

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：22303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24614014

研究課題名(和文) アルデヒド脱水素酵素遺伝子変異による骨密度低下の早期予防、治療法の確立

研究課題名(英文) Effective early prevention of osteoporosis caused by mutation of the gene coding for the aldehyde dehydrogenase 2 enzyme.

研究代表者

星 淡子 (HOSHI, HIROKO)

前橋工科大学・工学部・准教授

研究者番号：50399812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本人の約半数が遺伝子変異を有するアルデヒド脱水素酵素(ALDH2)遺伝子の変異は骨粗鬆症を惹起する。この原因に基づく骨粗鬆症を予防するための機能性化合物の検討を行った。遺伝子変異による酵素代謝不全の結果、原因物質として体内に過剰の過酸化脂質とアルデヒドの蓄積を確認した。機能性物質として抗酸化物質を添加したアセトアルデヒド存在下の骨芽細胞の分化誘導能を検討した結果、アセトアルデヒドによる骨芽細胞の形成不全を効果的に回復させた。そこで、実際にALDH2遺伝子変異マウスへ抗酸化化合物を経口投与して骨密度の検討を行った結果、大腿骨密度は有意な上昇を示し、骨粗鬆症の症状を回復させることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) has a major role in acetaldehyde detoxification and is localized in mitochondria. About half of Japanese and East Asians have a mutant ALDH2 gene, resulting in sensitivity to alcohol. We previously showed that a dominant-negative form of Aldh2 mice showed osteoporosis caused by impaired osteoblastogenesis. In this study, we examined whether or not various nutritional factors have effects of antioxidant reagents to prevent osteoporosis in Aldh2 transgenic (ALDH2-DAL) mice and in their osteoclast cells. As the results, astaxanthin effectively inhibited the failure of osteoblasts to differentiate in a dose-dependent manner. The administration of astaxanthin to ALDH2-DAL mice led to an increasing femur bone density compared to normal-diet ALDH2-DAL mice fed for 3 months in vivo experiments. In this study, we showed that astaxanthin prevented osteoporosis caused by ALDH2 gene mutation.

研究分野：生化学

キーワード：骨粗鬆症 骨芽細胞 アセトアルデヒド 遺伝子変異 抗酸化物質 アスタキサンチン

1. 研究開始当初の背景

アルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) はアルコールやアミノの酸代謝を司る生体内の代謝過程で重要な役割を担う酵素である。日本人の約半数が *ALDH2* 遺伝子の変異型 (dn-*ALDH2*) を有し、*ALDH2* 遺伝子に変異を有する人 (dn-*ALDH2*) は変異を有しない人と比較して有意に骨密度が低下することが統計学的に知られている。これまでの研究では、*Alah2* ドミナントネガティブ型のモデルマウスの骨解析により骨粗鬆症の症状を呈することを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では、*ALDH2* の遺伝子変異に伴う骨粗鬆症に対して予防が可能な食品成分に含まれる機能性物質の探索を行い、骨への効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) ALDH2-DAL マウスの骨髓細胞からの骨芽細胞及び破骨細胞の調製および MC3T3-E1 細胞のアセトアルデヒド存在下 rhBMP 誘導骨芽細胞培養

ALDH2-DAL マウスの骨髓細胞からの骨芽細胞及び破骨細胞の調製は ALDH2-DAL の骨髓採取後、未分化間葉系幹細胞及びマクロファージ細胞より単離し作成を行った。骨芽細胞は、骨髓間質細胞を比重分離によって分取後、分化誘導培地を用いて 2 週間培養し、骨芽細胞への分化誘導培養を行なった。破骨細胞は、骨髓細胞採取後 M-CSF 共存下で 3 日間培養した後の破骨細胞前駆細胞に RANKL を添加し、破骨細胞への分化誘導培養を約 5 日間行った。図.1 に示す抗酸化化合物は骨芽細胞、破骨細胞の分化誘導開始と同時に添加し 2 日毎の培地交換の際に抗酸化化合物を同時に添加し、培養期間終了まで継続して行った。また、MC3T3-E1 細胞は 10 µM アセトアルデヒド存在下で 30 ng / ml rhBMP 誘導により骨芽細胞への誘導培養を行った。

(2) 骨芽細胞及び破骨細胞の細胞分化能検討

骨芽細胞の形成能の評価は、骨芽細胞に沈着しているカルシウムを Alizarin red を用いて染色し細胞の形態と染色性について顕微鏡観察した。同時に分化した骨芽細胞に蓄積したリン酸カルシウムを溶解し、比色定量した。また骨芽細胞形成マーカーである、アルカリフォスファターゼ (ALP) の酵素活性測定を行った。一方破骨細胞に関しては、分化誘導後の破骨細胞を TRAP 染色により染色し細胞形態を顕微鏡観察した。

(3) ALDH2 遺伝子変異マウス (ALDH2-DAL) への機能性物質の投与後の骨密度評価

ALDH2 遺伝子変異を発現する、ドミナントネガティブ ALDH2 (ALDH2-DAL) マウスを用いて機能性物質を経口投与し、骨密度の変化について検討した。実験は 4 週もしくは 8 週齢の雌 ALDH2-DAL マウスに対して機能性物質として、図.1 の (b), (c), (d) に示す抗酸化物質を投与した。-tocopherol (トコフェロール) は 0.1 % を正常食餌に混合し、固形

餌として 3 か月間投与した。また、astaxanthin (アスタキサンチン) に関しては、0.02 % を正常食餌に混合し、固形餌として 3 か月間投与した。-lipoic acid (リポ酸) は 0.02 % 溶液を体重の 1 % 量になるように 3 週間ゾンデ投与した。投与期間終了後、それぞれのマウス大腿骨の骨密度を DEXA を用いて測定した。上記に挙げた 3 種類の抗酸化化合物の投与量はヒト及び齧歯類における一日許容摂取量の範囲内で行った。

4. 研究成果

(1) ALDH2-DAL マウス細胞を用いた骨芽細胞及び破骨細胞への細胞分化形成能の検討

これまでの研究では ALDH2-DAL の骨芽細胞は野生型と比較して著しく分化形成能が低下することを示している。原因として ALDH2-DAL マウス血漿中でアセトアルデヒドの濃度が上昇すると共に、骨芽細胞内にアルデヒドに修飾された過酸化脂質 (4HNE) が過剰に蓄積することを確認している。本研究ではこの結果に基づいて、体内の過剰なアセトアルデヒドの蓄積による酸化ストレスを除去するための抗酸化化合物を ALDH2-DAL 骨芽細胞へ添加し、骨芽細胞及び破骨細胞の分化形成能に対する変化を検討した。研究では、図.1 に示すような数種類の抗酸化能を示す化合物を添加した。

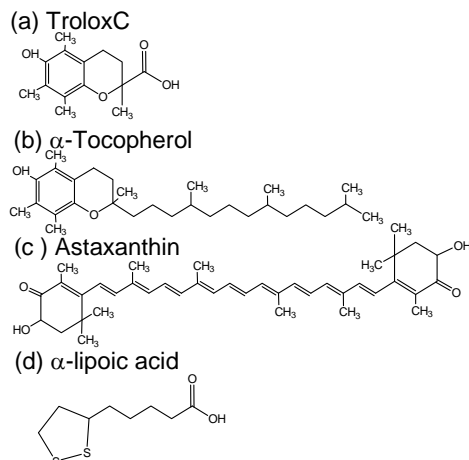


図 1 . 使用した抗酸化化合物

実験の結果、ALDH2-DAL の骨芽細胞は抗酸化化合物の添加によって分化形成能が回復することを Alizarin Red 細胞染色で確認した (図.2)

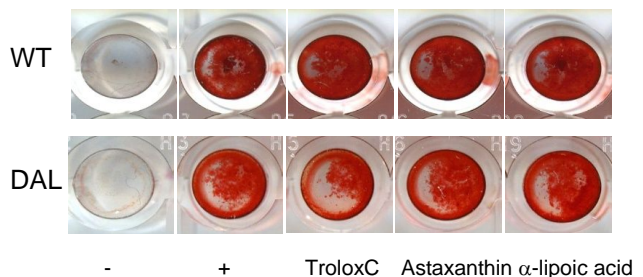


図 2 . 抗酸化化合物投与骨芽細胞形成能の検討

同様に、抗酸化化合物の添加によって、骨芽細胞形成に伴うリン酸カルシウムの蓄積量が増加することを確認した(図. 3)。検討した抗酸化化合物の中でも特に、アスタキサンチン(40 μM)と α-リポ酸 (0.5 μM) に関しては骨芽細胞のカルシウムの蓄積が有意に上昇することを確認した。また骨芽細胞分化マーカーである、アルカリフォスファターゼ (ALP)の酵素活性を測定した結果、すべての抗酸化化合物において ALDH2-DAL の骨芽細胞で ALP の活性が有意に増加することが示された(図. 4)。

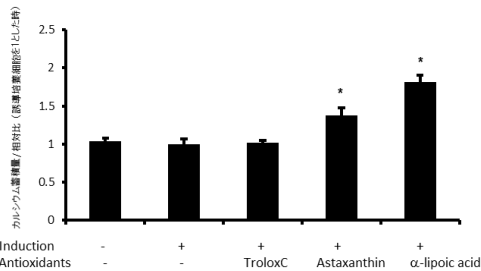


図 3 . ALDH2-DAL 骨芽細胞に対する抗酸化化合物の効果  
ALDH2-DAL 骨芽細胞カルシウム蓄積量の変化  
(\*:p<0.05/抗酸化化合物)

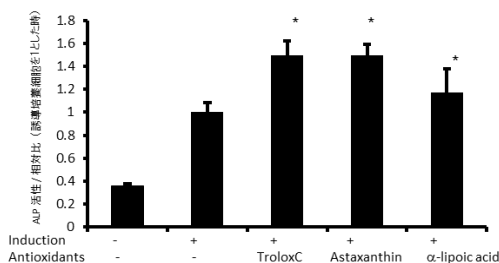


図 4 . ALDH2-DAL 骨芽細胞に対する抗酸化化合物の効果  
ALP 活性測定 (\*:p<0.05/抗酸化化合物無しに関して)  
骨芽細胞前駆細胞である、MC3T3E-1 を用いてアセトアルデヒド存在下における rhBMP2 誘導下での骨芽細胞分化形成に対する抗酸化化合物の効果について検討した。実験の結果、Trolox C (4.0 μM) 及び Astaxanthin (4.0 μM) において有意に ALP 遺伝子の発現が上昇することを示した(図.5)。更に Astaxanthin の濃度に関して検討した結果、0.4 μM - 40.0 μM で効果的にアセトアルデヒドにおける骨芽細胞形成不全を回復する効果のあることを示した(図.6)。

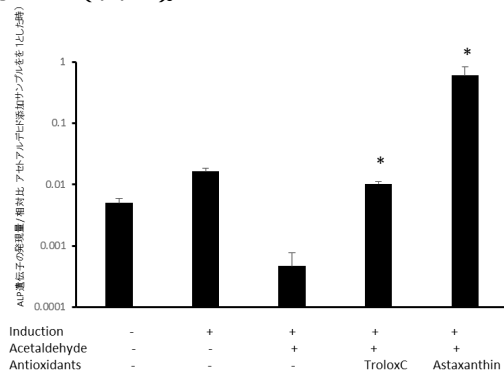


図.5 抗酸化物質を添加アセトアルデヒド存在下の MC3T3E1 骨芽細胞誘導における ALP 遺伝子の発現 (\*: p < 0.01)

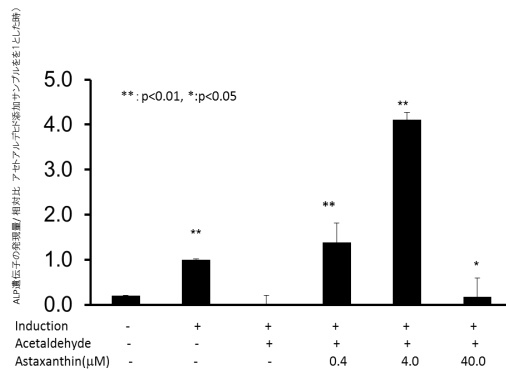


図. 6 アセトアルデヒド存在下骨芽細胞分化誘導における Astaxanthin 濃度の効果検討

一方、破骨細胞の分化誘導能についても同様に検討を行い、抗酸化化合物を添加した際の破骨細胞形態を酒石酸アルカリフォスファターゼ (TRAP) 染色で顕微鏡観察した。実験の結果、アスタキサンチンと α-リポ酸を添加した破骨細胞は、明らかに破骨細胞の形成が抑制されていることを TRAP 染色によって確認した。一方でビタミン E 誘導体である Trolox C を添加した際には、破骨細胞への分化形成が促進される傾向があることを示唆する結果を得ている。これらの結果より、アスタキサンチン及び α-リポ酸は ALDH2-DAL の骨芽細胞分化形成不全を回復、促進する効果があることを示すと同時に、破骨細胞では分化形成を抑制することで、遺伝子変異に伴う骨代謝不全をより効果的に改善できる可能性を示唆した。

## (2) ALDH2-DAL マウスに対する抗酸化化合物投与の骨密度改善効果

ALDH2-DAL 骨芽細胞の分化誘導能に対して効果のあった トコフェロール、アスタキサンチン並びに α-リポ酸を実際に ALDH2-DAL マウスへ一定期間投与し、大腿骨の骨密度測定及び軟 X 線写真の撮影を行った。0.02% アスタキサンチン含有食餌を 3 か月間経口投与した結果、骨密度は上昇し特に大腿骨遠位骨端部で有意な骨密度の上昇を認められた(図.7)。

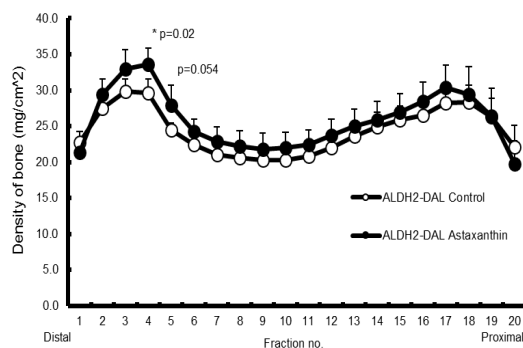


図.6 ALDH2-DAL マウスへの Astaxanthin 経口投与による骨密度の変化

一方、同期間、0.1%  $\alpha$ -トコフェロールを含む食餌を経口投与した際には、ALDH2-DAL マウス大腿骨の骨密度の上昇を確認したが有意な差は得られなかった。また0.02%  $\alpha$ -リポ酸の投与でも同様に骨密度の上昇傾向を確認したものの有意な差は示さなかった。この結果から、アスタキサンチンは *Aldh2* 遺伝子の変異による骨粗鬆症に伴う骨密度の低下を回復させる機能を有する抗酸化化合物であることを示した。

本研究により ALDH2-DAL マウスの骨芽細胞で起こる分化形成不全は抗酸化物質を添加することによって回復することを明らかにした。抗酸化化合物の中でも特にアスタキサンチンは顕著な効果を示し、ALDH2-DAL マウスへの経口投与と実験において骨密度低下の症状が有意に改善されることを示した。一方でアスタキサンチンは破骨細胞の分化形成を抑制する効果のあることを示した。これまで ALDH2-DAL の破骨細胞は野生型と比較して分化形成能に有意な差がないことを報告している。本研究により ALDH2 遺伝子変異による低代謝回転型を示す骨粗鬆症においてはアスタキサンチンが骨芽細胞並びに破骨細胞に効果的に作用することが示された。また、ALDH2 - DAL マウス血清のトリグリセリド (TG) の発現量の変化は野生型と比較して差異はなかった。一方で、ALDH2 - DAL の骨芽細胞では過酸化脂質タンパク質 (4HNE) の蓄積がアスタキサンチンの添加によって減少することを確認した。間葉系幹細胞由来の骨芽細胞と同様に、アセトアルデヒド存在下における rhBMP2 誘導 MC 3T3-E1 の骨芽細胞分化誘導の実験結果においてもアスタキサンチンの添加は骨芽細胞の分化形成能に対してレスキュー効果を示すと共に、細胞の増殖能を有意に上昇させる効果のあることを確認した。その際、同時に 4HNE の発現が減少することも確認している。これらの結果より、*Aldh2* 遺伝子の変異により起こる、骨芽細胞の形成不全は、アスタキサンチンを始めとした抗酸化化合物により回復が可能であることを示した (論文投稿中)。

アスタキサンチンはトマトや人参、エビ・カニに含まれる  $\beta$ -カロテンと同じカロテノイドの一種で赤い色素として知られている。アスタキサンチンの積極的な摂取により、日本人人口の約半数 (40-44%) である *ALDH2* 遺伝子保有者では将来の骨粗鬆症予防の効果が期待される。今後はヒトでの効果を検討すると共に、アスタキサンチンが骨芽細胞分化形成能を回復させる詳細な分子メカニズムの解明について検討を行いたいと考える。

##### 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 4 件)

- (1) Mukai T, Hoshi H, Ohtake K, Takahashi, M Yamaguchi A, Yokoyama S and Sakamoto K.

Highly reproductive *Escherichia coli* cells with no specific assignment to the UAG codon.

*Scientific Reports*, 5, 9699, (2015)

doi:10.1038/srep09699 査読有

- (2) Miyamoto H, Katsuyama E, Miyauchi Y, Hoshi H, Miyamoto K, Sato Y, Kobayashi T, Iwasaki R, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Fujie A, Hao W, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T.

An essential role for STAT6-STAT1 signaling in promoting macrophage cell-cell fusion.

*Journal of Biological Chemistry*., 287 (39),

32479-84, (2012). 査読有

- (3) Miyauchi Y, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Hoshi H, Miyamoto K, Sato Y, Kobayashi T, Akiyama H, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T.

Conditional inactivation of Blimp1 in adult mice promotes increased bone mass. *Journal of Biological Chemistry*., 287 (34), 28508-17, (2012). 査読有

- (4) Yoshida S, Iwasaki R, Kawana H, Miyauchi Y, Hoshi H, Miyamoto H, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Nakagawa T, Miyamoto T.

PDGFBB promotes PDGFR $\alpha$ -positive cell migration into artificial bone in vivo., *Biochem Biophys Res Commun*. 421 (4): 785-9, (2012). 査読有

〔学会発表〕(計 1件)

星淡子、宮本健史

アルデヒド脱水素酵素遺伝子変異による骨粗鬆症のための抗酸化物質の効果

第87回日本生化学会大会、2014年10月17日、(京都)

〔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 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

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

星 淡子 ( HOSHI HIROKO )

前橋工科大学・工学部・准教授

研究者番号：50399812

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

神 繁樹 ( JIN SHIGEKI )

研究者番号：60531845