

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15545

研究課題名(和文)骨-脳連関に立脚した骨由来脳調節因子の同定

研究課題名(英文) Identification of bone derived brain function regulating factor through bone-brain cross talk.

研究代表者

越智 広樹(Ochi, Hiroki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30582283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本検討では、骨に由来する脳機能の調節機構を解明することを目的として検討した。骨組織特異的膜タンパク質欠損マウスでは、血清成長ホルモンおよびIGF-1の低下に起因して、顕著な成長障害を示した。さらに本マウスでは、骨形成の低下に伴う有意な骨量減少が認められた。また、成熟骨芽細胞から分泌された因子が成長ホルモンの発現を直接的に抑制することも明らかとなり、骨による成長ホルモン分泌に対するフィードバック機構の存在が示された。今後は詳細なメカニズムを解明する予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the regulatory mechanism of the bone derived brain regulating factor. Firstly, we generated the bone specific membrane protein deficient (CKO) mice and analyzed. CKO mice showed dwarfism via low serum GH and IGF-1, and then low bone mass caused by decrease of osteoblast differentiation. Furthermore, matured osteoblast derived factors inhibited the GH expression on a GH3 pituitary cell line. These findings in this study indicates that bone regulates GH secretion in pituitary. We are now trying to clarify the molecular mechanism on the regulation of GH secretion by bone-derived factors.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 成長ホルモン 臓器連関

1. 研究開始当初の背景

近年の遺伝子工学的手法の発展により、ほとんどの臓器が、従来から知られていたよりも多くの機能を有していること、とりわけ、臓器同士は互いに協調し合い、生体の恒常性を維持していることが明らかとなった。このことは、臓器志向型の研究が一定の成果をあげた一方、単一臓器に注目した研究手法の限界を反映するものであり、多細胞生物である生体を全体として理解し、臓器間ネットワークに着目した研究を推進することにより、未知の高次調節機能を見出す可能性を強く示唆している。骨代謝領域においても例外ではなく、これまで申請者は、骨が他の臓器とネットワークを形成し、互いに協調的に代謝を調節し合っていることや、骨外臓器の代謝を積極的に調節していることを報告してきた(Nature 2013, Nat Med 2012, PNAS 2009, Nat Med 2007, Nature 2005, Cell 2002, 2000)。

生体の恒常性維持の観点から考えると、骨から中枢神経系へのフィードバック機構が存在することは想像に難くないが、その本態に関しては未だ不明である

2. 研究の目的

本研究では、骨組織による脳神経系調節機構を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨組織特異的膜タンパク質欠損マウスの作成・解析

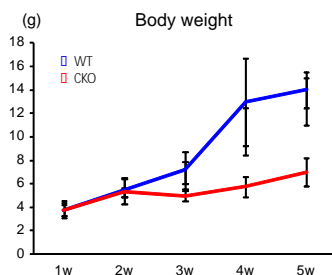
(2) 骨組織に由来する脳神経系調節因子の同定

4. 研究成果

(1) 骨組織特異的膜タンパク質欠損マウスの作成

破骨細胞特異的 Cre マウスとして Cathepsin K Cre マウス、骨芽細胞特異的 Cre マウスとして Type I Cre マウス、そして、骨細胞特異的 Cre マウスとして Dmp1Cre マウスを用い、各細胞特異的に膜タンパク質欠損マウスを作成した。これらの作成したマウスのうち、破骨細胞特異的に膜タンパク質を欠損したマウス(CKO)で成長障害が認められた(図1)。

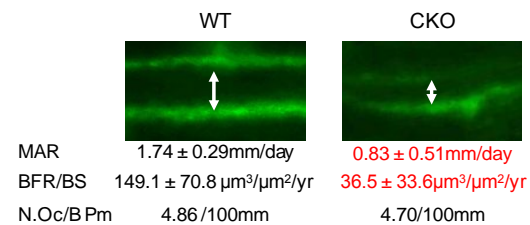
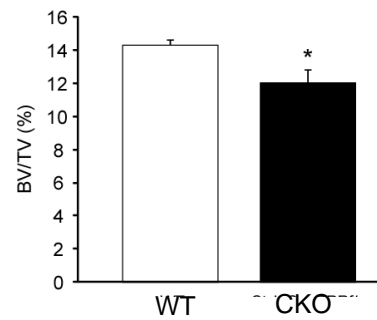
図1



まず、CKO マウスにおける骨の表現型を、マイクロCTならびに骨形態計測法を用いて検討した。その結果、CKO マウスでは、椎体および脛骨において有意な骨量減少を示すことが明らかとなった(図2)。

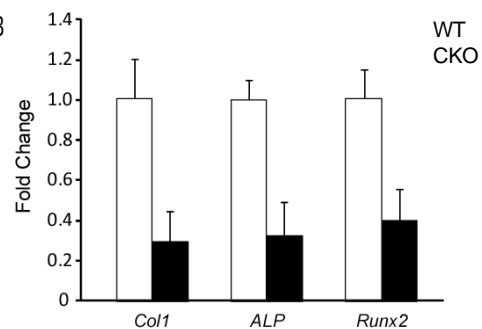
加えて骨形態計測によって骨の詳細なパラメーターを検討したところ、CKO マウスでは破骨細胞系のパラメーターには異常は認められないものの、骨形成が顕著に抑制されていた。

図2

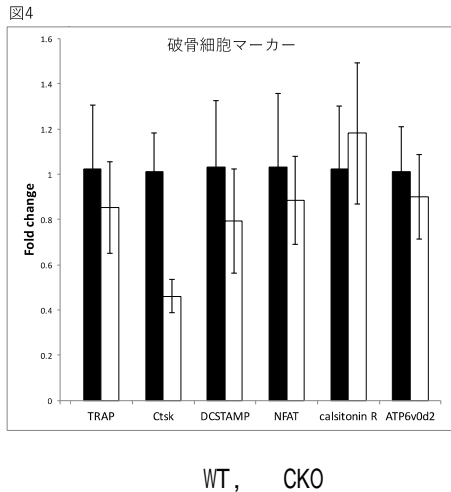


CKO マウスの骨組織から RNA を抽出し Real Time PCR において骨芽細胞、破骨細胞ならびに骨細胞のマーカー遺伝子の発現を確認したところ、骨芽細胞マーカー遺伝子の発現が有意に低下していた(図3)。

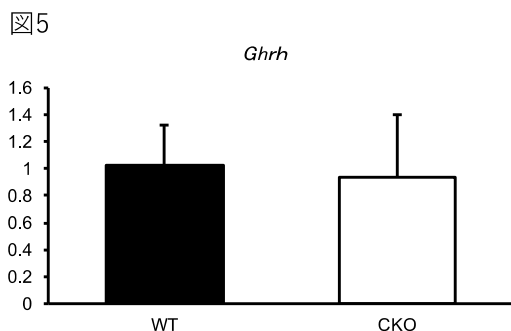
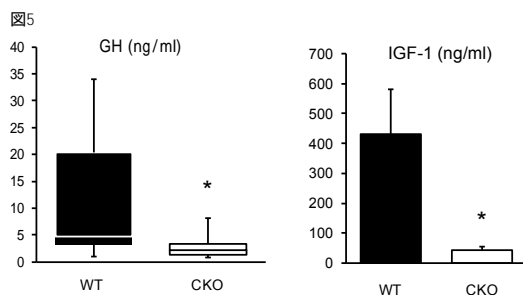
図3



In vitro において CKO マウスから骨髓細胞を採取し、破骨細胞分化に及ぼす影響を検討した。興味深いことに破骨細胞マーカーの発現ならびに分化に影響は認められなかった(図4)。



CKO マウスは顕著な成長障害を示すことから、血中の成長ホルモンならびに IGF-1 の濃度を測定した。その結果、CKO マウスでは成長ホルモン、IGF-1 とともに有意な低下を示した。さらに CKO マウスの下垂体を採取し、成長ホルモンの発現を、RNA ならびにタンパク質レベルで確認したところ、ともに有意に発現が低下していた。一方、視床下部における GHRH の発現には変化は認められなかった (図 5)。



(2) 破骨細胞特異的膜タンパク質欠損マウスにおける標的遺伝子の同定

CKO マウス由来の破骨細胞から RNA を抽出し、標的遺伝子を同定するために次世代シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析を実施した (図 6)。得られた結果から、発現変化

が統計学的に有意なものを選抜し、Real time PCR により定量的に評価した。

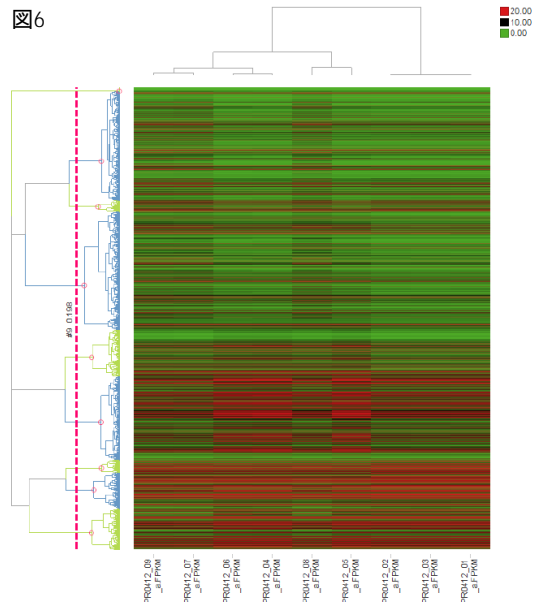


図 階層クラスタリング結果 (gene 9 分割)

(3) 骨芽細胞による成長ホルモン分泌調節

マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞の培養上清を用いて、下垂体前葉細胞株である GH3 細胞を培養し成長ホルモンの発現を検討した。その結果、骨芽細胞の分化に応じて GH3 細胞における成長ホルモンの発現は有意に低下した。骨芽細胞は成長ホルモンによって分化、増殖が促進されることが知られているが、本検討の結果から、骨芽細胞によるネガティブフィードバック機構が存在することが示唆された。

本検討の結果から、成長ホルモンの分泌に対し骨からの新たなフィードバック機構が存在することが示された。今後はその本態を明らかにするとともに、詳細なメカニズム解明を行っていく予定である。

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 7 件)

Circadian Clock Regulates Bone Resorption in Mice. Xu C, Ochi H, Fukuda T, Sato S, Sunamura S, Takarada T, Hinoi E, Okawa A, Takeda S., *J Bone Miner Res.* 2016 31(7):1344-55. 査読有り

A Comparison of the Process of Remodeling

of Hydroxyapatite/Poly-D/L-Lactide and Beta-Tricalcium Phosphate in a Loading Site. Akagi H, **Ochi H**, Soeta S, Kanno N, Yoshihara M, Okazaki K, Yogo T, Harada Y, Amasaki H, Hara Y., *Biomed Res Int*. 2015(2015):730105.

doi:10.1155/2015/730105. 査読有り

MicroRNA-145 regulates osteoblastic differentiation by targeting the transcription factor Cbfb. Fukuda T, **Ochi H**, Sunamura S, Haiden A, Bando W, Inose H, Okawa A, Asou Y, Takeda S. *FEBS Lett*. 2015 Oct 24;589(21):3302-8. 査読有り

Bone morphogenetic protein 4 and bone morphogenetic protein receptor expression in the pituitary gland of adult dogs in healthy condition and with ACTH-secreting pituitary adenoma. Sato A, **Ochi H** (Corresponding author), Harada Y, Yogo T, Kanno N, Hara Y., *Domest Anim Endocrinol*. 2015 doi:pii: S0739-7240(15)00102-2. 査読有り

The Two Sides of Vitamin E Supplementation. **Ochi H**, Takeda S., *Gerontology*. 2015;61(4):319-26. 査読有り

Genetic determination of the cellular basis of the ghrelin-dependent bone remodeling. Ma C, Fukuda T, **Ochi H**, Sunamura S, Xu C, Xu R, Okawa A, Takeda S., *Mol Metab*. 2015 4(3):175-85. 査読有り

Enhancement of Runx2 expression is potentially linked to β -catenin accumulation in canine intervertebral disc degeneration. Iwata M, Aikawa T, Hakozaiki T, Arai K, **Ochi H**, Haro H, Tagawa M, Asou Y, Hara Y., *J Cell Physiol*. 2015 230(1):180-90. 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 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

越智 広樹 (OCHI Hiroki)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30582283

(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

()