

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591007

研究課題名 ミネラル・骨代謝異常における酸化ストレス関与の解明

研究課題名（英文）Analyses of oxidative stress Mechanisms in bone mineral disorders

研究代表者

田口 学（TAGUCHI MANABU）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00265141

研究成果の概要（和文）：

骨組織は、骨吸収と骨形成を破骨細胞と骨芽細胞により繰り返しているが、骨代謝にカルシウムと共に重要な役割を果たしているリンの骨芽細胞に対する効果については必ずしも明らかではない。そこで、リンの骨芽細胞機能に及ぼす効果とその機序の解明を目的として本研究を行った結果、細胞外のリンは ROS 産生や NADPH oxidase を介した活性酸素種産生により、骨芽細胞分化に対して抑制的に作用するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Phosphate has been shown to work as a signaling molecule in several cells including endothelial cells and chondrocyte. In the present study, we investigated the effects of phosphate on reactive oxygen species (ROS) production and osteoblastic differentiation in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. Phosphate increased production of ROS in MC3T3-E1 cells and the inhibitors of sodium-phosphate cotransporter and NADPH oxidase suppressed ROS production by phosphate. Furthermore, phosphate decreased the expression of osteoblastic marker genes in MC3T3-E1 cells. These results indicate that phosphate suppresses osteoblastic differentiation at least in part by enhancing ROS production in MC3T3-E1 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、内分泌学

キーワード：内分泌学、ミネラル代謝

1. 研究開始当初の背景

骨組織は、骨吸収と骨形成を繰り返す骨リモデリングにより、周囲の環境に対して最適な構造と強度を維持している。この骨のリモ

デリングにおいて骨吸収は破骨細胞によって、また骨形成は骨芽細胞により担われている。このうち骨芽細胞は間葉系幹細胞に由来し、bone morphogenetic protein 2 (BMP2)

の作用などにより成熟骨芽細胞に分化していく。一方、加齢やホルモンバランスの異常、ミネラル代謝異常といった様々な要因により、骨に存在する細胞の機能が変化し、骨リモデリングの動的平衡が崩れる事によって多くの骨疾患が引き起こされる。こうした疾患の一つに、慢性腎臓病(chronic kidney disease: CKD)患者に認められる骨ミネラル代謝異常(chronic kidney disease - mineral and bone disorder: CKD-MBD)がある。従来CKD患者に伴う骨ミネラル代謝異常としては、二次性副甲状腺機能亢進症やこれに伴う線維性骨炎が重要視されてきたが、一方で近年CKD-MBDが、カルシウム・リン・副甲状腺ホルモンなどの検査値異常や骨代謝異常に加え、血管石灰化を含む全身性疾患としてとらえ直された。更にCKD-MBDの発症に、線維芽細胞増殖因子23(fibroblast growth factor 23: FGF23)が関与することも明らかにされ、またCKD患者ではPTHへの抵抗性が存在し、二次性副甲状腺機能亢進症の存在下でも骨吸収に比較し骨形成が抑制されていることが示されていた。ミネラル・骨代謝に重要な役割を果たすFGF23は、骨により産生され、腎臓でKlotho-FGF受容体複合体に作用することによりリン、ビタミンD代謝を調節するホルモンである。このKlothoは、動脈硬化や骨量の減少などの特徴を示す老化促進モデルマウス、Klothoマウスにおいて、著明に発現が低下している遺伝子としても同定された。FGF23ノックアウトマウスとKlothoマウスは、高リン血症、高1,25-水酸化ビタミンD[1,25(OH)₂D]などのミネラル代謝異常に加え、動脈硬化、骨量減少など全く同一の表現型を示す。一方遺伝子改変などによりFGF23ノックアウトマウスやKlothoマウスのミネラル代謝異常を改善することにより、これらの動物のいわゆる老化を思わせる表現

型が消失することが明らかにされた。これらの結果は、ミネラル代謝異常が動脈硬化や骨量減少などの原因となっていることを示している。既にKlothoマウスでは、酸化ストレスが亢進していることが明らかにされており、また多くの研究により、酸化ストレスが動脈硬化や骨粗鬆症の発症に関与していることが示されている。しかし、ミネラル代謝異常と酸化ストレスとの関連については、不明な点が多い。

CKD-MBDに伴う高リン血症は、異所性石灰化を促進するばかりではなく、血管平滑筋を骨芽細胞様細胞に分化させる事によっても血管石灰化の原因となり、CKD患者の死因のリスクファクターであることも報告されている。従って高リン血症は二次性副甲状腺機能亢進症の原因であるばかりではなく、特に血管平滑筋では自らシグナル分子として作用することが報告されている。

このシグナリング分子としてのリンの作用機序として、リンは血管内皮細胞で活性酸素種(reactive oxygen species:ROS)産生を惹起するとともに、軟骨細胞などではextracellular signal-regulated kinase (ERK)のリン酸化を惹起することが報告されている。よってリンは、複数の細胞内情報伝達系を活性化し得るものと考えられる。しかし、CKD-MBDの骨代謝異常の発症におけるリンの作用、リンの骨芽細胞や骨形成に対する効果については、必ずしも明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、リンの骨芽細胞機能に及ぼす効果とその機序やFGF23ノックアウトマウスやKlothoマウスに認められるミネラル代謝異常と酸化ストレスの亢進とリン代謝との関係を骨芽細胞様細胞株などを用いて、ミネ

ラル代謝異常と動脈硬化や骨代謝との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) リン負荷と ROS 産生の評価、ALP 活性測定

BMP2 に反応し、骨芽細胞分化のモデルとしての有用性が確立されているマウス骨芽細胞様細胞、MC3T3-E1 細胞を使用しリン負荷実験を行った。また負荷培養液中に、これらのリン負荷の細胞への影響を抑制する目的で、DPI や oxypurinol、rotenone、foscarnet といった各種の阻害試薬及び H₂O₂ 溶液を添加しをそれぞれ加えた後に NBT 法に従って ROS 産生、ALP 活性の測定を調べた。

(2) リアルタイム PCR と siRNA による遺伝子発現の抑制

定量 PCR は ABI StepOnePlus (Applied Biosystems)、TaqMan assay によりリアルタイム PCR を行った。内在性コントロールとして GAPDH をとり、各 mRNA とその比を測定して発現量を調べた。またリンの ROS 産生に及ぼす Nox ファミリー発現抑制の効果を siRNA による遺伝子発現の抑制により検討した。

(3) ウェスタンブロット

MC3T3-E1 細胞における ERK のリン酸化をウェスタンブロットを用いて検討した。

4. 研究成果

(1) リンの酸化ストレスに及ぼす影響

近年、血管内皮細胞において高リン負荷によって細胞の ROS (reactive oxygen species: 活性酸素種) 産生が亢進することが示されている。また CKD-MBD の発症に、高リン血症が寄与することが報告されている。そこでリンの骨に及ぼす効果を明らかにするために、まずリンが骨芽細胞の ROS 産生に対する効果を検討した。リン濃度を 0 mM から 5 mM まで変えたリン溶液を添加した培養液中で骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を 20~42 時間培養したのち、ニトロブルーテトラゾリウムクロライド (NBT) 法によってリン負荷による骨芽細胞の ROS 産生への影響を調べた。結果は添加リン濃度が上昇するにつれて ROS 産生も有意に増加していた。

従ってリンは、血管内皮細胞に加え骨芽細胞様細胞においても ROS 産生を促進すること、リンに特異的であることが明らかとなった。そこで更にこのリンによる ROS 産生の亢進がリンに特異的であることを示すために、ナトリウム-リン共輸送体阻害剤である foscarnet の効果を検討した。foscarnet を添加した群では、リンによる ROS 産生の亢進がほぼ完全に抑制されていた。従ってリンによる ROS 産生の促進には、ナトリウム-リン共輸送体によりリンが細胞内に入ることが必要であるものと考えられた。ROS 産生は NADPH oxidase、xanthine oxidase やミトコンドリア呼吸鎖の活性化といった経路によって産生されていることが知られている。そこで MC3T3-E1 細胞のリン負荷による ROS 産生の促進が、NADPH oxidase、xanthine oxidase、またはミトコンドリア呼吸鎖のう

ち、どの経路によって媒介されているかを調べるために、NADPH の特異的な阻害剤である DPI と apocynin をリン負荷と同時に添加することによって、高リン負荷時の ROS 産生が有意に抑制された。一方 xanthine oxidase 阻害剤である oxypurinol やミトコンドリア呼吸鎖の阻害剤である rotenone を添加しても、リン負荷時の ROS 産生の抑制は認められなかった。以上の実験結果より、リンによる ROS 産生の亢進は主として NADPH oxidase (Nox) を介して行われることが考えられた。

NADPH oxidase である Nox ファミリーの分子種のうち、これまでの報告で骨芽細胞では Nox3 以外の Nox1、Nox2 と Nox4 が発現している事が報告されていた。それらの中でも、Nox1 と Nox4 が酸化ストレスの上昇や骨代謝の調節に関与していることが示されていた。そこで、それら NADPH oxidase 発現を siRNA で抑制して、リンによる ROS 産生の亢進が低下するかを検討した。Nox1 と Nox4 を siRNA で抑制したところ ROS 産生の抑制が認められ、リンによる ROS 産生は NADPH oxidase を介して行われているものと考えられた。

(2) リンの ERK 活性化に及ぼす影響

リンは既に軟骨細胞などで ERK のリン酸化を惹起することが知られている。そこで MC3T3-E1 細胞においてもリンが同様の ERK のリン酸化をもたらすかどうかを検討した。リンを負荷したところ、Western blot で 30 分後に ERK (p-ERK 1/2) のリン酸化が惹起された。従ってリンは、ROS 産生に加え、ERK のリン酸化を介してもシグナルを伝達できるものと考えられた。

また、リンの負荷では有意な ROS 産生の上昇を認めなかった。したがって MC3T3-E1 細胞におけるリンによる ERK のリン酸化には、ROS 産生の亢進は必要ではないものと考えられた。

(3) リンの骨芽細胞分化に及ぼす影響

リン負荷による骨芽細胞分化への影響を調べるために、MC3T3-E1 を BMP2 の添加された培養液中で培養し、ALP 活性を測定した。また BMP2 と同時にリン溶液 5 mM を添加した培養液中で同様に細胞を培養し、ALP 活性の測定を行い、両者を比較した。BMP2 と同時にリン溶液を加えた群では ALP 活性が有意に低下しており、またナトリウム-リン共輸送体阻害剤の foscarnet 添加によってリンの細胞内流入を阻害することで ALP 活性抑制が回復することより、リンによって BMP が誘導する骨芽細胞分化が抑えられることが明らかとなった。

一方 ROS 産生に及ぼす効果と同様、 Na_2SO_4 によっては ALP 活性の抑制は認められなかった。従ってリンによる BMP2 誘導性骨芽細胞分化抑制は、リンに特異的なものと考えられた。さらにこのリンの効果が、骨芽細胞分化抑制によるものであることを確認するために、初期骨芽細胞分化マーカーである Runx2、後期骨芽細胞分化マーカーである OC、および ALP の発現をリアルタイム PCR で検討した結果、リンにより Runx2、ALP、および OC の発現が低下することが明らかとなった。従ってリンは、何らかの機序により骨芽細胞分化には抑制的に作用するものと考えられた。

さらにリンによる BMP2 誘導性骨芽細胞分化の

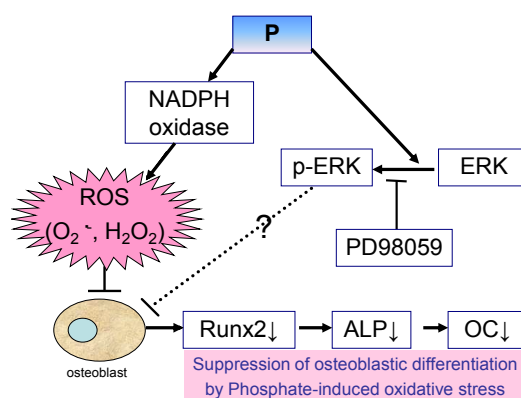
抑制の機序について明らかにするために、まずリンによって産生が亢進する ROS が骨芽細胞分化に及ぼす効果を検討した。H₂O₂ による酸化ストレス負荷により、MC3T3-E1 細胞の BMP2 誘導性 ALP 活性は有意に抑制された。一方この H₂O₂ 負荷は、MC3T3-E1 細胞の蛋白量を減少させなかったことから、非特異的な細胞障害によるものではないものと考えられた。次いでリンによる ROS 産生の促進が、ALP 活性抑制に関与しているかどうかを明らかにするために、リンの BMP2 誘導性 ALP 活性抑制に及ぼす NADPH oxidase 阻害剤の効果を検討した。その結果、リンは、少なくとも一部は NADPH oxidase を介した ROS 産生の亢進により、MC3T3-E1 細胞の分化に抑制的に作用するものと考えられた。

(4) まとめ

これらの結果から本検討によりリンは、骨芽細胞様細胞では骨芽細胞分化をむしろ抑制するように作用することが明らかとなった。このうち ALP 活性を指標として評価した骨芽細胞分化抑制は、NADPH oxidase の阻害剤により解除されたことから、リンは主に ROS 産生の促進を介して骨芽細胞分化を抑制するものと考えられる。従って、リンは血管平滑筋細胞を骨芽細胞様細胞に分化させ血管石灰化を促進するのは対照的に、骨芽細胞様細胞においては、骨芽細胞への分化を抑制するという逆の作用を示すことになる。この作用の相違の機序を明らかにするためには、平滑筋細胞と骨芽細胞様細胞において、リンにより発現が変化する遺伝子を、より詳細に検討する必要がある。酸化ストレスの増大や

リンによるシグナル伝達に、NADPH oxidase 以外に ERK のリン酸化を介した経路が存在する、あるいは NADPH oxidase が ERK のリン酸化を介して酸化ストレスの増大を招き骨芽細胞分化が阻害される可能性が示唆されていた。ERK は MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) ファミリーの中で最初に同定された、細胞の増殖・分化・アポトーシスに重要な役目を果たすシグナル伝達分子である。本検討でも、リンにより ERK のリン酸化が惹起されることが確認された。しかし ERK をリン酸化して活性化を引き起こす MAPK/ERK kinase (MEK) の選択的阻害剤である PD98059 では、リンによる ALP 活性抑制は完全には解除されなかった。従って、リンは骨芽細胞においても複数の細胞内情報伝達系を活性化するものの、骨芽細胞分化に対しては主に ROS 産生を介して抑制的に作用するものと考えられた(図)。

図：リンによって骨芽細胞分化が抑制される機序



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

リンの骨芽細胞に及ぼす影響
岡本 剛明、田口 学、福本 誠二、藤田 敏
郎
第 30 回日本骨代謝学会学術集会
2012 年 7 月 20 日 京王プラザホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 学 (TAGUCHI MANABU)
東京大学 医学部附属病院 助教
研究者番号 : 00265141

(2) 研究分担者

福本 誠二 (FUKUMOTO SEIJI)
東京大学 医学部附属病院 講師
研究者番号 : 30202287