

骨への力学的負荷によるアポトーシス制御とその分子機序の解明

松本俊夫¹⁾(研究代表者)、速藤逸朗¹⁾、今村健志²⁾、田中 栄³⁾

1)徳島大学大学院生体情報内科学 2)癌研究会研究所生化学部 3)東京大学大学院整形外科

抄録: 骨における力学刺激は、ユビキチン E3 リガーゼを介して骨芽細胞および破骨細胞の細胞寿命変化を起こしうることが示された。また、IL-11 は骨芽細胞分化および骨芽細胞寿命制御に重要な役割を果たしているが、その転写調節には ERK/CREB/ Δ FosB 系に加え、力学的負荷による Smad1/5 のリン酸化を介したシグナルが標的遺伝子の転写調節を介して協調して働いていることが明らかとなった。本検討の成果は、宇宙における微少重力環境や不動状態における骨量減少の分子機序を明らかにするとともに、これらの病態に対する治療法開発にも有用であると考えられる。

Abstract: Mechanical stress in bone can alter the survival of both osteoblasts and osteoclasts via its effect on ubiquitin E3 ligase. Mechanical stress also enhances IL-11 expression via ERK/CREB/ Δ FosB signaling pathway along with phosphorylation/activation by PKC δ of Smad1/5 signaling. The increased Δ FosB and activated Smad1/5 form complex and bind to AP-1 and SBE sites, respectively, on IL-11 gene promoter to enhance its transcription. The increased IL-11 by mechanical stress plays an important role in osteoblast development and survival. Further elucidation of the mechanism whereby osteoblast/osteoclast development and survival are regulated by mechanical stress should give us clues for the prevention of bone loss induced by micro-gravity and immobilization.

背景: 宇宙における微少重力環境や寝たきりなどの不動状態における骨量減少の病態は骨形成の低下と骨吸収の亢進が同時に起こる“アンカップリング”を特徴とするが、その発症機序には不明な点が多い。一方、近年、骨芽細胞系および破骨細胞系の細胞寿命の変化が生理的な骨代謝調節やステロイド性骨粗鬆症等の病態形成に重要な役割を果たしている可能性が明らかとなってきた。さらに力学的負荷が骨芽細胞や破骨細胞の寿命に影響を与えることを示唆する成績も報告されているが、その制御機構や細胞内情報伝達経路については殆ど不明である。

目的と方法: 不動状態および力学的負荷による骨芽細胞系および破骨細胞系の細胞寿命の変化とその分子機序を解明することを目的として、ユビキチン-プロテアゾーム(UP)経路に着目してそのアポトーシス制御における役割と作用機序を検討するとともに、Smad 等のシグナル分子や Bcl, IAP ファミリーなどのプロテアゾーム感受性アポト

シス関連分子の関与を検討する。In vivo 力学負荷モデルとしてはアンカップリングが再現できる尾部牽引マウスを、in vitro モデルとして液体シアストレス(FSS)負荷骨芽細胞を用いた。

結果と考察: 尾部懸垂 7 日後のマウス大腿骨遠位部では、多数の破骨細胞の出現を認めたが、運動負荷後 6 時間にはこれらの破骨細胞が消失した。また Bim 蛋白は同組織において荷重免荷によって増加、再負荷で減少し、Bim 陽性細胞と破骨細胞の局在は一致していた。Bim はサイトカイン除去後などに見られる破骨細胞アポトーシスに伴ってその発現を上昇させるが、Bim はアポトーシスエフェクターとして働く Caspase-3 の活性化の後、UP 経路によって分解され、その後発現が低下するといった、negative-feedback loop が存在することが明らかとなった。さらに、Caspase-3 ノックアウトマウスから得られた破骨細胞ではサイトカイン除去後の Bim の発現低下が認められず、破骨細胞アポトーシスは亢進していた。これらの成

績からは、破骨細胞も骨芽細胞同様、荷重変化に早期に応答してその細胞機能を変化させること、再負荷後の破骨細胞アポトーシスに Bim が関与していることを示唆すると考えられる。また、破骨細胞における Bim の発現は E3 ユビキチンリガーゼの 1 種である Cbl ファミリーによって調節されることを我々は既に報告しているが、尾部懸垂マウスの骨において Cbl mRNA の発現は亢進しており、この発現亢進は抗酸化作用を有する Tempol の投与で抑制された。この結果から、荷重変化に伴う Bim の発現変動に Cbl が関与する可能性が示唆された。

次に骨芽細胞に関して、我々は力学負荷および PTH の骨形成促進作用は AP-1 依存性の IL-11 発現誘導が骨芽細胞分化に重要な役割を果たしていることを示してきた。一方で、微小重力環境下やグルココルチコイド投与下における骨芽細胞のアポトーシス誘導が IL-11 の発現低下に起因する可能性を強く示唆する結果も得ている。そこで、骨芽細胞におけるデキサメタゾン (DEX) 誘導性の DNA ladder formation を検討したところ、ladder formation は PTH, IL-11 添加により用量依存的に抑制された。また、PTH による ladder formation 抑制作用は IL-11 のノックダウンで消失した。さらに cell viability assay でも PTH, IL-11 が用量依存的に DEX 誘導性アポトーシスを抑制できることが確認できた。DEX 処理後の骨芽細胞では、アポトーシス関連分子である Bcl-2 の発現抑制並びに Bax の発現誘導 (Bcl-2/Bax 比の低下)が見られたが、これらは FSS を加えることや外因性に IL-11 を添加することでほぼ正常化し、IL-11 中和抗体の投与により DEX 処理と同程度まで低下がみられた。従って力学的負荷は IL-11 の発現誘導を介して骨芽細胞のアポトーシスを抑制すること、また逆に内因性 IL-11 の発現低下は骨芽細胞のアポトーシスを惹起し得ることが明らかとなった。これらの成績は、IL-11 が骨芽細胞分化の促進と

ともに既に存在する骨芽細胞の寿命制御を介してより複合的に骨芽細胞の生存および機能を制御する可能性を示唆するものと考えられる。さらに、IL-11 と Smad シグナルとの相互作用に関して、我々はすでに力学的負荷が ERK, CREB, delta-FosB の誘導を介して AP-1 依存的に IL-11 遺伝子の転写促進を起こすこと、これとは別に、FSS は Smad のリン酸化を促進し、その経路は PKC delta に依存していることも示している。NA 沈降法により、Smad は delta-FosB/JunD 複合体と直接結合し、これらの複合体は JunD C 端を介して IL11 プロモーター上に存在する、我々が新たに同定した Smad binding element に結合する。さらにプロモーターアッセイにより delta-FosB/JunD と Smad complex は協調して IL-11 転写を促進することを確認した。一方、BMP シグナルもユビキチン E3 リガーゼの 1 種である Smurf1 により複数の段階で制御を受けることを明らかにしてきた。尾部懸垂マウス大腿骨では、Smurf1/2 mRNA の発現が上昇しており、この誘導は Tempol 投与尾部懸垂マウスでは軽度であった。したがって、荷重免荷骨細胞でも、smurf1/2 すなわち、ユビキチン E3 リガーゼが BMP 抑制シグナルとして働いていることが示唆され、その誘導は酸化ストレスによる調節を受けることが示された。

まとめ：破骨細胞における Bim(Cbl)および骨芽細胞における Smurf1 は、荷重免荷により発現亢進がみられ、力学負荷による破骨細胞・骨芽細胞寿命調節にはいずれもユビキチン E3 リガーゼが関与していることが示された。また、IL-11 は骨芽細胞分化および寿命制御に重要な役割を果たしているが、その転写調節には ERK/CREB/delta FosB 系のみならず力学負荷により動員される Smad リン酸化を介した BMP シグナルも協調して働いていることが示された。これら力学負荷の下流因子は、微小重力下における骨量減少および不動性骨粗鬆症の治療標的因子として有用であると考えられた。