

論 文 要 旨

BMP-induced Atoh8 attenuates osteoclastogenesis by suppressing Runx2 transcriptional activity and reducing the Rankl/Opg expression ratio in osteoblasts

BMP 標的遺伝子の Atoh8 は骨芽細胞内での Runx2 転写活性や Rankl/Opg 発現を減弱させることで破骨細胞分化を抑制する

八尋 雄平

【序論及び目的】

成熟した骨組織は骨吸収と骨形成とのカップリングを通して絶えずリモデリングを行いながら、骨構造を維持している。骨細胞や骨芽細胞には破骨細胞分化を制御する Rankl や Opg の受容体が存在する。

Bone morphogenetic protein (BMP)は骨誘導能を有するが、成人骨での主要な働きは骨細胞に対して sclerostin(Sost)を発現させ、Rankl/Opg 比を増加させることで結果的に破骨細胞分化を促進することになる。BMP 標的遺伝子による骨芽細胞での Rankl/Opg 比を制御する機序についてはいまだ解明されていない。

今回 BMP の直接標的遺伝子である Atoh8 について着目し、機能解析を行った。

【材料及び方法】

細胞株としては ST-2、COS-7、MC3T3-E1 を使用した。Primary culture としては C5BL/6J から採取した細胞を使用し、C57BL/6 マウスをもとに Atoh8 の exon1 を欠損させた KO マウスとの比較を、Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)、骨格標本、 μ CT や骨形態計測を用いて行った。Atoh8 発現に対しては in situ hybridization での確認を行い、その他は Runx2, Oserix, Bsp, Ocn, Rankl, Opg 抗体を用いた immunohistochemistry(IHC)で発現の確認を行った。

BMP 刺激として recombinant human(rh)BMP-2 や rhBMP-6 を使用。BMP 阻害剤として LDN193189 を使用。破骨細胞分化には rhM-CSF, rhRANKL、VD3, PGE2 を使用。

BMP 標的遺伝子の同定のために対して rhBMP 刺激後をマイクロアレイ並びに Smad 抗体を用いた Chip、smad bindin region(SBR)を含む遺伝子を導入させ Luciferase reporter assay で確認。

遺伝子の発現は RT-qPCR で評価を行い、染色で確認した。過剰発現のため human ATOH8、Runx2 遺伝子を導入させ、ノックダウンのためにはそれぞれの siRNA(Atoh8, Runx2)を導入させた。

【結 果】

成獣マウスを用いた in vivo では Atoh8 は骨芽細胞で発現が認められたが、骨細胞では発現が認められなかった。新生児の骨格標本では Atoh8 KO マウスでは軽度の表現型にもかかわらず、成獣マウスでの骨量は減少しており、破骨細胞は増加していた。Atoh8 欠損マウスから得られた骨髄間質細胞は

破骨分化が促進されており、骨芽細胞において Atoh8 の発現を抑制することで、Runx2 発現、Rankl/Opg 発現比も上昇する。一方でさらに Runx2 をダブルノックダウンすることで Rankl/Opg 発現比の上昇は再抑制された。免疫沈降実験で Atoh8 は bHLH ドメインを介して Runx2 と複合体を形成することと認められ、Runx2 の発現を阻害し、Rankl/Opg 発現比の上昇を抑えることが確認された。

【結論及び考察】

正常な骨リモデリングでは、骨髄間質細胞や幼弱な骨芽細胞において BMP-Smad1/5 シグナルにより Atoh8 が直接誘導され、これが Runx2 と結合してこの転写活性を抑制し、結果として Runx2 の positive auto-regulation と初期骨芽細胞分化、そして付随する Rankl/Opg 発現比を抑制することで、過剰な破骨細胞分化を抑えて骨量を維持していると考えられた。Atoh8 KO マウスでは、Runx2 の転写活性が増強し、ちょうど Runx2 Tg マウスの様に Rankl/Opg 発現比が増加して破骨細胞分化が亢進し、骨芽細胞分化成熟は negative feedback がかかり、その結果骨吸収優位となって骨量が減少すると示唆された。

(Bone Research 8:32, 2020 掲載)