

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791568

研究課題名(和文)酸化ストレスによる骨代謝制御機構の解明

研究課題名(英文)The role of oxidative stress in the maintenance of bone metabolism

研究代表者

齋田 良知 (Saita, Yoshitomo)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：00534885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨の恒常性維持における骨細胞の役割が注目されている。しかし、骨細胞における酸化ストレスが骨量維持機構に及ぼす影響についてはほとんど知られていない。我々は、ミトコンドリアでの酸化ストレス処理を担うスーパーオキシドディスムターゼ2の発現を骨組織特異的に欠損させたマウスを作成し、その骨形態計測を行った。このマウスでは、骨での酸化ストレスの上昇と骨量の減少が認められた。これは、骨でのスクレロスチンの低下による骨形成抑制と、破骨細胞分化・活性化因子の発現上昇による骨吸収の亢進による事を明らかにした。我々の検討は、骨細胞酸化ストレスが骨量維持に重要な役割を果たしている事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Osteocytes play a crucial role in maintaining the quality of and healing damage to bone tissue. However, the pathological effects of mitochondrial redox imbalances on osteocytes and bone metabolism have not been fully elucidated. We generated mice lacking mitochondrial superoxide dismutase 2 (Sod2) in osteocytes. Sod2 depletion in the osteocytes positively enhanced the production of cellular superoxide in vivo. Sod2-deficient femurs showed remarkable bone loss in an age-dependent manner. Sod2 deficiency significantly suppressed bone formation and increased bone resorption concomitant with the upregulation of sclerostin and receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL). These findings demonstrate that the mitochondrial superoxide induced in osteocytes by Sod2 ablation causes age-related bone loss due to the impairment of canalicular networks and bone metabolism via the deregulation of the sclerostin and RANKL expression.

研究分野：骨代謝学 整形外科・運動器医学

キーワード：酸化ストレス 骨粗鬆症 骨細胞

1. 研究開始当初の背景

加齢と共に生体内に蓄積する酸化ストレスは、種々の臓器に退行性変化をもたらすが、骨組織に及ぼす影響は不明な点が多い。さらに細胞質内、ミトコンドリア内でそれぞれ酸素代謝、活性酸素制御システムが存在し、臓器によってそれぞれの役割、依存度が異なる。我々は、骨組織での細胞質内における酸化ストレスの増加が骨量減少を来す事を明らかにしたが、ミトコンドリア内の酸化ストレスと骨の関係は不明であった。

2. 研究の目的

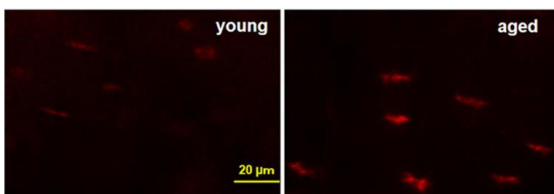
ミトコンドリアでの酸化ストレス増加が骨粗鬆症の一因となるかを明らかにすること。

3. 研究の方法

ミトコンドリアでの活性酸素処理を担う Mn-SOD を骨組織特異的に欠損させたマウスを作成し解析することで、骨組織の酸化ストレスによる骨量制御機構を解明する。

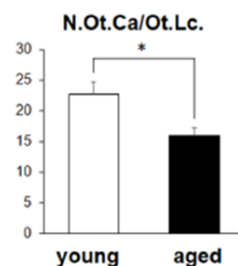
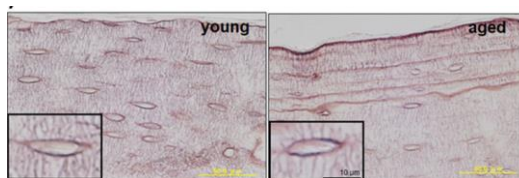
4. 研究成果

はじめに、骨細胞における酸化ストレスが加齢とともに増加するかを検討するため、若年のマウスと老齢マウスの骨細胞における酸化ストレス度を測定した。老齢 (aged) のマウスでは赤で示す酸化ストレスマーカーの DHE が強く認められ、これを定量するとグラフのように、老齢マウスで有意に酸化ストレスが上昇していることが明らかとなった。加齢マウス骨細胞での酸化ストレスが増加している事が示されたことは、酸化ストレスが加齢による骨量減少に関与する事を示唆した。



骨細胞は、細胞の存在する骨小腔同志を骨細管という細い管によるネットワークを構築し相互の情報伝達を行っている事が近年の研究によって明らかにされている。我々は、骨小腔および骨細胞の構造を詳細に解析したところ、老齢マウスでは骨細胞あたりの骨細管数が有意に減少している事を確認した。

この事は、加齢による骨量減少の一因として、骨細管による骨細胞のネットワーク機構の破綻が関与する事を示唆した。



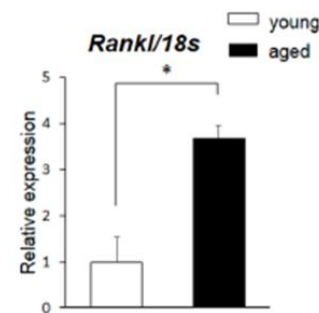
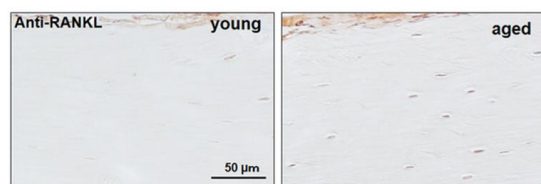
上図の如く、Agedのマウスでは骨細管構造が疎になり、これを定量すると、左図の如く Aged マウスで有意に低値を示した。

以上より、哺乳類の生体における骨組織において、加齢に伴い酸化ストレスが増加する事と、骨細管ネットワークの破綻が生じる事が確認された。

加齢に伴う骨粗鬆症の一因として、骨吸収活性の亢進が挙げられ、これは、骨芽細胞や骨髄ストローマ細胞由来の破骨細胞分化・活性化調節機構の促進によるものと考えられてきた。しかし、近年になり骨細胞にも破骨細胞分化・活性化を調節する機構が存在する事が次々と明らかにされている。

こうした背景から、次に我々は、加齢マウスの骨細胞における破骨細胞分化・活性化促進因子 Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) の発現を確認した。

すると、老齢マウスにおいて有意に RANKL の発現が上昇しており、加齢により骨細胞を介した骨吸収促進機構が、骨量減少の一因となる可能性が示唆された。

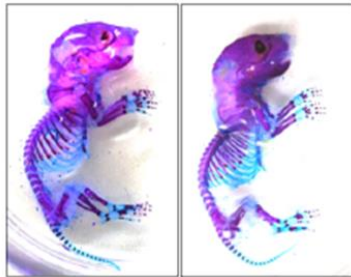


若年及び老齢マウス皮質骨における RANKL の発現 (上図) と mRNA 発現レベルの比較 (左図)。

これらの結果から、加齢による骨量減少の一因として、骨細胞における RANKL 発現の上昇による骨吸収の促進が関与する事が示唆された。

次に、Cre-LoxP システムを用い、ミトコンドリア酸化ストレス処理機構において重要な役割を担う SOD2 を骨細胞において欠損させるマウスを作製した。

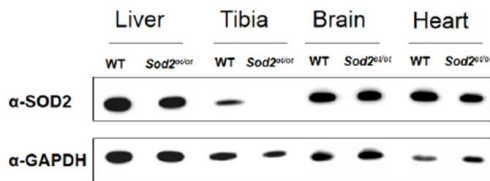
このマウスでは、骨組織の発育・形成異常は認めず、生存可能であった。



WT Sod2^{ot/ot}

野生型及び遺伝子改変マウスの骨格標本。石灰化（赤）軟骨（青）に染色される。骨組織の形成異常を認めない。

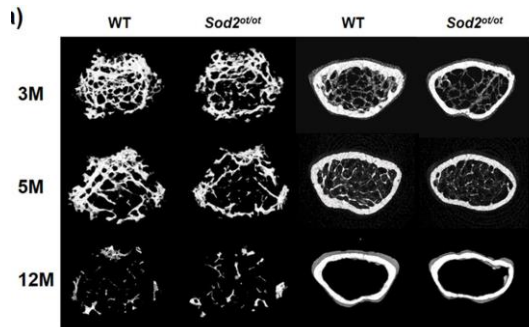
また、このマウス全身の臓器および骨組織より蛋白を抽出し、ウェスタンブロットを行ったところ、骨組織において特異的に SOD2 の発現が認められない事が確認出来た。この事により、このシステムが骨細胞における SOD2 の役割を解析するモデルとして機能している事を確認した。



このマウスにおいて、骨粗鬆症様の表現型を呈するかを明らかにするため、野生型及び骨細胞特異的 SOD2 欠損マウス大腿骨の 3 次元マイクロ CT の撮影を撮影した。

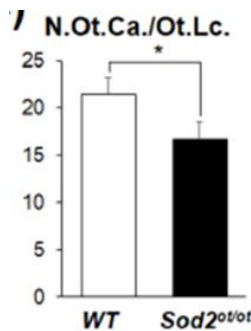
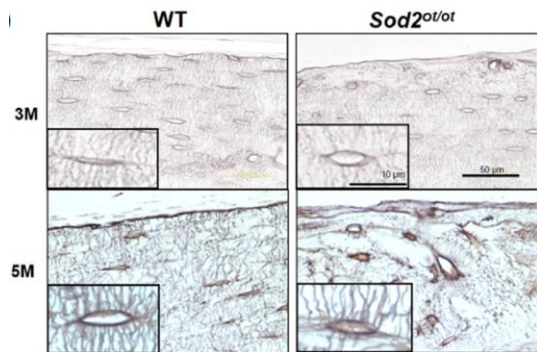
すると、骨細胞特異的 SOD2 欠損マウスにおいて、有意な骨密度の減少および骨量の減少が認められた。これを定量化すると、野生型マウス (WT) と比較し有意に骨密度 (BMD)、皮質骨幅 (Ct. Th)、海綿骨量 (BV/TV)、海綿骨数 (Tb. N) が減少しており、骨粗鬆症様の表現型を呈する事が明らかとなった。

(図：大腿骨 3 DCT 像)



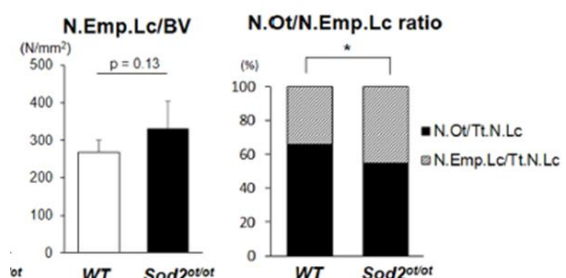
さらに、この表現型は、生後 3 か月齢のマウスより認められ、5 か月でその差が最も大きくなり、12 か月例では野生型のマウスも骨量が低下するため野生型と SOD2 欠損マウスとの間の骨量の差が少なくなることが明らかとなり、このマウスが骨組織の早期加齢様の表現型を呈することを示した。

次に我々は、このマウスにおける骨組織の組織的解析を行ったところ、前述した加齢マウスの骨組織に類似し「骨細管の形成不全（骨細管数の減少）」が認められる事を明らかにした。これを定量化するためこのマウスにおける骨小腔の数を計測したところ、SOD2 欠損マウスにおいて骨小腔数が有意に少ない事が明らかとなった。



SOD2 欠損マウスでは骨細管構造が疎になり（上図）、骨小腔あたりの骨細管数を定量化すると、左図の如く SOD2 欠損マウスで有意に低値を示した。

骨細胞は骨小腔 (Osteocyte lacunae) に存在するが、骨細胞死が生じると、その骨小腔は細胞が存在しない Empty lacunae となる。骨壊死組織や加齢に伴いこの Empty lacuna の比率が存在する事が知られているため、SOD2 欠損マウスにおける Empty lacunae の割合を計測した。すると、Empty lacunae の比率が SOD2 欠損マウスで有意に高い事が確認された (下図)。



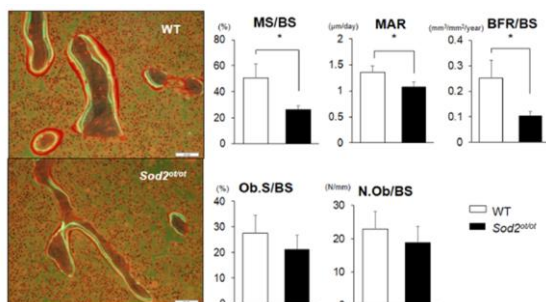
この事より、骨組織特異的 SOD2 欠損マウス

において、骨細胞の細胞死が亢進している事を示唆された。

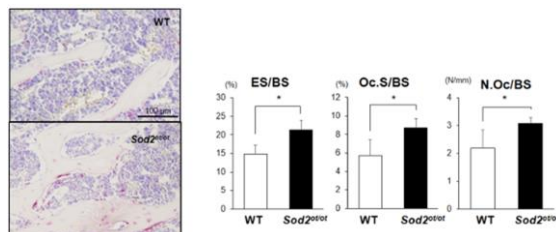
これまでの結果から、骨組織特異的 SOD2 欠損マウスでは、加齢マウスに類似した骨量の減少と骨小腔および骨細管の変化をもたらせることが明らかとなった。次に、そのメカニズムを解明するため、このマウスにおける骨代謝動態の解析を行った。

まず、非脱灰切片を作成し、カルセインダブルラベリングによる動的骨形成能の解析を行った。すると、下図に示すように SOD2 欠損マウスでは石灰化面 (MS/BS)、石灰化速度 (MAR)、これらの掛けた骨形成率 (BFR/BS) が有意に低下していることが示された。一方、骨芽細胞数 (N. Ob/BS) 及び骨芽細胞面 (OB. S/BS) には差は認められなかった。

骨細胞における SOD2 欠損により骨形成が抑制されたことから、SOD2 は骨形成に促進的や役割を果たすことが生体レベルで確認出来た。



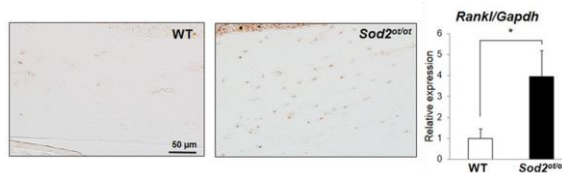
生体の骨量は骨形成と骨吸収のバランスによって維持されている。そのため、次にこの骨代謝制御機構のもう一方を担う骨吸収に関する解析を行った。すると、SOD2 の欠損マウスでは、破骨細胞数 (N. Oc)、破骨細胞面 (Oc. S)、骨吸収面 (ES) が増加しており、骨吸収活性が亢進している事が明らかとなった。



これらの骨形態計測結果より、骨細胞における SOD2 の欠損は骨形成の低下と骨吸収の亢進による骨粗鬆症を呈する事が明らかになった。

骨細胞における SOD2 の欠損による骨吸収亢進のメカニズムを明らかにするため、骨組織における RANKL の免疫染色を施行した。す

ると、SOD2 欠損マウスでは、骨細胞における RANKL の発現が増加していた (下図)。



これらの結果より、SOD2 による酸化ストレス処理機構が骨の恒常性の維持に必須であることが証明された。

今回の我々の検討により、これまで明らかにされていなかった、骨量維持機構における骨細胞ミトコンドリア酸化ストレス処理機構の重要性を生体レベル初めて明らかにすることが出来た。

高齢化社会において、骨量減少の予防や骨粗鬆症治療の発展は急務である。我々の検討結果から、加齢とともに増加する酸化ストレスを抗酸化作用を有する食物や抗酸化剤の投与などでコントロールすることが出来れば、骨粗鬆症の予防・治療の一助となる可能性が示唆された。

この事は、骨粗鬆症の病態解明と治療の発展に貢献するものと考えている。

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 2 件)

1. Mitochondrial superoxide in osteocytes perturbs canalicular networks in the setting of age-related osteoporosis. Kobayashi K, Nojiri H, Saita Y, Morikawa D, Ozawa Y, Watanabe K, Koike M, Asou Y, Shirasawa T, Yokote K, Kaneko K, Shimizu T. Sci Rep. 2015 Mar 16;5:9148. 査読あり
2. Cytoplasmic reactive oxygen species and SOD1 regulate bone mass during mechanical unloading. Morikawa D, Nojiri H, Saita Y, Kobayashi K, Watanabe K, Ozawa Y, Koike M, Asou Y, Takaku T, Kaneko K, Shimizu T. J Bone Miner Res. 2013 Nov;28(11):2368-80. 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

1. Mitochondrial Superoxide Produced by

- Sod2 Deficiency Suppresses Proliferation of Chondrocytes.
Koike M, Nojiri H, Saita Y, Morikawa D, Kobayashi K, Watanabe K, Kaneko K, Shimizu T
American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2012 Annual Meeting, Minneapolis, Minnesota, Oct. 12-15, 2012
2. Manganese superoxide dismutase deficiency in chondrocytes induces mitochondrial superoxide generation leading to impaired proliferation and matrix production, but not apoptosis.
Koike M, Nojiri H, Saita Y, Morikawa D, Kobayashi K, Watanabe K, Kaneko K, Shimizu T
Osteoarthritis Research Society International (OARSI) 2013, Philadelphia, Pennsylvania, April 18-21, 2013
3. Sod2 deficiency in chondrocytes accelerates age-related osteoarthritis in mice. Koike M, Nojiri H, Ozawa Y, Watanabe K, Masuda I, Muramatsu Y, Kaneko H, Morikawa D, Kobayashi K, Sasho T, Shirasawa T, Yokote K, Kaneko K, Shimizu T
2014 Osteoarthritis Research Society International (OARSI) world congress 2014, Paris, France, Apr., 24-27, 2014, [OARSI 2014 Young Investigator Award]
4. Osteocyte Specific Deletion of Superoxide Dismutase2 Induces Osteocyte Loss Resulting in Bone Loss Associated with Impairment of Bone Remodeling
K Kobayashi, H Nojiri, Y Saita, D Morikawa, M Koike, Y Ozawa, Y Asou, K Kaneko, T Shimizu,
ASBMR 2013 Annual Meeting in Baltimore, Maryland, USA, October 4-7, 2013. [ASBMR 2013 Young Investigator Award]
5. 骨細胞における酸化ストレスは骨リモデリングバランスの破綻をもたらす
小林 慶司, 野尻 英俊, 齋田 良知, 森川 大智, 小池 正人, 小澤 裕介, 麻生 義則, 金子 和夫, 清水 孝彦: 日本整形外科学会雑誌 (0021-5325)88 巻 3 号 PageS643 (2014. 03)
6. 骨細胞特異的 Sod2 欠損マウスにおける骨リモデリング制御機構の解析
小林 慶司, 野尻 英俊, 齋田 良知, 森

川 大智, 小池 正人, 麻生 義則, 金子 和夫, 清水 孝彦
日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録 集 (1349-0761)31 回
Page77 (2013. 05)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋田 良知 (SAITA YOSITOMO)
順天堂大学 整形外科 助教
研究者番号: 534885

(2) 研究分担者

野尻 英俊 (NOJIRI HIDETOSHI)
順天堂大学 整形外科 助教
研究者番号: 10317456

(3) 連携研究者

清水 孝彦 (SHIMIZU TAKAHIKO)
千葉大学 大学院医学研究院先進加齢医学講座 准教授
研究者番号: 40301791