

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659714

研究課題名（和文）骨代謝における活性酸素シグナルの解明

研究課題名（英文） Elucidation of the role of reactive oxygen species in bone metabolism

研究代表者

森田 定雄 (MORITA SADA0)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20202426

研究成果の概要（和文）：

申請者らは骨代謝における活性酸素の意義を分子生物学的に解析することを目的として、破骨細胞特異的 PHGPx 欠損マウス (PHGPx oc/-マウス) を用いて検討した。すると、PHGPx oc/-マウスは耳介の低形成、破骨細胞数の著明な増加、破骨細胞マーカーの発現レベルの上昇が認められた。

研究成果の概要（英文）：

We aimed to study the role of reactive oxygen species in bone metabolism by using osteoclast-specific PHGPx-deficient mice. These mice developed hypoplasia of auricle, increase in osteoclast differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨代謝、酸化ストレス、活性酸素、シグナル伝達機構、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた我が国では、約 1100 万人とされる骨粗鬆症をはじめとする骨関連疾患の患者数は飛躍的に増加している。骨粗鬆症による骨折は寝たきりの原因の第 2 位であり、その病態解明と効果的な治療法の創出は急務である。申請者らは現在まで「神経と骨とのネットワーク」の発見を契機として、骨代謝学にパラダイムシフトをもたらす重要な知見を報告してきた (Cell 2000, 2002, Nature 2005, NatMed 2007 など)。近年、活性酸素は生体に損傷をもたらす単なる毒性因子ではなく、シグナル伝達機構の担い手であることが明らかになりつつあるが、その骨代謝への影響および分子生物学的な作用機構については不明な点が多い。

2. 研究の目的

申請者らは骨代謝における活性酸素の意義を分子生物学的に、また特異的蛍光プロー

ブを用いて細胞生物学的に解明すること、ならびに「神経と骨とのネットワーク」における活性酸素シグナルの役割を *in vivo* で詳細に解析することを目的として以下のような研究を計画した。

(1) 活性酸素シグナルの破骨細胞分化における意義を分子生物学的に解明する。

(2) 骨代謝におけるグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の意義の解明

各種の GPx のうち、PHGPx は活性酸素により生体膜に生じる脂質ヒドロペルオキシドを直接還元できる唯一の酵素である。我々は骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞、骨細胞特異的 PHGPx 欠損マウスをすでに作成しており、これを用いて骨代謝における GPx の *in vivo* における生理的意義を包括的に解析する。

3. 研究の方法

PHGPx は各種の GPx のうち、活性酸素によ

り生体膜に生じる脂質ヒドロペルオキシドを直接還元できる唯一の酵素である。本研究では、この酵素の組織特異的ノックアウトマウスを用い、活性酸素シグナルの分子プローブを用いて、活性酸素シグナルを固体内、組織内、細胞内で可視化し、骨代謝における活性酸素シグナルの全容を解明する。さらに神経系による骨代謝調節におけるシグナル分子としての活性酸素の意義を解明する。そのために、①破骨細胞の分化における活性酸素シグナルの意義の解明、②骨代謝におけるグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の意義の解明を通じて骨代謝における活性酸素シグナルの全容を明らかにし、骨の健康に留意した抗酸化物質の適正な摂取量の策定につなげることを目標とした。

①破骨細胞の分化における活性酸素シグナルの意義の解明

破骨細胞は単球/マクロファージ系の細胞から形成される多核の巨細胞である。その分化には骨芽細胞で産生されるサイトカインである RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand) が必須である。そこで、RANKL 添加による破骨細胞の分化誘導過程において、活性酸素シグナル同定プローブを用いて、活性酸素シグナルの時間的、空間的局在を詳細に検討した。

②骨代謝におけるグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の意義の解明

骨代謝における GPx の *in vivo* における生理的意義を、骨芽細胞特異的 PHGPx 欠損マウス、破骨細胞特異的 PHGPx 欠損マウスを用いて解析する。PHGPx flox マウスおよび、骨芽細胞、破骨細胞特異的 Cre マウスを交配させ、各マウスの骨代謝動態を分子生物学的、組織学的に解析する。まず、マイクロ CT を用いて骨量の 3 次元定量を行い、さらに骨形成、骨吸収の指標を骨形態計測法を用いて解析した。また、骨芽細胞、破骨細胞の分化や増殖に特に重要な遺伝子、蛋白の発現を大腿骨より調整した cDNA、蛋白を用いて、リアルタイム PCR 法および Western blot 法で検討した。

4. 研究成果

PHGPX 遺伝子に注目して研究を進めた。

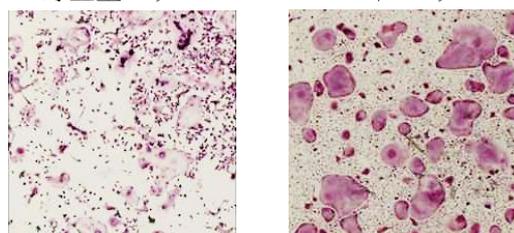
in vitro において、骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) で siRNA を用いて本遺伝子をノックダウンすると、骨芽細胞の分化マーカーである ALP 活性および mRNA 発現の低下が認められたことから、骨芽細胞分化に対して促進的に働く可能性が考えられた。一方、*in vitro* で M-CSF、RANKL により誘導される破骨細胞分化の過程において、本遺伝子は分化後期で発現が減少する事が明らかとなった。

破骨細胞特異的 PHGPX 欠損マウス (PHGPx oc^{-/-}マウス) は耳介の低形成を示し、それらの個体では PHGPx の発現レベルが有意に低

下していた。

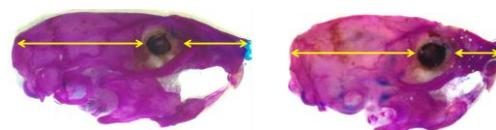
また、出生直後では野生型マウスとの差は認められないが、出生後 10 日目から体重の低下が確認された。PHGPx の発現レベルが極端に低いマウスでは、耳介の低形成に加えて破骨細胞数が著明に増加し、破骨細胞マーカーの DC-STAMP の発現レベルが上昇していた (図 1)。

図 1 PHGPx oc^{-/-}マウスの破骨細胞形成能
野生型マウス PHGPx oc^{-/-}マウス



また、頭蓋骨において主に膜性骨の辺縁部に歪曲や形成異常が認められた (図 2)。

図 2 PHGPx oc^{-/-}マウスの骨格形成
野生型マウス PHGPx oc^{-/-}マウス



これらの結果から、過酸化脂質が、破骨細胞分化の下流に位置する DC-STAMP を制御して、骨組織の膜性骨化や耳介の形成に影響を与えたことが示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) Yamauchi Yuki, Jinno Tetsuya, Koga Daisuke, Asou Yoshinori, Morita Sadao, Okawa Atsushi, Comparison of different distal designs of femoral components and their effects on bone remodeling in 1-stage bilateral total hip arthroplasty, J Arthroplasty, 査読有り, 27 巻、2012、1538-43

(2) Keisuke Kaji, Munenori Katoh, Koji Isozaki, Junya Aizawa, Tadashi Masuda, Sadao Morita, The Effect of Mastication on Reaction Latency to Unanticipated

External Disturbances in the Standing Position、Journal of Medical and Dental Sciences、査読有り、59巻、2012、83-88

(3) 勝木員子、相澤純也、磯崎弘司、神野哲也、森田定雄、THA 前後における中殿筋と大殿筋の筋断面性の回復と JOA Hip Score との関連-CT を用いて-、理学療法学、査読有り、39巻、2012、122-23

(4) 小谷野 岳、神野 哲也、麻生 義則、古賀 大介、谷口 直史、高田 ちさと、宗田 大、大川 淳、森田 定雄、山内 裕樹、両側一期的人工股関節全置換術におけるドレーン留置の有用性に関する検討、Hip Joint、査読有り、38巻、2012、472-475

(5) 古賀 大介、神野 哲也、宗田 大、森田 定雄、人工股関節全置換術における関節安定性 前方アプローチと後側方アプローチの術中比較、日本関節病学会誌、査読有り、31巻、2012、7-11

(6) 高田 ちさと、古賀 大介、神野 哲也、麻生 義則、山内 裕樹、谷口 直史、小谷野 岳、佐々木 亨、森田 定雄、宗田 大、大川 淳、人工股関節全置換術における神経麻痺発生の危険因子の検討、Hip Joint、査読有り、38巻、2012、448-452

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 定雄 (Morita Sadao)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：20202426

(2) 研究分担者

麻生 義則 (Aso Yoshinori)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科

・寄付講座教員

研究者番号：50345279

(3) 連携研究者

竹田 秀 (Takeda Shu)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：30376727