

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18952

研究課題名（和文）骨細胞の生存シグナルとしての8-nitro-cGMPの機能解析

研究課題名（英文）8-Nitro-cGMP as a survival signal of osteocytes

研究代表者

長山 和弘（Nagayama, Kazuhiro）

昭和大学・歯学部・普通研究生

研究者番号：30827035

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）：骨表面で骨形成を担う骨芽細胞が、骨基質中に埋め込まれ分化した細胞である骨細胞は、互いにネットワークを形成し、骨への力学的負荷やPTHの刺激を受容し、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収を調節する。骨細胞株Ocy454細胞はPTH刺激により8-nitro-cGMPの産生が上昇したが、外因性の8-nitro-cGMPはスクレロスチンあるいはRANKLの発現に影響を及ぼさなかった。一方、低酸素状態はOcy454細胞の生存率を低下させた。また、乳酸はスクレロスチンとRANKLの産生の調節を因子した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨細胞が産生するスクレロスチンは骨芽細胞による骨吸収を抑制する。また、骨細胞が産生するRANKLは破骨細胞の分化と骨吸収を支持する。したがって、骨細胞の生存や機能は、骨代謝調節に重要な役割を果たしている。骨細胞の機能を調節する因子に関する研究は、骨代謝の基礎的理解に加え、臨床的意義も大きい。今回の研究成果は、骨細胞機能の調節に酸素分圧や乳酸などの低分子化合物などの環境因子が重要な役割を果たしていること示唆している。

研究成果の概要（英文）：Osteocytes are cells differentiated from osteoblasts that produce bone matrix proteins and induce mineralization. They receive mechanical stimuli and regulate bone formation by osteoblasts and bone resorption by osteoclasts through the production of sclerostin and RANKL. While Ocy454, an osteocyte line, produced 8-nitro-cGMP after stimulation by PTH, chemically synthesized 8-nitro-cGMP did not affect either the production of sclerostin or RANKL. On the other hand, low oxygen tension lowered the viability of Ocy454 cells. Lactic acid regulated the production of sclerostin and RANKL by Ocy454 cells.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：骨細胞 一酸化窒素 酸素

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

骨表面で骨基質を産生と石灰化を担う骨芽細胞が、骨形成に伴い骨基質中に埋め込まれ分化した細胞である骨細胞は、骨組織に最も多く存在する細胞である。骨細胞は、互いにネットワークを形成し、骨への力学的負荷を受容し、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収を調節すると言われている。エストロゲンなどの性ホルモンの減少、加齢、ステロイド剤投与および不動(メカニカルストレスの減弱)は、骨量を減少させる刺激として知られるが、これらはいずれも骨細胞の細胞死を誘導する。逆に、性ホルモンや成長ホルモン、副甲状腺ホルモン(PTH)は、骨細胞の細胞死を抑制する[Bone 54:264-271, 2013]。骨細胞は、骨芽細胞による骨形成および破骨細胞による骨吸収を制御するため、骨細胞のアポトーシスは、骨代謝全体を攪乱する。メカニカルストレスを受容した骨細胞では一酸化窒素(NO)の産生が亢進する[J Bone Miner Res 21:1722-1728, 2006; Calcif Tissue Int 94:414-422, 2014]。また、骨細胞で抗アポトーシス作用を示すエストロゲンは、そのシグナル伝達に NO を用いるという報告がある[J Biol Chem 287:978-988, 2012; Bone 96:8-17, 2017]。しかし、NO がどのような機序で骨細胞の生存に関わるかは不明である。近年、NO と活性酸素種(ROS)の下流シグナル分子として 8-nitro-cGMP が発見された[Nat Chem Biol 3:727-735, 2007]。8-nitro-cGMP は、可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)活性化の他、様々なタンパク質のシステイン残基を S-グアニル化と呼ばれる新しい翻訳後修飾をすることでシグナルを伝えることが明らかとなった。さらに、イオウ原子が複数連結したパースルフィドやポリスルフィドなどの活性イオウ分子種(RSS)が 8-nitro-cGMP の分解を開始することが明らかとなった[Nat Chem Biol 8:714-24, 2012]。さらに、RSS 産生酵素(システインパースルフィド合成酵素)としてミトコンドリア型システイン tRNA 合成酵素(CARS2)が同定された[Nat Commun 8:1177, 2017]。このように、8-nitro-cGMP は、生成・シグナル伝達機構・不活性化の経路が解明され、シグナル分子としての要件を満たすことになった。

8-nitro-cGMP は、KEAP-1 を S-グアニル化することで、KEAP-1 に不活性化されている転写因子 NRF-2 を活性化し、その制御化にある種々の抗酸化タンパク質、抗酸化酵素類の発現を誘導する。これにより、8-nitro-cGMP は、細胞に対する種々のストレスに対して細胞保護作用を発揮することが明らかとなっている[Nat Chem Biol 3:727-735, 2007; J Immunol 182:3746-56, 2009]。

2. 研究の目的

我々は、マウス骨組織中の骨細胞および骨細胞様細胞株 Ocy454 細胞が 8-nitro-cGMP を産生することを発見した。副甲状腺ホルモン(PTH)は Ocy454 細胞による 8-nitro-cGMP の産生を促進した。しかし、その機能は明らかとなっていない。予備的検討では、外因性 8-nitro-cGMP はスクレロスチンあるいは RANKL の発現に大きな影響を与えなかった。化学合成した 8-nitro-cGMP がスクレロスチンや RANKL 産生などの骨細胞機能に対する効果や骨細胞の細胞死に与える影響を解析したいと考えた。これらを明らかにすることで、骨細胞のアポトーシスに起因する様々な病態の新たな治療法、予防法の開発に重要な情報を提供できると考えた。本研究は、NO の下流シグナル分子 8-nitro-cGMP が骨細胞における細胞生存シグナルであるという仮説を検証するために研究を開始した。

3. 研究の方法

化学合成 8-nitro-cGMP 添加が PTH 刺激時および非刺激時の Ocy454 細胞におけるスクレロスチン産生、RANKL 産生にどのような影響を与えるかを検証することとした。そこで、NO 産生、ROS 産生、8-nitro-cGMP 産生に大きな影響を与える、酸素分圧および pH 環境が骨細胞の生存と機能に与える影響を解析することとした。低酸素分圧下(2%酸素下)および通常の酸素分圧下(20%酸素下)にマウス骨細胞株 Ocy454 細胞を培養し、細胞の形態、生存率、スクレロスチンの発現を評価した。さらに、代謝性アシドーシスの原因のひとつである乳酸が Ocy454 細胞の生存率、スクレロスチン発現などの骨細胞機能に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

Ocy454 細胞に PTH を作用させることで、8-ニトロ-cGMP の産生が上昇した。PTH で刺激した Ocy454 細胞でスクレロスチンの mRNA とタンパク質が低下、RANKL の mRNA とタンパク質の発現が上昇した。一方、化学合成 8-ニトロ-cGMP を外因性に Ocy454 細胞に与え、スクレロスチンと RANKL の発現を解析した。その結果、8-ニトロ-cGMP はスクレロスチンと RANKL の発現には直接関与しなかった(Nagayama K et al., In Vitro Cell Dev Biol Animal 55:45-51, 2019)。

8-ニトロ-cGMP 生成に必要な NO および ROS の産生に影響を及ぼす酸素分圧が骨細胞に与

える影響を調べたところ、Ocy454 細胞は、2%酸素環境下で形態が球状になり、生存率が低下した。また、代謝性アシドーシスの原因物質のひとつである乳酸がスクレロスチンと PTH 刺激後の RANKL の産生の制御因子と考えられた。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 嶋崎 絢、長濱 諒、塩龜素哉、上原めぐみ、加藤梨友、岩崎このみ、長山和弘、吉田 寛、各務知芙美、高橋正皓、中納治久、槇 宏太郎
2．発表標題 昭和大学口唇口蓋裂センターにおける骨移植時期の違いによる顎顔面成長評価.
3．学会等名 第43回 日本口蓋裂学会総会・学術大会
4．発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学歯学部 口腔生化学講座 http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/ 昭和大学歯科病院 矯正歯科 http://www.ortho-showa.com
--

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