

Title	脱ユビキチン化酵素による骨代謝調節の分子機構の解明
Sub Title	Molecular mechanism of bone metabolism regulated by ubiquitin C-terminal hydrolase-L3
Author	砂村, 聡子(Sunamura, Satoko)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
Abstract	脱ユビキチン化酵素UCH-L3欠損マウスは、網膜など一部を除けば病理変化は乏しいと考えられてきたが、我々はUCH-L3欠損マウスと野生型マウスの骨形態計測を行い、UCH-L3欠損マウスは野生型マウスと比較して骨量の多いことを見出した。マウス骨芽細胞においてUCH-L3を過剰発現させると、骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性が低下した。マウス破骨細胞においては、UCH-L3の過剰発現による破骨細胞分化マーカーへの影響は見られなかった。これまでの研究結果から、UCH-L3は骨形成因子の制御に関わっている可能性のあることが示唆された。今後は、骨形成に関わる種々の因子と、それらのユビキチン化-脱ユビキチン化という観点から骨代謝機構の解明にアプローチする予定である。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2010～2011 課題番号：22791403 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科
Genre	Research Paper
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22791403seika

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791403

研究課題名（和文） 脱ユビキチン化酵素による骨代謝調節の分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of bone metabolism regulated by ubiquitin C-terminal hydrolase L3

研究代表者

砂村 聡子（SUNAMURA SATOKO）

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：20570386

研究成果の概要（和文）：脱ユビキチン化酵素 UCH-L3 欠損マウスは、網膜など一部を除けば病理変化は乏しいと考えられてきたが、我々は UCH-L3 欠損マウスと野生型マウスの骨形態計測を行い、UCH-L3 欠損マウスは野生型マウスと比較して骨量の多いことを見出した。マウス骨芽細胞において UCH-L3 を過剰発現させると、骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性が低下した。マウス破骨細胞においては、UCH-L3 の過剰発現による破骨細胞分化マーカーへの影響は見られなかった。これまでの研究結果から、UCH-L3 は骨形成因子の制御に関わっている可能性のあることが示唆された。今後は、骨形成に関わる種々の因子と、それらのユビキチン化・脱ユビキチン化という観点から骨代謝機構の解明にアプローチする予定である。

研究成果の概要（英文）：Ubiquitin C-terminal hydrolase L3 deletion mice have high bone mass phenotype. Alkaline phosphatase activity was reduced in the UCH-L3 overexpressed osteoblast. No effect on osteoclast markers was found in UCH-L3 overexpressed osteoclast.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：骨・軟骨代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の分子生物学的研究の進展から、骨の吸収および形成過程の分子制御機構が

徐々に解明され、分子骨代謝学とも呼べる新しい領域が大きく開かれてきた。そして数々の骨疾患の原因となる遺伝子変異の解明や、

遺伝子欠損マウスを用いた研究などから、骨格系の制御に必須の数多くの因子が明らかとなってきた。骨形成・骨吸収の各過程は、全身性のホルモンやサイトカイン、あるいは細胞-基質間および細胞-細胞間相互作用などによる緻密な調節を受けており、その分子機構は完全には解明されていない。

細胞中の不要な蛋白質はユビキチンにより標識され(ユビキチン化)、ユビキチン-プロテアソームシステムを介して分解除去されている。細胞周期制御や転写因子に関わる重要な遺伝子の発現は、細胞内蛋白質のユビキチン化により調節されている。脱ユビキチン化酵素はユビキチン化された蛋白質からユビキチンを切り出す酵素であり、低分子型の UCH (ubiquitin C-terminal hydrolase) と高分子型の UBP (ubiquitin specific protease) に大別される。UCH-L1 は神経細胞や精巣に特異的に存在し、脳においては全可溶性蛋白質の 1~2% を占めている。UCH-L1 の遺伝子変異が優性遺伝性パーキンソン病患者の家系で報告されており(Leroy ら, Nature 1998)、UCH-L1 の hydrolase 活性と神経疾患との関連が注目されている。UCH-L3 は UCH-L1 とアミノ酸レベルで約 50% の相同性を有する。UCH-L3 遺伝子欠損マウスは網膜など一部を除けば病理変化は乏しいと考えられてきた。我々は、UCH-L3 欠損マウスは野生型マウスと比較して骨量が多いことを見出した。これらの検討から、脱ユビキチン化酵素は骨代謝において重要な役割を担っていると考えた。骨代謝に関わるシグナル伝達因子や転写因子の発現は、細胞内蛋白質のユビキチン化により調節されている。そのため、ユビキチン化を高次的に制御している脱ユビキチン化酵素の意義を解明することは、骨代謝研究における新たな進展をもたらすものと考えた。

2. 研究の目的

骨格系の制御機構の異常に基づく各種疾患の治療法を確立するためには、骨の吸収および形成に関わる細胞の分化・機能の調節因子およびその制御機構を解明する必要がある。我々は、脱ユビキチン化酵素に着目、脱ユビキチン化酵素の骨代謝における役割を解明し、骨代謝研究に新たな進展をもたらすこと、さらに各種骨疾患の病態の解明、その治療法の確立を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

脱ユビキチン化酵素の骨代謝における意義を、脱ユビキチン化酵素のひとつであるユビキチン C 末端加水分解酵素 L3 (UCH-L3) 欠損マウスを用いて分子生物学的に解明する。

まず、組織学的方法および骨形態計測法により UCH-L3 欠損マウスの骨代謝動態を *in vivo* で検討する。続いて、UCH-L3 欠損マウスより骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞を単離し、*in vitro* でそれらの分化・増殖活性を野生型マウスと比較・検討する。また、骨代謝に関連する因子の発現を、遺伝子レベル・蛋白質レベルで解析する。さらに UCH-L3 阻害薬の骨粗鬆症治療薬としての可能性を検討する。

これらの解析で脱ユビキチン化酵素 UCH-L3 の骨代謝における作用の分子基盤を包括的に解析していく。

4. 研究成果

(1) 脱ユビキチン化酵素 UCH-L3 欠損マウスについて、*in vivo* および *in vitro* における解析を行った。

in vivo における解析

UCH-L3 欠損マウス(国立精神・神経センター神経研究所、和田圭司教授より供与)および対照群として野生型マウスの骨代謝動態を骨形態計測法を用いて組織学的に解析した。組織量に対する骨量の割合を測定したところ、UCH-L3 欠損マウスは野生型マウスと比較して骨量が多かった(Fig. 1 および Fig. 2)。

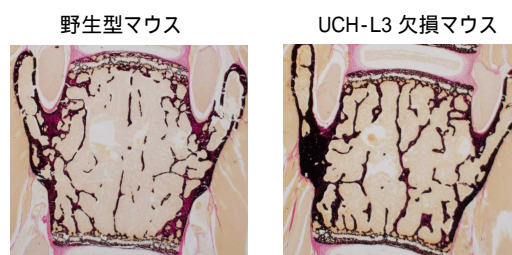


Fig. 1 UCH-L3 欠損マウスの骨量増加 (椎体、Von Kossa 染色)

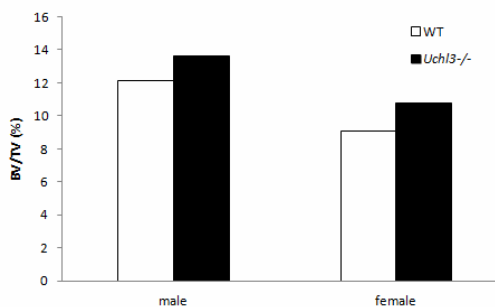


Fig. 2 UCH-L3 欠損マウスの骨量

また、UCH-L3 欠損マウスと野生型マウスの血清中の酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRACP 5b) を測定したところ、メスでは UCH-L3 欠損マウスにおける TRACP 5b 活性が野生型マウスに比べて高かった (Fig. 3)。

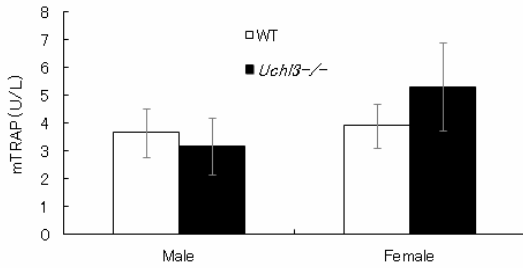


Fig. 3 マウス血清中の TRACP 5b 活性

以上の検討は現時点では検体数が少ないため、今後検体数を増やしてさらに検討を行う予定である。

骨量の定量については、今後マイクロ CT を用いた 3 次元定量を行い、より正確なデータ解析を行う予定である。また、骨形態計測における骨構造に関するパラメータ（海綿骨量、骨梁幅、骨梁数）、骨形成に関するパラメータ（骨吸収面、破骨細胞数、破骨細胞面）の測定は現在進行中であり、これらのパラメータを数値化し、UCH-L3 欠損マウスと野生型マウスのデータを比較・検討して、UCH-L3 の骨代謝動態に対する影響を評価していく予定である。

in vitro における解析

まず、野生型マウス各臓器における UCH-L3 の発現を確認したところ、ユビキタスに各臓器に発現していることがわかった (Fig. 4)。

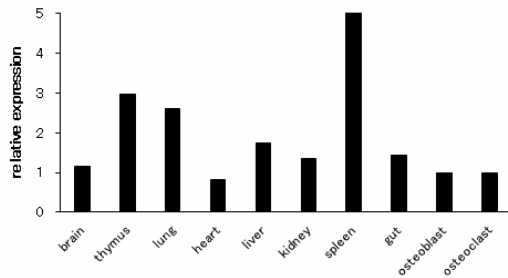


Fig. 4 マウス各臓器における UCH-L3 発現

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 において、アデノウイルスベクターを用いて UCH-L3 を過剰発現させ、骨芽細胞のマーカー遺伝子の発現に影響が見られるかを検討したところ、UCH-L3 の過剰発現によりオステオカルシンの発現に上昇が見られたが、その他のマーカー遺伝子については発現量に変化は見られなかった (Fig. 5)。

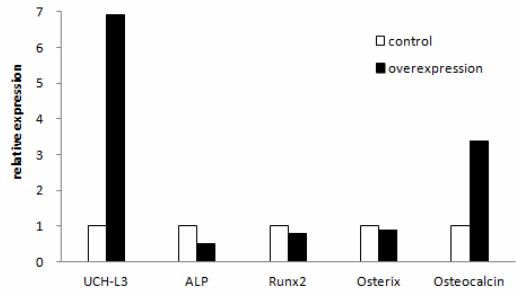


Fig. 5 UCH-L3 過剰発現の骨芽細胞マーカーにおける影響

また、培養細胞のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定したところ、UCH-L3 を過剰発現することで骨芽細胞における ALP 活性が低下した (Fig. 6)。

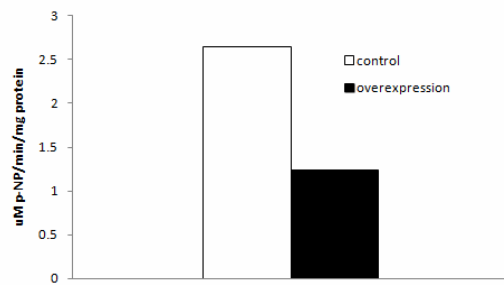


Fig. 6 UCH-L3 過剰発現のアルカリフォスファターゼ活性における影響

野生型マウスの骨髄細胞から破骨細胞を形成し、UCH-L3 を過剰発現させ、破骨細胞マーカー遺伝子の発現への影響を確認したところ、破骨細胞マーカーへの影響は見られなかった (Fig. 7)。

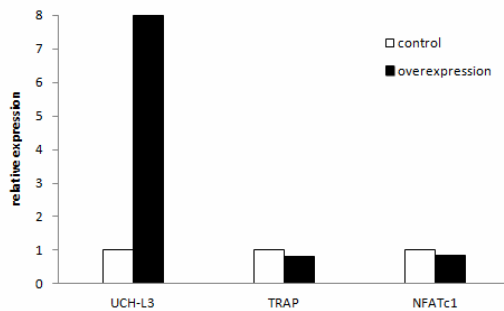


Fig. 7 UCH-L3 過剰発現の破骨細胞マーカーにおける影響

骨代謝関連因子の細胞内での分解に着目して骨代謝の分子機構の解明に臨んだが、脱ユビキチン化酵素 UCH-L3 のターゲットとなる因子を特定することには現時点では至っていない。

これまでの研究結果から、UCH-L3 は骨形成因子の制御に関わっている可能性のあるこ

とが示唆された。今後は、骨形成に関わる種々の因子と、それらのユビキチン化・脱ユビキチン化という観点から骨代謝機構の解明にアプローチする予定である。骨格系の制御に関わる分子機構の統合的な理解を進めることは、骨粗鬆症をはじめとした多様な疾患の病態の解明に繋がり、治療法・創薬研究の進展にも貢献するものと思われる。

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)

Fujita K, Sunamura S (18人中9番目), Takeda Sら、Vitamin E decreases bone mass by stimulating osteoclast fusion., Nat. Med. 18(4): 589-594, 2012 (査読有り)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

砂村 聡子 (SUNAMURA SATOKO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 20570386