

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06607

研究課題名(和文)軟骨形成における活性イオウ種の役割の解析

研究課題名(英文)Analysis of the role of reactive sulfur species in the chondrogenesis

研究代表者

星野 真理江 (Hoshino, Marie)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10756464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、イオウ原子が多数つながって生成された活性イオウ種(RSS)の存在が生体内で発見された。RSSは、優れた抗酸化作用を有しており、さらに内因性親電子物質の1つである8-ニトロ-cGMPを修飾することにより、様々な生理活性を引き起こすことが明らかとなった。本研究の結果、マウス脛骨の伸長にはRSSが必要であることが示唆された。また、マウス脛骨成長板軟骨における8-ニトロ-cGMPの局在も確認され、8-ニトロ-cGMPによる脛骨の伸長も認められた。これらの結果より、RSSは軟骨疾患に対する新規治療薬になり得ると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, RSS are polysulfur-containing compounds such as cysteine hydropersulfide and peptides/proteins harboring polysulfated cysteine residues. RSS provides superior antioxidation. Furthermore, RSS cause various bioactivity by modifying 8-nitro-cGMP which is one of the endogenous electrophile. As a result of this study, it was suggested that RSS was necessary for the extension of the mouse tibia. In addition, local existence of 8-nitro-cGMP with the mouse tibia growth plate cartilage and the tibial extension by 8-nitro-cGMP were accepted, too. It was suggested that RSS may become the new therapeutic drug for the cartilage disease.

研究分野：生化学

キーワード：活性イオウ種

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、シスタチオンβ-シターゼ (CBS) およびシスタチオンγ-リアーゼ (CSE) がシスチンを基質としてイオウ原子が多数つながった persulfide を生成することが明らかとなった (Proc Natl Acad Sci USA 11: 7606, 2014)。Persulfide は化学的反応性が極めて高いことから活性イオウ種 (RSS) と呼ばれ、細胞内酸化還元環境の維持やシグナル伝達に重要な役割を果たす可能性が示唆されているが、硬組織における役割は全く分かっていない。

(2) RSS はシステインやグルタチオンなどのチオール基に連続した硫黄分子を付加し、CysSSH や GSSH として様々な生理活性を發揮する。RSS は硫黄分子が1つだけのチオール化合物よりもその強力な還元性のため、生体内において優れた抗酸化制御機能を有している (Proc Natl Acad Sci USA 11: 7606, 2014)。

(3) 活性酸素種シグナル伝達系に關与する内因性親電子物質の一つである 8-NO₂-cGMP は、心筋細胞の老化促進を介して心不全を誘発するが、RSS は、8-NO₂-cGMP をスルフヒドリル化 (-SH 基の付加) することによって心筋細胞の保護作用を發揮するというユニークな反応が新たに報告された。酸化ストレスに關連する疾患には、感染・炎症、がん、心血管障害などが挙げられ、RSS の生理活性の解明は新たな治療法開発にきわめて重要であると言える。

2. 研究の目的

(1) 骨軟骨における RSS の生成・生理的骨軟骨代謝における役割、あるいは様々な骨軟骨疾患における RSS の動態は全く不明である。

(2) 酸化ストレスが病態に深くかかわることが知られている軟骨の代表的な疾患である変形性関節症は、わが国ではおよそ 1000 万人を超える患者がおり、根本的な治療薬が存在しない現代において、新規の治療法の早期確立が期待されている。

(3) 以前の研究において、RSS の軟骨内骨化における役割を解析したところ、RSS の前駆物質である NaHS が軟骨細胞の増殖や骨格成長を著しく促進させることを見出した。そこで、RSS が骨軟骨疾患の治療薬の一つとなり得ると考え、RSS や 8-NO₂-cGMP の軟骨代謝における役割を解明することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

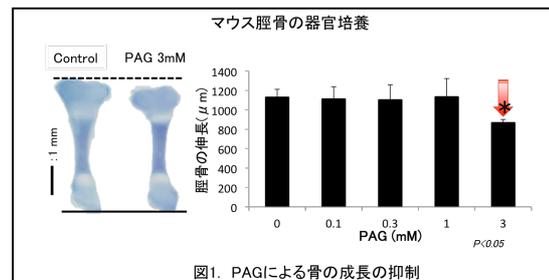
本研究では、脛骨器官培養系を用いた。

器官培養系では、胎生 16.5 日齢のマウスより摘出した脛骨に RSS を發生させる硫化水素 (NaHS) を添加し、4 日間培養後、脛骨の

伸長を培養前後で比較しその差を測定した。また、期間培養後の成長板軟骨を、*in situ* hybridization 法、アルシアンブルー/H-E 染色、8-NO₂-cGMP の蛍光免疫染色の方法を用いて組織化学的に解析した。また、CSE 阻害剤である DL-Propargylglycine (PAG) を添加し、脛骨の伸長を測定した。

4. 研究成果

(1) これまでの研究で、RSS の前駆物質である NaHS を添加した培地にてマウス脛骨の伸長を検討したところ、NaHS にて有意に脛骨の伸長が認められた。そこで、RSS 産生酵素である CSE の阻害剤の PAG を培地に添加し、NaHS による脛骨の伸長にどのように影響を及ぼすか解析を行った。Control 群または PAG を添加し 4 日間器官培養した脛骨を図. 1 に示す。測定の結果、PAG を 3mM 添加した培地で脛骨の伸長は抑制された。このことから、脛骨の伸長には内在性の NaHS が必要であると考えられ、軟骨代謝における RSS の重要性が示唆される結果となった。



(2) 長管骨の伸長は、骨端部と骨幹部の間に存在する軟骨細胞で構成される成長板で起こる。成長板軟骨は、分化段階が低いものから高いものへ、静止軟骨細胞層・増殖軟骨細胞層・前肥大軟骨細胞層・肥大軟骨細胞層に分かれており、増殖軟骨細胞が増殖することにより骨が長軸方向に成長する。そこで、マウス脛骨の伸長における RSS の修飾先である 8-NO₂-cGMP の影響を検討するために、脛骨の組織切片にアルシアンブルー/H-E 染色を施した。さらに、増殖軟骨細胞層のマーカー遺伝子である *Col2* の mRNA の発現の解析を *in situ* hybridization 法にて行った。図 2 に示す通り、8-NO₂-cGMP は脛骨の伸長を促進させ、さらに成長板軟骨の部位の中でも、増殖細胞層の伸長を有意に促進させた。これは、以前の研究において RSS が軟骨細胞の分化を促進せず、細胞増殖能を亢進した結果と一致している。

(3) RSS の修飾先である 8-NO₂-cGMP がマウス脛骨成長板軟骨の増殖軟骨層の伸長を促進させたことから、次に 8-NO₂-cGMP の成長板軟骨での発現と発現部位を特定した。マウス脛骨を 4 日間器官培養したのち、切片上にて 8-NO₂-cGMP の蛍光免疫染色を施したところ、

増殖軟骨層付近に 8-NO₂-cGMP の発現が認められた。これは、8-NO₂-cGMP が成長板軟骨で伸長させた部位と一致していた。これらの結果を図 3 に示す。

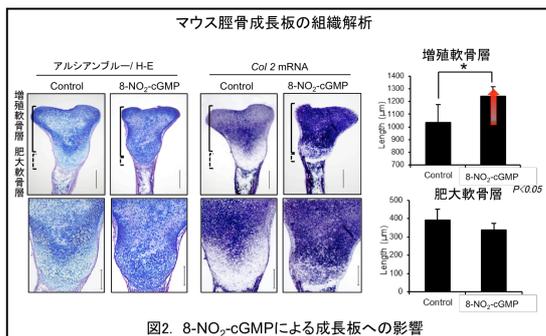


図2. 8-NO₂-cGMPによる成長板への影響

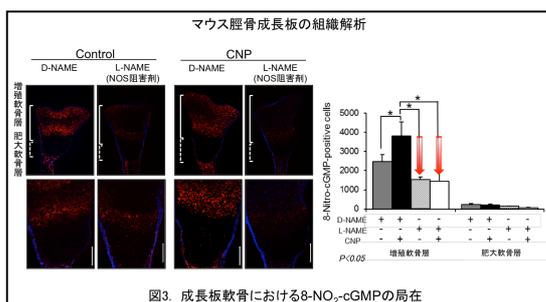


図3. 成長板軟骨における8-NO₂-cGMPの局在

以上の結果より、脛骨の伸長には内在性の RSS が必要であること、RSS の修飾先である 8-NO₂-cGMP は脛骨の伸長を促進させ、それは特に増殖軟骨層に作用していることが明らかとなった。これらのことから、RSS が軟骨疾患の治療薬となりうることが示唆された。今後もさらなる研究の継続が必要であると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

① 金子児太郎, 星野真理江, 宮本洋一, 宇山理紗, 近津大地, 上條竜太郎:
新規内因性シグナル分子 8-ニトロ-cGMP は骨の伸長を促進する。(第 53 回日本口腔組織培養学会, 金沢, 2016 年 11 月 18 日)

② 金子児太郎, 星野真理江, 宮本洋一, 赤池孝章, 井田智章, 藤井重元, 近津大地, 馬場一美, 上條竜太郎: 8-NO₂-cGMP は骨の伸長を促進する内因性シグナル分子である。(第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会, 仙台, 2016 年 8 月 30 日)

③ 宮本洋一, 金子児太郎, 星野真理江, 赤池孝章, 井田智章, 藤井重元, 近津大地, 馬場一美, 上條竜太郎: (シンポジウム)

8-nitro-cGMP は成長板軟骨で産生される骨伸長因子である。(第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会, 仙台, 2016 年 8 月 30 日)

④ Marie Hoshino, Kotaro Kaneko, Yoichi Miyamoto, Takaaki Akaike, Kentaro Yoshimura, Dai Suzuki, Kazuhiro Nagayama, Koutaro Maki, Daichi Chikazu, Kazuyoshi Baba, Ryutaro Kamiyo: (The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 仙台, 2016 年 5 月 21 日)

⑤ Kotaro Kaneko, Marie Hoshino, Yoichi Miyamoto, Takaaki Akaike, Kentaro Yoshimura, Dai Suzuki, Kazuhiro Nagayama, Koutaro Maki, Daichi Chikazu, Kazuyoshi Baba, Ryutaro Kamiyo: Reactive sulfur species promotes bone elongation. (The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 仙台, 2016 年 5 月 21 日)

⑥ 星野真理江, 金子児太郎, 宮本洋一, 赤池孝章, 近津大地, 馬場一美, 上條竜太郎: 内因性活性イオウ種はマウス軟骨細胞の増殖と骨の伸長を促進した。(第 33 回日本骨代謝学会学術大会, 東京, 2015 年 7 月 24 日)

⑦ 星野真理江, 宮本洋一, 金子児太郎, 赤池孝章, 近津大地, 馬場一美, 上條竜太郎: 8-ニトロ-cGMP はマウス軟骨細胞の増殖と骨の伸長を促進する新規内因性シグナル分子である。(第 15 回東京骨関節フォーラム, 東京, 2015 年 7 月 4 日)

⑧ 星野真理江, 宮本洋一, 金子児太郎, 赤池孝章, 近津大地, 馬場一美, 上條竜太郎: 8-ニトロ-cGMP は骨伸長を促進する新規内因性シグナル分子である。(第 1 回日本骨免疫学会, 宮古島, 2015 年 6 月 30 日)

[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

星野 真理江 (HOSHINO, Marie)
昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10756464

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()