

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689004

研究課題名(和文) アミノ酸シグナルによる骨代謝調節機構

研究課題名(英文) The regulation of bone metabolism by amino acid

研究代表者

檜井 栄一 (Hinoi, Eiichi)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：70360865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,000,000円、(間接経費) 6,300,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸は、細胞機能調節因子(シグナル伝達分子)として能動的に働くことが近年注目されている。本研究では、システムA型中性アミノ酸トランスポーターであるSlc38a1の骨関連細胞(骨芽細胞と破骨細胞)特異的遺伝子欠損マウス(KOマウス)を作製し、骨表現型解析を行った。その結果、どちらの細胞特異的KOマウスにおいても、野生型マウスと比較して、骨量、骨形成・骨吸収パラメーターに著明な変化は認められなかった。また、骨芽細胞特異的KOマウスを用いて卵巣摘出による閉経後骨粗鬆症モデルを作成した。その結果、野生型マウスおよび骨芽細胞特異的KOマウスのどちらも同程度の骨量低下が認められた。

研究成果の概要(英文)：Although amino acid transporters are indispensable for a variety of cellular events in eukaryotic cells, little attention has been paid to their functional role in bone modeling and remodeling so far. Here, we have attempted to demonstrate the possible involvement of a system A amino acid transporter Slc38a1 in the regulation of osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in vivo. To that end, cell-specific (osteoblast and osteoclast) knockout mice were generated. In vertebrae of those knockout mice, no marked change was seen in bone volume over tissue volume, osteoblastic parameter and osteoclastic parameter compared with wild-type (WT) mice by bone histomorphometric analyses. Moreover, ovariectomy resulted in a marked reduction of vertebrae bone volume in both WT mice and osteoblast-specific Slc38a1 knockout mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：骨代謝 骨芽細胞 破骨細胞 遺伝子欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

栄養素のひとつであるアミノ酸は、体を構成する材料としてあるいはエネルギー源として受動的に働くだけでなく、細胞機能調節因子(シグナル伝達分子)として能動的に働くことが近年注目されている。そのアミノ酸シグナルは、アミノ酸トランスポーターを介したアミノ酸の細胞内流入に始まり、mechanistic/mammalian target of rapamycin (mTOR)へとシグナルが統合される。我々は、細胞機能調節因子としてのアミノ酸による骨組織構成細胞(骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞)の分化調節機構の解明を行ってきた経緯があるが、そのなかで、酸性アミノ酸のひとつであるグルタミン酸が骨形成を担う骨芽細胞の分化・成熟化に必須であることを見出した。さらに、骨吸収を担う破骨細胞の分化・成熟化においても、アミノ酸トランスポーターのひとつであるシスチン・グルタミン酸アンチポーター(Scl7a11)が重要であることを報告してきた。さらに我々は、閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出(OVX)を施したマウスの骨髄から破骨前駆細胞を単離し、その遺伝子発現を Sham マウスと比較した。その結果、OVX マウスの破骨前駆細胞において、システム A 型中性アミノ酸トランスポーターである Slc38a1 の発現が特異的に増加していることを明らかとした。これらの事実は、生理学的条件下においてシステム A 型中性アミノ酸トランスポーターが骨関連細胞の分化・機能調節に重要な役割を果たしているだけでなく、病態生理学的条件下においても同トランスポーターの機能変動が病態発現に関与することを示す結果である。

一方、現在日本における骨粗鬆症患者は1,100万人を超えると推定されており、骨粗鬆症に起因する骨折は寝たきりにつながる可能性もあり、同疾患は患者の quality of life を大きく低下させ、超高齢化社会を迎えた我が国において医療費高騰の大きな原因の一つにもなっている。このような事実を勘案すると、同疾患に対する効果的な治療法の確立および治療薬の開発は社会的緊急課題である。

2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」に基づき、本研究では骨芽細胞と破骨細胞に発現するアミノ酸トランスポーターに焦点をあて、アミノ酸シグナルによる骨代謝調節メカニズムの解明を行い、アミノ酸トランスポーターを分子標的とした骨粗鬆症に対する新規治療薬開発を展開するための研究基盤を確立することを目的とする。具体的には、遺伝子改変マウスを用いた遺伝学的な解析により、システム A 型中性アミノ酸トランスポーターと骨代謝性疾患の病態発現との関連性につい

て解析することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、Slc38a1flox マウスを Cd11b-Cre マウス(破骨前駆細胞特異的 Cre マウス)あるいは $\alpha 1(I)$ collagen-Cre マウス(骨芽細胞特異的 Cre マウス)と交配し、各細胞特異的遺伝子欠損マウスを作製した。Slc38a1flox マウスは当研究室で作製した。Cd11b-Cre マウスは Dr. Jean vacher (Institut de Recherches Cliniques de Montréal)から、また、 $\alpha 1(I)$ collagen-Cre マウスは Dr. Gerard Karsenty (Columbia University)より提供された。3か月齢のマウスから摘出した脊椎から非脱灰薄切標本作製し、骨形態計測を行った(骨量測定、骨形成・骨吸収に関するパラメーターの測定)。また、8週齢の骨芽細胞特異的遺伝子改変マウスおよび野生型マウスの卵巣の摘出を行い、閉経後骨粗鬆症モデルを作製した。そして術後4週間目に各マウスから脊椎と長骨を摘出し、非脱灰薄切標本作製後、骨形態計測を行った。

4. 研究成果

(1) Slc38a1flox マウスと Cd11b-Cre マウスを用いて、破骨前駆細胞特異的 Slc38a1 ノックアウトマウスの作製とその解析を行った。その結果、破骨前駆細胞特異的 Slc38a1 ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して、長骨および脊椎において、骨量の著明な変動は認められなかった。さらに、非脱灰薄切標本を用いて、骨形成(骨芽細胞数および骨形成速度)、骨吸収(破骨細胞数および破骨細胞表面)に関するパラメーターの測定を行った結果、ノックアウトマウスと野生型マウスにおいて、両パラメーターともに著明な変化は認められなかった。

(2) Slc38a1flox マウスと $\alpha 1(I)$ collagen-Cre マウスを用いて、骨芽細胞特異的 Slc38a1 ノックアウトマウスの作製とその解析を行った。その結果、骨芽細胞特異的 Slc38a1 ノックアウトマウスでは、破骨前駆細胞特異的ノックアウトマウスと同様に、野生型マウスと比較して、長骨および脊椎において、骨量の著明な変動は認められなかった。さらに、骨形成および骨吸収に関するパラメーターの測定を行った結果、ノックアウトマウスと野生型マウスにおいて、両パラメーターともに著明な変化は認められなかった。

(3) 骨芽細胞特異的 Slc38a1 ノックアウトマウスを用いて、卵巣摘出による閉経後骨粗鬆症モデルを作成し、骨量の測定および骨形成、

骨吸収に関するパラメーターの測定を行った。野生型マウスを用いて閉経後骨粗鬆症モデルを作成した場合、骨量の低下と破骨細胞の活性化が認められたが、骨芽細胞特異的 Slc38a1 ノックアウトマウスを用いた場合においても野生型マウスと同程度の骨量低下と破骨細胞活性化が認められた。

(4) 以上の結果により、システム A 型中性アミノ酸トランスポーターである Slc38a1 の細胞特異的 (骨芽細胞および破骨細胞) 遺伝子欠損マウスは、生理学的条件下および病態生理学的条件下では、著明な骨表現型を示さないことが明らかとなった。アミノ酸トランスポーターと疾患との関連性については、中枢神経系疾患など、これまでいくつか報告されているが、中性アミノ酸を基質とするアミノ酸トランスポーターと疾患との関連性についてはこれまでほとんど報告がない。今回 Slc38a1 遺伝子欠損マウスは我々が調べる限り骨表現型を示さなかったが、同じ性質をもつトランスポーターによるリダンダンシーが関与する可能性も考えらえる。中性アミノ酸を輸送するトランスポーターはシステム A 型以外にもあるため、今後はそれらのアミノ酸トランスポーターについても骨代謝への影響を検討し、アミノ酸トランスポーターによる骨代謝調節機構を明らかとしていく必要がある。

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5件)

Takarada, T., Hinoi, E., Nakazato, R., Ochi, H., Xu, C., Tsuchikane, A., Takeda, S., Karsenty, G., Abe, T., Kiyonari, H. and Yoneda, Y. An analysis of skeletal development in osteoblast- and chondrocyte-specific Runx2 knockout mice. *J. Bone Miner. Res.* 28:2064-9, 2013. (査読有)

doi: 10.1002/jbmr.1945.

Le, N.Q., Binh, N.T., Takarada, T., Takarada-Iemata, M., Hinoi, E. and Yoneda, Y. Negative correlation between Per1 and Sox6 expression during chondrogenic differentiation in pre-chondrocytic ATDC5 cells. *J. Pharmacol. Sci.* 122:318-25, 2013. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23883486>

Hinoi, E., Nakatani, E., Yamamoto, T., Iezaki, T., Takahata, Y., Fujita, H., Ishiura, R., Takamori, M. and Yoneda, Y. The transcription factor paired box-5 promotes osteoblastogenesis

through direct induction of Osterix and Osteocalcin. *J. Bone Miner. Res.* 27:2526-34, 2012. (査読有)

doi: 10.1002/jbmr.1708.

Hinoi, E., Ochi, H., Takarada, T., Nakatani, E., Iezaki, T., Nakajima, H., Fujita, H., Takahata, Y., Hidano, S., Kobayashi, T., Takeda, S. and Yoneda, Y. Positive regulation of osteoclastic differentiation by growth differentiation factor-15 up-regulated in osteocytic cells under hypoxia. *J. Bone Miner. Res.* 27:938-49, 2012. (査読有)

doi: 10.1002/jbmr.1538.

Hinoi, E. and Yoneda, Y. Possible involvement of glutamatergic signaling machineries in pathophysiology of rheumatoid arthritis. *J. Pharmacol. Sci.* 116:248-56, 2011. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21666346>

[学会発表](計3件)

檜井栄一, Growth differentiation factor-15 を介した骨細胞による破骨細胞活性化調節、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本市水道町鶴屋 7F カーネーションサロン (熊本県)

檜井栄一, 低酸素誘導性骨細胞由来因子 GDF15 による破骨細胞機能調節機構、第 15 回骨発生・再生研究会、2012 年 11 月 10 日、慶応大学 (東京都)

檜井栄一, 骨格系細胞群のシグナル応答性解明研究、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、京都国際会議場 (京都府)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況 (計1件)

名称: 破骨細胞が関与する疾患の予防剤及び/又は治療剤

発明者: 米田幸雄、檜井栄一、山本朋未、家崎高志、石浦遼

権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-238455 号

出願年月日: 2011 年 10 月 31 日

国内外の別: 国内

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
<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~yakubutu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜井 栄一 (HINOI Eiichi)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号：70360865

(2) 研究分担者

なし
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし
研究者番号：