

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790398

研究課題名(和文)骨の機械受容におけるインテグリンの生理機能

研究課題名(英文)Physiological function of Integrin in mechanical response of bone

研究代表者

兼子 佳子 (Kaneko, Keiko)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・運動器疾患研究部・研究員

研究者番号：60532976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞系列細胞、特に骨細胞は力学負荷受容細胞と考えられている。しかしその受容メカニズムの実態についてはほとんど明らかにされていない。インテグリン α -v 欠損骨芽細胞にシアストレスを負荷し、 α -v 下流に Src, p130Cas, JNK のリン酸化と、その結果として YAP/TAZ の核移行が誘導されることを明らかにした。さらに個体においてインテグリン α -v のメカニカルストレス応答機能を実証するために骨芽細胞系列特異的インテグリン α -v 欠損マウスを作製した。その前肢に強制負荷を加え SOST 遺伝子を readout として、インテグリン α -v がメカニカルストレスの受容に必須の生理機能を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Osteoblast lineage cells, especially osteocytes, are thought to be a primary mechanosensory cell in bone. However, the identity of the mechano-receptor and downstream mechano signaling pathways remain largely unknown. Using primary osteoblastic cells mechanically stimulated with fluid shear stress, an intracellular kinase cascade involving c-Src, p130Cas and JNK was identified the downstream of integrin α -v. Mice deficient in integrin α -v in the osteoblast lineage exhibited an impaired skeletal response to ulnar loading, in terms of Sost expression, pointing to the role of integrin α -v in mechanosensing in vivo. Thus, integrin α -v may be integral to a mechanosensing machinery in osteoblast lineage cells and involved in the activation of a Src-JNK-YAP/TAZ pathway in response to mechanical stimulation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：骨代謝 骨芽細胞 骨細胞 インテグリン 遺伝子改変マウス シグナル伝達 細胞骨格 シアストレス

1. 研究開始当初の背景

寝たきりや微小重力空間における長期滞在によって骨量が減少することが知られている。これは重力や歩行により骨に荷重が負荷されることが骨の恒常性維持に必須であることを示している。骨が力学負荷に反応するメカニズムとして、骨表面の骨芽細胞や骨基質内に埋没している骨細胞によるメカニカルストレス受容がある。特に、骨細胞は、骨芽細胞が自ら産生した細胞外基質に埋まり終末分化した細胞である。神経細胞のように骨細胞同士は無数の長い突起を伸ばし、骨格全体にネットワークを形成していることから、ネットワーク内での細胞間情報伝達が骨代謝の恒常性維持に必須な役割を担っていると想定される。近年、骨細胞特異的に発現する DMP1 や SOST のような遺伝子が明らかになり、DMP1 プロモーターを用いることによって骨細胞における遺伝子発現の制御を行うことが可能となった。このシステムを利用して、研究代表者が所属する研究室では、骨細胞が骨代謝の司令塔の役割を果たすこと、とりわけメカニカルストレス感知に主要な働きをすることを *in vivo* で証明した (Cell metabolism 2007)。

骨芽細胞および骨細胞上に発現する接着分子インテグリンは、そのリガンドが周囲の骨基質中に豊富に存在することから、*in vitro* の解析や数理モデルから、メカノセンサーの候補一つに考えられてきた。しかしながら個体レベルでは実証されていなかった。また、インテグリンは破骨細胞機能調節において盛んに研究されている一方、骨芽細胞や骨細胞におけるインテグリンの機能については十分に明らかにされてこなかったという経緯がある。そこで本研究では、インテグリン α_v flox マウスを用いて、骨芽細胞や骨細胞におけるインテグリンの機能解析を行った。

2. 研究の目的

本研究は、インテグリン α_v が生体内の骨芽細胞や骨細胞においてメカニカルストレス受容に関わるとの仮説を個体レベルで証明し、そのシグナル伝達メカニズムを明らかにすることが主な目的である。

3. 研究の方法

骨芽細胞系列におけるインテグリン α_v がメカニカルストレス受容に機能することを検証するために、インテグリン α_v flox マウスと Osx-Cre マウスを交配させ、骨芽細胞および骨細胞特異的にインテグリン α_v 発現欠損マウス (Δ OB/ Δ OB) を作製した。骨基質に埋没している骨細胞がその局在特性よりメカニカルストレス受容細胞と考えられているので、インテグリン α_v flox マウスと Dmp1-Cre マウスを交配させて、骨細胞特異的にインテグリン α_v 発現欠損マウスも作成し、骨細胞におけるインテグリン α_v 機能についても検証を行った。

検証は細胞レベルと個体レベルの双方で行った。細胞レベルでは、マウス頭蓋冠より単離した骨芽細胞系列細胞を用いた。メカニカルストレスの一種であるシアストレスにตอบสนองしてインテグリン α_v 下流で活性化するシグナルに注目するために、インテグリン α_v flox マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞に Cre recombinase を発現するアデノウイルスを感染させることによって、インテグリン α_v 欠損細胞を作製した。細胞の培養液を動かすことによって生じるシアストレスを負荷し、シアストレスにตอบสนองする細胞内シグナルの動態について検証を行った。また、個体レベルでは、マウスの前肢に強制的に負荷を加え、前肢尺骨におけるメカニカルストレス応答因子の動態について検証を行った。

4. 研究成果

細胞レベルでの検証では、メカニカルストレスの一種であるシアストレスにตอบสนองしてインテグリン α_v 下流で活性化するシグナルに注目した。インテグリン α_v flox マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞に Cre recombinase を発現するアデノウイルスを感染させ、インテグリン α_v を欠損させた細胞を作製した。インテグリン α_v 発現細胞ではシアストレス負荷によって Src, p130Cas, JNK のリン酸化が促進されたが、インテグリン α_v 欠損細胞ではそれらのリン酸化が抑制された。

近年、基質剛性にตอบสนองして YAP/TAZ の局在が細胞質から核へ移行することが報告されている。インテグリン α_v 発現細胞では、シアストレスにตอบสนองして YAP/TAZ の核への移行促進が観察された (図 1A)。しかしながら、インテグリン α_v 欠損細胞においてはその核移行が抑制された (図 1B)。また、YAP/TAZ の核内移行は標的遺伝子 ANKRD1、CTGF の発現を誘導することが知られている。実際コントロール細胞では、シアストレスにตอบสนองして ANKRD1、CTGF の発現が上昇した。しかしながら、インテグリン α_v 欠損細胞、

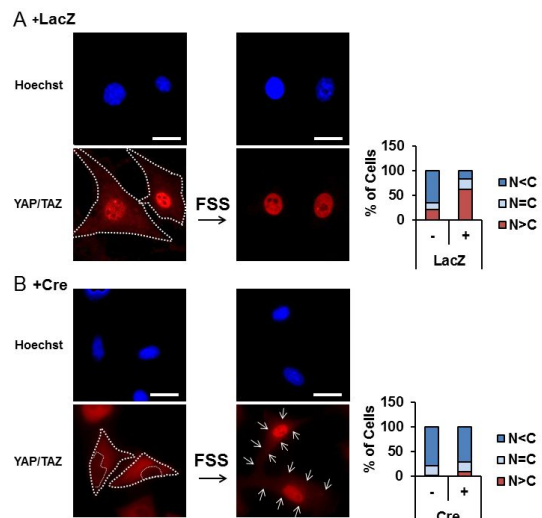


図1 インテグリン α_v 下流でYAP/TAZの局在が調節される

Src 欠損細胞、JNK 阻害剤存在下においては、シアストレス負荷により誘導される ANKRD1、CTGF の発現上昇が抑制された。以上をまとめると、インテグリン α_v を介してメカニカル応答にかかわる Src-p130Cas-JNK-YAP/TAZ という新たなメカニカルストレス伝達シグナルの存在を明らかにした(図2)。

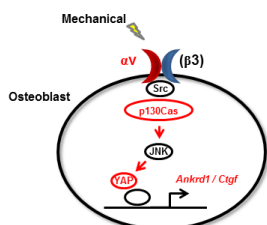


図2 インテグリン α_v はメカニカルストレス受容反応に含まれる

次に個体レベルでの検証では、骨芽細胞系列特異的インテグリン α_v 欠損マウス($\Delta OB/\Delta OB$)を作成して解析した。このマウスは、コントロールマウス($\Delta OB/+$)と比較して骨吸収マーカーである骨コラーゲン分解産物(CTX)の血清濃度が低下し、骨形成マーカーである血清オステオカルシンも低下していた。骨吸収低下と骨形成低下は、骨代謝回転が低下していることを示す(図3A)。また、マイクロCTによりマウス脛骨の3次元構造解析を行ったところ、低骨量傾向を示した(図3B)。さらに、骨細胞特異的にインテグリン α_v を欠損させたマウスでも同様に、骨吸収マーカーである CTX の低下傾向、骨形成マーカーである血清オステオカルシンの低下傾向、マイクロCTによるマウス脛骨の低骨量傾向を示した。

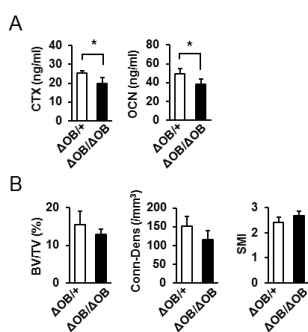


図3 骨芽細胞系列特異的インテグリン α_v ノックアウトマウスは低骨代謝回転を示す

個体レベルでのメカニカルストレス受容機構の分子メカニズムを明らかにするために、この骨芽細胞系列特異的インテグリン α_v 欠損マウス($\Delta OB/\Delta OB$)の前肢に強制負荷を行った。SOST は、古典的 Wnt シグナル伝達経路のアンタゴニストのひとつで、骨細胞が特異的に発現する。SOST 遺伝子は、メカニカルストレスに応答し、その発現が抑制されることが知られている。コントロールマウス

($\Delta OB/+$)の前肢に強制負荷すると前肢尺骨における SOST の発現は抑制されたが、インテグリン α_v 欠損マウス($\Delta OB/\Delta OB$)では、その発現抑制が見られなかった(図4)。以上から、インテグリン α_v が力学負荷に対する骨応答に必須の生理機能を果たしていると結論した。

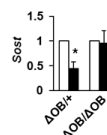


図4 骨芽細胞系列特異的インテグリン α_v ノックアウトマウスの前肢尺骨においてメカニカルストレス受容反応が抑制される

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 1 件)

1. Keiko Kaneko, Masako Ito, Yoshinori Naoe, Adam Lacy-Hulbert, Kyoji Ikeda. Integrin α_v in the mechanical response of osteoblast lineage cells. *Biochem and Biophys Res Commun.* 2014 May 447: 352-357.

[学会発表](計 2 件)

1. Keiko Kaneko, Masako Ito, Adam Lacy-Hulbert, Kyoji Ikeda. Integrin α_v and mechano signal transduction in osteoblast lineage cells. 第 86 回日本生化学大会、2013 年 9 月 11 日 (横浜)
2. Keiko Kaneko, Masako Ito, Adam Lacy-Hulbert, Kyoji Ikeda. Integrin α_v in the mechanical response of osteoblast lineage cells. 2013 ASBMR Annual Meeting, October 6, 2013, Baltimore (USA).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncgg.go.jp/department/bjd/bjd/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

兼子 佳子 (KANEKO, Keiko)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・研究員

研究者番号：60532976

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし