

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月27日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791416

研究課題名（和文）老人性骨粗鬆症モデルマウスの作製と解析

研究課題名（英文）The development and analyses of the mouse model of age-related osteoporosis.

## 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

## 研究成果の概要（和文）：

酸化ストレスと老人性骨粗鬆症の関係を明らかにするため、活性酸素を除去する酵素の一つ（SOD1）を発現出来ない遺伝子改変マウスを解析したところ、老人性骨粗鬆症に類似した低骨代謝回転型の骨粗鬆症を呈する事が明らかとなった。さらにこのマウスに抗酸化作用を有するビタミンCを投与すると骨量減少が抑制できた。これらより、老人性骨粗鬆症のメカニズムの解明と治療法の確立に貢献できると考えている。

## 研究成果の概要（英文）：

We revealed that the relationships between oxidative stress and age-related osteoporosis by analyzing the bone tissue of superoxide dismutase 1 (SOD1) -deficient mouse. This mouse showed low turnover bone remodeling osteoporosis similar to that of age-related osteoporosis and that was rescued by oral administration of vitamin C. These results may help us to know the unknown mechanisms and establishment of the treatment strategy for age-related osteoporosis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：骨代謝

科研費の分科・細目：外科計臨床医学・整形外科学

キーワード：老化、骨粗鬆症、酸化ストレス、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは老化とともに増加するが、酸化ストレスと骨粗鬆症の関係は不明な点が多い。加齢に伴う骨量低下の一因が、酸化ストレスの増加にあるのではないかと予測されるが、その全容は明らかにされていない。

酸化ストレスを処理する酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ 1 (SOD1) の欠損マウスは、マウス生体において、活性酸素が若齢から蓄積し、種々の組織に退行性の変化をもたらすため、老化のモデルマウスと考えられている。しかし、このマウスが骨粗鬆症を来すかどうかは不明であった。

また、閉経後骨粗鬆症は卵巣摘出によりマウスでの疾患モデルによる解析が可能であるのに対し老人性骨粗鬆症のモデルは存在しない。

## 2. 研究の目的

酸化ストレスと骨量維持機構の関係を明らかにする(骨での酸化ストレスの増加が骨量減少を引き起こすかを検討する)。

加齢に伴う骨量減少の一因として酸化ストレスの増加が関与することを明らかにし、骨粗鬆症が抗酸化剤の投与により改善するかを検討する事。

## 3. 研究の方法

遺伝子改変マウス(SOD1 欠損マウス)を用いた骨形態計測を行い、このマウスで骨粗鬆症が認められるか否かを確認する。

SOD1 欠損マウスでの骨代謝動態を解析し、骨形成・骨吸収活性を評価する。

SOD1 欠損マウスの骨組織において、酸化ストレスが増加しているかを確認する。

SOD1 欠損マウスに抗酸化剤を投与し、骨粗鬆症が改善されるかどうか、及び骨組織での酸化ストレスの増加が改善されるかを解析する。

SOD1 欠損マウス由来細胞を用いて、骨芽細胞・破骨細胞の増殖・分化・生存活性を評価する。

SOD1 欠損マウス由来細胞を用いて、細胞での酸化ストレスの増加が認められるかを確認する。

SOD1 欠損マウス由来細胞に抗酸化剤を添加し細胞増殖・分化・生存活性を評価する。

## 4. 研究成果

SOD1 欠損マウスでは、骨での酸化ストレスが増加しており、骨密度が減少していた。骨量の減少は、全身・長管骨・椎体すべてに認められた。また、マイクロ CT を用いた解析

では、SOD1 欠損マウスでは海綿骨及び皮質骨の両者が減少していた。

SOD1 欠損マウスの骨密度解析では、野生型と比較し若年で骨量のピークに至ることが明らかになった。

骨代謝動態の解析では、SOD1 欠損マウスでは骨形成率(BFR)が著明に低下しており、骨形成が抑制されていた。骨芽細胞数も激減していた。また、破骨細胞数の減少も同時に見られ、骨吸収活性も同時に低下していることが明らかになった。これらから、SOD1 欠損マウスでは低骨代謝回転による骨量減少が認められることが明らかとなった。

SOD1 欠損マウスの骨髄では、活性酸素種(ROS)の上昇がみられ、酸化ストレスが増加していることが明らかになった。

さらに、SOD1 欠損マウスに抗酸化作用を有するビタミンCを投与すると、この骨量減少をほぼ完全に抑制できることが明らかになった。

図 1  
SOD1 欠損マウスと野生型マウスにおける骨密度の変化(左)と大腿骨マイクロ CT(右)

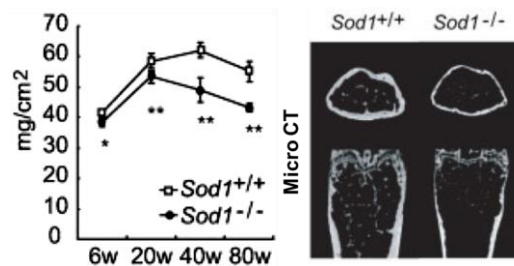
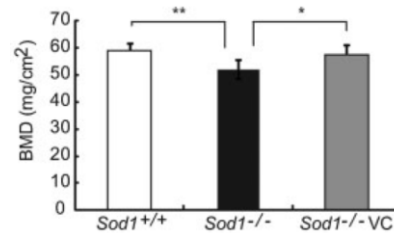


図 2  
SOD1 欠損マウスへのビタミン C (VC) 投与による骨密度減少の抑制



細胞レベルでは、SOD1 欠損マウス由来骨芽細胞では細胞増殖能が著しく低下し、アポトーシスの亢進も認められた。このため、SOD1 欠損骨芽細胞は 2 週間以上の細胞培養が困難で、石灰化の誘導が不可能であった。これらより、SOD1 欠損マウスでの骨芽細胞の減少は細胞増殖・生存が低下するためと考えられた。

図 3

SOD1 欠損マウス由来骨芽細胞の培養 (右)

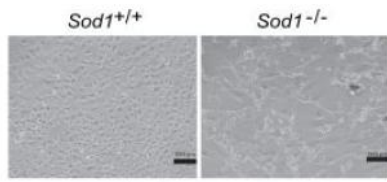
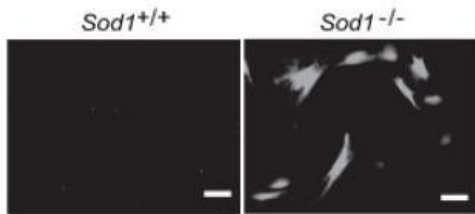


図 4 SOD1 欠損マウスでの酸化ストレスの増加 (蛍光色素で標識)



次に、SOD1 欠損状態での破骨細胞の増殖・分化・生存を評価した。しかし、骨芽細胞での結果とは反対に、破骨細胞は正常に分化し、生存能も低下せず、酸化ストレスの増加も認められなかった。

そのため、次に SOD1 欠損マウスでの破骨細胞の減少の原因が、骨芽細胞による破骨細胞分化支持能の低下であるか否かを解析した。すると、SOD1 欠損マウス由来骨芽細胞は、破骨細胞分化支持機能が著しく低下し、破骨細胞分化に必要な RANKL の発現も低下していた。

図 5 SOD1 欠損マウスでの破骨細胞分化 (RANKL と M-CSF を加えて分化誘導。SOD1 欠損でも正常に分化)

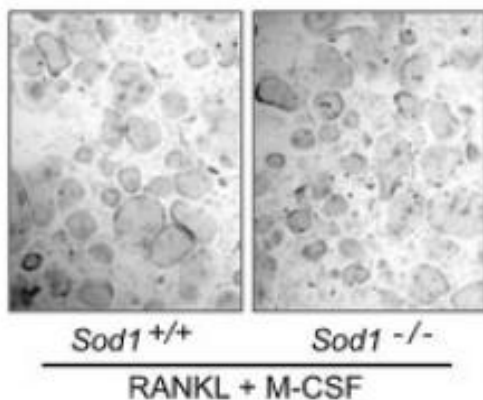
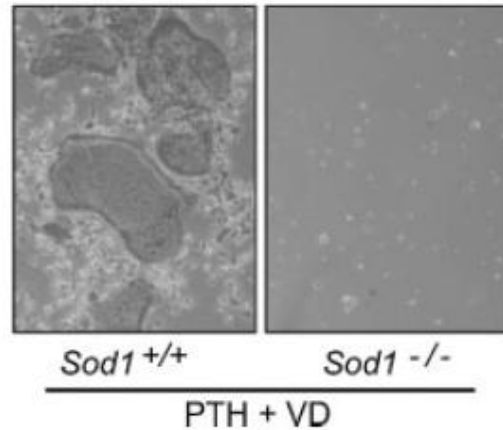


図 6 SOD1 欠損骨芽細胞による破骨細胞分化支持機構の破綻 (骨芽細胞との共培養で PTH とビタミン D を加えて分化誘導)



以上から、SOD1 欠損状態での低骨代謝回転型骨粗鬆症の原因は、酸化ストレスの増加による骨芽細胞増殖・生存能の低下により骨芽細胞性の骨形成活性が低下し、それにより二次的に生じる骨芽細胞の破骨細胞分化支持機構の破綻により破骨細胞数が減少し骨吸収活性が低下し、骨吸収の低下に比し骨形成能の低下がより著しいため骨量の減少を呈すると考えられた。

### 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)

Nojiri, Saita et al  
 Cytoplasmic superoxide causes bone fragility owing to low-turnover osteoporosis and impaired collagen cross-linking  
 Journal of Bone and Mineral Research, November 2011 Volume 26, Issue 11 2682-2694 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

#### 1. 野尻英俊

スーパーオキシドディスムターゼ 1 (SOD1) 欠損は低代謝回転型骨量減少と加齢性コラーゲン架橋変化を引き起こし骨脆弱化する  
 日本骨代謝学会学術集会  
 2011 年 7 月 新大阪

2. 森川大智  
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  
日本骨代謝学会学術集会  
2011年7月 新大阪

3. 齋田良知  
スーパーオキシドディスムターゼ 1(SOD1)による骨代謝制御機構の解析  
日本整形外科学会基礎学術集会  
2011年10月 前橋

4. 森川大智  
廃用性骨萎縮における活性酸素産生と抗酸化酵素 SOD1 の役割(会議録)  
日本骨整形外科学会基礎学術集会  
2011年10月 前橋

5. Hidetoshi Nojiri  
Vitamin C Administration Markedly Ameliorates Bone Loss by Restoring the Osteoblastic Viability in Sod1-Deficient Mice  
第33回アメリカ骨代謝学会  
2011年9月18日 アメリカ・サンディエゴ

6. Keiji Kobayashi  
Mitochondrial Superoxide Dismutase Regulates Proliferation and Differentiation of Osteoblasts  
第33回アメリカ骨代謝学会2011年9月17日  
アメリカ・サンディエゴ

7. Daichi Morikawa  
The Role of Oxidative Stress and Antioxidant Enzymes in Bone Under Mechanical Unloading  
第33回アメリカ骨代謝学会2011年9月16日  
アメリカ・サンディエゴ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋田 良知 (SAITA YOSITOMO)  
順天堂大学 医学部 助教  
研究者番号：00534885

### (2) 研究分担者

野尻 英俊 (NOJIRI HIDETOSHI)  
順天堂大学 医学部 助教  
研究者番号：10317456

### (3) 連携研究者

清水 孝彦 (SHIMIZU TAKAHIKO)  
千葉大学 大学院医学研究科 准教授  
研究者番号：40301791