

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19599018
 研究課題名（和文） 骨粗鬆症モデル動物におけるシスタチンCの骨形成促進効果の解析
 研究課題名（英文） Examination for the effects of Cystatin C on bone formation
 In osteoporotic mice
 研究代表者
 檀上 敦 (DANJO ATSUSHI)
 佐賀大学・医学部・助教
 研究者番号：80452712

研究成果の概要：近年、骨粗鬆症の治療薬の一部で顎骨壊死などの副作用が起きることが知られてきている。そこで、新たな骨粗鬆症薬の開発を目指して、シスタチンCに着目した。シスタチンCは体内に存在するタンパクで骨芽細胞を促進し、破骨細胞を抑制する。骨粗鬆症モデル動物を用いて、シスタチンCを経口投与する実験を行い、シスタチンCが骨量減少を抑制することがわかった。このことは、シスタチンCが新たな骨粗鬆症薬の可能性を持つことを示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：シスタチンC、骨粗鬆症、骨髄間葉系細胞

1. 研究開始当初の背景

骨は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスで維持されている。加齢に伴いそのバランスは崩れ、骨量は低下する。その原因は、エストロゲンの欠乏による破骨細胞機能の抑制の解除、骨芽細胞の増殖と分化の亢進がおこることで骨リモデリングのバランスがくずれるためであると言われている。エストロゲンはまたIFN、IL-1、IL-6等のサイトカインを制

御することが知られている。エストロゲンが欠如することによりIL-6の抑制が失われ、IL-6の上昇、続いて破骨細胞数の増加が引き起こされることが報告されている（Jilka RLら、1992）。

ヒトシスタチンCは、分子質量13.359Daの一本鎖のポリペプチドで、システインプロテアーゼインヒビター的一种である。シスタチンCは、唾液や乳汁、尿、脳脊髄液に多く分布しており、生体内でのシステイ

ンプロテアーゼの活性を調節することで知られている。環境変化に影響を受けず、血中濃度が一定であり、糸球体濾過率の指標として活用されつつあるタンパクである。また、ES細胞が神経幹細胞へと分化するのをシスタチンCが促進することや、海馬の細胞の増殖因子として働くとの報告もされ、再生療法を目指した研究においても有望な分子として着目されつつある。

骨に対するシスタチンCの研究は少なく、シスタチンCが破骨細胞の骨吸収能を抑制する(Lernerら、1992, 1997)ことや、破骨細胞の分化を抑制する(Brageら、2004, 2005)、骨芽細胞MC3T3-E1細胞において培養中期と後期でシスタチンCのmRNAが上昇すること(Raoufら、2002)が報告されてきた。しかし、骨芽細胞における、シスタチンCの分化や骨形成促進効果についての報告は全くなかった。そこでわれわれは、*in vitro*実験においてシスタチンC添加マウス骨芽細胞において、非添加群にくらべ分化が促進するだけでなく、石灰化能が飛躍的に向上することを証明した(Danjo A., 2007)。これらのことから、シスタチンCは骨吸収、破骨細胞分化を抑制し、骨芽細胞に対しては石灰化および分化を促進する因子であることがわかってきた。また、ごく最近になって樹状細胞においてIL-6-STAT3経路を刺激するとシスタチンCが抑制され、シスタチンCを過剰発現するとIL6-STAT3経路の効果が減弱することが報告された(北村ら、2005)。以上のことから、我々は、IL-6-STAT3経路が亢進していると考えられる骨粗鬆症モデル動物にシスタチンCを補充することでIL-6の効果を減弱させ、骨粗鬆症の進行を抑制できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

今回の研究では以下の目的を設定した。

実験1：シスタチンCを*in vivo*投与し、骨粗鬆症モデルマウスの骨組織に及ぼす影響を解析する。

実験2：*in vitro*でのIL-6刺激した骨芽細胞、破骨細胞におけるシスタチンCの発現変化の解析

3. 研究の方法

実験1：

CystatinCを飲料水に混ぜて投与し、その骨形成促進効果を確認する。

6週齢雌性C57BL6/Jマウスを以下の4群に分ける

対照群：shamOP後通常の飲料水を投与

対照 CysC群：shamOP後シスタチンC含有飲料水を投与

骨粗鬆症モデルOVX群：OVX(卵巣摘出術)後通常の飲料水を投与

骨粗鬆症モデルOVX CysC群：OVX後シスタチンC含有飲料水を投与

実験開始後28日後に以下の解析を行った。

血清学的検査：

血中osteocalcin濃度(ELISA)

組織学的評価：

マウスを4%パラフォルムで還流固定。5% EDTAで脱灰後、HE染色を行った。))

X線の評価：

マウスを70%エタノールで固定。軟X線撮影にて評価した。

遺伝子的評価：

マウスの脛骨、大腿骨から液体窒素下にtotal RNAを取り出す。

RT反応の後、osteocalcin遺伝子をRT-PCRで比較した。

実験2：

C3H/HeJマウスから骨髓細胞を採取し、*in vitro*でIL-6刺激を行い、以下の解析を行った。

ALP染色、石灰化能の比較

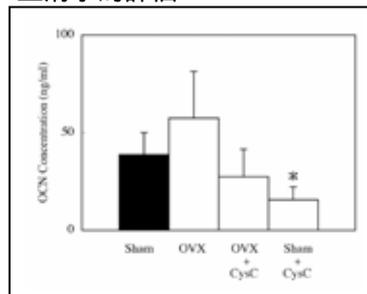
骨髓細胞から破骨細胞への分化、*dentin slice*上での吸収能の比較

RT-PCRによるシスタチンCの発現量比較

4. 研究成果

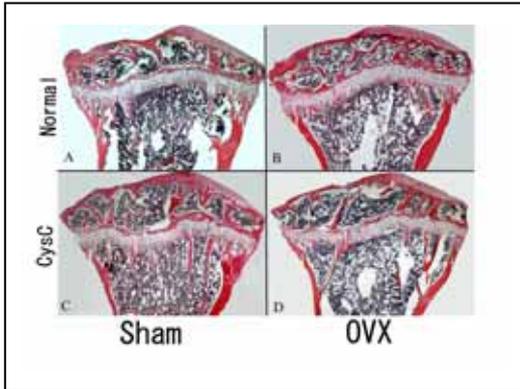
実験1

血清学的評価



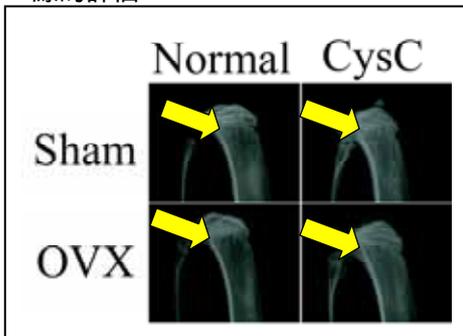
血中オステオカルシンの濃度：OVX を行うと、血中のオステオカルシンの濃度が下がる傾向にあった。シスタチンCを投与すると、血中のオステオカルシン濃度が下がる傾向にあった。このことは卵巣摘出によって高回転型骨粗鬆症を呈している時期のマウスにおいても、シスタチンCを投与することで骨粗鬆症を予防できる可能性を示唆している。

組織学的検査



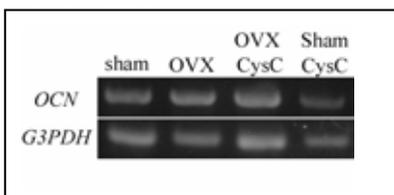
HE染色像：OVXマウスにおいて、シスタチンC投与群の方がより多くの骨量を維持していることがわかった。また、骨粗鬆症でないコントロールマウスにおいても、シスタチンC投与群の方が軽度骨量が増しているような傾向であった。

X線の評価



各実験条件でのマウス鼠蹠骨のX線写真：X線写真でも、組織やRT-PCRの結果と同様に、シスタチンC投与群の方が骨密度が高い傾向にあった。

遺伝子的評価



RT-PCRによる骨組織中のosteocalcinの比較：骨粗鬆症モデルマウス（OVX）にシスタ

チンC (CysC)を内服させると、オステオカルシンの発現強度が軽度上昇することがわかった。このことはシスタチンCの添加によって骨芽細胞の分化が促進されている事を示唆していると思われる。

実験2

マウス初代細胞を用いて骨芽細胞にIL-6を添加して石灰化誘導実験を行うと、石灰化が促進された。しかしながらシスタチンCの発現量の変化は明らかでなかった。

また、同様に破骨細胞の分化誘導実験において、IL-6を添加すると、破骨細胞の分化は促進された。この時のシスタチンCの発現量の変化も明らかでなかった。

まとめ

以上のように、シスタチンCが骨粗鬆症モデルマウスにおいて、その骨吸収を抑制できることがわかった。今回はIL-6との関連を評価することを試みたが、結論を出すには至らなかった。今後さらに研究をすすめ、シスタチンCの骨形成促進機能のメカニズムの解明を進めたいと考えている。

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0件)

〔学会発表〕(計4件)

1. Danjo A., Yamashita Y., Shigematsu M., Noguchi N. and Goto M.: Cystatin C stimulates bone formation. Bangkok, Thailand 3rd, Nov, 2008
2. 檀上敦、山座孝義、城戸瑞穂、下平大治、田中輝男：シスタチンCは骨髄由来間葉系幹細胞の骨への分化を促進する 第5回日本再生歯科医学会 東京 2007年9月22日
3. 檀上敦、山座孝義、下平大治、西嶋克司、城戸瑞穂、田中輝男：シスタチンCのマウス骨髄間葉系細胞における骨形成促進効果 第49回歯科基礎医学会 札幌 2007年8月30日
4. 檀上敦、山下佳雄、下平大治、井原功一郎、後藤昌昭：シスタチンCによる麻売骨芽細胞および頭蓋冠器官培養における石灰化組織形成の促進 第61回日本口腔科学会 神戸 2007年4月20日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

産業財産権の種類：特許権

発明者：城戸瑞穂、渡邊敏之、檀上敦、田中輝男、上辻大輔、小野愛子、芹沢敦

権利者：国立大学法人 九州大学
雪印乳業株式会社

産業財産権の種類：特許願い

番号：000006699

出願年月日：2008 年 11 月 17 日

国際特許分類：A61K 38/16

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

檀上 敦(DANJO ATSUSHI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：80452712

(2)研究分担者

城戸瑞穂(KIDO MIZUHO)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：60253457

渡邊 敏之(WATANABE TOSHIYUKI)

九州大学・歯学研究院・学術研究員

研究者番号：70367522

西嶋克司(NISHIJIMA KATSUSHI)

九州大学・歯学研究院・准助教

研究者番号：00136508

田中輝男(TANAKA TERUO)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：60077667

(3)連携研究者

なし