

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670811

研究課題名(和文) Fkbp5ノックアウトマウスを用いた廃用性およびステロイド性骨粗鬆症の病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of disuse osteoporosis and steroid-induced osteoporosis using Fkbp5 knockout mice

研究代表者

小守 壽文 (KOMORI, Toshihisa)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：00252677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨細胞ネットワークが破綻した骨芽細胞特異的Bcl2トランスジェニック(tg)マウスを用いて、骨細胞ネットワークの機能を解明してきた。このマウスを用い、非荷重時に骨細胞ネットワークの存在下でのみ、骨芽細胞と骨細胞に発現誘導されるFkbp5(FK506 binding protein 5)を同定した。

Fkbp5は、ステロイドレセプターに結合するシャペロン分子の1つである。Fkbp5の骨における機能を明らかにするため、ノックアウト(Fkbp5^{-/-})マウスを作製した。Fkbp5^{-/-}マウスは、非荷重時およびグルココルチコイド投与時に野生型マウスと比較し、より強度の骨量減少を来した。

研究成果の概要(英文)：We are clarifying the functions of osteocyte network using osteoblast-specific Bcl2 transgenic mice, in which osteocyte network is completely disrupted. We identified Fk506 binding protein 5 (Fkbp5), which was induced in osteoblasts and osteocytes on unloaded condition in the presence of osteocyte network.

Fkbp5 is a chaperon molecule, which binds to steroid receptor. To investigate the functions of Fkbp5 in bone, we generated Fkbp5 knockout (Fkbp5^{-/-}) mice. Fkbp5^{-/-} mice showed more severe reductions of bone mass at unloaded condition and in the treatment of glucocorticoid as compared with those in wild-type mice.

研究分野：骨代謝学

キーワード：グルココルチコイド ステロイド性骨粗鬆症 Fkbp5 骨細胞 メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

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。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と考えられる。一つは細胞間ネットワークであり、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、骨細胞通して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、傍骨細胞間隙を介した細胞外ネットワークであり、これも骨表面へと及んでいる。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の機能は多くの間接的な観察から推測されてきたが、直接その機能を証明することは困難であった。

我々はこの2つのネットワークが破壊された Bcl2 トランスジェニック (tg) マウスを用いて、骨細胞ネットワークの機能を解明してきた。これまで、骨細胞は、骨形成を促進、骨吸収を抑制すると考えられてきたが、骨芽細胞機能を抑制、破骨細胞形成を促進させることにより、骨形成を抑制、骨吸収を促進していることを初めて明らかにした^{2, 3)}。さらに、骨細胞ネットワークは、非荷重を感知し、骨細胞でスクレロステイン発現を上昇させ骨芽細胞機能を抑制、骨芽細胞で Rankl 発現を上昇させ破骨細胞形成を促進させ、骨量減少へと導くことを明らかにした。

次に、骨芽細胞・骨細胞において、野生型マウスでは非荷重時に誘導されるが、Bcl2 tg マウスでは誘導されない遺伝子をマイクロアレイで検索、Fkbp5 を同定した。Fkbp5 は、グルココルチコイドレセプター (GR)、プロゲステロンレセプター (PR)、ミネラルコルチコイドレセプター (MR)、アンドロゲンレセプター (AR) に結合する HSP90 を中心とするシャペロン複合体の 1 構成分子として報告されている。

ステロイド剤は、現在でも多くの炎症性疾患や自己免疫疾患の効果的治療薬であり、ステロイド剤の投与によって生じる骨粗鬆症は二次性骨粗鬆症のなかで最も頻度が高い。ステロイド剤の治療を長期に受けている患者の 30-50% が骨折を起こす可能性がある。ヒトのステロイド剤治療では、早期の骨吸収の増加により、急激な骨密度の低下をきたす。そして長期に続く骨形成の低下により、さらに骨密度は低下していく。ヒトでは海綿

骨が主に低下し、椎体や大腿骨頸部骨折を起こす。マウスへのグルココルチコイド投与実験の遺伝子発現解析でも、早期に破骨細胞分化関連遺伝子の発現上昇が見られ、その後、骨形成関連遺伝子の発現低下が見られる。グルココルチコイドレセプターは、細胞質内で HSP90、Fkbp5 を含むシャペロン分子と複合体を形成する。グルココルチコイドのレセプターへの結合により、複合体は解体し、グルココルチコイドレセプターは、二量体を形成、核移行する。核移行した二量体は、DNA 上のグルココルチコイドリスポンズエレメント (GRE) に結合、ターゲット遺伝子の転写を誘導あるいは抑制する。グルココルチコイドレセプター単量体も転写因子との蛋白-蛋白相互作用によって、転写調節に関わる。

2. 研究の目的

Bcl2 tg マウスの骨組織を用いたマイクロアレイから同定した Fkbp5 は、骨細胞ネットワークが存在して初めて非荷重時に誘導される分子である。Fkbp5 の骨における機能はこれまで全く報告されていない。Fkbp5 の非荷重時の骨における機能解析は、我々が初めて明らかにした骨細胞の生理的機能を分子レベルでの機能解明へと発展させる研究である。また、ステロイド性骨粗鬆症は臨床的に大きな課題であるが、その病態は充分解明されていない。Fkbp5 は、GR のグルココルチコイド結合、二量体形成および核移行を阻害すると考えられており、Fkbp5^{-/-} マウスはグルココルチコイド投与に対し過剰に反応することが予想される。したがって、グルココルチコイド投与実験により、ステロイド性骨粗鬆症の病態解明を大きく前進させることが出来る。

具体的には、以下の事項を明らかにする。1) Fkbp5^{-/-} マウスの骨芽細胞を用いて、GR, PR, AR, エストロゲンレセプター (ER) の転写活性化能に対する Fkbp5 の機能を明らかにする。2) Fkbp5^{-/-} マウスの表現型を解析することにより、生理的条件下における Fkbp5 の機能を明らかにする。3) 尾部懸垂実験を行うことにより、非荷重時の骨量減少における Fkbp5 の関与を明らかにする。4) グルココルチコイド投与時の骨量減少における Fkbp5 の関与を実証するとともに、ステロイド性骨粗鬆症の病態を解明する。

3. 研究の方法

(1) GR, PR, AR, ER の転写活性化能に対する Fkbp5 の機能解析

GR, PR, AR, ER, ER、それぞれに対するレポーターベクター (ルシフェラーゼベクター: pGL3-MMTV, pGL3-tkERE) 標準化用のレニラルルシフェラーゼベクターを、野生型マウスおよび Fkbp5^{-/-} マウスから得た頭蓋冠由来骨芽細胞にそれぞれ導入、デキサメサゾン、プロメゲストン、ジヒドロテストステロン、^{17β}-エストラジオールを

種々の濃度で添加、48 時間培養後にルシフェラーゼ活性を測定する。

(2) 非荷重実験

9 週齢の GFP (0b) マウスおよび Fkbp5^{-/-}-GFP (0b) マウスをコントロール群、尾部懸垂群にわけ、1 週間尾部懸垂を施行、大腿骨をマイクロ CT、骨組織形態計測で比較する。

屠殺時に血清を採取し、血清骨吸収マーカー TRAP5b、血清骨形成マーカーオステオカルシンを測定する。これまでの実験では、尾部懸垂しても血清グルココルチコイドの上昇は認められなかったが、実験ごとに血清グルココルチコイドレベルも確認する。

(3) グルココルチコイド投与実験

8 週齢の GFP (0b) マウスおよび Fkbp5^{-/-}-GFP (0b) マウスの背部皮下に、徐放性プレドニゾロンペレット (低容量 1.25mg/kg/day、高容量 3.2 mg/kg/day) あるいはプラセボペレットを植え込み、1 週間ごとに体重を測定するとともにマウスの挙動を観察する。4 週間後に屠殺、大腿骨をマイクロ CT、骨組織形態計測で比較する。

TUNEL 染色で、骨芽細胞、骨細胞におけるアポトーシスを比較する。

屠殺時に血清を採取し、血糖、コレステロール、中性脂肪、アルブミン、コリンエステラーゼ、CPK、LDH 等を測定し、プレドニゾロンの耐糖能、脂質代謝、筋に対する作用を調べる。

筋重量を測定するとともに組織切片で筋細胞面積を計測し、筋萎縮を比較する。また、消化管潰瘍や出血がないか腸管を調べる。

4. 研究成果

(1) グルココルチコイドレセプター (GR)、プロゲステロンレセプター (PR)、アンドロゲンレセプター (AR)、エストロゲンレセプター (ER) の転写活性化能に対する Fkbp5 の機能解析

GR, PR, AR, ERα, ERβ それぞれに対するレポーターベクター、標準化用のレニラルシフェラーゼベクターを、野生型マウスおよび Fkbp5^{-/-} マウスから得た頭蓋冠由来骨芽細胞にそれぞれ導入、デキサメサゾン、プロメゲストン、ジヒドロテストステロン、b-エストラジオールを種々の濃度で添加、48 時間培養後にルシフェラーゼ活性を測定した。GR に対するレポーターベクターを用いたデキサメサゾンの添加実験のみ、Fkbp5^{-/-} 骨芽細胞で野生型骨芽細胞に対してレポーターアッセイの上昇を見た。

(2) 非荷重実験

8 週齢の雄および雌の野生型マウスと Fkbp5^{-/-} マウスを用いて 1 週間尾部懸垂を行い、マイクロ CT で骨密度および骨量を比

較した。まず、コントロール群の比較では、Fkbp5^{-/-} 雌マウスが野生型雌マウスと比較し骨量が減少していた。したがって、Fkbp5 は、生理的条件下でも必要であることが明らかとなった。尾部懸垂群の雄マウスでは、Fkbp5^{-/-} マウスでのみ、骨密度低下および骨量が野生型マウスと比較し低下していた。尾部懸垂群の雌マウスでは野生型マウスおよび Fkbp5^{-/-} マウスともに骨密度および骨量が野生型マウスと比較し低下していたが、その程度は Fkbp5^{-/-} マウスの方が強かった。

(3) グルココルチコイド投与実験

徐放性プレドニゾロンペレット (低容量 1.25mg/kg/day、高容量 3.2 mg/kg/day) あるいはプラセボペレットを植え込み、骨量をマイクロ CT にて比較した。高容量プレドニゾロンペレットでは、Fkbp5^{-/-} マウスは 4 週間以内に全例が死亡した。低容量プレドニゾロンペレットでは、死亡例は少なかったが、野生型マウスに比較し、骨量減少が顕著であった。したがって、Fkbp5 は、グルココルチコイドによる骨量減少に関与することが明らかとなった。

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 12 件)

Moriishi T, Fukuyama R, Miyazaki T, Furuichi T, Ito M, Komori T. Overexpression of BCLXL in Osteoblasts Inhibits Osteoblast Apoptosis and Increases Bone Volume and Strength. J Bone Miner Res. 2016 Feb 8. doi: 10.1002/jbmr.2808. [Epub ahead of print] (査読有)

Komori T. Animal models for osteoporosis. Eur J Pharmacol. 759: 287-94, 2015. (査読有)

Komori T. A review of the differing roles of dead and live osteocytes. Journal of Oral Biosciences. 56(3): 101-104, 2014. (査読有)

[学会発表](計 10 件)

小守壽文: “骨細胞と骨代謝制御” 第 32 回日本骨代謝学会学術大会. (20140724-20140726). 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

森石武史, 小守寿人, 小守壽文: “Bcl-2 ノックアウトマウスでは Akt の不活性化により FoxO が活性化し、骨芽細胞分化が促進する” 第 32 回日本骨代謝学会学術大会. (20140724-20140726). 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

[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

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小守 壽文 (KOMORI, Toshihisa)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
教授
研究者番号：00252677

(3) 連携研究者

森石 武史 (MORIISHI, Takeshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
助教
研究者番号：20380983

福山 亮 (FUKUYAMA, Ryo)
広島国際大学・薬学部・講師
研究者番号：20389117