

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09233

研究課題名（和文）骨折治癒過程におけるマイオカイン:irisinの役割とその機序解明

研究課題名（英文）The Effects of myokine: irisin on fracture healing process and osteogenesis

研究代表者

大田 陽一（Ohta, Yoichi）

大阪公立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50633484

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、irisinの骨形成タンパク（BMP）シグナルを介した骨芽細胞分化および骨形成に対する効果を解明することである。

マウスに埋植したBMP-2含有ポリエチレングリコールペレットの異所性骨形成のirisin投与による影響を骨微細構造解析により評価した。また、C2C12細胞をBMP-2投与により骨芽細胞分化を誘導し、irisin投与後の骨形成関連遺伝子の発現を評価した。μCT解析では、irisin投与により異所性骨の骨塩量や骨体積が有意に増加した。リアルタイムRT-PCRの結果、BMP-2/irisin共投与群はBMP単独投与群より骨形成関連遺伝子の発現量が有意に増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マイオカイン:irisinによるBMP-2誘導骨形成およびBMPシグナルを介した骨芽細胞分化の促進効果が認められた。骨折や転倒は疾病負荷を増加させ、それらの主因である骨粗鬆症やサルコペニアに対する治療は、超高齢社会を迎えている現在、重要課題である。さらに、骨形成や骨折修復過程では内因性のBMPシグナルの役割が重要であるため、筋組織への同化作用も示されているirisinのBMPシグナルとの相互作用の解明は骨折治癒の新たな概念や治療法の開発に繋げることが期待できる。

研究成果の概要（英文）： This study aimed to elucidate the effects of myokine irisin on osteoblast differentiation and osteogenesis via bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway. In vivo, BMP-2-containing polyethylene glycol was implanted in mice, and bone microstructural analysis of ectopic bone harvested after intraperitoneal administration of irisin was performed. In vitro, C2C12 cells were induced to differentiate into osteoblasts by BMP-2 treatment, and the mRNA expression levels of osteogenesis-related genes were evaluated after irisin treatment. In vivo study showed that irisin significantly increased bone mineral content and bone volume in ectopic bone in μCT analysis. In vitro study, BMP-2/irisin co-treatment group showed significantly higher mRNA expression levels of osteogenesis-related genes than BMP treatment group.

研究分野：整形外科学

キーワード：マイオカイン 骨形成タンパク 骨形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えているわが国では、骨折、転倒は要介護に至る主な原因であり、quality of life (生活の質) の低下や医療費増加に関連している (引用文献、)。骨粗鬆症やサルコペニアは生物学的、機能的観点から相互関連しており、骨折や骨癒合遅延のリスクを高めるため、それら治療は重要な課題であると考えられる (引用文献、)。したがって、骨とその周囲の筋組織の両者を制御する因子・システムを解明し、これら運動器疾患を予防・治療することは、健康寿命の延伸や疾病負荷の減少に直結することが考えられる。

マイオカイン: irisin は、運動や寒冷刺激に応答して骨格筋で発現する FNDC5 (Fibronectin type domain-containing protein 5) の細胞外ドメインが切断されて血中に分泌されるタンパク質であり (引用文献)、骨芽細胞や骨細胞への同化作用 (引用文献、) や破骨細胞に対する骨吸収抑制効果 (引用文献、) が示されている。in vitro 実験系において、irisin は p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) および extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化によって骨芽細胞の増殖と分化を促進することが報告されている (引用文献)。また、in vivo 実験では、irisin 投与によりマウスの脛骨の骨密度、骨強度が増加した報告や卵巣摘出マウスの骨量減少抑制効果を示した研究 (引用文献、) が報告されているが、irisin の骨芽細胞分化や骨形成に関する作用機序の詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では irisin の骨折治癒過程における効果について、骨組織に内在し骨癒合に重要な役割を果たす骨形成タンパク (BMP) シグナルとの相互作用機構を明らかにし、そのメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) In vivo: BMP 誘導骨形成に対する irisin の効果

生後 4 週齢 ICR 雄マウスの背筋膜内に recombinant human (rh)-BMP-2 5 µg 含有ポリエチレングリコールペレット (直径 4mm, 厚さ 1.8mm) を埋植し、recombinant irisin produced in E-coli (re-irisin) 100 µg/kg を週に 1 回マウス腹腔内投与した。埋植後 3 週で rh-BMP-2 によって誘導された異所性骨を µCT による骨微細構造解析、Hematoxylin Eosin (HE) 染色による組織学的評価を行った。各評価において、re-irisin 非投与群をコントロールとして比較検討を行った。また、組織学的評価では、HE 染色における新生骨の面積の割合を ImageJ™ software を用いて算出した。

(2) In vitro: irisin の BMP 誘導骨芽細胞分化に対する効果

マウス筋芽細胞由来未分化間葉系細胞 C2C12 細胞に rh-BMP-2 200ng/ml を投与し、骨芽細胞分化を誘導した。re-irisin (100ng/ml) を投与後 6 日目に RNA を回収し、骨芽細胞分化マーカーとして、アルカリホスファターゼ (ALP)、オステオカルシン (Ocn)、オステオポンチン (OPN)、runt-related transcription factor 2 (Runx2) の発現量を、非投与群をコントロールとして real time RT-PCR を用いて評価した。さらに、骨細胞における irisin 受容体である integrin V 受容体の inhibitor (SB273005) を投与し、C2C12 細胞の骨芽細胞分化に対する re-irisin の制御機構について検討を行った。

4. 研究成果

(1) In vivo : BMP 誘導骨形成に対する irisin の効果

rh-BMP-2 5 μ g 含有ポリエチレングリコールペレット埋植後3週における rh-BMP-2 誘導異所性骨の μ CT による骨微細構造解析の結果、re-irisin 投与群は非投与群と比較し、異所性骨の平均骨塩量 (BMC)、全骨体積 (TV)、骨梁体積 (BV)、BV/TV は有意に高値であった (図1)。

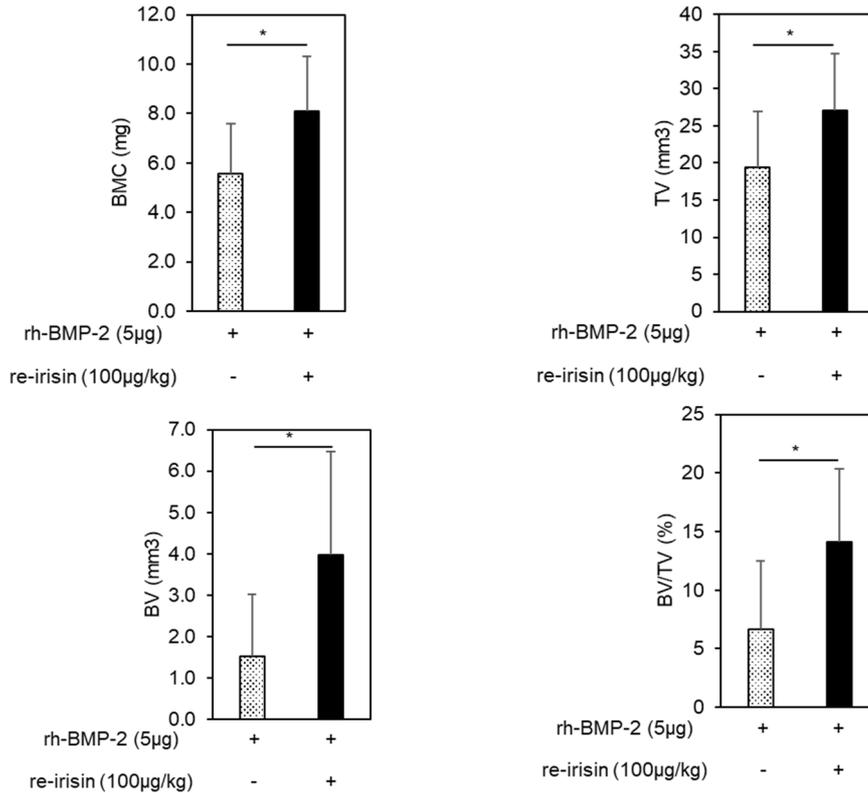


図1 : μ CT を用いた骨微細構造解析 (* : $p < 0.05$)

rh-BMP-2 誘導異所性骨の組織学的解析の結果、re-irisin 投与群は非投与群と比較し、HE 染色における異所性骨内新生骨面積の割合は有意に高値であった (図2)。

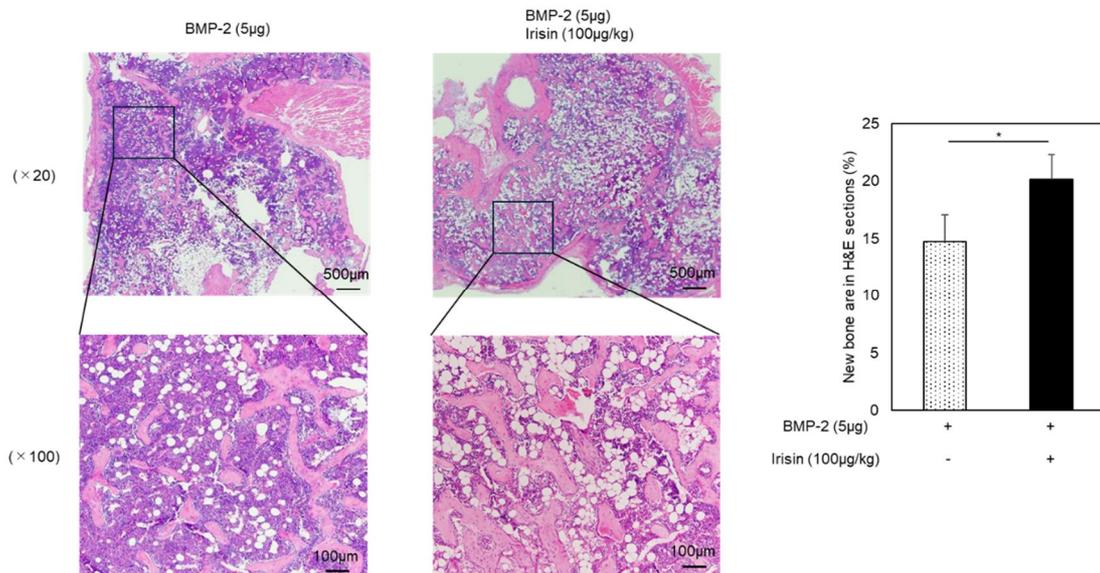


図2 : HE 染色による組織学的解析 (* : $p < 0.05$)

(2) In vitro : irisin の BMP 誘導骨芽細胞分化に対する効果

C2C12 細胞に rh-BMP-2 (200ng/ml) および re-irisin (100ng/ml) を投与 6 日後の real time RT-PCR 法の結果、re-irisin 単独投与群では ALP、Ocn、OPN、Runx2 の発現レベルの上昇は認められなかった。rh-BMP-2 投与により、ALP、Ocn、OPN、Runx2 の発現上昇を認めた。さらに、BMP-2 / irisin 共投与群では、rh-BMP-2 単独投与群に比べ、ALP、Ocn、OPN、Runx2 の有意な発現上昇が認められた。また、これら BMP-2 / irisin 共投与による発現上昇は、integrin V 受容体の inhibitor (SB273005) 投与により有意な発現低下が認められた(図 3)。

これらの結果から、irisin による integrin V receptor を介した BMP 誘導骨芽細胞分化促進効果の存在が明らかになった。

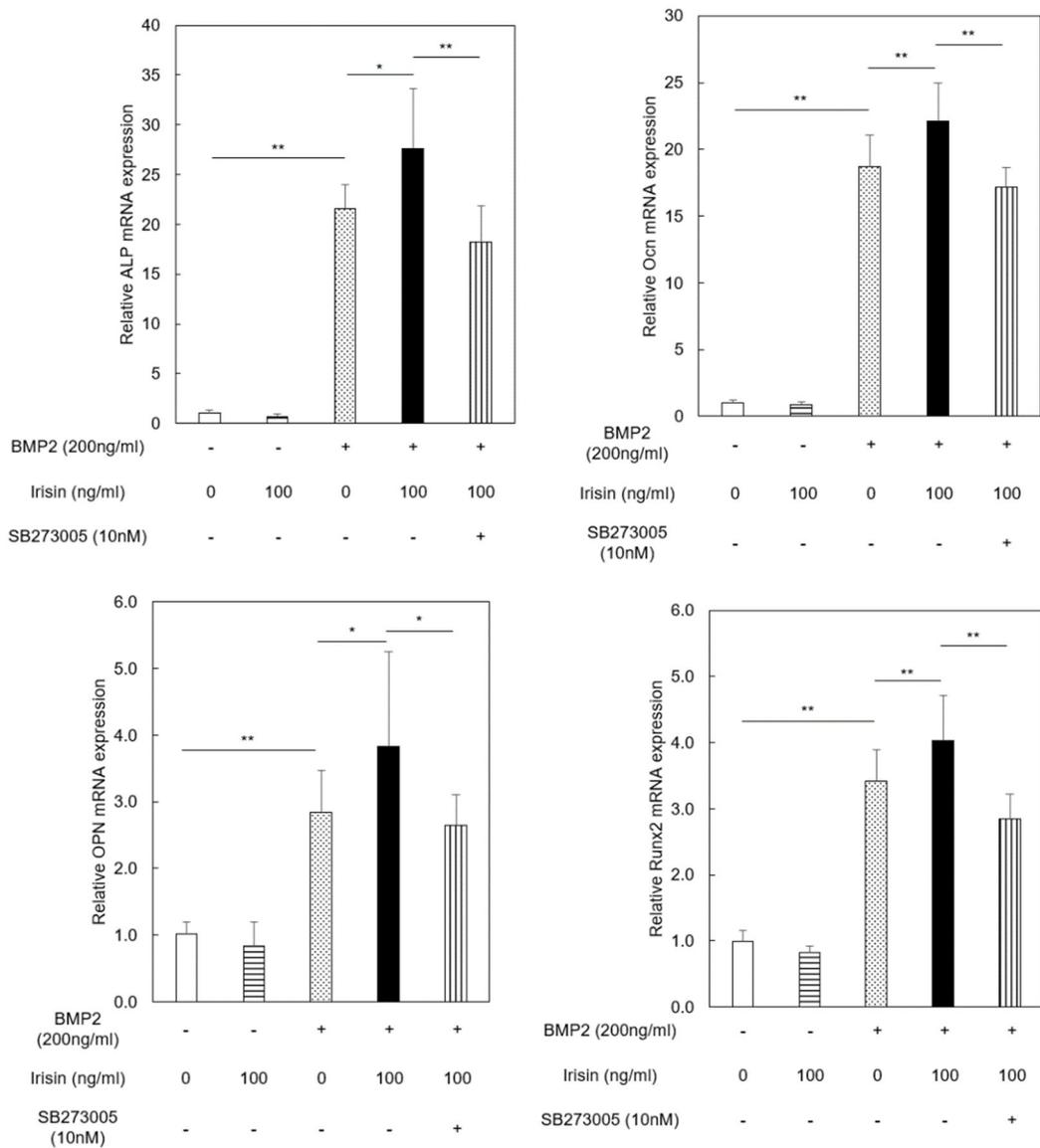


図 3 : real time RT-PCR 法による骨芽細胞分化マーカーの評価(* : p<0.01、** : p<0.001)

<引用文献>

Tarrant SM, Balogh ZJ. The Global Burden of Surgical Management of Osteoporotic Fractures. World J Surg 2020; 44: 1009-1019.

Fujiwara S, Zhao X, Teoh C, et al. Disease burden of fractures among patients with osteoporosis in Japan: health-related quality of life, work productivity and activity impairment, healthcare resource utilization, and economic costs. J Bone

Miner Metab 2019; 37: 307-318.

Gielen E, Dupont J, Dejaeger M, et al. Sarcopenia, osteoporosis and frailty. *Metabolism: Clinical and Experimental*; 145. Epub ahead of print 1 August 2023. DOI: 10.1016/j.metabol.2023.155638.

Yoshimura N, Muraki S, Oka H, et al. Is osteoporosis a predictor for future sarcopenia or vice versa? Four-year observations between the second and third ROAD study surveys. *Osteoporosis International* 2017; 28: 189-199.

Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; 481: 463-468.

Storlino G, Dicarlo M, Zerlotin R, et al. Irisin Protects against Loss of Trabecular Bone Mass and Strength in Adult Ovariectomized Mice by Stimulating Osteoblast Activity. *Int J Mol Sci*; 24. Epub ahead of print 1 June 2023. DOI: 10.3390/ijms24129896.

Yang J, Yu K, Liu D, et al. Irisin enhances osteogenic differentiation of mouse MC3T3-E1 cells via upregulating osteogenic genes. *Exp Ther Med* 2021; 21: 1-7.

Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, et al. Irisin enhances osteoblast differentiation in vitro. *Int J Endocrinol* 2014; 2014: 8.

Colaianni G, Mongelli T, Cuscito C, et al. Irisin prevents and restores bone loss and muscle atrophy in hind-limb suspended mice. *Sci Rep* 2017; 7: 1-16.

Qiao XY, Nie Y, Ma YX, et al. Irisin promotes osteoblast proliferation and differentiation via activating the MAP kinase signaling pathways. *Sci Rep* 2016; 6: 1-11.

Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, et al. Erratum: The myokine irisin increases cortical bone mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015; 112: 12157-12162.

Ma Y, Qiao X, Zeng R, et al. Irisin promotes proliferation but inhibits differentiation in osteoclast precursor cells. *FASEB Journal* 2018; 32: 5813-5823.

Estell EG, Le PT, Vegting Y, et al. Irisin directly stimulates osteoclastogenesis and bone resorption in vitro and in vivo. *Elife* 2020; 9: 1-13.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Takemura Susumu, Ohta Yoichi, Sugama Ryo, Minoda Yukihide, Ohyama Yohei, Nakamura Hiroaki	4. 巻 597
2. 論文標題 Eldecalcitol regulates the gene expressions of articular cartilage markers and differentiation markers in chondrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 58 ~ 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.01.119	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 Ueyama Hideki, Ohta Yoichi, Imai Yuuki, Suzuki Akinobu, Sugama Ryo, Minoda Yukihide, Takaoka Kunio, Nakamura Hiroaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Topical co administration of zoledronate with recombinant human bone morphogenetic protein-2 can induce and maintain bone formation in the bone marrow environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12891-021-03971-w	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大田 陽一、上山 秀樹、今井 祐記、洲鎌 亮、箕田 行秀、高岡 邦夫、中村 博亮
2. 発表標題 rh-BMP-2とZoledronateの局所同時投与による骨髄環境下骨形成誘導効果
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
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
研究分担者	洲鎌 亮 (Sugama Ryo) (00779457)	大阪公立大学・大学院医学研究科・講師 (24405)	

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