

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791569

研究課題名(和文) 廃用性骨萎縮における細胞質酸化ストレスの役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of pathological role of cytoplasmic oxidative stress in disuse bone atrophy

研究代表者

野尻 英俊 (Nojiri, Hidetoshi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10317456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：廃用性骨萎縮を再現するためにマウスの尾部懸垂モデルを用いた。骨への機械的刺激の低下により骨髄内の活性酸素産生量が増大し、抗酸化酵素であるSOD1の発現上昇を認めた。SOD1欠損マウスにて骨量減少が増悪したことにより、SOD1は廃用性骨萎縮に対し防御的に働いていることが明らかとなった。さらにビタミンC投与によるレスキュー実験において廃用性骨萎縮の抑制が認められた。

研究成果の概要(英文)：We herein report that mechanical unloading significantly increased intracellular ROS production and the specific up-regulation of Sod1 in bone tissue in a tail-suspension experiment. We also reveal that Sod1 loss exacerbated bone loss via reduced osteoblastic abilities during mechanical unloading. We found that the administration of an antioxidant, vitamin C, significantly attenuated bone loss during unloading. These results indicate that mechanical unloading, in part, regulates bone mass via intracellular ROS generation and the Sod1 expression.

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・軟骨代謝学 廃用 骨萎縮 酸化ストレス SOD1

## 1. 研究開始当初の背景

骨脆弱化は易骨折性を導き我々の日常生活動作 (ADL) を妨げる。骨量の低下、骨質の劣化が骨脆弱化の原因となっているが、それらの維持には骨に対する刺激 (機械的ストレス) が必要不可欠で老若男女、哺乳動物において共通の生理機能である。昨今の骨研究によりビスフォスフォネート製剤、選択的エストロゲン受容体モジュレーター、副甲状腺ホルモンの間欠的投与、活性化ビタミン D 投与などの骨粗鬆症治療が開発されているが機械的刺激の乏しい環境、すなわち廃用による骨萎縮をターゲットにした治療戦略、予防対策は未だに解決されていない。廃用になりがちな活動性の低下した高齢者の骨萎縮は骨折のリスクを高めるばかりか、健康寿命を低下させる要因となる。また転倒・外傷により障害を患った人々は創内外の固定、荷重制限により廃用性骨萎縮を引き起こし、障害程度の増悪、復帰の遅延を導く。よって骨の廃用性変化の病態解明とその治療・予防の開発は健康老化を目指す上で重要な課題と考えている。

一方、活性酸素の蓄積が生体機能の低下、すなわち老化を進行させる原因であるという「活性酸素説 (フリーラジカル説)」が提唱され、臓器老化または疾病発症・進行に深く関連している事が解明されてきた。活性酸素は酸素代謝の副産物として産生され、タンパク質、核酸、脂質といった生体物質を酸化すること (酸化ストレス) で機能不全を起こす結果、細胞毒性を発生させると考えられている。我々は酸化ストレスに着目し骨研究を行ってきたが機械的ストレスと酸化ストレスとの関与はいまだ明確ではない。

## 2. 研究の目的

骨の恒常性の維持において機械的刺激 (機械的ストレス) は必要不可欠である。廃用性骨萎縮は疾病または外傷により、機械的スト

レスが減少することで引き起こされ、易骨折性、リハビリテーション遅延を惹起する。酸化ストレスの蓄積が様々な疾病の発症・進行に深く関連していることが解明されてきているが廃用性骨萎縮への酸化ストレスの関与は未だ明確ではない。本研究の目的は廃用性骨萎縮に対する酸化ストレスの影響をモデルマウスを用いて解析し、活動性の低下した高齢者、または外傷・疾病罹患患者の骨萎縮の発症機序を酸化ストレスという観点から明確にすることで、新たな予防または治療介入の確立に役立てることである。

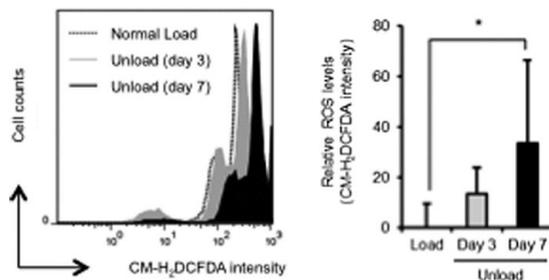
## 3. 研究の方法

細胞質内の抗酸化酵素である SOD1 を欠損させたマウスを用いて骨中の細胞質内のスーパーオキシド (酸化ストレス) が増加した状態を導いた。さらに機械的ストレスの減少状態を導くために 2 週間の尾部懸垂を行った。野生型マウスと SOD1 欠損マウスの尾部懸垂前後でのそれぞれ骨量、骨質、骨代謝マーカー、骨代謝関連遺伝子発現、骨強度を比較検討し、機械的ストレス減少時の酸化ストレスの存在の影響を解析した。

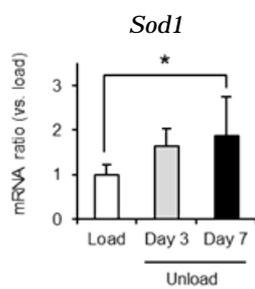
また、尾部懸垂で出現する骨の形態変化において抗酸化剤、または既存の骨粗鬆薬の投与効果を確認した。2 週間の尾部懸垂中、または懸垂終了後に薬剤、またはサプリメントの投与を行うことで改善効果、予防効果があるか検討した。

## 4. 研究成果

廃用性骨萎縮のモデルとしてマウスの尾部懸垂を行い、7 日後に採取した骨髄細胞での活性酸素産生量を蛍光試薬を用いた FCM にて測定したところ、荷重群に比し有意に蛍光強度が増強していた ( $p < 0.05$ 、図 1)。

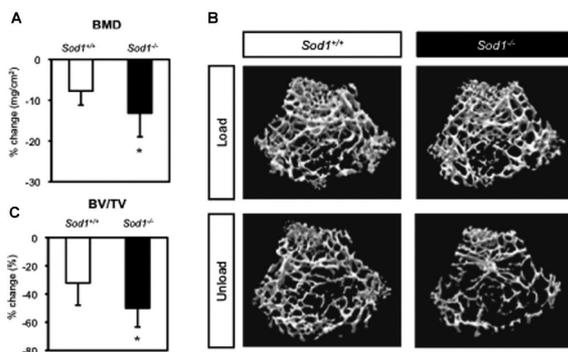


尾部懸垂後 7 日の骨髄細胞では、ALP・Runx2 など骨芽細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現レベルの低下と破骨細胞分化マーカー (Cathepsin K) の発現レベル上昇が認められた。同時に、細胞内 SOD のうち主に細胞質に存在する SOD1 の有意な上昇が認められたが、SOD2 (ミトコンドリアに局在) の発現レベルの変化は見られなかった (図 2)。



これらから、尾部懸垂による骨髄内活性酸素の増加に対する SOD1 の関与が示唆された。そこで、SOD1 欠損

マウスにて尾部懸垂を行い、3D マイクロ CT 解析を行った。欠損マウスの大腿骨で骨量 (BV TV) の減少が増強された (野生型: -23.9, 欠損マウス: -47.5)。骨形態計測においては、欠損マウス尾部懸垂において骨形成率の減少が有意に増強されていたが、尾部懸垂による骨吸収活性上昇率には有意差は認められなかった (図 3)。



骨への刺激低下により骨髄内の活性酸素産生量が増大し、抗酸化酵素 SOD1 の発現上昇を認めた。SOD1 欠損マウスにて廃用性骨萎縮が増悪したことにより、SOD1 は廃用性

骨萎縮に対し防御的に働いていることが明らかとなった。さらにビタミン C 投与によるレスキュー実験において廃用性骨萎縮の抑制が認められた。

## 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 1 件)

Morikawa D, Nojiri H, Saita Y, Kobayashi K, Watanabe K, Ozawa Y, Koike M, Asou Y, Takaku T, Kaneko K, Shimizu T: Cytoplasmic reactive oxygen species and SOD1 regulate bone mass during mechanical unloading. J Bone Miner Res. 28, 2368-80, 2013

[学会発表](計 2 件)

Morikawa D, Saita Y, Nojiri H, Kobayashi K, Watanabe K, Asou Y, Kaneko K, Shimizu T: Analysis of oxidative stress and antioxidant enzymes in mechanical stress response. IOF-ANZBMS, Gold Coast, Australia, Sep 4-8, 2011, 第 29 回日本骨代謝学会 2011 IOF-ANZBMS Travel Award 受賞

森川大智 野尻英俊 斎田良知 小林慶司 渡辺憲史 麻生義則 金子和夫 清水孝彦: メカニカルストレス応答における酸化ストレスと抗酸化酵素の解析. 第 29 回日本骨代謝学会 (2011/7 大坂)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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：  
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

野尻英俊 (Nojiri, Hidetoshi)  
順天堂大学・整形外科・助教  
研究者番号：10317456

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：