

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462360

研究課題名(和文) 骨細胞レニン・アンジオテンシン系をターゲットとした新規骨粗鬆症治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel osteoporosis medication which focusses on the renin angiotensin system in osteocytes

研究代表者

森田 定雄 (Morita, Sadao)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20202426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、骨細胞におけるレニン・アンジオテンシン系(RAS)の機能を解析することを目的として、骨細胞特異的RAS関連遺伝子欠損マウスを作成し検討した。本マウスでは、皮質骨量の有意な増加が認められ、これは、皮質骨における骨芽細胞および破骨細胞活性の亢進が原因であると考えられた。加えて、骨細胞培養系において、RAS関連遺伝子をノックダウンすると、初代骨芽細胞培養との共存培養において、有意にALP活性が増加されることが明らかとなった。この結果から、骨細胞におけるRAS関連遺伝子は、骨芽細胞の代謝を調節することで、骨代謝に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the role of renin angiotensin system in osteocytes by using osteocyte-specific RAS related gene-deficient mice. These conditional knockout mice showed that cortical bone mass is significantly increased. In contrast, trabecular bone mass was not changed. The expression of the osteoblast differentiation markers in the cortical bone in cKO mice is significantly increased. When the primary osteoblasts were co-cultured with RAS related gene knocked-down osteocytes, the osteoblasts activity was significantly increased. These results suggest that RAS related gene in osteocytes regulate indirectly the osteoblast activity and maintain the bone metabolism.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨細胞 レニン・アンジオテンシン系

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、人間のかかる疾患のうち、もっとも頻度が高く、今後、社会の高齢化に伴い、さらに増加が見込まれているが、骨粗鬆症の発症機序については未だ不明な点が多い。成長後の骨の代謝は、主に骨形成を担う骨芽細胞、骨吸収を担う破骨細胞そして骨芽細胞に由来する骨細胞によって調節されている。近年の分子生物学の進歩は、骨芽細胞及び破骨細胞に関する研究を飛躍的に進展させ、骨粗鬆症治療の進歩に多大な貢献をもたらした。

しかしながら一方、骨細胞に関する研究は未だ黎明期にある。骨細胞は骨芽細胞から分化し、骨基質中に埋没した細胞であり、骨組織の中で最も数が多いことが知られている。これまでに重力のメカノセンサー、石灰化の調節、マイクロダメージの感知・修復などの作用を示すことが示唆されているものの、詳細は不明であり、その生理的機能ならびに調節機構に関しては謎に包まれている。骨細胞の機能不全は骨粗鬆症を生じることが知られていることから、骨細胞は骨粗鬆症の病態解明ならびに新規治療方法の開発において新たな標的となると考えられる。

一方、古くからレニン-アンジオテンシン系 (RAS) は血圧調節において重要な役割を果たしていることが知られていたが、近年、RAS に関わる ACE2 が腸内環境の正常化に重要であり腸炎発生の予防に重要であることが明らかとなった (Penninger JM.ら Nature 2012)。このことは、これまで血圧調節にのみ重要であると考えられていた RAS が、全身の臓器で生理機能の維持や病態形成に重要な役割を担っていることを示唆している。疫学的な検討からも、高血圧患者では骨量が減少しており、骨粗鬆症のリスクが高いことが知られているため、RAS は血圧調節以外に、骨局所において骨代謝調節の重要な役割を担っている可能性が推測されてきたが、その詳細な分子機構は不明であった。そこで本研究では、骨組織における RAS の役割を解明するために、RAS 関連遺伝子に着目し、研究を実施した。

2. 研究の目的

本検討では、骨代謝における RAS 関連遺伝子の役割を明らかにするために、特に骨細胞に着目し、骨細胞における役割を解明するとともに、さらには、骨粗鬆症の病態解明ならびに新規治療方法の開発を目的とする。

(1) 骨細胞における RAS 関連遺伝子の生理的意義の解明

(2) 骨細胞における RAS 関連遺伝子の標的遺伝子の同定と生理的意義の解明

(3) 骨細胞における RAS をターゲットとした骨粗鬆症治療薬の開発

3. 研究の方法

(1) 骨細胞特異的 RAS 関連遺伝子欠損マウ

スの解析

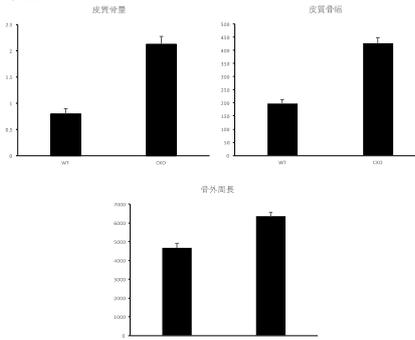
(2) 網羅的遺伝子解析による RAS 関連遺伝子の標的遺伝子の同定

(3) RAS 関連遺伝子における骨細胞制御機構の解明

4. 研究成果

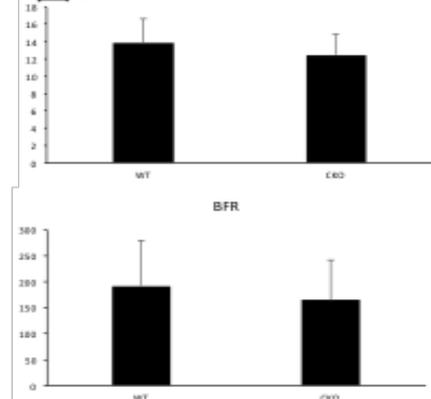
骨細胞特異的 RAS 関連遺伝子欠損マウスを作成しその長管骨を、マイクロ CT を用いて解析したところ、顕著な皮質骨量の増加が認められた (図 1)。

図1



一方、骨形態計測による海綿骨の解析では野生型マウスと差は認められなかった (図 2)。

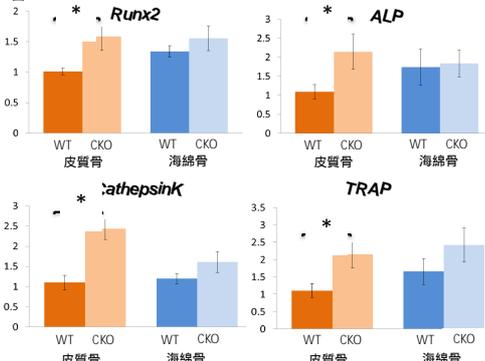
図2



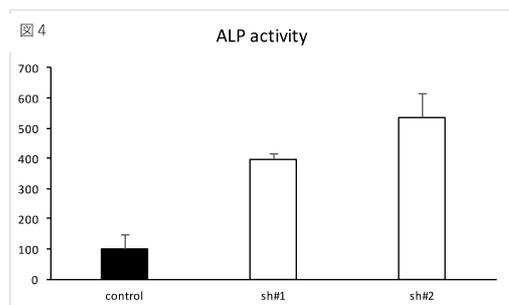
皮質骨から抽出した RNA を用いて、骨形成および骨吸収そして骨細胞マーカー遺伝子の発現を解析した結果、骨細胞特異的 RAS 関連遺伝子欠損マウスでは、野生型と比較して、皮質骨での骨形成ならびに骨吸収マーカーの発現が亢進しており、骨代謝回転が活性化している可能性が示唆された (図 3)。

加えて、骨における Sost の発現が低下していた。

図3



In vitroにおいてRAS関連遺伝子を恒常的にノックダウンした骨細胞株を樹立した。これらの細胞株を用いて骨細胞分化を検討した結果、骨細胞マーカーの発現が低下した。加えて、樹立した骨細胞株と骨芽細胞株を共存培養した結果、骨芽細胞分化が促進された(図4)。



また、骨細胞における Sost 発現のメカニズムを解明するために CRISPR/Cas9 を用いて RAS 関連遺伝子欠損細胞株を作成し、メカニズムを解明した。

また、骨細胞特異的 RAS 関連遺伝子欠損マウスと野生型マウスから RNA を抽出し、骨細胞における RAS 関連遺伝子標的因子を同定するために網羅的遺伝子解析を実施し、詳細を検討した。

以上の結果から、骨細胞における RAS 関連遺伝子は、皮質骨における骨芽細胞ならびに破骨細胞の活性を調節することで骨代謝を調節している可能性が示唆された。今後、骨細胞における標的遺伝子をターゲットとした新たな骨粗鬆症治療薬の開発が期待される。

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 10 件)

1. 平尾昌之・神野哲也・古賀大介・高田亮平・瀬川裕子・星野ちさと・麻生義則・森田定雄・宗田大・大川淳. 人工股関節全置換術におけるトラネキサム酸静脈内投与の効果と凝固線溶系に与える影響 Hip Joint. 2015.41; 804-808 (査読有)
2. 森田定雄・神野哲也・相澤純也・増田正. 磁気センサを用いた動作解析. Journal of Clinical Rehabilitation. 1116-1120, 2014 (査読有)
3. 神野哲也 森田定雄・相澤純也・増田正.

肩関節の回旋角度表示における問題点と解決法の一提案. The Japanese Journal of Rehabilitation Medicine. 574-581, 2014 (査読有)

4. 平尾昌之・神野哲也・古賀大介・森田定雄・大川淳. ステム形状の違いによる THA の周術期凝固線溶系変化の比較. Hip Joint.40 : 979-983, 2014 (査読有)
5. 高田亮平・神野哲也・古賀大介・星野ちさと・森田定雄・大川淳. ステム長の違いがステムの前捻角とアライメントに及ぼす影響. Hip Joint.40 : 616-619, 2014 (査読有)
6. Piao J, Tsuji K, Ochi H, Iwata M, Koga D, Okawa A, Morita S, Takeda S, Asou Y. Sirt6 regulates postnatal growth plate differentiation and proliferation via Ihh signaling. Sci Rep. Oct 23;3:3022, 2013. (査読有)
7. Aizawa J, Masuda T, Hyodo K, Jinno T, Yagishita K, Nakamaru K, Koyama T, Morita S. Ranges of active joint motion for the shoulder, elbow, and wrist in healthy adults. Disabil Rehabil. 2013 Aug; 35(16):1342-9. (査読有)
8. Inoue K, Uematsu M, Maruoka H, hara K, Kanemura N, Masuda T, Morita S. Influence of Lower Limb Muscle Fatigue on Balance Function. Journal of Physical Therapy Science Vol.25 No.3 331-335, 2013. (査読有)
9. 星野ちさと, 古賀大介, 神野哲也, 麻生義則, 小谷野岳, 森田定雄, 宗田大, 大川淳. 術中筋誘発電位モニタリングで大腿神経損傷を認知しえた前方進入 THA の 1 例. Hip Joint 39, 811-815, 2013. (査読有)
10. 小谷野岳, 神野哲也, 古賀大介, 麻生義則, 星野ちさと, 宗田大, 大川淳, 森

田定雄, 松原正明. 両側臼蓋形成不全症例に対し片側のみ寛骨臼回転骨切り術によって介入した例の長期経過. Hip Joint 39, 295-299, 2013. (査読有)

[学会発表](計 17 件)

1. 平尾昌之、神野哲也、木村晶理、高田亮平、麻生義則、森田定雄、宗田大、大川淳. セメントレス人工股関節全置換術後の大腿骨脆弱性骨折の特徴. 日本股関節学会 2015.10.30 グランフロント大阪、大阪府大阪市
2. 山内裕樹、神野哲也、古賀大介、高田亮平、平尾昌之、麻生義則、森田定雄、宗田大、大川淳. Metal-on-Metal 摺動面 THA 術後経過についての検討. 日本人工関節学会 2015.02.27 福岡国際会議場、福岡県福岡市
3. 古賀大介、神野哲也、麻生義則、高田亮平、平尾昌之、森田定雄、宗田大、大川淳. 筋誘発電位モニタリング併用人工股関節全置換術におけるアラートポイントの検討. 日本人工関節学会 2015.02.27 福岡国際会議場、福岡県福岡市
4. 平尾昌之、神野哲也、古賀大介、高田亮平、瀬川裕子、星野ちさと、麻生義則、森田定雄、宗田大、大川淳. 両側人工股関節全置換術におけるトラネキサム酸静脈内投与の効果と凝固線溶系マーカーに与える影響. 日本人工関節学会 2015.02.27 福岡国際会議場、福岡県福岡市
5. Ryohei Takada, Tetsuya Jinno, Daisuke Koga, Masanobu Hirao, Chisato Hoshino, Yoshinori Asou, Sadao Morita, Takeshi Muneta, Atsushi Okawa. Risk Factors related to dislocation after primary total hip arthro-plasty. 15th European Federation of National

Associations of Orthopaedics and Traumatology (EFFORT) Congress. 2014 Jun. 4. London, UK.

6. 星野ちさと、神野哲也、古賀大介、大川淳、森田定雄. 初回人工股関節全置換術における退院後早期の ADL. 第 51 回日本リハビリテーション医学会学術集会. 2014.06.05 名古屋国際会議場、愛知県名古屋市
7. 星野ちさと、神野哲也、古賀大介、大川淳、森田定雄. 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. 第 51 回日本リハビリテーション医学会学術集会. 2014.06.05 名古屋国際会議場、愛知県名古屋市
8. 高田亮平、神野哲也、古賀大介、平尾昌之、星野ちさと、麻生義則、森田定雄、宗田大、大川淳. 初回人工股関節全置換術における術後脱臼因子の解析と検討. 第 87 回日本整形外科学学術総会 2014/05/22-25 神戸ポートピアホテル、兵庫県神戸市
9. 神野哲也、古賀大介、宮武和正、高田亮平、平尾昌之、麻生義則、森田定雄、星野ちさと、宗田大、大川淳. 青壮年期股関節疾患における手術法選択. 第 40 回日本股関節学会学術集会, 平成 25 年 11 月 29-30 日, 広島国際会議場、広島県広島市.
10. 古賀大介、神野哲也、麻生義則、高田亮平、平尾昌之、森田定雄、宗田大、大川淳. Wedge taper stem を用いた人工股関節置換術における術後早期のステム周囲放射線透過像の変化. 第 40 回日本股関節学会学術集会, 平成 25 年 11 月 29-30 日, 広島国際会議場、広島県広島市.
11. 高田亮平、神野哲也、古賀大介、宮武和正、星野ちさと、平尾昌之、麻生義則、森田定雄、宗田大、大川淳. ステム長の違いがステム前捻角とアライメントに

- 及ぼす影響。第 40 回日本股関節学会学術集会，平成 25 年 11 月 29-30 日，広島国際会議場、広島県広島市。
12. 平尾昌之，神野哲也，古賀大介，宮武和正，高田亮平，麻生義則，森田定雄，宗田大，大川淳。ステム形状の違いによる T H A 周術期凝固線溶系の比較。第 40 回日本股関節学会学術集会，平成 25 年 11 月 29-30 日，広島国際会議場、広島県広島市。
13. 山内祐樹，神野哲也，古賀大介，平尾昌之，高田亮平，谷口直史，麻生義則，森田定雄，宗田大，大川淳。Tapered wedge ステムと大径骨頭 metal-on-metal 摺動面使用人工股関節置換術後早期に再置換を要した一例。平成 25 年 11 月 29-30 日，広島国際会議場、広島県広島市。
14. Kokubun T, Kanemura N, Maejima H, Morita S, Takayanagi K. Biochemical Changes that affect immature patella tendon and Fat Pad after eccentric contraction. WCPT-AWP & ACPT Congress 2013, September 5-9, 2013, Taichung, Taiwan.
15. T. Kokubun, N. Kanemura, Y. Nishikawa, H. Maejima, S. Morita, K. Takayanagi. Early protective joint motion with anterior cruciate ligament complete rupture leads to natural healing. 7th World Congress of ISPRM 2013, June 16-20, 2013, Beijing, China.
16. 国分 貴徳，金村 尚彦，藤野 努，前島 洋，森田定雄，高柳 清美。ラット膝前十字靭帯の治癒過程における Collagen type1・3mRNA の発現動態。第 48 回日本理学療法学会学術大会，2013.5.24 ~ 26，名古屋国際会議場、愛知県名古屋市
17. Kokubun T, Kanemura N, Maejima H, Morita S, Takayanagi K. Early

protective joint motion influences gene expression in a rat model of anterior cruciate complete rupture. Experimental Biology. April 20-24, 2013. Boston MA United States.

〔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)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：20202426

(2) 研究分担者

麻生義則 (ASOU, Yoshinori)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：50345279

(3) 連携研究者

()

研究者番号：