

## 論文の内容の要旨

論文題目 抗アポトーシス分子 Bcl-xL による破骨細胞機能・生存に  
関する研究

指導教員 中村 耕三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 岩澤 三康

### 背景と目的

破骨細胞は単球・マクロファージ系前駆細胞が融合して形成される多核巨細胞で、生体内で唯一骨吸収を行う。破骨細胞異常による疾患として、骨粗鬆症、関節リウマチ、悪性腫瘍骨転移、大理石骨病が挙げられる。破骨細胞による骨吸収は分化・機能・生存の各々の段階で統御されているが、細胞死ではアポトーシスが重要であり、そのメカニズム解析は途上にある。アポトーシスはデスレセプターを介する経路とミトコンドリアを介する経路が存在し、後者で Bcl-2 ファミリー分子が重要である。Bcl-2 ファミリー分子は、Bcl-2、Bcl-xL などアポトーシス抑制蛋白群と、Bim や Bax などのアポトーシス促進蛋白群が存在する。破骨細胞ではアポトーシス促進分子 Bim が重要である一方で、抗アポトーシス分子 Bcl-xL の検討はない。Bcl-xL は *bcl-x* 遺伝子の alternative splicing によって産生される major form で、ノックアウトマウスは胎生 13 日で致死であるが、骨組織に対する検討はない。本研究は破骨細胞での Bcl-xL の役割を、*in vitro* と共に Cre-lox recombination system を用いて破骨細胞特異的 *bcl-x* 遺伝子ノックアウトマウスを作出・解析した。

### 結果

#### 1. 破骨細胞生存・機能における Bcl-xL の効果

##### 1-1. Bcl-xL 強制発現は破骨細胞生存を延長し、骨吸収能は低下する

Bcl-xL 強制発現が与える影響を確認した。Bcl-xL 強制発現 (Ax Bcl-xL) 群とコントロール (Ax GFP) 群を比べると Ax Bcl-xL 群は生存率は高く、Caspase-3 活性化は抑制された。これらより破骨細胞アポトーシス抑制が示された。次に骨吸収窩を測定した。Ax Bcl-xL 群は骨吸収面積が減少し、破骨細胞骨吸収の低下が確認された (data not shown)。

##### 1-2. Bcl-xL ノックアウト破骨細胞は生存率が低下し、骨吸収能は亢進する

*bcl-x* flox マウスの前駆細胞が幼弱破骨細胞となる時期に Cre アデノウイルスを感染させた。この Ax Cre 群を Bcl-xL ノックアウト破骨細胞とした。Ax Cre 群で生存率は低値を示し (Fig. 1A)、Caspase-3 活性化は増加した (Fig. 1B)。これらより Bcl-xL ノックアウト破骨細胞のアポトーシス亢進が示された。次に骨吸収窩を測定した。Bcl-xL ノックアウト破骨細胞では骨吸収面積が増加し、骨吸収能が亢進した (Fig. 1C)。

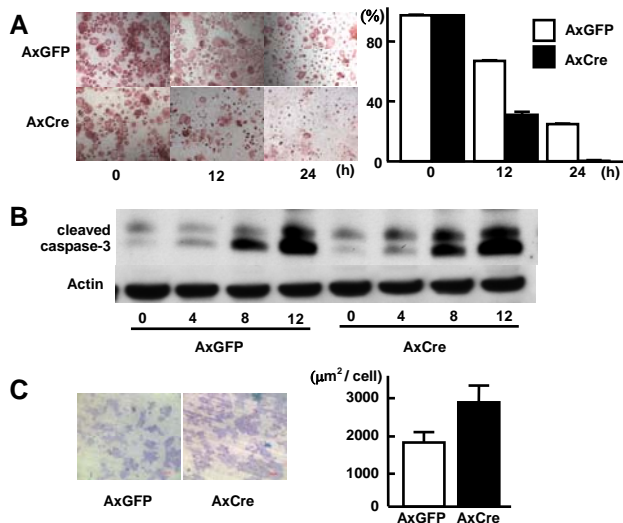


Fig.1; *bcl-x* ノックアウト破骨細胞の表現型

A; 生存率 B; cleaved caspase-3 発現 C; 骨吸収窩計測

### 1-3. Bcl-xL ノックアウト破骨細胞では c-Src が活性化し、RGD 配列を含む蛋白の発現が亢進する

骨吸収活性を反映するリン酸化 c-Src は AxCre 群で亢進し、AxBcl-xL 群で低下した(Fig.2A)。c-Src 活性化は、RGD 配列を含む蛋白を認識したインテグリンが細胞内へシグナルを伝えることが重要であるため、主要な RGD 配列を含む蛋白の発現を見ると、fibronectin と vitronectin は AxCre 群で発現が増加し、AxBcl-xL 群で発現が低下した。これより破骨細胞自身による RGD 配列を有する蛋白の発現が骨吸収活性に関与していることが示唆された(Fig.2B)。

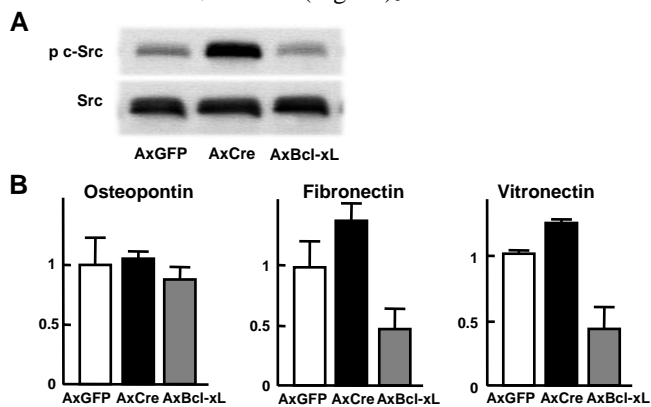


Fig.2; Bcl-xL による骨吸収活性のメカニズム

A; 活性化 c-Src 発現 B; RGD 配列を有する蛋白の発現

## 2. 破骨細胞特異的 *bcl-x* ノックアウトマウスの解析

### 2-1. *bcl-x* cKO マウスは成長に伴い骨量が減少する

生後 1 年 *bcl-x* cKO マウスの大腿骨  $\mu\text{CT}$  で海綿骨減少を呈した(Fig.3A)。また *bcl-x* cKO マウスで骨密度減少を認めた(Fig.3B)。

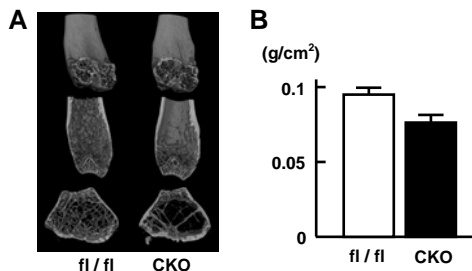


Fig.3; *bcl-x* cKO マウスの表現型

A; 大腿骨  $\mu\text{CT}$  像 B; 大腿骨骨密度

### 2-2. *bcl-x* cKO マウスは骨吸収が増加する

骨吸収能マーカーの血清 CTx-I は、*bcl-x* cKO マウスで増加し、骨吸収活性亢進を示した(Fig.4A)。骨形態計測では骨吸収骨面積(ES/BS)は増加し、破骨細胞面(Oc.S/BS)と破骨細胞数(N.OC/B.Pm)に差はなかった(Fig.4B)。一方、骨芽細胞の骨形成能に差はなかった(data not shown)。これらより *bcl-x* cKO マウスは破骨細胞の骨吸収増加による骨量減少を示した。

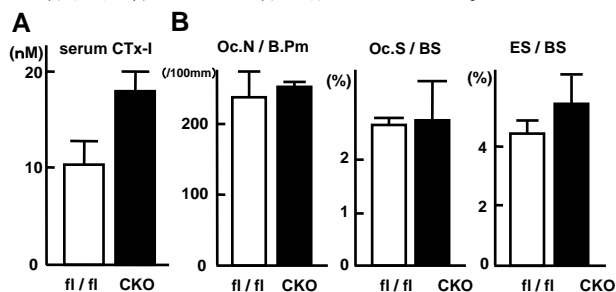


Fig.4; *bcl-x* cKO マウス骨吸収活性

A; 血清 CTx-I 濃度 B; 骨形態計測における骨吸収指標

## 3. 破骨細胞分化における Bcl-xL の効果

### 3-1. Bcl-xL は前駆細胞の proliferation に影響しない

レトロウイルスで Bcl-xL を強制発現した細胞 (RxBcl-xL)、shRNA を導入し発現抑制した細胞 (RxshBcl-xL)、empty ウイルスを導入した細胞 (RxCRL) を作成し、これらを M-CSF で刺激して細胞増殖数を比べると、proliferation に Bcl-xL は関与が乏しいと示された(data not shown)。

### 3-2. Bcl-xL は破骨細胞分化を抑制する

3 群に破骨細胞分化刺激を行い、NFATc1 を確認した。Bcl-xL 発現抑制群で発現増加し、Bcl-xL 強制発現群で発現抑制された(Fig.5A,B)。また刺激早期に Bcl-xL 発現抑制群で成熟した破骨細胞数が多く形成され、逆に Bcl-xL 強制発現群では少なかった。これらより Bcl-xL は differentiation を抑制することが確認された。

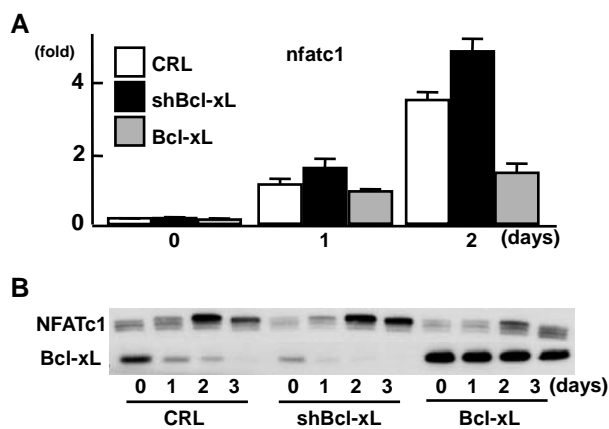


Fig.5; 破骨細胞分化におけるBcl-xLの効果  
A; リアルタイムPCR B, Western blotting

### 考察

破骨細胞における抗アポトーシス分子は検討が不十分であり、代表的な Bcl-xL について検討した。唯一重要な報告としては Roodman らが、oncogene の Simian Virus 40 large T antigen (Tag) と Bcl-xL を発現する破骨細胞特異的 Bcl-xL/Tag トランスジェニックマウスを作成し、破骨細胞数増加とその生存延長を認めたが、一方で Bcl-xL のみでは効果は不十分とした。彼らは Bcl-xL 自体の作用にはそれ以上踏み込んでいない。

### 破骨細胞の生存及び機能（骨吸収活性）における役割

生存では、Bcl-xL 強制発現により破骨細胞アポトーシスは抑制された。一方ノックアウト破骨細胞でアポトーシスは亢進した(Fig.1A,B)。この結果は生理的条件下でアポトーシスに陥りやすい破骨細胞でも Bcl-xL が生存維持に働くことを示した。

骨吸収活性は、Bcl-xL を強制発現した破骨細胞で骨吸収活性の低下を認め、Bcl-xL を発現抑制した破骨細胞では骨吸収活性の亢進を認めた(Fig.1C)。これは、Bcl-xL が骨吸収活性に抑制的に働くことを示す。骨吸収活性における key の一つは c-Src である。c-Src ノックアウトマウスは破骨細胞の細胞骨格異常と骨吸収活性障害による大理石骨病を示す。今回も活性化 c-Src 発現は骨吸収窩測定の結果を反映しており、c-Src 活性化が Bcl-xL の破骨細胞機能調節で key であると示された(Fig.2A)。c-Src 活性化の重要な経路として RGD 配列を有する蛋白を認識するインテグリンを介する経路がある。そこで RGD 配列を有する蛋白の発現を見るとフィブロネクチンとビトロネクチンの発現が Bcl-xL ノックアウト破骨細胞で増加し、Bcl-xL 強制発現破骨細胞で低下した(Fig.2B)。従って Bcl-xL ノックアウト破骨細胞の骨吸収活性亢進は、自身の RGD 配列を有する蛋白の発現増加によるインテグリン

ナル刺激の関与が示唆された。

### 破骨細胞特異的 bcl-x ノックアウト(bcl-x cKO)マウスは骨吸収能亢進による骨量の減少を呈する

Bcl-xL ノックアウト破骨細胞の生存期間は短く、骨吸収能は亢進する。一般に生存期間短縮は骨量増加に、骨吸収亢進は骨量減少に働き、in vivo 表現型では相反する。bcl-x cKO マウスは生後 1 年では著明な骨量減少を呈した。また、骨形態計測で骨吸収が増加し、血清 CTx-I が増加した。以上より、bcl-x cKO マウスは骨吸収増加による骨量減少を示した。ノックアウト破骨細胞での Cre 発現は幼弱破骨細胞が形成される時点から徐々に見られ、形成される細胞数が多い傾向にあることから破骨細胞分化への影響が考えられた。

### 破骨細胞分化における役割

そこで Bcl-xL の破骨細胞分化への効果を検討した。その結果、破骨細胞前駆細胞の proliferation に影響はないと示された。一方、differentiation は Bcl-xL 発現抑制群で NFATc1 の発現が高く、Bcl-xL 強制発現群で低下した(Fig.5A,B)。また、TRAP 染色像で Bcl-xL 発現抑制群は成熟破骨細胞が数多く形成されたが、Bcl-xL 強制発現群では少なかった。これらより Bcl-xL は differentiation に抑制的に働くと示された。この機序は今回は詳細を明らかにすることはできず、今後の研究課題である。

bcl-x cKO マウスの骨形態計測で破骨細胞数に差がないことは bcl-x ノックアウト破骨細胞の生存短縮に相反するが、bcl-x cKO マウスでは破骨細胞分化が亢進するために、生存期間短縮と相殺する形で細胞数に差がないと解釈される。

### 結論

抗アポトーシス分子 Bcl-xL は破骨細胞の生存延長のみならず、破骨細胞分化および骨吸収機能を抑制する。破骨細胞特異的 bcl-x ノックアウトマウスは骨吸収能亢進により骨量減少を呈する。