

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09659

研究課題名(和文) 雌特異的な骨芽細胞における性差シグナル系の解明と骨粗鬆症治療法への応用

研究課題名(英文) Elucidation of sex-specific signaling pathways in female-specific osteoblasts and their application to osteoporosis therapies.

研究代表者

石田 昌義 (Ishida, Masayoshi)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号：50643251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：PAI-1は線溶系に重要なプラスミノゲン活性化因子(PA)を阻害する因子で、骨粗鬆症など止血作用以外に種々の疾患の病態に関与することが知られている。我々は以前に、PAI-1が雌マウスでのみ糖尿病性骨粗鬆症の病態に関与し、雌由来骨芽細胞でのみ骨芽細胞の分化や機能を抑制することを示した。そこで、網羅的遺伝子発現解析により雌骨芽細胞でPAI-1刺激によって発現が増加した遺伝子を抽出したところ、RanBP3Lが抽出された。RanBP3L遺伝子の機能解析によって骨芽細胞の機能や分化を抑制したため、RanBP3L遺伝子はPAI-1を介した雌における糖尿病性骨粗鬆症の病態に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症の病態形成において、明らかな性差が認められ、これまでは、多くの研究において、性ホルモンの作用機構という観点から、多くの研究が進められてきた。しかし、性ホルモン以外の性差を説明する機構については、ほとんど何もわかっていないのが現状である。本研究成果は性ホルモン関連以外の骨粗鬆症病態を説明する新規な因子を見出したところに学術的意義があり、骨粗鬆症の発症の機序を解明し、治療薬の開発につながる点において社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：PAI-1 is an inhibitor of plasminogen activator (PA), which is important for the fibrinolytic system and is known to be involved in the pathogenesis of various diseases other than hemostasis such as osteoporosis. We previously showed that PAI-1 is involved in the pathogenesis of diabetic osteoporosis only in female mice and suppresses osteoblast differentiation and function only in female-derived osteoblasts. Therefore, we used comprehensive gene expression analysis to extract genes whose expression was increased by PAI-1 stimulation in female osteoblasts, and RanBP3L was extracted, and functional analysis of the RanBP3L gene showed that it suppressed osteoblast function and differentiation, suggesting that the RanBP3L gene is involved in the PAI-1-mediated differentiation of osteoblasts in females. This suggests that the RanBP3L gene is involved in the pathogenesis of diabetic osteoporosis.

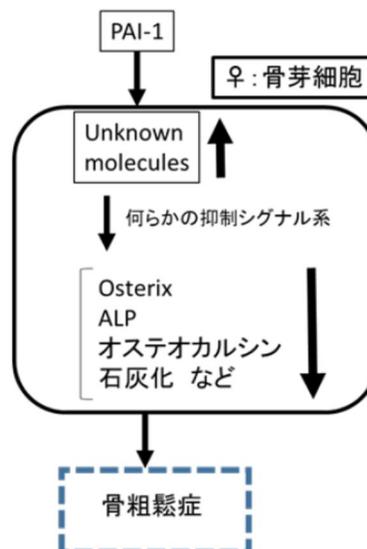
研究分野：骨代謝

キーワード：骨粗鬆症 骨芽細胞 シグナル伝達因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床において、骨密度低下および骨折リスクの増加が閉経後女性において顕著に認められることから、骨粗鬆症の病態形成に性差があることが示唆される。さらに糖尿病性骨粗鬆症やステロイド性骨粗鬆症の病態や頻度においても性差が認められる。これまで、多くの遺伝子改変マウスを用いた研究や臨床知見より、女性ホルモン（エストロゲン）の骨代謝における重要性および骨代謝における女性ホルモンや男性ホルモン（アンドロゲン）の作用機構が明らかにされてきた。一方、骨粗鬆症へのエストロゲン補充療法は治療の選択肢の一つではあるが、その骨密度や骨折への効果はビスホスホネートなどと比較して限定的である。これらのことから、性ホルモン以外の因子が骨粗鬆症病態に強く関与している可能性が考えられるが骨粗鬆症発症機序における性ホルモン以外の性差を説明する因子は未だ不明である。



雌骨芽細胞における未知シグナル系の存在

したがって、右図に示すように、本研究では雌の骨芽細胞には骨粗鬆症発症を規定する因子（遺伝子）やシグナル系が細胞レベルで存在するのではないかと仮説、また、同時に我々の教室で見出した雌由来骨芽細胞にのみ PAI-1 が抑制的に作用するのは PAI-1 に対する何らかの特異的なシグナル経路が存在することを明らかにするという問いを立て研究を進めることにした。

2. 研究の目的

PAI-1 は線溶系に重要な PA を阻害する因子で、骨粗鬆症・糖尿病・心血管疾患・癌など、止血作用以外に種々の疾患の病態に関与することが知られてきた。我々は以前に、PAI-1 が雌マウスでのみ糖尿病性骨粗鬆症の病態に関与し、雄由来ではなく雌由来の骨芽細胞でのみ、骨芽細胞の分化や機能を抑制することを示した¹。しかし、PAI-1 が雌骨芽細胞でのみ抑制作用を示す機序は不明であった。そこで、今回 PAI-1 刺激により発現が雌でのみ増加する因子の同定を、網羅的遺伝子発現解析(cDNA マイクロアレイ)を用いて試みた。

3. 研究の方法

(1) 初代骨芽細胞の分離と培養

生後3~5日目の雌マウス頭蓋骨よりコラゲナーゼ処理により骨芽細胞を単離し、 α -MEM/10%FBS培地で培養を行い、継代2代目の細胞を実験に用いた。

(2) マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

雌由来骨芽細胞に活性型 PAI-1 を 20 μ M で 24 時間刺激を行い、トータル RNA を抽出精製を行った。cDNA マイクロアレイはアフィメトリクス社製の Clariom S Assay をメーカー推奨プロトコール通りに実施し、遺伝子発現解析は TAC4.0 ソフトウェアを用いて刺激有で刺激無と比較し 2.5 倍以上上昇した遺伝子を抽出した(図1)。

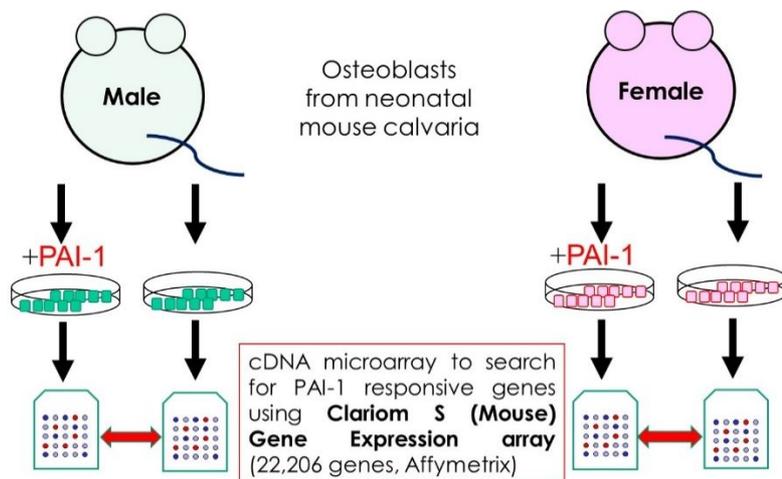


図1 網羅的遺伝子発現解析

マウス初代培養骨芽細胞に活性型 PAI-1 で 24 時間刺激を行い RNA を抽出し cDNA マイクロアレイにて網羅的遺伝子発現解析を行い PAI-1 により誘導される遺伝子を抽出した。

(3) リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析とウェスタンブロッティング法による発現解析
 トータル RNA は cDNA へ逆転写を行ったものを鋳型にサイバークリーン法でマイクロアレイにて抽出した候補遺伝子の発現確認を行った。細胞溶解液を調整し、SDS-PAGE ゲルによりタンパクを分離後、PVDF 膜に転写し、目的とする標的タンパクに対する抗体により、標的タンパクの発現を解析した。

(4) 骨芽細胞株への RanBP3L cDNA の過剰発現

骨芽細胞株として MC3T3-E1 細胞を用い RanBP3L 遺伝子を一過性に導入して 48 時間後に実験に用いた。

(5) RanBP3L 過剰発現骨芽細胞における BMP シグナル系の解析

(4)で得られた一過性 RanBP3L 過剰発現株からトータル RNA を抽出し、骨芽細胞特異的遺伝子発現 (Runx2, Osterix, Osteocalcin, ALP)を(3)で記したリアルタイム PCR 法にて確認した。さらに、BMP2 で刺激を行い 1 時間後の Smad1/5/8 のリン酸化をウェスタンブロッティング法にて確認した。一過性過剰発現株に BMP2 刺激を行って 3 日後に ALP 染色を行って ALP 活性を検出した。

4 . 研究成果

PAI-1 は線溶系に重要な PA を阻害する因子で、骨粗鬆症・糖尿病・心血管疾患・癌など、止血作用以外に種々の疾患の病態に関与することが知られてきた。我々は以前に、PAI-1 が雌マウスでのみ糖尿病性骨粗鬆症の病態に関与し、雄由来ではなく雌由来の骨芽細胞でのみ、骨芽細胞の分化や機能を抑制することを示した(Diabetes 2013)。しかし、PAI-1 が雌骨芽細胞でのみ抑制作用を示す機序は不明であった。そこで、今回 PAI-1 刺激により発現が雌でのみ増加する因子の同定を、網羅的遺伝子発現解析(cDNA マイクロアレイ)を用いて試みた(図1)。

新生児雄雌マウス由来骨芽細胞に PAI-1 を添加し、雌でのみ PAI-1 により発現が 2.5 倍以上増加した遺伝子を抽出したところ、RanBP3L や Ccl3 を含む 41 個の遺伝子が抽出された。遺伝子発現解析とウェスタンブロッティング法により、Ccl3 は PAI-1 で刺激した雌由来骨芽細胞株には有意な発現上昇は見られなかったことから Ccl3 は PAI-1 により誘導される因子ではないものとして除外した。一方、RanBP3L については、PAI-1 刺激によって雌由来骨芽細胞で有意な発現上昇を見られたため、PAI-1 刺激によって発現が誘導され、骨芽細胞の機能抑制を生じさ

せる因子の一つである可能性が高まったため、解析を進めることにした(図2)。

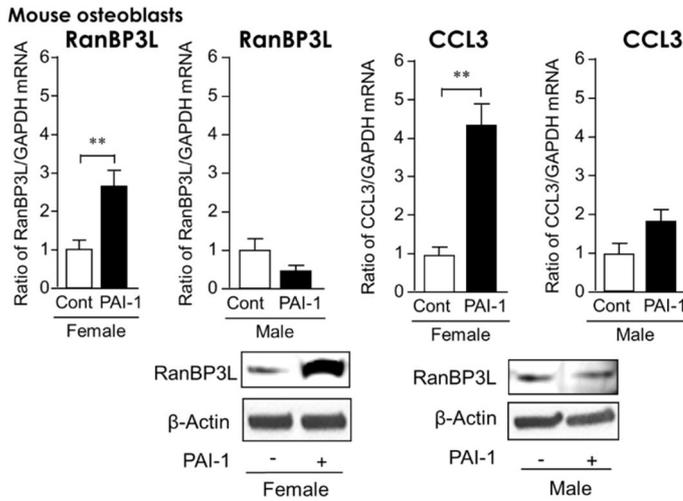


図2 候補遺伝子の発現量解析(qRT-PCR 法とウェスタンブロッティング法)

新生児雄雌マウス由来骨芽細胞に PAI-1 を添加し、雌でのみ PAI-1 により発現が 2.5 倍以上増加した遺伝子、RanBP3L や Ccl3 の発現をリアルタイム PCR 法とウェスタンブロッティング法にて雌骨芽細胞でのみ、PAI-1 刺激に応じて RanBP3L の発現誘導が確認された。

次に、RanBP3L の骨芽細胞への作用機序を検討した。MC3T3-E1 細胞において、RanBP3L 過剰発現は、BMP による骨芽細胞分化・ALP 活性促進を有意に阻害し、Smad1/5/8 のリン酸化を促進し、Smad6 と Smad7 の発現を増加させたが、Noggin の発現には影響を及ぼさなかった。抑制性 Smad の Smad6, Smad7 の発現は RanBP3L 過剰発現によって上昇していたことから、RanBP3L による骨芽細胞の分化抑制の機序には Smad6, Smad7 を介していることが示唆された(図3)。

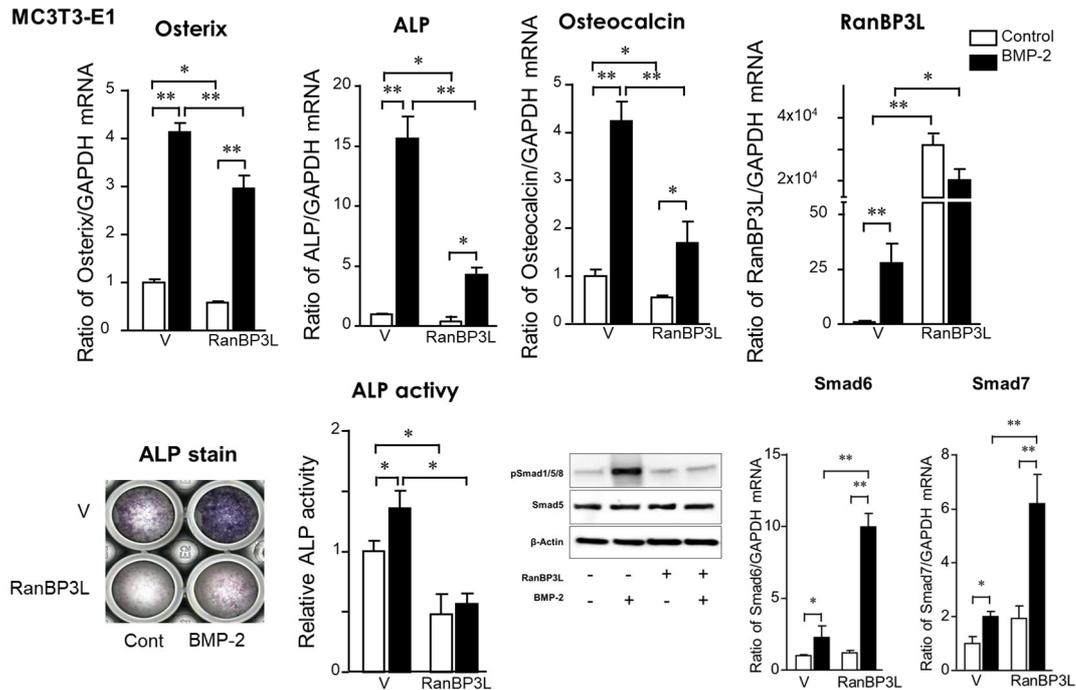


図3 RanBP3L 遺伝子の機能解析

マウス由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞に RanBP3L 遺伝子を過剰発現させた。RanBP3L 過剰発現細胞と空ベクターのみ導入の細胞(V、発現なし)を BMP2 存在下()と非存在下()で3日間培養後、RNA 抽出し、骨芽細胞マーカー(Osterix, ALP, osteocalcin)と抑制性 Smad (Smad6, Smad7) の発現を解析した。ALP 活性は細胞染色と細胞溶解液を用いて行った。ウェスタンブロッティング法にて Smad1/5/8 のリン酸化レベルを解析した。

今回の実験結果より、新しく同定したシグナル伝達因子 RanBP3L の発現増加が、PAI-1 の雌でのみ骨芽細胞分化・機能を抑制する作用に重要であることが考えられ、さらに RanBP3L の骨芽細胞への作用機序に抑制性 Smad による BMP シグナルの阻害が関与することが示唆された。

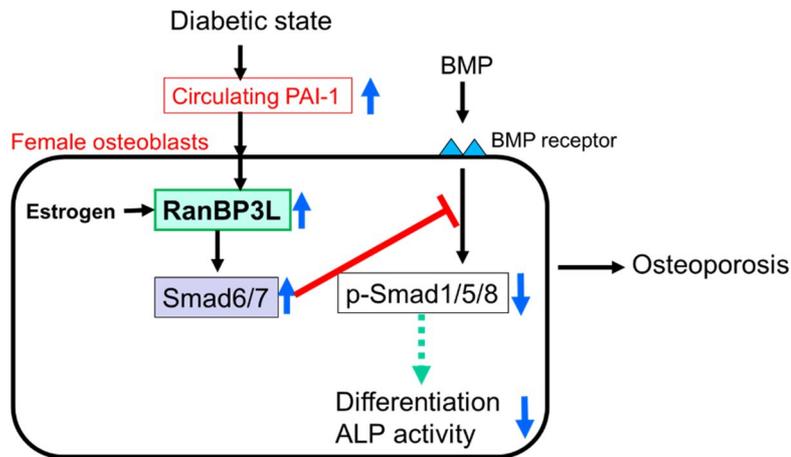


図 4 RanBP3L 遺伝子が骨芽細胞の機能を抑制するメカニズム

糖尿病が進行すると血中 PAI1 が上昇する。それが雌においては骨芽細胞に作用し RanBP3L の発現誘導が引き起こされ RanBP3L が抑制性 Smad の発現増加を増やす。さらに Smad1/5/8 のリン酸化を抑制し、骨芽細胞の機能が抑制されて、糖尿病性骨粗鬆症が引き起こされるのかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Okada Kiyotaka, Okamoto Takahiro, Okumoto Katsumi, Takafuji Yoshimasa, Ishida Masayoshi, Kawao Naoyuki, Matsuo Osamu, Kaji Hiroshi	4. 巻 134
2. 論文標題 PAL-1 is involved in delayed bone repair induced by glucocorticoids in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115310 ~ 115310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115310	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Masayoshi, Kawao Naoyuki, Mizukami Yuya, Takafuji Yoshimasa, Kaji Hiroshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Influence of Angpt11 on osteoclast formation and osteoblastic phenotype in mouse cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-021-04278-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Masayoshi, Kawao Naoyuki, Mizukami Yuya, Takafuji Yoshimasa, Kaji Hiroshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Serpinb1a suppresses osteoclast formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101004 ~ 101004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ehara Hiroki, Tatsumi Kohei, Takafuji Yoshimasa, Kawao Naoyuki, Ishida Masayoshi, Okada Kiyotaka, Mackman Nigel, Kaji Hiroshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Role of tissue factor in delayed bone repair induced by diabetic state in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0260754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0260754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石田昌義、河尾直之、岡田清孝、辰巳公平、松尾 理、高藤義正、峯 嘉宏、梶 博史
2. 発表標題 RanBP3LはPlasminogen activator inhibitor (PAI) -1のマウス骨芽細胞作用における性差に関与する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田昌義、河尾直之、岡田清孝、辰巳公平、松尾 理、梶 博史
2. 発表標題 RanBP3LはPlasminogen activator inhibitor (PAI) -1のマウス骨芽細胞作用における性差に関与する
3. 学会等名 第29回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------