

令和 5 年 4 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02922

研究課題名(和文) 骨格発生及び骨軟骨疾患における好気性・嫌気性ATP合成の関与に関する解析

研究課題名(英文) The study for ATP biosynthesis in skeletal development and skeletal disorders

研究代表者

秋山 治彦 (Akiyama, Haruhiko)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60402830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨格形成における好気性ATP合成経路の機能解明のため、Tfam遺伝子を四肢骨格形成段階の未分化間葉系細胞特異的に欠失させたノックアウトマウスを作成した。このマウスは生後数日で骨折の自然発生を認める骨脆弱性モデルであった。よって、骨格形成、特に骨形成過程においては、ミトコンドリアにおける好気性ATP合成経路が必須であることが明らかになった。次に、内軟骨骨形成の過程において成長軟骨板を精査した。乳酸脱水素酵素A(LDHA)コンディショナルノックアウト遺伝子改変マウスでは長管骨の著明な変形を認めたことから、内軟骨骨形成にはLDHAによる嫌気性ATP合成経路が必須であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨軟骨形成過程におけるエネルギー代謝の変化、すなわち好気性エネルギー代謝と嫌気性エネルギー代謝の精査は、胎性期の骨格異常疾患の研究に重要であるのみでなく、生後の骨粗鬆症や変形性関節症の病態解明及び新規治療法の開発にも大いに役立つ結果をもたらした。今後は、好気性エネルギー代謝及び嫌気性エネルギー代謝を亢進させる低分子化合物などの探索を行い、骨関節疾患における新規治療法の確立を目指す。

研究成果の概要(英文)：For analysis of the role of aerobic ATP production in skeletogenesis, we generated Tfam conditional knockout mice. These mice exhibited spontaneous bone fracture within a week after birth. In contrast, LDHA conditional knock out mice exhibited severe growth plate deformity. These data showed that during osteogenesis, aerobic ATP production by mitochondria is critical, and that during chondrogenesis, anaerobic ATP production is indispensable.

研究分野：整形外科

キーワード：骨格形成 エネルギー代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国は高齢者が増加し、主な運動器疾患も次第に変化している。特に、骨粗鬆症に伴う骨折や軟骨変性による変形性関節症は、50歳代から罹患する患者が増加し、60歳代以降手術的治療が必要な患者が増加している。この運動器の代表的な組織である骨・軟骨組織の加齢による変化はこれまで多くの研究がなされてきたが、細胞レベルでの細胞の加齢的变化の研究はほとんどなされていない。骨組織は比較的血流が豊富な組織ではあるが骨細胞は硬い基質に被われており、また海綿骨の骨芽細胞も骨髓内のため十分な酸素分圧下で活動しているか未だ明らかではない。また、軟骨は無血管組織であり従来より低酸素組織と考えられているが、これら骨・軟骨細胞における好気性 ATP 生合成や解糖系嫌気性 ATP 生合成についての詳細な研究報告は未だ存在していない。組織の老化においては細胞レベルでの ATP 生合成能が次第に低下している可能性が高く、本研究では骨・軟骨細胞における好気性 ATP 生合成及び解糖系嫌気性 ATP 生合成を遺伝子改変マウスを用いて *in vivo* で詳細に解析することとした。骨格においてエネルギー産生機能状態と疾患との関わりとそのメカニズムを明らかにすることは、加齢に伴う骨格疾患の革新的治療法開発のために極めて重要である。前述の通り、我々は近年、マウス骨格発生段階において *Tfam* を四肢骨格特異的に欠失した遺伝子改変マウスを作成した(秋山、投稿中)。このマウスは著明な四肢骨格変形を認め、生後は四肢の多発性骨折を自然発症した。この結果から、ミトコンドリアにおける好気性 ATP 生合成は骨格の正常な形成および骨軟骨疾患に極めて重要な役割を果たしていることが強く示唆される。さらに、このコンディショナルノックアウトマウスの四肢軟骨細胞を単離し、ミトコンドリア DNA 量を測定したところ殆ど測定できなかった(下図：左)。しかし、細胞内 ATP 量は野生型マウスに比べ30%程度の減少にとどまり(下図：中)、細胞外乳酸量が増加していた(下図：右)。よって、このマウスの骨軟骨では好気性 ATP 生合成の減少に伴う解糖系嫌気性 ATP 生合成の亢進という代償機構が生じている。すなわち、骨軟骨組織では好気性 ATP 生合成と解糖系嫌気性 ATP 生合成の両者が極めて重要であることが示唆された。以上の結果から、本研究において、発生期及び生後の骨格組織において好気性 ATP 生合成と解糖系嫌気性 ATP 生合成の両者を詳細に解析することとした。さらに、ミトコンドリアでの好気性 ATP 生合成が低下した場合には解糖系嫌気性 ATP 生合成が亢進するが、これだけでは正常な骨格組織を維持するには十分な ATP が産生されないことが明らかとなった。よって、低分子化合物で骨軟骨細胞における ATP 生合成を促進し細胞内 ATP 量を増加させることは骨格の病態の改善に有効であることが強く示唆されている。

骨軟骨細胞及び骨軟骨疾患において、好気性 ATP 生合成と解糖系嫌気性 ATP 生合成の役割を体系的に詳細に研究した報告は、国内外を通してこれまでなく、極めて独創的である。

また、本研究成果は、ミトコンドリアにおける好気性 ATP 生合成と解糖系嫌気性 ATP 生合成の骨格形成における機能解明という研究面のみでなく、現在我が国で大きな問題となっている加齢に伴う骨格疾患、すなわち骨粗鬆症や変形性関節症に対する病態の理解を深め、現代社会における高齢者運動器疾患に対し新しい治療薬の開発が期待でき、社会貢献度も極めて大きい。

2. 研究の目的

我が国は高齢社会の進行で、骨・軟骨組織などの運動器に関わる疾患、例えば骨組織では骨粗鬆症による脆弱性骨折、軟骨組織では軟骨変性による変形性関節症などが急速に増加している。これらの疾患の原因や病因は未だ明らかになっていない点が多く、特にこれらの疾患における骨・軟骨組織における個々の細胞の生理的活動の低下の原因は全く解明されていない。細胞はミトコンドリアにおける好気性 ATP 生合成と解糖系による嫌気性 ATP 生合成により主たるエネルギーを産生しているが、老化に伴うミトコンドリア機能の低下による細胞機能の低下は各々の臓器の機能不全につながる可能性が示唆されている。本研究では、好気性 ATP 生合成低下及び嫌気性 ATP 生合成低下による骨格形成異常を詳細に解析し、さらに骨格系細胞における ATP 生合成を亢進する低分子化合物をスクリーニングし、主に高齢者における骨格疾患の革新的な治療法を開発することを目標とする。

3. 研究の方法

I. 骨格形成における好気性 ATP 生合成経路の機能解明

1) Tfam コンディショナルノックアウト遺伝子改変マウスを用いた解析

Prx1-Cre トランスジェニックマウスを用いて Tfam 遺伝子をマウス胎生期四肢骨格形成段階の未分化間葉系細胞特異的に欠失させたコンディショナルノックアウトマウスの結果から、ミトコンドリアにおける好気性 ATP 産生が骨格形成と正常な骨格維持に重要であることが明らかになった。この骨格異常が内軟骨性骨形成過程のどの段階の障害に起因するかを詳細に解析するため、Col2a1-Cre トランスジェニックマウスを用いた分化軟骨細胞特異的 Tfam 欠失マウス、Col10a1-Cre ノックインマウスを用いた肥大軟骨細胞特異的 Tfam 欠失マウス、Col1a1-Cre トランスジェニックマウスを用いた骨芽細胞特異的 Tfam 欠失マウスを作製し、それぞれの骨格表現系を skeletal preparation、組織学的解析、in situ hybridization による遺伝子発現解析で明らかにする。これらの結果から好気性 ATP 産生の抑制が骨格形成のどの段階でどのように必須であるかを詳細に解明する。

2) 骨軟骨培養細胞を用いた in vitro 解析

初代軟骨細胞及び骨芽細胞を用いてミトコンドリアにおける好気性 ATP 産生能及び嫌気性 ATP 産生能を分化段階ごとに解析する。細胞を分化培養液で培養し、各分化段階ごとに細胞内 ATP 濃度、ミトコンドリア DNA 量、乳酸量を定量する。次に各分化段階の細胞にミトコンドリア ATP 産生阻害物質であるロテノンまたは LDHA 阻害物質である GKS2837808A を投与し、細胞増殖活性、アポトーシスを解析し、Sox9, Col2a1, Col10a1, Ihh,

PTHrP 受容体, Col1a1, Osteocalcin, Runx2 など骨軟骨細胞に発現している遺伝子発現レベル、骨軟骨細胞における低酸素状態関連遺伝子 HIF および AMPK 遺伝子発現の変化を解析する。

II. 骨格形成における嫌気性 ATP 生合成経路の機能解明

乳酸脱水素酵素 A (LDHA) コンディショナルノックアウト遺伝子改変マウスを用いた解析
嫌気性解糖系における ATP 産生は、ピルビン酸が LDHA により乳酸に変化する反応による。本研究では LDHA flox アレルを有するコンディショナルノックアウト遺伝子改変マウス作製する。この遺伝子改変マウスと Prx1-Cre トランスジェニックマウス、Col2a1-Cre トランスジェニックマウス、Col10a1-Cre ノックインマウス、Col1a1-Cre トランスジェニックマウスを交配し骨格形成過程の各段階で LDHA 遺伝子を欠失させ、それぞれの骨格表現系を skeletal preparation、組織学的解析、in situ hybridization による遺伝子発現解析で明らかにする。これらの結果から嫌気性 ATP 産生の抑制が骨格形成のどの段階でどのように必須であるかを詳細に解明する。

III. 恒常活性化型 AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) による ATP 産生亢進が骨格形成に与える影響の詳細な解析

1) 恒常活性化型 AMPK コンディショナルトランスジェニックマウスの作製 (秋山、河村)

AMPK は酵母から人まで高度に保存された細胞内のエネルギーセンサーで、AMPK はグルコースの取り込みやミトコンドリア新生などを介して ATP 産生を亢進する。骨格形成における ATP 生合成を亢進させるため CAG プロモーターを用いて組織特異的に恒常活性化型 AMPK 変異体を発現させるためのコンディショナルトランスジェニックマウスを作成する。恒常活性化型 AMPK コンディショナルトランスジェニックマウスに Prx1-Cre, Col2a1-Cre, Col10a1-Cre, Col1a1-Cre マウスを交配し、四肢未分化間葉系細胞特異的、分化軟骨細胞特異的、肥大軟骨細胞特異的、骨芽細胞特異的に ATP 生合成を亢進させたマウスを作製する。それぞれの骨格表現系を skeletal preparation、組織学的解析、in situ hybridization による遺伝子発現解析で明らかにする。これらの結果から骨軟骨細胞の ATP 生合成が亢進した場合、骨格形成のどの段階でどのように影響するかを解明する。

IV. 骨軟骨細胞 ATP 生合成を亢進する低分子化合物のスクリーニング

従来の諸家の研究や我々の研究結果から、骨軟骨細胞での ATP 生合成を亢進する薬剤の開発は、骨折などの骨格疾患のみならず加齢により発症する骨粗鬆症や変形性関節症の初期治療に期待できるのではないかと推察される。本研究では、1 次スクリーニングとして骨および軟骨初代培養細胞を用いて約 10,000 種類の種々の化学構造を有する低分子合成化合物を、ルシフェリンを用いた ATP 発光量で定量解析し、リード化合物を選択する。

4. 研究成果

骨格形成における好気性 ATP 生合成経路の機能解明のため、Tfam 遺伝子を四肢骨格形成段階の未分化間葉系細胞特異的に欠失させたノックアウトマウスを作成した。このマウスは生後数日で骨折の自然発生を認める骨脆弱性モデルであった。成長軟骨帯の組織学的異常は

軽度であった。遺伝子改変マウスの骨組織は I 型コラーゲンの産生及び蓄積が減少し、オステオカルシンの発現及び産生が減少し、アパタイトの配向性が不正となり骨脆弱性をきたしていた。よって、骨格形成、特に骨形成過程においては、ミトコンドリアにおける好気性 ATP 生合成経路が必須であることが明らかになった。乳酸脱水素酵素 A(LDHA)コンディショナルノックアウト遺伝子改変マウスでは長管骨の著明な変形を認めたことから、内軟骨骨形成には LDHA による嫌気性 ATP 生合成経路が必須であることが明らかになった。成長軟骨帯の増殖軟骨は扁平化し柱状構造が乱れていた。細胞増殖も低下し、増殖軟骨は未熟な肥大細胞化をきたしており、一次骨化中心の形成も遅延していた。また、生後の遺伝子改変マウスでは初期変形性関節症の組織学的所見を認めた。以上の所見から、骨格形成、特に内軟骨骨形成過程においては、嫌気性 ATP 生合成経路が必須であることが明らかになった。10000 種類の合成化合物を用いて骨軟骨細胞で ATP 生合成が更新する化合物をスクリーニングし、現在、リード化合物の 2 次スクリーニングを予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	河村 真吾 (Komura Shingo) (30456511)	岐阜大学・医学部附属病院・助教 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関