

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23118

研究課題名(和文)イオウ呼吸による軟骨細胞の増殖と長管骨伸長機序の解明

研究課題名(英文)Study on the mechanism of chondrocyte proliferation and bone growth from the viewpoint of sulfur respiration

研究代表者

笹間 雄志(Sasama, Yuji)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90878464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨の伸長は、骨端部の成長板軟骨細胞が増殖・分化することで誘導される。血管が存在せず、低酸素環境にある成長板で軟骨細胞がいかんして増殖に必要なエネルギーを得ているかは、生命科学における大きな謎のひとつである。最近、哺乳類のミトコンドリアで硫黄呼吸の存在が示唆された。そこで、硫黄呼吸に必要な活性硫黄分子種産生の基質供給源としてシスチンを多く含む飼料がマウスの成長に与える影響を調べた。8週齢のマウスをシスチンを12倍含む飼料で4週間飼育したところ、肝機能の低下が見られ、肝臓の組織所見から、炎症を起こしている可能性が示唆された。マウスの週齢とシスチンの量・投与方法の検討が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成長板軟骨の軟骨細胞の増殖と分化により骨成長が起こる。一方、成長板には血管が走行せず酸素の供給に乏しいことから、軟骨細胞は低酸素状態で増殖に必要なエネルギー産生を行うことができるはずで、その機序を理解することは、成長障害などへの対応に重要な示唆を与える。硫黄呼吸は重要な機序のひとつと考えられる。本研究で、低硫黄飼料はマウスの成長および生存を損なった。硫黄呼吸に必要なシステインの細胞外ソースであるシスチンを大量に含む飼料でマウスを飼育した。技術的な問題から8週齢のマウスで実験を行ったが、上記のような結果が得られた。このような試みは、成長改善方法を見出すために重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bone growth is induced by the proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in the epiphysis. How chondrocytes obtain the energy necessary for proliferation in the growth plate, where blood vessels are absent and the environment is hypoxic, is one of the questions to be answered. Recently, sulfur respiration was found in mammalian mitochondria. In this study, we fed 8-week-old mice for 4 weeks with a diet high in cystine as a substrate source for reactive sulfur species required for sulfur respiration. Mice fed with a diet containing 12-fold cystine showed a decrease in liver function. Histological findings suggested the possibility of inflammation. It was considered necessary to examine the age of the mice and the amount and method of cystine administration.

研究分野：生化学

キーワード：活性硫黄分子種 骨成長 成長板軟骨

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨端部に存在する成長板の軟骨細胞が増殖・分化することで骨は成長する。成長板軟骨を含め、軟骨には血管が走行していない。血管から酸素の供給を受けないため、成長板軟骨は低酸素環境に置かれている。一般に細胞の主要なエネルギー産生システムは、酸素を電子受容体とする呼吸である。低酸素環境下にある、成長板の軟骨細胞が増殖に必要なエネルギーを産生するメカニズムは、解明されるべき重要な課題のひとつである。

(2) 古細菌などがイオウ化合物の酸化還元を利用して ATP を産生することが知られている。最近、哺乳類のミトコンドリアで、イオウ呼吸の存在が示唆された [Akaike T, et al. Nat Commun 8:1177, 2017]。イオウ呼吸は、システインパースルフィドなどイオウ原子が連結した活性イオウ分子種が、酸素の代わりに電子伝達系の電子受容体として機能する。我々は、軟骨細胞はイオウ呼吸で増殖に必要なエネルギーを産生している可能性があると考えた。

(3) ミトコンドリアのシステイン tRNA 合成酵素(CARS2)がシステインパースルフィド合成酵素(CPERS)活性を持つことが証明されている[Akaike T, et al. Nat Commun 8:1177, 2017]。CARS2/CPERS は、2分子のシステインを基質に、1分子のシステインパースルフィドと1分子のアラニンを生産する[Akaike T, et al. Nat Commun 8:1177, 2017]。細胞は、システインの酸化二量体であるシスチンとして、シスチン・グルタミン酸アンチポーターを介して、システインを細胞内に取り込む。

(4) 我々は、飼料中のシスチン含量を変化させることで、マウスの成長が変化すると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、軟骨細胞におけるイオウ呼吸の重要性を検証することである。そのために、シスチン含量の異なる飼料でマウスを飼育することで、マウスの成長に及ぼすイオウ呼吸の役割を解析した。

3. 研究の方法

(1) シスチン含量を変化させたマウス飼料、すなわち、シスチンをまったく含まない飼料、通常量のシスチン、通常量の6倍および12倍のシスチンを含む飼料を作製した。飼料重量当たりのカロリーは、すべて同じにした。これらの飼料でマウスを飼育する条件検討を行った。すなわち、試験に用いる飼料、マウス週齢、飼育ケージ、給餌器具と方法などを検討した。

(2) (1)の結果をもとに、8週齢の雄 C57BL/6 マウスを4週間、通常量、通常量の6倍、通常量の12倍のシスチンを含む飼料で飼育し、成長を記録した。

(3) (2)の飼育終了後、血液を採取し、生化学検査を行った。

(4) 生化学検査の結果を参考に、肝臓の組織検査を行った。

(5) 大腿骨遠位部について骨形態計測を行った。

4. 研究成果

(1) 4週齢の雄 C57BL/6 マウスを用い、メタボリックケージで飼料および水の消費をモニターしながら飼育したところ、4週齢マウスは給餌箱に入り込むなど、安定した記録が困難であった。また、シスチンを通常餌の12倍含む餌を与えたマウスで死亡例が見られた。この飼料でカゼインを減らしたため、成長期のマウスの成長に悪影響を及ぼした可能性がある。そこで、8週齢のマウスを4週間飼育することにした。また、シスチンをまったく含まない飼料は、マウスの状態を悪化させたため、倫理的観点から試験を行わないことにした。8週齢のマウスを用いることにした。さらに、摂餌量を同じにするため、通常餌、シスチン含量が6倍の餌、12倍の餌の摂餌量を計測し、1日2グラムを与えることにした。水は自由に摂らせることにした。

(2) 8週齢雄の C57BL/6 を1群5匹の3群に分け、(a)通常シスチン量の餌、(b)通常の6倍のシスチンを含む餌、(c)通常の12倍のシスチンを含む餌、それぞれ2グラム/日、4週間与え、毎日、体重を測定した。その結果、(a)群と(b)群間に体重の大きな差はなかったが、(c)群のマウスの実験開始直後1から3日までに体重の減少が認められた。その後の体重増加率は(a)および(b)群と同程度であったが、(c)群の最終的な体重は、実験開始直後の体重減少の影響がそのまま残った。

(3) 血液生化学検査を行ったところ、(c)群で ALT の上昇がみられ、肝機能の低下が疑われた。

(4) 肝臓の組織を解析したところ、門脈周囲に炎症を示す像が見られた。

(5) 骨形態計測の数値としては、3群に有意な差は見られなかった。

今回のカロリーを一定にしてシスチン量を変えた餌を与える実験から、イオウ呼吸が骨成長に与える影響を検証することは難しいと考えられた。妊娠マウスの母マウスに胃ゾンデなどでシスチンなどの硫黄化合物を与える方法など、今後検討する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Takimoto R, Suzawa T, Yamada A, Sasa K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Sasama Y, Tanaka M, Kinoshita M, Ikezaki K, Ichikawa M, Yamamoto M, Shirota T, Kamiyo R	4. 巻 162
2. 論文標題 Zoledronate promotes inflammatory cytokine expression in human CD14-positive monocytes among peripheral mononuclear cells in the presence of T cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunology	6. 最初と最後の頁 306-313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imm.13283.	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 朝倉真莉子, 佐藤仁, 宮本袋也, 鈴木麻衣子, 笹間雄志, 筑田洵一郎, 瀧本玲子, 嶋根俊和, 代田達夫	4. 巻 80
2. 論文標題 下顎に発生した埋伏歯を伴わない腺腫様歯源性腫瘍の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昭和学会雑誌	6. 最初と最後の頁 570-575
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 氷見 奈々絵, 栗原 祐史, 筑田 洵一郎, 高松 弘貴, 笹間 雄志, 代田 達夫	4. 巻 66
2. 論文標題 下顎埋伏過剰歯が筋突起まで移動した1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 411-415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 筑田洵一郎, 葭葉清香, 笹間雄志, 安田有沙, 八十篤聡, 代田達夫	4. 巻 81
2. 論文標題 魚骨が舌背部に迷入した1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昭和学会雑誌	6. 最初と最後の頁 363-367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笹間雄志, 田中元博, 池崎かおり, 上條竜太郎, 代田達夫
2. 発表標題 イオウ呼吸は軟骨細胞の増殖と骨伸長に必須である：顎変形症の新たな治療戦略に向けて.
3. 学会等名 第65回 公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学口腔生化学講座 http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/ 昭和大学口腔外科学講座 https://www.showa-omfs.jp
--

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