

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18502

研究課題名(和文) エストロゲン欠乏による骨折治癒遅延の分子メカニズム解明と治癒促進法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms of impaired fracture healing due to estrogen deficiency and development of methods to promote healing

研究代表者

池戸 葵 (Ikedo, Aoi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・特定研究員

研究者番号：60834520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン欠乏は骨組織の恒常性だけでなく骨折治癒も損なうが、そのメカニズムは不明である。本研究では、成熟骨芽細胞特異的エストロゲン受容体(ER)及び遺伝子欠損マウスを用いて、骨再生過程におけるERs役割を明らかにすることを目的とした。OCN-Cre;ER f/fマウスの仮骨形成量は、ER f/fマウスと比較して14日後でのみ減少を認めた。一方で、OCN-Cre;ER f/fマウスは、ER f/fマウスと比較して仮骨形成量に変化を認めなかった。したがって、OCN陽性の骨芽細胞では、ERではなくERが、骨再生過程の後期における仮骨リモデリングを制御することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、各分化段階の骨芽細胞におけるER及びERが骨折治癒に与える影響は不明であった。本研究では、成熟骨芽細胞のERが骨再生後期の仮骨リモデリングに関与することが示された。本研究結果は、エストロゲン欠乏による骨折治癒遅延を改善するための治療法の開発に向けた基礎的な知見になり得る。

研究成果の概要(英文)：Estrogen deficiency impaired fracture healing. It has been reported that OVX induced estrogen deficiency in mice attenuated fracture healing and the expression ratio of estrogen receptor (ER) and ER changes during the process of fracture healing under estrogen deficiency. However, the roles of ERs in fracture healing process are still unknown. The purpose of this study is the clarification of the significance of ERs during fracture healing using osteoblast-specific ERs knockout mice with drill hole bone regeneration model. The callus volume at the restricted drill hole site was significantly decreased in OCN-Cre;ER f/f compared to ER flox mice only at day 14 and not at day 10. In addition to femoral BMD, there is no significant difference in regeneration callus volume between OCN-Cre;ER f/f and ER flox mice. These results suggested that ER but not ER in osteocalcin-positive osteoblasts might regulate the late stage of fracture healing process.

研究分野：スポーツ科学

キーワード：骨芽細胞 エストロゲン受容体 骨再生

1. 研究開始当初の背景

閉経後骨粗鬆症は、超高齢社会である本邦において解決すべき重要課題である。さらに近年、月経異常(無月経、稀発月経)のある日本人女子トップアスリートが約40%を占めることが報告されており、低骨量や疲労骨折の発症率が高いことが問題視されている。このようなエストロゲン欠乏は、骨折リスクを高めるだけでなく、骨折治癒も損なうため、高齢者はADLの低下、アスリートは競技人生に大きな影響を与える。

骨折治癒過程は、主に炎症反応期、修復期、リモデリング期の3期で構成されている。卵巣を摘出(OVX)しエストロゲン分泌を低下させたマウスでは、仮骨の炎症性サイトカイン発現が増加し(Haffner-Luntzer et al., *Eur J Med Res.* 2017)、血管新生の低下、仮骨形成の減少が見られ、リモデリングや石灰化の異常、力学的特性の低下が起こることが報告されている(Beil et al., *J Trauma.* 2010, He et al., *Bone.* 2011)。このように、エストロゲン欠乏は骨折治癒における一連の過程を損なわせている。さらに、骨折仮骨において、ER α 発現量の低下、ER β 発現量の増加が認められている(He et al., *Bone.* 2011)。我々も予備実験において、骨膜損傷部位にER α 陽性の細胞が集積していることを確認している。これらの知見から、ERの発現量の変化が骨折治癒過程に関与していることが推察される。

これまで、エストロゲンの骨代謝制御機構の解明には、骨の細胞種特異的にER遺伝子を欠損した遺伝子改変マウスが役立ってきた。骨代謝の恒常性維持について、骨芽細胞の各分化段階特異的なER α の機能を評価した報告では、各分化段階に応じてER α により制御される骨の部位(皮質骨、海綿骨)が異なることが示されている(Almeida et al., *J Clin Invest.* 2013, Melville et al., *J Bone Mineral Res.* 2013, Kondoh et al., *Bone.* 2014)。しかし、このようなERの機能の違いが骨折治癒過程に及ぼす影響は、これまで研究されたことがなく、大部分が不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨折治癒過程中の骨芽細胞におけるエストロゲン-ERシグナル異常により骨折治癒が遅延される詳細な分子メカニズムを解明し、新規骨折治癒促進法を開発することである。

3. 研究の方法

3-1. 卵巣摘出(OVX)マウスの作成

麻酔下にて、7-8週齢の野生型マウスの卵巣を摘出し、エストロゲン欠乏を誘発した。その2週間後骨欠損処置を実施し、骨再生過程を観察した。

3-2. 骨芽細胞特異的ER遺伝子欠損マウスの作出

Osterix 遺伝子(Osx; 骨芽細胞前駆細胞)、Coll1a1 遺伝子(前骨芽細胞)、Osteocalcin 遺伝子(OCN; 成熟骨芽細胞)、Dentin matrix acidic phosphoprotein 1 遺伝子(Dmp1; 骨細胞)のプロモーターの下流にCreタンパク質を発現させたCreマウスと、ER α およびER β 遺伝子がloxP配列に挟まれたfloxedマウスを交配し(Cre/loxPシステム)、作出した(図1)。このマウスの8週齢時に骨欠損処置を実施し、骨再生過程を観察した。

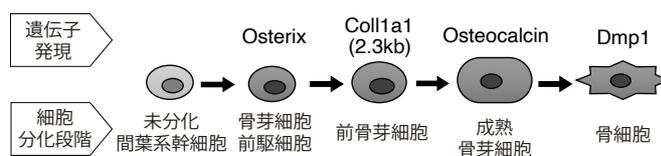


図1. 骨芽細胞分化と遺伝子発現

このマウスの8週齢時に骨欠損処置を実施し、骨再生過程を観察した。

3-3. 皮質骨欠損骨再生モデル

麻酔下にて、①及び②のマウスの脛骨前内側の骨幹部付近の皮膚を切開した後、皮下組織および骨膜を剥離し、直径0.8mmのドリルで脛骨前面に穴を開けた。その後、皮下組織を元の位置に戻し、皮膚を縫合した(図2)。



図2. 皮質骨欠損骨再生モデル

3-4. 骨密度及び骨構造解析

皮質骨欠損処置後、経時的(Day 7, 14, 21)に摘出した骨は、DXAによる骨密度測定、 μ CTによる骨構造解析(仮骨量の評価)を行った。

3-5. 組織学的解析

DAX及び μ CTの撮影を実施したサンプルは、脱灰し、パラフィン組織切片を作製した。組織

観察は、H&E 染色によって行った。また、Toluidine blue 染色及び TRAP 染色を行った切片を用いて骨形態計測を実施し、仮骨内の骨芽細胞及び破骨細胞を評価した。

4. 研究成果

まず、OVX による骨再生過程への影響を検討した。OVX マウスは、Sham マウスと比較して、体重の有意な増加 (図 3. B) と子宮重量の有意な低下 (図 3. C) を認めた。すなわち、OVX によるエストロゲン欠乏の誘発は成功したと考えられる。このマウスの骨再生過程について検討を進めると、OVX マウスは Sham マウスと比較して骨欠損処置 10 日後および 14 日後に仮骨形成量の有意な減少を認めた (図 3. D,E)。しかし、7 日後の仮骨量には差を認めなかった。そこで、骨芽細胞特異的 $ER\alpha$ 遺伝子欠損マウスの骨再生過程は骨欠損処置後 10 日および 14 日に仮骨形成量を評価することとした。

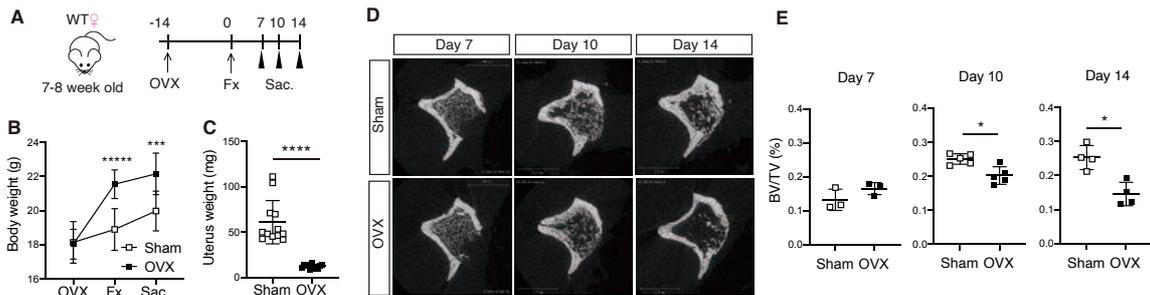


図 3. OVX マウスの骨再生過程

次に、骨芽細胞各分化段階特異的に $ER\alpha$ 遺伝子を欠損させたマウスの骨再生過程について評価を行った。各マウスのうち骨再生過程に表現型を認めたのは、成熟骨芽細胞特異的 $ER\alpha$ 遺伝子欠損マウス ($ER\alpha^{AOB/AOb}$)であった。

$ER\alpha^{AOB/AOb}$ マウスは、骨欠損処置 14 日後において仮骨形成量が減少し、10 日後には変化を認めなかった (図 5. A,B)。一方で、成熟骨芽細胞特異的 $ER\beta$ 遺伝子欠損マウス ($ER\beta^{AOB/AOb}$) では、仮骨形成量に変化を認めなかった (図 5. C,D)。

また、 $ER\alpha^{AOB/AOb}$ マウスにおける仮骨部位の骨芽細胞および破骨細胞を骨形態計測にて評価したところ、 $ER\alpha^{AOB/AOb}$ マウスの骨芽細胞面 (Ob.S/BS) および骨芽細胞数 (N.Ob/B.Pm) は、 $ER\alpha^{fl/fl}$ マウスと比較して処置後 10 日目でのみ有意な減少を認めた (図 6. C,E)。これに対して、 $ER\alpha^{AOB/AOb}$ マウスの破骨細胞面 (Oc.S/BS) および破骨細胞数 (N.Oc/B.Pm) は、 $ER\alpha^{fl/fl}$ マウスと比較して 14 日目でのみ有意な減少を認めた (図 6. B,F)。これらの結果から、OCN 陽性の骨芽細胞では、 $ER\beta$ ではなく $ER\alpha$ が、骨芽細胞や破骨細胞の数を調節し、骨再生過程の後期における仮骨リモデリングを制御することが示された。

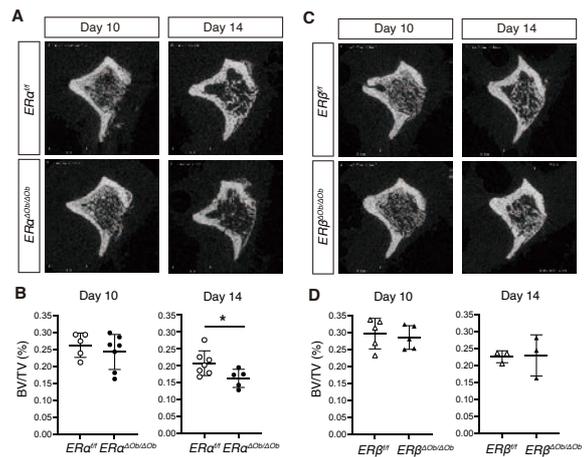


図 5. $ER\alpha^{AOB/AOb}$ マウスは骨欠損 14 日後に仮骨量の減少を認めたが、 $ER\beta^{AOB/AOb}$ マウスには認められなかった

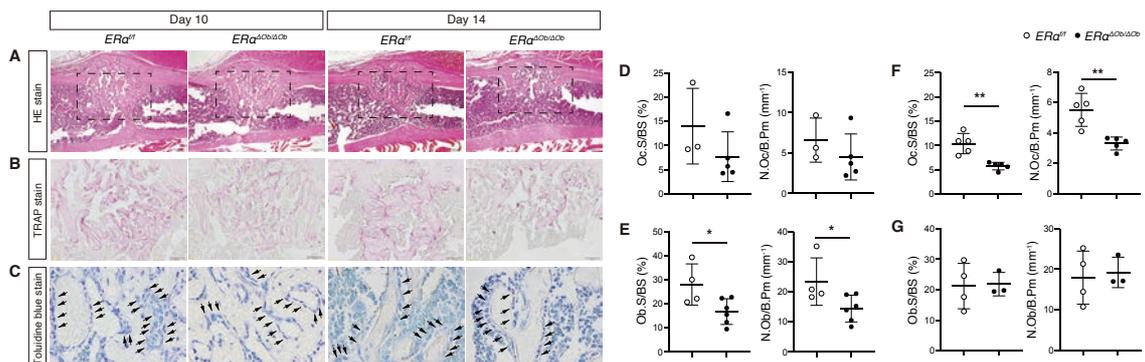


図 6. 仮骨内における破骨細胞と骨芽細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ikedo Aoi, Imai Yuuki	4. 巻 559
2. 論文標題 Estrogen receptor in mature osteoblasts regulates the late stage of bone regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 238 ~ 244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.04.112	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池戸葵, 今井祐記
2. 発表標題 骨折治癒過程での骨芽細胞におけるエストロゲン受容体の役割.
3. 学会等名 第10回 Orthopedic Research Club.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Aoi Ikedo, Yuuki Imai
2. 発表標題 Estrogen receptor in mature osteoblasts regulate the late stage of fracture healing.
3. 学会等名 The ECTS Congress 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------