

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09533

研究課題名(和文)骨代謝におけるスフィンゴシン1リン酸レセプター3(S1P3)の働き

研究課題名(英文)The role of S1P3 signaling in the bone metabolism

研究代表者

河野 正孝(KOHNO, Masataka)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60405256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：S1P3受容体シグナルの骨代謝における役割解明のため、野生型(WT)およびS1P3ノックアウト(KO)マウスに対し、day0において卵巣摘出術(OVX)を施行し、骨粗しょう症モデルを作成、day28に大腿骨を回収しpQCTにより骨密度を測定した。S1P3-KOマウスはWTマウスより骨幹端部の骨密度が有意に低いことが確認された。

WTマウスおよびS1P3-KOマウスの大腿骨から回収した骨髄由来細胞より分化させた破骨細胞を用い、S1Pによる刺激を加えた7日後の骨吸収面積を比較したところ、生理的な濃度ではWT、KOともに有意な変化を認めず、S1P3シグナルの破骨細胞への働きは小さいと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The role of S1P3 receptor signaling in bone metabolism is poorly understood. Thus, we examined the mechanisms in the development of osteoporosis which were induced by ovariectomy in murine. pQCT showed that S1P3^{-/-} (KO) mice had significantly lower bone mineral density compared with wild type (WT) in the 28th day. Osteoclast precursors obtained from femoral bone marrow were cultured for 7 days in the medium containing M-CSF. The adherent cells were resuspended and seeded on the culture plate coated with an inorganic crystalline calcium phosphate. These cells were cultured in the medium containing M-CSF and RANKL with or without variable concentration of S1P and area of absorption pits were cumulated and compared with each others. There was no significant differences of pit areas between WT and S1P3-KO in physiological concentrations(0, 0.1, 1μM) of S1P. It was suggested that S1P-S1P3 signaling in osteoclast didn't make a significant contribution to its activity.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：スフィンゴシン1リン酸 S1P3受容体 S1P3-KOマウス 骨粗しょう症 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

正常な骨代謝は骨の質と構造を保持するために必要で、骨吸収と骨形成の厳密なバランスにより成立している。このバランスの破綻は骨の微細構造を乱し、骨の安定性の低下、骨折リスクの上昇を来す。RA の様な慢性の炎症性疾患やステロイドなどの薬剤、身体活動の低下や閉経によるエストロゲンの欠乏などが骨粗鬆症の原因となるが、この病態は相対的な骨形成の低下や骨吸収の亢進状態である。近年、日本でも高齢化社会の進展とともに、骨粗鬆症患者数の増加が問題となっており、その予防や治療は極めて重要な研究テーマであると考えられる。骨代謝研究は破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞の相互作用における receptor activator of NF- κ B-ligand(RANKL)や TNF- α などの、破骨細胞分化を来すサイトカインの遺伝子発現調節が中心になされてきている。

スフィンゴシン1リン酸(S1P)は特異的G蛋白質共役型レセプターファミリーであるS1P₁₋₅レセプターに結合することで**細胞外メディエーターとして働くと共に、細胞内メッセンジャーとしても働く**ということが示されている。その生理作用はきわめて強力かつ多彩で、増殖・分化・アポトーシス・形態変化・遊走・浸潤などの細胞の基本的なプロセスに影響を与えることが知られている(Spiegel S, et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4:397-407. / Hla T. Pharmacol Res. 2003;47:401-7.)。

近年、スフィンゴ脂質やスフィンゴシンキナーゼ1 (SphK1) が骨代謝に関与し、その働き的重要性を示す報告がいくつかなされている。RyuらはRANKLは破骨細胞内でのSphK1発現を増強し、それに伴い破骨細胞によるS1Pの産生・分泌が増すこと、S1Pは骨芽細胞 破骨細胞間の相互作用において、骨芽細胞内でcyclooxygenase-2とPGE2を調整しRANKLを増加させることによって、破骨細胞分化において重要な役割を果たしていることを報告している(Ryu J, et al. EMBO J. 2006; 25:5840-51)。また細胞遊走に関しては、IshiiらがS1Pが破骨細胞前駆細胞の遊走をS1P₁, S1P₂レセプターを介して調節すること(Ishii M, et al. Nature. 2009; 458: 524-528, J Exp Med. 2010; 207: 2793-2798)や、Quintらは骨芽細胞の遊走に関してもS1P₁とS1P₂レセプターが協調してを引き起こすこと(Quint P, et al. J Biol Chem. 2013; online)を報告している。この様に骨代謝におけるS1P

シグナルは骨芽細胞、破骨細胞共に重要な役割を果たしていることは間違いないが、これらは主にS1P₁, S1P₂レセプターを介した報告である。S1P₃の発現に関しては報告されているが、現在のところS1P₃シグナルの果たす役割についてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

今回我々は S1P₃ KO マウスを用い S1P₃レセプターシグナルの骨代謝における役割を解明することで、**S1PがS1P₃レセプターを介し骨代謝に関わる**こと及びそれが原発性骨粗鬆症及び RA の骨破壊における治療標的の一つとなり得ることを示す。具体的には卵巣摘出骨粗鬆症モデルを用い S1P₃レセプターの骨代謝への関与を証明する。また野生型と KO マウスにおけるサイトカインやケモカインの発現を検討することで、S1P₃を介した骨代謝のメカニズムを解明する。

骨代謝における S1P₃シグナルの働きを解明する。破骨細胞、骨芽細胞のバランスにおける S1P₃シグナルの役割を解明することで、**原発性骨粗鬆症の治療及び予防のターゲット**となり得ることを示す。また関節リウマチ (RA) における骨代謝異常に対する S1P₃シグナルの役割を解明することで、**RA骨破壊の抑制**を目的とする。

3. 研究の方法

(1) S1P₃ ノックアウトマウスの確立

C57BL/6 および 129/sv の背景を持つ S1P₃ KO マウス(Kono M, et al. J Biol Chem. 2004;279: 29367)に C57BL/6 マウスを 6 世代以上 backcross を行う。S1P₃^{+/-}の雄及び雌を交配し生まれた野生型及び KO マウスとその子孫を実験に用いる。

(2) 卵巣摘出骨粗鬆症 (OVX) モデル

8 週齢の雌の野生型 (WT) および S1P₃ KO マウスに、第 1 日に塩酸メドミジン・ミダゾラム・酒石酸ブトルファノールの腹腔内投与による麻酔下に両側卵巣摘出術もしくは sham 手術を施行し、第 28 日に屠殺し両側大腿骨を摘出する。

(3) 骨密度測定

リン酸緩衝ホルマリンで固定後、peripheral Quantitative Computed

Tomography (pQCT) により骨密度測定を行う。撮影装置は動物研究用 pQCT 骨密度測定装置 XCT Research SA+ (Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Germany) を使用する。骨幹端部は近位成長軟骨より 1.2 mm の部位の、骨幹部は骨長の約 1/2 の部位のスライスを用いて解析を行う。海綿骨と皮質骨はそれぞれ骨密度が 395 mg/cm³ 以下と 690 mg/cm³ 以上の領域と定義し、全骨塩量と海綿骨量は骨幹端部で、皮質骨量は骨幹部で比較検討する。

(4) Bone absorption assay

WT および S1P3-KO マウスの大腿骨を回収し、骨髄内腔を DMEM/F12, GlutaMAX 培地 (Invitrogen, MA, USA) でフラッシュし骨髄細胞を回収する。30 ng/mL の M-CSF (R&D systems, MN, USA) を添加し 7 日培養し骨髄由来マクロファージを誘導する。第 1 日に細胞を回収し OsteoAssay surface (Corning, NY, USA) に 5×10^4 cell/well で播種し、30ng/mL M-CSF + 50ng/mL RANKL を添加して破骨細胞の誘導を行い、2 日毎に培地交換を行う。同時に段階的に濃度を変更した (0, 0.1, 1, 5, 15 μ M) の S1P3 (Cayman Chemical, MI, USA) を加え、第 7 日に細胞成分を完全に剥離し、顕微鏡 BZ-X800 (Keyence, Osaka, Japan) で撮像を行い骨吸収面積を付属の解析ソフトウェアで測定する。

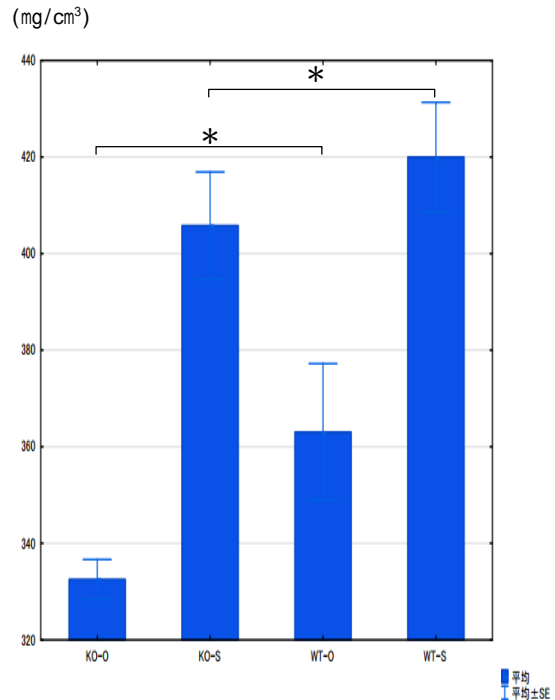
(5) 統計解析

骨密度データの結果は、すべて全て中央値 \pm 標準誤差で記載し、WT 群と S1P3-KO 群の差の比較を Mann-Whitney U test で行い $p=0.05$ を有意水準とする。Bone absorption assay における骨吸収面積率の結果は、平均値 \pm 標準偏差で記載し、各群の差について t 検定で検討を行い $p=0.05$ を有意水準とする。

4. 研究成果

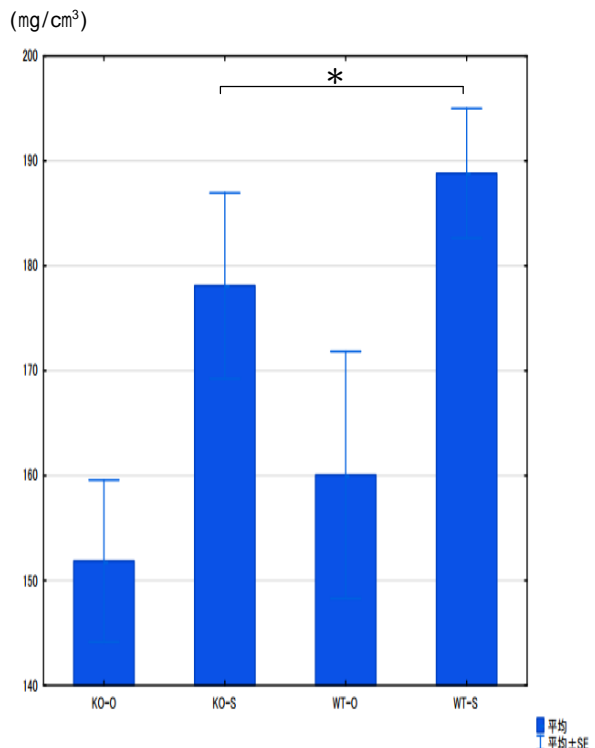
(1) 骨密度

全骨密度



sham 群において、S1P3-KO 群では WT 群より有意に骨密度が低かった (WT-sham 419.98 ± 25.40 mg/cm³, KO-sham 405.80 ± 24.87 mg/cm³; $p < 0.05$)。OVX 群においても同様の結果であった (WT-OVX 363.02 ± 31.73 mg/cm³, KO-OVX 332.54 ± 9.15 mg/cm³; $p < 0.05$)。

海綿骨密度

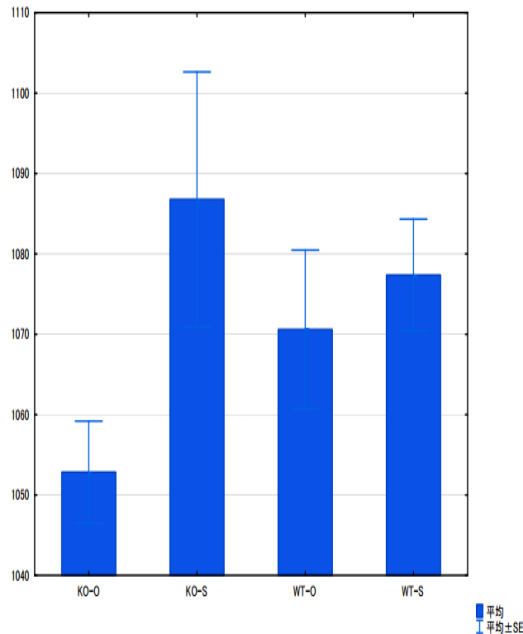


sham 群において、S1P3-KO 群では WT 群よ

り有意に骨密度が低かった (WT-sham $188.82 \pm 13.81 \text{ mg/cm}^3$, KO-sham $178.10 \pm 19.81 \text{ mg/cm}^3$; $p < 0.05$)。OVX 群においては、この差は有意ではなかった (WT-OVX $160.06 \pm 26.32 \text{ mg/cm}^3$, KO-OVX $151.86 \pm 17.25 \text{ mg/cm}^3$; $p = 0.75$)。

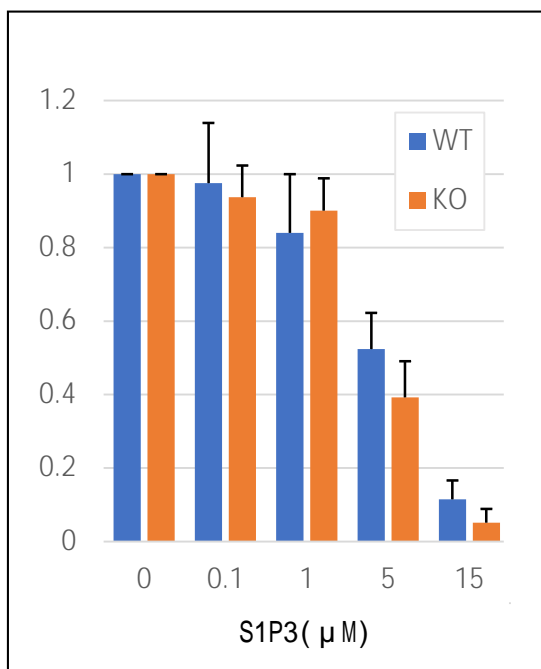
皮質骨密度

(mg/cm^3)



sham 群では、S1P3-KO 群と WT 群で骨密度に有意な差を認めなかった (WT-sham $1077.36 \pm 15.59 \text{ mg/cm}^3$, KO-sham $1086.78 \pm 35.47 \text{ mg/cm}^3$; $p = 0.322$)。OVX 群においてもこの差は有意ではなかった (WT-OVX $1070.60 \pm 22.08 \text{ mg/cm}^3$, KO-OVX $1052.85 \pm 14.19 \text{ mg/cm}^3$; $p = 0.174$)。

(2) Bone absorption assay



生理的な S1P 濃度 (0.1, 1 μM) においては、S1P 無添加時と比較して、骨吸収面積に有意な差を認めなかったが、高濃度の S1P を添加すると (5, 15 μM) 有意な骨吸収の低下を認めた。いずれの濃度においても、WT 群と S1P3-KO 群において、骨吸収面積に有意な差を認めなかった。

(6) 結論

S1P3 は、生理的な状態においても、閉経後骨粗鬆症モデルにおいても骨密度に重要な役割を持つことが示唆された。S1P および S1P3 は生理的濃度では破骨細胞の骨吸収能に大きな影響を及ぼさないと考えられた。S1P3 の骨代謝への関与が示唆されるが、S1P/S1P3 が生理的状态および閉経後骨粗鬆症などの病的状態において、骨形成や骨代謝に与える影響やその機序については更なる研究が必要である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

河野 正孝 (KOHNO, Masataka)

京都府立医科大学・医学(系)研究科・講師

研究者番号：6 0 4 0 5 2 5 6

(2) 研究分担者

中田 博 (NAKADA, Hiroshi)

京都産業大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：9 0 1 1 3 1 4 1

川人 豊 (KAWAHITO, Yutaka)

京都府立医科大学・医学(系)研究科・准教授

研究者番号：5 0 3 3 6 7 3 1