨細胞突起がギャップ結合によって連結し、骨全体に細胞間ネットワークを形成している。骨芽細胞突起と骨細胞突起もギャップ結合で連結しており、この細胞間ネットワークは骨表面の骨芽細胞に及んでいる。もう一つは、骨小腔と骨細管の傍骨細胞間隙を用いた細胞外ネットワークであり、これは骨表面あるいは骨内の血管周囲へ開口している。この2つのネットワークを介して、血管および骨髄から酸素、栄養、生存シグナルを得る他、骨表面の骨芽細胞への様々なシグナルの伝達および液性因子の骨外への放出を行っていると考えられる。骨細胞ネットワークは、メカニカルストレスを感知、骨芽細胞・破骨細胞にシグナルを伝達し、骨量を調節していると考えられている (Bone 2008, 42:606-615)。骨細胞は非荷重時にスクレロスタチンの発現を増加させ、Wnt シグナルを抑制することにより骨芽細胞機能を抑制していることが報告されている (J Bone Miner Res 2008, 23:860-869)。しかし、実際に骨細胞がメカニカルストレスを感知し、骨量を調節していることを証明することは困難であった。それは、骨細胞機能を欠失させようと骨細胞死を誘導すると、骨小腔内に存在する骨細胞はマクロファージに貪食されずにネクローシスを起こし、破骨細胞分化・活性化を引き起こし、骨吸収を惹起するからである。これは、細胞内の免疫惹起分子が骨細管を通して、骨表面に放出されることにより、マクロファージを活性化、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1等の産生・放出が促され、破骨細胞の分化・活性化、骨吸収が促進されることによる。

(2) 我々の作製した骨芽細胞特異的 BCL2 トランスジェニックマウスでは、骨細胞突起および骨細管の数が著減し、骨細胞死が起こるが、骨細管の減少のために、ネクローシスによる骨吸収の亢進が起こらない。したがって、細胞間ネットワークと細胞外ネットワークの両者が破綻しており、骨細胞機能を調べるのに適したマウスである。このマウスの解析により、骨細胞ネットワークは、生理的条件下では骨形成を軽度抑制、骨吸収を軽度促進

していること、非荷重状態になると、この機能は増強され、骨形成を強く抑制、骨吸収を強く促進することが明らかになった。これらの制御の一部は、骨細胞における Sost 発現および骨芽細胞における Rankl 発現調節によっていた。さらに骨細胞ネットワークによる骨量調節に関わる分子を同定する目的で、BCL2 トランスジェニックマウスと野生型マウスで、非荷重時に誘導される遺伝子をマイクロアレイにて比較、野生型マウスで誘導され、骨細胞ネットワークが破綻したマウスでは誘導されない遺伝子を探索、Pdk4 を同定した。Pdk4 は、糖代謝でのエネルギー産生を抑制する酵素である。Pdk4 ノックアウトマウスを作製したが、野生型マウスに見られる非荷重時の骨吸収亢進が、ノックアウトマウスでは見られなかった。Pdk4 は、非荷重時に骨細胞からのシグナルによって骨芽細胞に発現誘導され、RANKL 発現を誘導、破骨細胞分化を促進させることを明らかにした (Bone 50:409-419, 2012)。また、Pdk4 は、破骨細胞前駆細胞でも発現、破骨細胞分化に関わっていることも明らかにした。さらに、Pdk4 は、PDC (pyruvate dehydrogenase complex) の抑制を介さずに破骨細胞分化を促進していることも明らかにしている。

## 2. 研究の目的

Pdk には Pdk1, 2, 3, 4 があるが、骨格筋や心筋で強く発現しており、筋での糖代謝によるエネルギー産生においてのみ研究されてきた分子群である。これらは、主に飢餓時に誘導され、TCA サイクルの入り口で、ピルビン酸脱水素酵素複合体 (pyruvate dehydrogenase complex, PDC) をリン酸化、抑制することにより、ピルビン酸のアセチル CoA への変換を抑制、ミトコンドリアでのエネルギー産生を抑制する。Pdk のうち Pdk4 が最も骨に発現が高く、Pdk4 のみが、非荷重時に骨芽細胞、骨細胞および骨髄細胞に発現誘導されることも明らかにした。しかし、PDC リン酸化に対する Pdk4 アンタゴニストは、破骨細胞分化に影響を与えなかった。したがって、Pdk4 はこれまでの通説とは異なり、PDC 以外のリン酸化基質を持つ可能性を示唆している。さらに、Pdk4 にはミトコンドリア移行シグナルを持たないアイソフォームが存在し、これが骨芽細胞に発現していることも見だしている。したがって、Pdk4 は、ミトコンドリアだけでなく細胞質にも存在して、RANKL 発現誘導に関わる分子のリン酸化を行っている可能性が示唆された。研究期間内に Pdk4 によってリン酸化される新たな基質を同定、その分子が Pdk4 によるリン酸化によって、RANKL 発現および破骨細胞分化を促進させるか明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 非荷重と Pdk4 の相関

8週齢の野生型マウスを3日、7日、14日

尾部懸垂し、骨芽細胞および骨細胞分画より RNA を抽出、リアルタイム RT-PCR で Pdk 発現をコントロール群（非尾部懸垂群）と比較した。また、14 週齢の野生型マウスを 2 週間尾部懸垂し、同様に Pdk 発現をコントロール群と比較した。14 週齢の野生型および Pdk4 ノックアウトマウスを用い、1 週間の尾部懸垂を行い、骨量の変化をマイクロ CT で、それぞれのコントロール群と比較した。

#### (2) 酵母ツーハイブリッド法による Pdk4 結合タンパク質の同定

Pdk4 の全長 cDNA あるいはその cDNA 断片を LexA(DNA 結合ドメインとして使用)に結合させ、Western blot により bait としての融合蛋白の安定性を調べた。初代培養骨芽細胞より cDNA ライブラリーを構築、B42 (転写活性化ドメインとして使用)を含む prey ベクターに挿入した。酵母を用いた two hybrid system により、結合蛋白を同定した。結合は、pull down assay で確認した。

#### (3) ミトコンドリアターゲティングシグナル配列変異 Pdk4 過剰発現細胞の作製

C 末端に GFP を付加した Pdk4 の全長 cDNA およびミトコンドリアターゲティングシグナル配列を変異させた DNA を用いて発現ベクターを作製した。これらを骨芽細胞株に導入、ミトコンドリアマーカで免疫染色後、蛍光顕微鏡にて GFP の局在を観察した。また、Western blot にて発現レベルを確認した。

#### (4) リン酸化タンパク質の定量

デキサメサゾンによって Pdk4 を誘導するため、野生型および Pdk4 ノックアウトマウス由来の初代培養骨芽細胞にデキサメサゾンを添加した。これらの細胞より蛋白質を抽出、トリプシン消化した。iMAC 法によりリン酸化ペプチドを濃縮、液体クロマトグラフィーにて分離後、TOF MS/MS による質量分析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 非荷重と Pdk4 の相関

8 週齢の野生型マウスを 3 日、7 日、14 日間尾部懸垂を行い、骨芽細胞分画、骨細胞分画での Pdk4 発現を検討した。8 週齢マウスでは、コントロール群（非尾部懸垂群）と比較し、骨芽細胞分画、骨細胞分画での Pdk4 mRNA の発現上昇は、尾部懸垂群 3 日、7 日、14 日ともに認められなかった。次に 14 週齢マウスを用いて同様の実験を行った。14 週齢マウスでは、骨芽細胞分画、骨細胞分画ともに、コントロール群と比較し、尾部懸垂群 3 日、7 日、14 日いずれにおいても Pdk4 の発現上昇を認めた（図 1）。16 週齢の 7 日間の尾部懸垂でも尾部懸垂群はコントロール群と比較し、Pdk4 の発現上昇を認めており、骨細胞の成熟が Pdk4 の発現誘導に必要であることが示唆された。

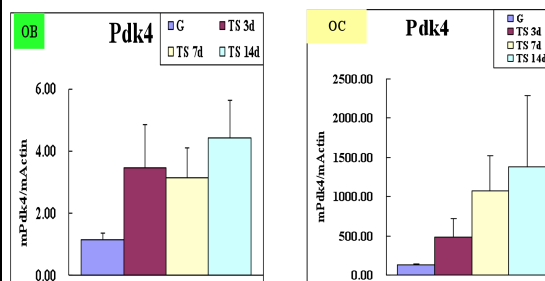


図 1 14 週齢野生型マウスの尾部懸垂 3 日、7 日、14 日後の骨芽細胞分画 (OB)、骨細胞分画 (OC) での Pdk4 の発現 (G: ground group, コントロール群; TS: tail suspension, 尾部懸垂群)

14 週齢野生型マウスおよび Pdk4 ノックアウトマウスを用いて 1 週間の尾部懸垂を行い、マイクロ CT で解析した。骨量、海面骨厚は野生型マウスで減少したが、Pdk4 ノックアウトマウスでは減少しなかった。16 週齢マウスでも同様の結果を得ており、14 週齢以降では、非荷重時の Pdk4 の発現上昇が骨量減少を引き起こす要因であることが示唆された。

#### (2) Pdk4 の基質タンパク質の探索

初代培養骨芽細胞より構築した cDNA ライブラリーを prey ベクターに挿入、Pdk4 の全長 cDNA を bait として、酵母ツーハイブリッド法を施行した。しかし、破骨細胞分化・活性化に関与する可能性のあるタンパク質は、同定されなかった。

ミトコンドリアターゲティングシグナル配列を変異させ、細胞質内の Pdk4 の濃度を上げを試みた。C 末端に GFP を付加した Pdk4 の全長 cDNA を用いて発現ベクターを作製、骨芽細胞株に導入した場合、ミトコンドリアに Pdk4 は局在していた。ミトコンドリアターゲティングシグナル配列に変異を導入した DNA を用いて GFP 融合発現ベクターを作製、骨芽細胞株に導入した場合、細胞質に GFP を検出できたが、発現レベルは低かった。そこで、野生型および Pdk4 ノックアウトマウス由来の初期培養骨芽細胞を用いて、リン酸化タンパク質を比較することにした。iMAC 法によりリン酸化ペプチドを濃縮、液体クロマトグラフィーにて分離後、TOF MS/MS による質量分析を行っているが、現在のところ、破骨細胞分化・活性化に関与する候補タンパク質は得られていない。

### 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 16 件)

Moriishi T, Kawai Y, Komori H, Rokutanda S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Asahina I, Komori T. Bcl2 deficiency activates FoxO

through Akt inactivation and accelerates osteoblast differentiation. PLoS One. 9(1): e86629. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0086629 (査読有) Mizuhashi K, Komori T, Furukawa, T(他7名、9番目). Filamin-interacting proteins, Cfm1 and Cfm2, are essential for the formation of cartilaginous skeletal elements. Hum Mol Genet. Vol.23, 2953-67,2014. (査読有)

Yoon WJ, Islam R, Cho YD, Woo KM, Baek JH, Uchida T, Komori T, van Wijnen A, Stein JL, Lian JB, Stein GS, Choi JY, Bae SC, Ryoo HM. Pin1-mediated Runx2 modification is critical for skeletal development. J Cell Physiol. Vol.228, 2377-85, 2013. (査読有)

Sato S, Hashimoto J, Usami Y, Ohyama K, Isogai Y, Hagiwara Y, Maruyama N, Komori T, Kuroda T, Toyosawa S. Novel sandwich ELISAs for rat DMP1: age-related decrease of circulatory DMP1 levels in male rats. Bone. Vol.57, 429-436, 2013. (査読有)

Ito K, Maruyama Z, Sakai A, Izumi S, Moriishi T, Yoshida CA, Miyazaki T, Komori H, Takada K, Kawaguchi H, Komori T. Overexpression of Cdk6 and Ccnd1 in chondrocytes inhibited chondrocyte maturation and caused p53dependent apoptosis without enhancing proliferation. Oncogene.Vol.33, 1862-71, 2013. (査読有)

Komori T. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. Cell Tissue Res. Vol.352, 191-198. 2013. (査読有)

Watanabe T, Komori T, Asahara H(他10名、11番目). MAML1 enhances the transcriptional activity of Runx2 and plays a role in bone development. PLoS Genet.9(1):e1003132. doi: 10.1371/journal.pgen.1003132. 2013. (査読有)

Moriishi T, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Maeno T, Kawai Y, Komori H, Komori T. Osteocyte network; a negative regulatory system for bone mass augmented by the induction of Rankl in osteoblasts and Sost in osteocytes at unloading. PLoS One. 7(6):e40143.doi:10.1371/journal.pone.0040143. 2012. (査読有)

Masuyama R, Mizuno A, Komori H, Kajiya H, Uekawa A, Kitaura H, Okabe K, Ohyama K, Komori T. Calcium/calmodulin-signaling supports TRPV4 activation in osteoclasts and regulates bone mass. J Bone Miner Res. Vol.27, 1708-1721, 2012. (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

小守壽文: “骨細胞ネットワークによるメカニカルストレス応答” 第55回歯科基礎医学学会学術大会・総会.(20130920-20130922). 岡山コンベンションセンター(岡山県)

小守壽文: “Roles of Cbfb in bone development during embryonic stage and after birth” The EMBO Workshop RUNX transcription factors in development and disease.(20130616-20130619). Wilsede,Germany.

小守壽文: “Osteocytes, Coordinator of the Bone” 2013 Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism. (20130502-20130505). Grand Hilton Seoul Hotel, Korea.

小守壽文: “Osteocyte network and mechanical stress” 第22回国際リウマチシンポジウム.(20130418-20130420). 国立京都国際会館(京都府)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 荷重感知遺伝子

発明者: 小守壽文

権利者: 長崎大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-138935

出願年月日: 2011年6月22日

国内外の別: 国内

取得状況(計 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

<http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/dokuji/kaihou-2/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小守 壽文 (Komori Toshihisa)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00252677

### (2) 研究分担者

森石 武史 (Moriishi Takeshi)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 20380983