

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461355

研究課題名(和文) AKAP13を用いた骨代謝の新たな制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of bone metabolism by AKAP13

研究代表者

小出 尚史 (KOIDE, Hisashi)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30507223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：AKAP13は、機械刺激応答や女性ホルモン活性化など様々なシグナリングを統合するタンパクである。動物実験や細胞実験解析によって、AKAP13は、骨形成に関与することが判明した。実際、骨マーカー遺伝子発現解析結果や骨形成に重要な骨芽細胞の分化過程での同遺伝子発現解析結果から、AKAP13は骨芽細胞の分化の極初期の段階で重要な役割を担っており、骨形成機能発現や骨リモデリングのイニシエーショントリガーになっている可能性が示唆された。同遺伝子およびCo-factorの解析は、今後、新たな骨形成を介した骨粗鬆症治療薬開発に繋がるものとする。

研究成果の概要(英文)：AKAP13 is a protein that integrates various signaling such as mechanical stress and estrogen receptor activation. Analyses of animal and osteoblastic cells revealed that AKAP13 is involved in bone formation. AKAP13 plays an important role in the early stages of differentiation of osteoblasts, according to the expression analysis of the AKAP13 mRNA during differentiation of osteoblasts for bone formation, suggesting that AKAP13 may be an initiation trigger for osteogenic function and bone remodeling. We believe that analysis of AKAP13 and co-factor will lead to the development of new osteoporosis drugs the future.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 骨粗鬆症 骨リモデリング 骨形成

## 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、本邦で現在約1千万人が診断され、特に閉経後および高齢女性で最も重要な疾患の一つである。現在、我々が本疾患への治療として臨床上使用可能な薬剤は、ビスフォスフォネート、SERM、エストロゲン、抗RUNKL抗体などといった、主に骨吸収を抑制するものよりなり、骨形成を直接促す薬剤はこれまでのところ副甲状腺ホルモンに限られる。従って、同疾患の骨リモデリングを、骨吸収抑制に偏らずに正常に戻すためにも、骨形成を促進する薬剤の開発が急務であるといえる。これに付随して、メカニカルストレス刺激応答やエストロゲンの骨芽細胞に及ぼす機能などについては未解明な点も多く、骨形成の機序について完全には明らかにされたとはいえないのが現状である。

## 2. 研究の目的

我々は、これらの問題点に対して、Guanine nucleotide exchange factor (GEF)であり、リガンド依存性にエストロゲンやグルココルチコイド受容体作用を増強するといった、多彩な機能を有する protein kinase A-anchoring protein 13 (AKAP13)を用いて、骨形成作用の解明を目指したい。これまでの知見に基づけば、**AKAP13は、多数のシグナリングモジュールを統合し、コーディネートするように働くタンパクであり、以下に述べるように骨形成に関与する可能性が示された。**さらには、いくつかのヒトの疾患に関与していることがわかっており、これまで、乳がん、リンパ腫、前立腺がん、結腸直腸がん、アルツハイマー病、高血圧、食道がんでのAKAP13の関与を示す報告を認める。一方で、AKAPファミリーの1つであるAKAP11が、ヒトのゲノムワイド解析により椎体骨の骨密度に関連することが報告された。しかし、**まだAKAPの骨に対する影響について基礎研究レベルでの報告はなく、AKAP13の骨での役割の研**

## **究が、今後骨代謝の新たな制御機構の解明に非常に重要な意義を持つものと考えられた。**

## 3. 研究の方法

我々はAKAP13が、骨の成長、発達、メンテナンスにどのように影響を及ぼすかについて調べた。AKAP13のホモノックアウトマウスは胎生致死であるため、ヘテロノックアウトマウスを用いて解析を行った。

AKAP13のメッセージは、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞の存在する骨に発現しており、軟骨細胞を有する proliferative と hypertrophic ゾーンにおいては比較的発現であった。そして、大変興味深いことに、エックス線画像でヘテロマウスにおいて野生型と比較して骨密度の低下を認め、 $\mu$ CTの解析では20週のヘテロマウスで、野生型と比較して骨密度は低下、さらに、BV/TVとTrabecular Numberが有意に減少し(10.9%、14.0%、12.8%)、Trabecular Spacingが有意に増加しており(14.7%)、いわゆる骨粗鬆症様変化を示していた。10週のマウスでも同様の傾向が認められていたが、その傾向は20週のマウスにおいて強く示された。

骨密度の変化は、骨リモデリングの骨形成と骨破壊のバランスの均衡が破られたときに生じる。我々は、頭蓋骨で、破骨細胞の活性マーカーであるTRAP染色を行ったが、ヘテロマウスと野生型に差はみられなかった。一方、骨に沈着するテトラサイクリン、カルセインの二重染色による面積の計測により、ヘテロマウスで野生型と比較して皮質骨での骨形成の低下が明らかとなった。骨形成には、骨芽細胞数の変化および、骨マトリクス形成のための骨芽細胞における遺伝子発現や同タンパクの活性の変化が重要である。我々は、endoperiosteum上の骨芽細胞数を調べたところ、興味深いことにヘテロマウスで野生型に比較して減少していた。さらに、大腿骨および脛骨より抽出した Bone marrow

stromal cells (BMSCs)によって測定された Colony-forming unit fibroblast efficiency も減少を示した。一方、骨内遺伝子の発現変化を調べたところ、ヘテロマウスの大腿骨で、*Runx2* と alkaline phosphatase (*ALP*)の mRNA の発現低下を認めた。

以上より、**AKAP13 は、骨形成の初期の段階、すなわち骨髄間質細胞数に影響を与えるとともに、骨形成に関する骨芽細胞数の決定に関与し、さらに転写レベルで *Runx2* の発現を刺激し、その下流遺伝子を上昇させることにより骨形成を刺激している可能性が示唆され、AKAP13 が骨形成に重要な役割を担っていることが分かった**

本研究ではこれらの結果を踏まえ、既に我々が世界に先駆けて作成した AKAP13 の GEF 領域を loxp で挟んだ floxed マウスを用いて、osterix promoter 誘導性 CRE マウスを掛け合わせ、**AKAP13 を骨特異的にノックアウトしたマウスを作製し解析する**。未だ AKAP ファミリーの骨に対する影響について基礎研究レベルでの報告はなく、この AKAP13 の骨における役割の解明が、今後非常に重要な意義を持つものと考えられる。AKAP13 の骨への影響を足掛かりに、**骨エビジェネティクス制御機構を解明するとともに、新たな骨代謝制御因子・生理活性物質の探索、創薬基盤の開発、さらには新たな骨質評価マーカーの開発**を目指した。

#### 4. 研究成果

これまでの研究成果に、in vitro の解析を加えて、骨分野のトップジャーナルである Journal of Bone Mineral Research に AKAP13 の骨解析結果が採用された (Koide et al. J Bone Miner Res 2015)。

また、AKAP13 の、Col Type1a1Cre との骨特異的コンディショナルノックアウト (cKO)マウスを作製した。cKO マウスの解析では、一部顎骨に Anomaly を認めた。現在

までのところ、骨の表現型に関しては野生型と比較して変化を認めていない。これらの結果は、collagen Type 1a1 の誘導以前に AKAP13 が重要であることが示唆され、従ってこれまでの結果から示されたように、**RUNX2 の upstream において AKAP13 が関与している可能性、骨芽細胞分化の非常に初期の段階に重要である**可能性に矛盾しない結果であった。

さらに、我々は PKA 結合ドメイン、GEF ドメイン、Nuclear Receptor Interacting ドメインをそれぞれ欠失した Mutant structure を作成し、各々プラスミドを細胞に導入したところ、ALP mRNA はマウスおよびヒト AKAP13 では増加を示したものの、その他の機能ドメインをそれぞれ欠失させた mutant structure を導入してもその効果は減弱または認められなかった。従って、**AKAP13 の効果発現には各種機能ドメインの存在が重要**であることが示された。

また、RhoA の高発現実験を行ったところ、これまで Rho の骨への作用には controversial な結果が報告されているが、我々の系においては導入量に応じて ALP のメッセージは増加したが、AKAP13 のノックダウンによりそれらは減少し、RhoA を多く入れたときによりその効果が強くなることが示され、**AKAP13 の骨への作用は少なくとも Rho シグナルを介するものである**ことが示された。

現在、更なるノックアウトマウス解析に並行して、**in vitro の系で CRISPR CAS9 系を用いたノックダウン解析、これに FAK を介した Wnt シグナルへの影響の解析が進行中**であり、さらに、これらの実験系での遺伝子変化を RNA seq で解析し、epigenetics 解析も加えて、新たな骨形成に重要な co-factor を見出す予定である。

## 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1件)

Koide H, Holmbeck K, Lui JC, Guo XC, Driggers P, Chu T, Tatsuno I, Quaglieri C, Kino T, Baron J, Young MF, Robey PG, Segars JH. Mice Deficient in AKAP13 (BRX) Are Osteoporotic and Have Impaired Osteogenesis. J Bone Miner Res. 2015 Oct; 30(10):1887-95.doi:10.1002/jbmr.2534.

(査読有)

[学会発表](計3件)

1. 筋骨格系機能制御の解明と臨床応用の新機軸 AKAPにおける骨代謝制御 小出尚史、田中知明、横手幸太郎 第34回日本骨代謝学会学術集会 あり方委員会シンポジウム若手シンポジウム 内科系(招待講演) 2016年7月20日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
2. Mice Deficient in AKAP13 Are Osteoporotic and Have Impaired Osteogenesis Hisashi Koide, Kenn Holmbeck, Julian Lui, Paul H Driggers, Akitoshi Nakayama, Tiffery Chu, Ichiro Tatsuno, Tomoaki Tanaka, Koutaro Yokote and James H. Segars 2016 Endocrine Society's 98<sup>th</sup> Annual Meeting and Expo (国際学会) 2016年4月1日、Boston Convention and Exhibition Center (Boston, USA)
3. AKAP13の骨代謝制御を介した骨リモデリング調節機構、小出尚史、田中知明、横手幸太郎、第87回日本内分泌学会学術総会、2014年4月24日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

[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

千葉大学大学院医学研究院細胞治療内科学  
ホームページ上で研究内容と論文掲載。

<http://www.m.chiba-u.jp/class/clin-cell/biol/research/contents/endocrine.html#jump3>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小出 尚史(KOIDE, Hisashi)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30507223

### (2)研究分担者

田中 知明(TANAKA, Tomoaki)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 50447299

### (3)連携研究者

該当なし( )

研究者番号:

### (4)研究協力者

該当なし( )