

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08814

研究課題名(和文) 生理的および炎症性骨破壊における骨細胞とアンジオテンシン受容体の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of osteocytes and angiotensin receptors in physiological and inflammatory bone destruction

研究代表者

守田 吉孝 (Morita, Yoshitaka)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：50346441

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)：アンジオテンシンII受容体は全身諸臓器に幅広く内在性発現があり、骨組織では骨芽細胞及び骨細胞などで発現を認める。生理的および炎症性骨破壊におけるアンジオテンシンII受容体の役割を解明するため、アンジオテンシンII受容体(AT1R)遺伝子欠損マウスと関節リウマチモデルであるTNF過剰発現マウスと交配させて作出した二重変異マウスの解析を行った。AT1R遺伝子欠損は関節炎部位の骨破壊や椎体や脛骨の骨量に影響を与えなかった。さらに、骨細胞特異的AT1R遺伝子を欠損させたマウスを作出して解析を行ったが、関節炎部位の骨破壊や全身骨に対して影響を与えないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は先行研究にて、モデル動物を使用し、外因性アンジオテンシンIIの過剰投与が炎症性骨破壊のリスク因子となり得ることを示してきた。本研究では、生理的あるいは炎症性骨破壊における内因性のアンジオテンシンIIの役割を検討したが、アンジオテンシンII受容体の遺伝子欠損は関節炎部位の骨破壊や全身骨に対して影響を与えなかった。総合的に考察すると、慢性腎臓病や肥満等のレニン・アンジオテンシン系が過剰に亢進した際には骨破壊は亢進するが、そうでない場合は内因性アンジオテンシンIIの骨代謝における役割は限定的である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Angiotensin II receptors are expressed endogenously in a wide range of organs throughout the body, and in bone tissue they are expressed in osteoblasts and osteocytes. To elucidate the role of angiotensin II receptors in physiological and inflammatory bone destruction, we analyzed double mutant mice generated by crossing angiotensin II receptor (AT1R) gene-deficient mice with TNF-overexpressing mice, a model of rheumatoid arthritis. AT1R gene deletion did not affect bone destruction at the site of arthritis or bone mass in the vertebrae or tibia. Furthermore, mice lacking the osteocyte-specific AT1R gene were generated and analyzed, and no effect was found on bone destruction at the site of arthritis or on whole-body bone.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アンジオテンシンII 関節リウマチ 関節炎 レニン・アンジオテンシン系 骨細胞

### 1. 研究開始当初の背景

(1) アンジオテンシン II (Ang II) は血圧や体液の調整を行っているが、Ang II 受容体は全身諸臓器に幅広く内在性発現があり、骨組織では骨芽細胞及び骨細胞などで発現を認めている。また、Ang II は破骨細胞の分化成熟を促進させることで、骨吸収を亢進させることが明らかとなっている。しかしながら、生体内での Ang II と骨代謝の関係には未だ不明な点が多い。

(2) 関節リウマチなど炎症性骨破壊を起こす病態において、Ang II の役割は解明されていない。我々の先行研究にて、関節リウマチのモデルマウスであるヒト TNF トランスジェニック (TNF-tg) マウスに対して Ang II の持続投与を行ったところ、関節炎マウスの骨破壊が有意に増強することを明らかにしている。

### 2. 研究の目的

先行研究をさらに発展させ、関節炎状態における内因性の Ang II 及び Ang II 受容体の役割について検討を行うこと、近年骨代謝の司令塔として注目されている骨細胞に焦点をあて、Ang II の骨代謝における役割を解明することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) TNF-tg マウスの骨破壊における Ang II タイプ 1 受容体 (AT1R) の役割の解明：  
内因性の Ang II の役割を検討するため、AT1R 欠損マウスと TNF-tg マウスを交配し、産出された二重変異マウスの骨破壊や骨量を解析した。具体的には、経時的な足関節腫脹を観察、16 週齢時の足関節、脛骨および腰椎を摘出、組織学的な足関節の重症度を評価し、骨破壊の程度、骨量の評価を足関節 (距骨)、脛骨、腰椎のマイクロ CT 解析、組織学的解析をそれぞれ行った。

(2) 骨細胞特異的 AT1R 欠損マウスの生理的及び病的状態における骨量の解析：  
骨細胞特異的な Cre 発現系統 Dmp1-Cre マウスを用いて、骨細胞特異的 AT1R 遺伝子欠損マウスを作成、さらに TNF-tg マウスと交配して、三重変異マウスを作成した。上記(1)と同様に経時的な骨破壊や骨量を解析した。

(3) マウス骨細胞株 IDG-SW3 細胞を用いた解析：  
骨細胞からの骨吸収・骨形成因子の発現に Ang II が及ぼす影響を検討するために、IDG-SW3 細胞を Ang II や TNF 等の炎症性サイトカインにて刺激し、定量 PCR 法にて様々な骨代謝調整因子やレニン・アンジオテンシン系 (RAS) 関連分子の発現を検討した。

### 4. 研究成果

(1-1) AT1R の欠損は TNF-tg の関節炎の程度に影響を与えない：  
AT1R 欠損は TNF-tg マウスの体重 (図 1A)、関節炎スコア (図 1B)、関節炎発症の足の数 (図 1C) 等、関節炎の肉眼的重症度に影響を与えなかった。組織学的解析においても、炎症細胞浸潤 (図 1D) や軟骨破壊の程度 (図 1E) において、有意な違いは認められなかった。

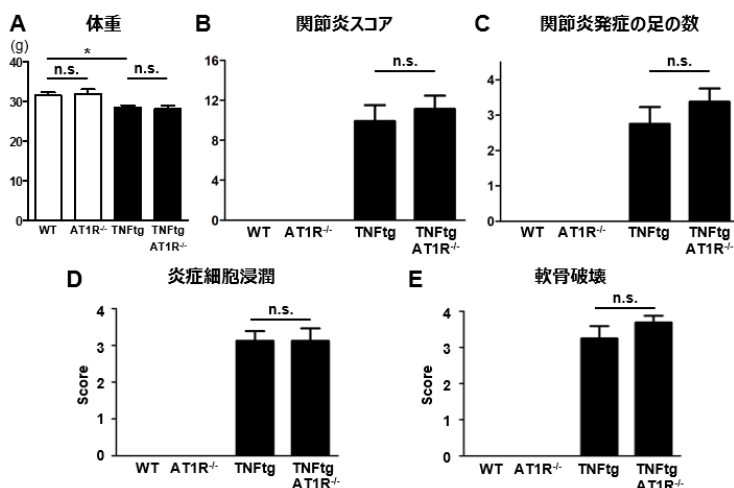


図 1. AT1R の欠損が TNF-tg マウスの関節炎に与える影響。  
n.s.: 有意な違いなし。  
\*: p<0.05 で有意差あり。

(1-2) AT1R の欠損は TNF-tg の骨破壊に影響を与えない：  
マイクロ CT 解析を行ったが、AT1R の欠損は TNF-tg マウスの関節炎部位である足関節 (距骨) の骨びらんに影響を与えなかった (図 2A)。定量的解析でも、距骨の骨量、骨量の%減少率、骨びらんの程度 (Ev/Rpv) において、有意な違いは認められなかった (図 2B, 2C, 2D)。

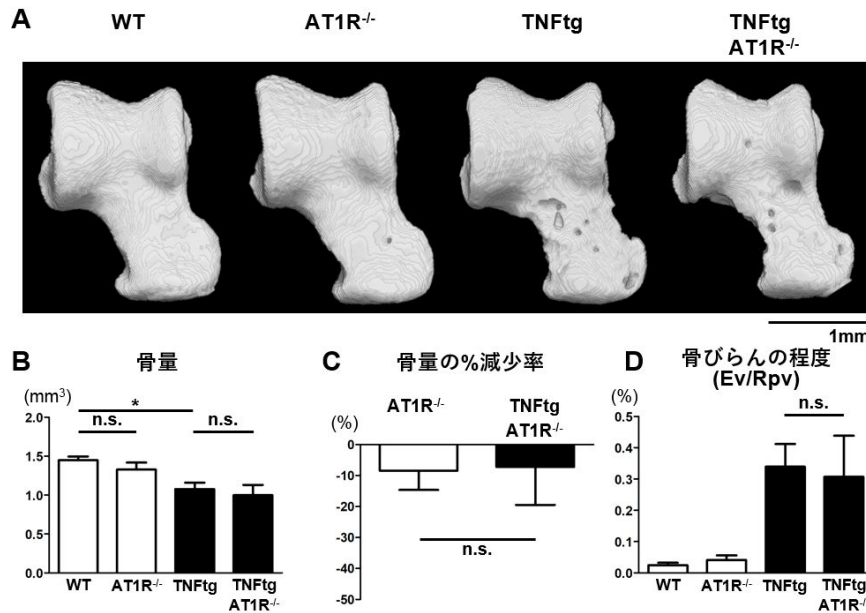


図 2. AT1R の欠損が TNF-tg マウスの距骨の骨破壊に与える影響。  
n.s.: 有意な違いなし。  
\*:  $p < 0.05$  で有意差あり。

(1-3) AT1R の欠損は TNF-tg マウスの脛骨や椎体の骨量に影響を与えない：  
TNF-tg マウスの脛骨と椎体の海綿骨の骨量について、マイクロ CT 解析を行ったが、AT1R の欠損はこれらの骨量に影響を与えなかった (図 3)。

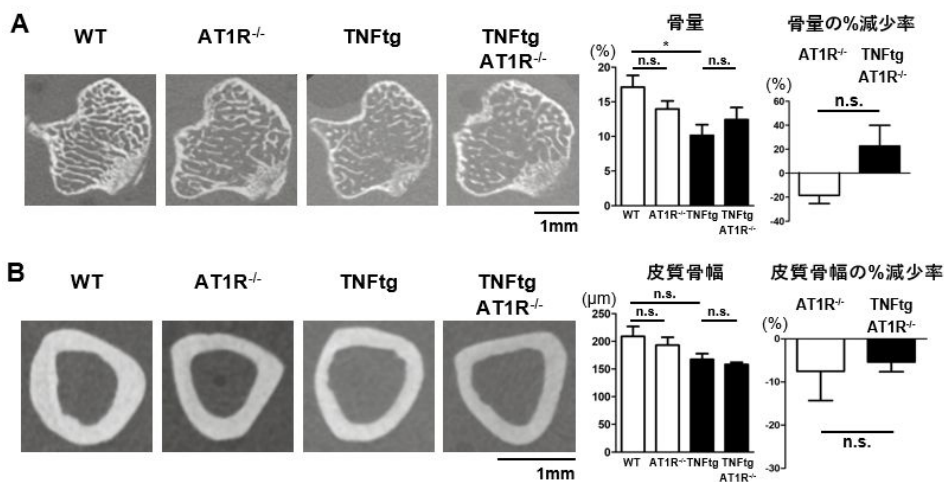


図 3. AT1R の欠損が TNF-tg マウスの脛骨(A)と第 5 腰椎(B)の海綿骨の骨量に与える影響。  
n.s.: 有意な違いなし。  
\*:  $p < 0.05$  で有意差あり。

(2) 骨細胞特異的 AT1R 欠損は TNF-tg の関節炎や全身骨量に影響を与えない：  
上記の研究成果(A)と同様に、骨細胞特異的 AT1R 欠損 TNF-tg マウスの関節炎評価や腰椎骨量の定量を行ったが、有意な違いは認められなかった。

(3) マウス骨細胞株 IDG-SW3 細胞を用いた解析：  
RT-PCR 法にて解析したところ、IDG-SW3 細胞では様々な骨代謝調整因子や RAS 関連分子の発現が認められた (図 4)。IDG-SW3 細胞の分化段階を GFP の蛍光発色や *Dmp1*、*Sost* の遺伝子発現にて確認し、様々な分化段階の細胞を Ang II や TNF 等の炎症性サイトカインで刺激した。しかしながら、*Rankl* 遺伝子の発現増強は認められず、骨芽細胞を用いた既報と異なる結果が得られた。今後、マウス初代培養骨細胞やヒト骨細胞を用いたさらなる検討が必要と考えている。

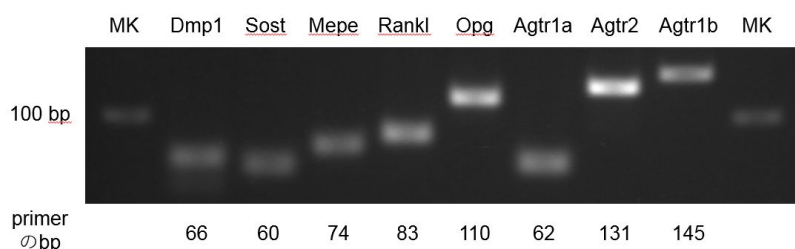


図 4. IDG-SW3 細胞における骨代謝調整因子や RAS 関連分子の遺伝子発現。

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 1件）

1. 著者名 Takahiko Akagi, Tomoyuki Mukai, Takafumi Mito, Kyoko Kawahara, Shoko Tsuji, Shunichi Fujita, Haruhito A. Uchida, Yoshitaka Morita	4. 巻 21
2. 論文標題 Effect of Angiotensin II on Bone Erosion and Systemic Bone Loss in Mice with Tumor Necrosis Factor-Mediated Arthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21114145	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 1件）

1. 発表者名 赤木貴彦、向井知之、三戸崇史、河原恭子、児玉尚子、藤田俊一、内田治仁、守田吉孝
2. 発表標題 Excessive Angiotensin II exacerbates bone erosion in a murine tumor necrosis factor-mediated arthritis model
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahiko Akagi, Tomoyuki Mukai, Takafumi Mito, Kyoko Kawahara, Shoko Tsuji, Shunichi Fujita, Haruhito A. Uchida, Yoshitaka Morita
2. 発表標題 Effect of Angiotensin II on Bone Erosion and Systemic Bone Loss in Mice with Tumor Necrosis Factor-Mediated Arthritis
3. 学会等名 The 22nd Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2020)（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤木貴彦、向井知之、河原恭子、守田吉孝
2. 発表標題 炎症性骨破壊におけるアンジオテンシン の役割の検討
3. 学会等名 第40回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2020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
研究分担者	向井 知之 (Mukai Tomoyuki) (00454421)	川崎医科大学・医学部・教授  (35303)	
研究分担者	平野 紘康 (Hirano Hiroyasu) (10454828)	川崎医科大学・医学部・講師  (35303)	
研究分担者	藤田 俊一 (Fujita Shunichi) (30722607)	川崎医科大学・医学部・講師  (35303)	

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