

平成 30 年 5 月 5 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11186

研究課題名(和文) 骨粗鬆症に特有なコラーゲン翻訳後修飾のメカニズム 新規顎骨骨質マーカーの選出

研究課題名(英文) Oxidative stress alters the expression of genes related to posttranslational modifications of collagen

研究代表者

松浦 尚志 (MATSUURA, Takashi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授

研究者番号：60330966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：過酸化水素による酸化ストレスは骨芽細胞の分化と骨基質の石灰化を抑制した。酸化ストレスを受けた骨基質は、ピクロシリウスレッド染色後の偏光顕微鏡下での色彩がオレンジや黄色ではなく、緑色が主体となっており、コラーゲン線維が細くなっていることが示唆された。酸化ストレスによって、LH1、LH2、LH3やGLT25D1のコラーゲン線維形成に関わる酵素の発現量は変化しなかった。一方、コラーゲン分子間架橋形成に関わる酵素のうち、LOXとLOXL-1の発現は酸化ストレスによって増加した。酸化ストレスはコラーゲン翻訳後修飾関連因子に影響を与えて、骨基質を脆弱化させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress induced by hydrogen peroxide repressed the differentiation of and mineralization by osteoblasts. The oxidative stress altered the bone matrix stained with picrosirius red, with a color change from orange to yellow observed under polarized light microscope, suggesting hindrance of collagen fibril formation. The stress altered gene expression of some of posttranslational modifiers of collagen, which control collagen cross-linking and fiber formation. Although there were no expression changes of collagen fibrillogenesis modulators such as lysyl hydroxylase 1 (LH1), LH2, LH3, and glycosyltransferase family 25 domain 1 (GLT25D1), the expression of some collagen cross-link initiators such as lysyl oxidase (LOX) and lysyl oxidase-like protein 1 (LOXL-1) enhanced. The oxidative stress deteriorates bone matrix with thinning of collagen fibrils, possibly due to the alteration of expression of collagen cross-link initiators, LOX and LOXL-1.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：コラーゲン 酸化ストレス 骨芽細胞 コラーゲン架橋形成 コラーゲン線維形成

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症の病因論は、古典的なホルモンの分泌低下による骨形成と吸収のアンバランスによる骨量の減少の理論から、酸化ストレスによる種々の現象の結果として骨量と骨質の低下が起こるという理論にスイッチしてきた。骨量の減少に関しては酸化ストレスによるメカニズムの追求が盛んに行われているが、骨質の低下に関しては未だ不明な部分が多い。今のところ、細胞内の活性酸素を分解する酵素である superoxide dismutase (SOD) の一つである SOD1 のノックアウトマウスの骨組織での研究によって、コラーゲン分子間の生理的架橋の減少と糖添加による非生理的架橋の増加によって骨の脆弱化が起こると説明されている。コラーゲンの架橋形成の開始は lysyl oxidase (LOX) による酵素反応によって起こるが、コラーゲン架橋形成はこの酵素の働きのみではなされない。Lysyl hydroxylase (LH) などによるコラーゲン分子の特異的な部位のリジン残基の水酸化とその後の糖添加はコラーゲン線維形成を抑制的に制御し、そのみならずコラーゲン架橋形成部位の三次元構造の変化などによって架橋形成も変化させうる。酸化ストレスの増加によってそれらの因子がどう変化するかについては未だ不明であり、それらの様相が酸化ストレスの単純な実験系である、*in vitro* での過酸化水素による骨芽細胞が分泌する骨基質への影響を調べる実験系で明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

過酸化水素を作用させることによる酸化ストレスが骨芽細胞の分化および石灰化、骨芽細胞が分泌した骨基質中のコラーゲン線維の様相、とコラーゲンの架橋形成および線維形成に関連した翻訳後修飾を媒介する酵素の遺伝子発現の様相を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞：マウス由来の骨芽細胞様株化細胞である MC3T3-E1 細胞を用いた。

(2) 骨芽細胞に作用させる過酸化水素の濃度の決定：骨芽細胞をディッシュ内でコンフルエントになるまで培養した後、系列希釈した過酸化水素を含んだ石灰化誘導液体培地中で骨芽細胞を数日培養し、細胞が死なない最高濃度を調べた。

(3) 骨芽細胞の分化の測定：(2) で調べた細胞が死なない最高濃度以下の系列希釈した過酸化水素含有石灰化誘導液体培地中で1週間骨芽細胞を培養し、細胞と骨基質を回収した後、アルカリフォスファターゼ活性を測定した。

(4) 骨芽細胞の石灰化の測定：同上の培養条件で骨芽細胞を50日間培養した後、形成された骨基質をアルザリンレッド染色して、その染色を観察し、分光光度計でその染色状

態を定量した。

(5) コラーゲン線維の太さの推定のためのピクロシリウスレッド染色後の偏光顕微鏡下での観察：同上の培養条件で2週間培養し、骨基質をピクロシリウスレッドで染色した後、偏光顕微鏡下でその色彩を観察した。観察される色彩は、オレンジ色、黄色、緑色であるが、オレンジ色であればコラーゲン線維は太く、密な状態であることを示しており、緑色になるほど、コラーゲン線維は細く、線維が疎な状態であることを示す。この色彩から、コラーゲン線維の太さを判定した。

(6) 遺伝子発現量の定量：コラーゲン線維の狭小化が認められた 200 μ M の過酸化水素を含む石灰化誘導液体培地中で2日間培養した骨芽細胞の mRNA 量をリアルタイム PCR で定量し、コントロール(過酸化水素を含まない条件)と比較した。調べる分子は、コラーゲンのリジン残基の水酸化とその後の糖添加に参与する LH1, LH2, LH3 および glycosyltransferase family 25 domain 1 (GLT25D1) と、コラーゲン架橋形成に参与する LOX, lysyl oxidase-like protein 1 (LOXL-1), LOXL-2, LOXL-3 および LOXL-4 とした。House keeping gene を *-actin* として mRNA を相対的に定量した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞に作用させる過酸化水素の濃度の決定：骨芽細胞は 400 μ M の過酸化水素の混入によって翌日には死に至るが、300 μ M では細胞がはがれるなどの影響が認められなかった。従って、300 μ M 以下の系列希釈した過酸化水素を用いて酸化ストレスによる影響を調べることとした。

(2) 酸化ストレスが及ぼす骨芽細胞の分化への影響：過酸化水素の作用によって濃度依存的にアルカリフォスファターゼ活性の低下が認められ、100 μ M 以上の濃度で有意に低い活性値が認められた(図1)。従来の報告通り、酸化ストレスが骨芽細胞の分化を抑制することが示された。

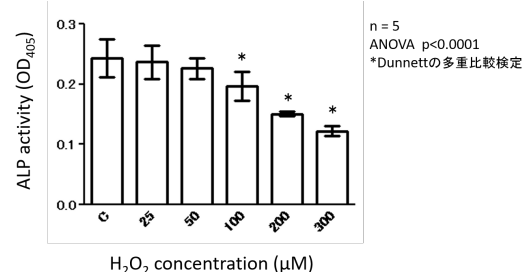


図1 過酸化水素が及ぼす骨芽細胞のアルカリフォスファターゼへの影響

(3) 酸化ストレスが及ぼす骨芽細胞が分泌した骨基質の石灰化への影響：アルザリンレッドの染色の程度は過酸化水素濃度依存的に薄くなり、50 μ M 以上の濃度で有意に薄くなった。しかし、300 μ M でも完全に染色がなくなるわけではなかった(図2)。従来の報告通り、酸化ストレスが石灰化を抑制することが示された。

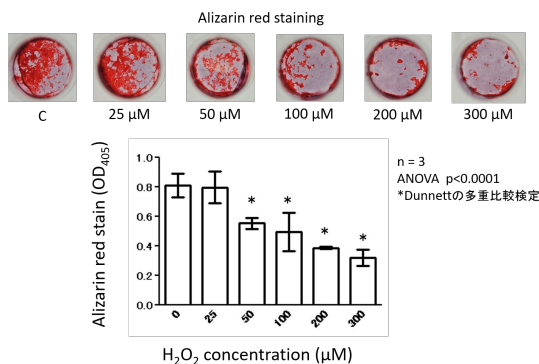


図2 過酸化水素が及ぼす骨芽細胞が分泌した骨基質の石灰化への影響

(4) 酸化ストレスが及ぼす骨芽細胞が分泌した骨基質のピクロシリウスレッド染色後の偏光顕微鏡下での色彩への影響: コントロールと25 μMの過酸化水素存在下では骨基質色彩はオレンジと黄色が主体であったが, 50 μMで緑色の骨基質が増え, 200 μM以上では緑色のみとなった(図3)。この現象は, 25 μMの過酸化水素存在下まではコラーゲン線維の形成が抑制されていないが, 50あるいは100 μMの濃度でコラーゲン線維形成の抑制が始まっていることを示している。また, この色彩の差異は我々が以前報告した骨粗鬆症モデルマウスの骨とコントロールマウスの骨が示す色彩の差異と非常に類似している¹⁾。従って, 酸化ストレスを受けた骨は, 骨粗鬆症の骨と同じように骨コラーゲン線維形成を抑制している可能性が示唆された。

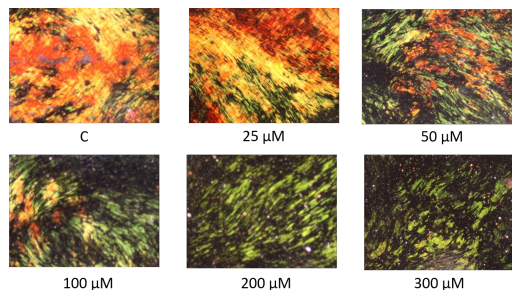


図3 過酸化水素が及ぼす骨芽細胞が分泌する骨基質のピクロシリウスレッド染色後の偏光顕微鏡下での色彩への影響

(5) 酸化ストレスが及ぼすコラーゲン線維形成および架橋形成に関連するコラーゲン翻訳後修飾を媒介する酵素の遺伝子発現への影響: コラーゲン線維形成の関与する酵素の α -actin を house keeping gene とした場合のコントロールと200 μMの過酸化水素存在下での相対的な mRNA のそれぞれの量(平均値 ± SD) は, LH1 で 2.10 ± 0.91 と 1.74 ± 0.86 であり, LH2 で 1.29 ± 0.33 と 1.10 ± 0.28 であり, LH3 で 0.29 ± 0.06 と 0.28 ± 0.08 であり, GLT25D1 で 25.79 ± 9.55 と 25.27 ± 10.92 であった。いずれの酵素の発現も過酸化水素による有意な変化を受けなかった。

一方, コラーゲン架橋形成に関与する酵素では, コントロールと200 μMの過酸化水素存在下での mRNA 量はそれぞれ LOX で 3.41 ± 1.71 と 5.52 ± 2.01 であり, LOXL-1 で 0.91 ± 0.13 と 1.134 ± 0.25 であり, LOXL-2 では従来からの報告が示す通り, 双方ともに検出

されず, LOXL-3 で 1.00 ± 0.14 と 1.10 ± 0.20 であり, LOXL-4 で 1.83 ± 0.44 と 1.88 ± 0.48 であった。コントロールと過酸化水素存在下での mRNA 量に有意差が認められたのは LOX と LOXL-1 であり, いずれも過酸化水素処理によって mRNA が増加した。

過酸化水素処理によって予想外の結果であったが, 架橋形成開始に関与する LOX と LOXL-1 の発現が増加することが分かった。骨粗鬆症の骨ではコラーゲン分子間の生理的な架橋が減少し, その原因は LOX の活性の低下か, 発現の減少が関与しているのではないかと推測されているが, 実際にヒトの骨粗鬆症の骨あるいは骨粗鬆症モデル動物での骨における LOX の発現あるいは LOX の活性を調べた研究はない。今回の酸化ストレス下における LOX と LOXL-1 の遺伝子発現の増加は従来の見解に反する結果である。タンパクレベルあるいは活性レベルを調べていないため, 遺伝子発現が増加しているようにみえても, 実際にタンパクとして分泌されていなかったり, あるいは何らかの影響で活性自体が低下している可能性もありうる。しかし, この発現の増加によって実際のタンパクレベルも増加していても, 骨粗鬆症様の脆弱化した骨基質ができるかもしれない。あくまで推測の域を出ないが, 過剰に形成された分子間架橋によって, 分子間の三次元構造が変化し, コラーゲン線維形成が抑制されたり, 石灰化が抑制される可能性はありうる。今後, 過剰な LOX 発現が骨粗鬆症様骨基質を作りうるのかどうか検証を進める予定である。

<引用文献>

1) Tokutomi K, Matsuura T, Atsawasuwan P, Sato H, Yamauchi M. Characterization of mandibular bones in senile osteoporotic mice. *Connect Tissue Res* 2008;49:361-366.

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 3 件)

黒嶋伸一郎, 熱田生, 松浦尚志, 加来賢: 硬軟組織の難治性疾患に対する病因解明と治療方法開発に向けての取り組み。日本補綴歯科学会第 124 回学術大会。2015 年 5 月, 大宮

Matsuura T, Seo A, Inai T, Arima Y, Sato H: A 3D keratinocyte culture model creating a keratinized epithelial equivalent. 16th Meeting of the International College of Prosthodontists. 2015 年 9 月, Seoul. 松浦尚志, 有馬裕子, 山口雄一郎, 佐藤博信: 骨粗鬆症におけるコラーゲンの翻

訳後修飾と線維形成 .第 23 回日本歯科医
学会総会 . 2016 年 10 月 , 福岡 .

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 尚志 (MATSUURA, T)
福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授
研究者番号 : 6 0 3 3 0 9 6 6

(2) 研究分担者

篠崎 陽介 (SHINOZAKI, Y)
福岡歯科大学・口腔歯学部・助教
研究者番号 : 8 0 7 3 6 6 8 7