

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792526

研究課題名（和文） 加齢モデルマウスにおけるレドックス制御と骨吸収のシグナル分子伝達機構の解析

研究課題名（英文） Identification of signaling mechanism of bone resorption and redox control in the aging mouse model

研究代表者 小俣 和彦（OMATA KAZUHIKO）  
日本歯科大学・生命歯学部・非常勤講師

研究者番号：00434142

研究成果の概要（和文）：本研究では、加齢による酸化—抗酸化バランスの変化が骨代謝に与える影響を、自然加齢マウス由来細胞を用いてその分子機構について解析を行った。破骨細胞形成能の解析から、加齢に伴う破骨細胞形成能の低下が見られ、その過程に redox 関連分子が関与し細胞機能の調節を行っている可能性が示唆された。加齢による骨代謝機能の低下には、酸化—抗酸化バランスの崩壊がみられ、その制御に redox 関連分子 txnip の発現上昇が破骨細胞の分化能を抑制することで骨代謝に対し負の影響を及ぼしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the molecular mechanism of bone metabolism due to aging changes, using the aging mouse-derived cells. We found that increased expression of redox-related molecules txnip decrease differentiation of osteoclast activity in vitro. The reduction of bone metabolic function due to aging, txnip may regulate osteoclast genesis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：redox 骨代謝 加齢

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは老化や加齢性疾患、生活習慣病の発症原因の一つであると考えられるようになってきた。酸化ストレスのおもな原因となるのはReactive oxygen (ROS)やreactive nitrogen(RNS)などのフリーラジカルであり、通常フリーラジカルは生体が持つ抗酸化作用、すなわちRedox（酸化還元）制御機構により消

去され、生体内にフリーラジカルが蓄積するのを抑制している。しかし加齢とともに生体内の抗酸化能は低下するため、高齢者は酸化ストレスの影響を受けやすくなり、老化が進行して様々な疾患を発症しやすくなる。また、酸化ストレスに対する生体の防御機構として、活性酸素のスカベンジャーであるスーパーオ

キシドジスムターゼ (SOD) が知られている。骨粗鬆症や加齢性骨吸収における骨量低下・骨破壊の進展においては、骨吸収を直接担う唯一の細胞と考えられている破骨細胞が重要な役割を果たしている。これまでの報告から、酸化ストレスは破骨細胞の形成に促進的に作用することが報告され、加齢による骨吸収に対する酸化ストレスおよび抗酸化物質の関与が考えられている。しかし、レドックス機構による破骨細胞分化関しての詳細は明らかとなっていない。そのため、代謝性骨疾患の治療法の開発には骨代謝制御におけるレドックス制御機構の解明が必要となる。

## 2. 研究の目的

本研究は加齢に伴う骨代謝能の低下に対する酸化還元バランス、すなわちレドックス機構の関与について、分子生物学的解析を行うことで詳細な分子メカニズムを解明することを目的とする。

本研究では「加齢に伴うレドックス制御の変動は、RANKL の発現とシグナル伝達を介した破骨細胞形成を調節することで、歯槽骨の低代謝型骨量減少を惹起する。」を研究仮説とし、加齢モデルマウスを作製し酸化ストレスと抗酸化物質が破骨細胞形成に与える影響とそれに伴う骨吸収能について *in vitro* で、詳細な分子シグナル伝達機構について検討した。加齢モデルマウスの酸化度および抗酸化力の変動様態、破骨細胞形成能および、破骨細胞分化に対する redox 関連分子の関与について、そのシグナル伝達機構について解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 自然加齢マウスにおける酸化—抗酸化能の検討

24 週齢 ICR 雄性マウスを 30・48・72 週まで飼育し、自然加齢マウスとした。加齢マウスより採取した血清をサンプルとし、1) 細胞の DNA 酸化ダメージの定量 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) 2) 酸化ストレス (過酸化物質濃度) d-ROMs

(diacron-Reactive Oxygen Metabolites) Test 3) 抗酸化度 (鉄イオン還元量) BAP (Biological Antioxidative Potential) Test について測定した。

### (2) 自然加齢による redox 関連遺伝子の発現変動の解析

24 週齢 ICR 雄性マウスを 30・48・72 週まで飼育し、自然加齢マウスとした。摘出した組織より Total RNA を抽出・精製しサンプルとした。DNA マイクロアレイ解析は Agilent DNA microarray scanner (Agilent Tech. Inc., USA) を用いて、発現変動 (5 倍以上/ 0.2 倍以下) を示した Redox 関連の遺伝子を抽出した。

### (3) 自然加齢モデルマウス由来細胞での破骨細胞形成能の解析

加齢マウスの頭蓋冠からコラゲナーゼとトリプシンを用いた連続的酵素処理によって調製し培養骨芽細胞を初代培養した。大腿骨より抽出した骨髄間質細胞に、分化誘導因子である Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$ B Ligand (RANKL) を作用させ、TRAP 陽性細胞数を定量した。

マウス由来の破骨細胞前駆細胞の RAW264 を 10% (v/v) ウシ胎児血清 (MBL)、1% (v/v) ペニシリン・ストレプトマイシン (GIBCO) を添加した DMEM (Sigma) を用いて、5% Co<sub>2</sub> 存在下 37°C インキュベーター内で 1~7 日間培養した。

破骨細胞分化の確認には TRAP 染色 (破骨細胞特異的) を用い、破骨能の比較には Pit formation (疑似骨のプレート上での解析) を用いた。TRAP 染色キットを用いて染色し、染色後は顕微鏡を用いて視野中の細胞数をカウントした。各群 10 視野について観察した。次に、OAAS プレート上での pit 形成能を評価した。分化した破骨細胞の破骨能を、BD Bio Coat OSTEOLOGIC Bone Cell Culture System (BD Biosciences) を使用した Pit formation により解析した。Well 中に RAW264 細胞を 50,000 個/2mL 播種し、前述の DMEM で 24 時間培養した後、10% (v/v) ウシ胎児血清 (MBL)、1% (v/v) ペ

ニシリン・ストレプトマイシン含有MEM alpha(Invitrogen)にて培養した。メディアウム交換時に、RANKL(30ng/mL)を添加し、37°Cインキュベーター内で7日間培養した。培養後、bleach solutionで5分間固定、乾燥後にデジタルカメラを用いて撮影を行い、フリーソフトImageJを用いて食食割合(面積)を算出した。

(4) 破骨細胞形成能に対するredox関連遺伝子の影響

上記実験に使用した細胞よりtotal RNAを抽出し、RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いてプロトコールに従ってcDNAを調整した。既製のTaqman gene expression assaysプライマー(Applied Biosystems)を使用し、サーマルサイクラー(Roche)を用いて遺伝子の発現量を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 72 週齢マウスでは、血清 8-OHdG および d-ROMs Test において、コントロール群に比べて有意な上昇を認めた。また BAP Test では、コントロール群に比べて有意な減少を認めた。

加齢マウスの大腿骨近位端および下顎骨の海綿骨量をマイクロ CT にて解析を行ったところ、加齢マウスにおいて骨密度および骨塩量の低下が認められた。

(2) 自然加齢によるredox関連遺伝子の発現変動の解析

30~48週においては、redox関連遺伝子の挙動には大きな変化を認めなかった。48~72週ではpro-oxidants関連遺伝子、特にThioredoxin 制御に関与する遺伝子の発現上昇が認められた。

加齢により発現量が上昇した遺伝子 Txnip

Alox15 Por Cybb

加齢により発現量が減少した遺伝子 NOS1

NOS3 Alox5

(3) 自然加齢モデルマウス由来細胞での破骨細胞形成能の解析

TRAP(酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ)染色では、加齢モデルでは、赤色に染まる大型の破骨細胞の数はcontrol群に比べ有意に減少した。

Pit formationの結果、プレート上に観察された吸収窩の数および面積は、自然加齢マウス由来細胞ではcontrol群に比べ有意に減少した。

以上より、加齢による破骨細胞分化能および破骨能の低下が認められた。

(4) 破骨細胞形成能に対するredox関連遺伝子の影響

実験(2)において同定したredox関連遺伝子群(7遺伝子)について、加齢マウス由来細胞の破骨細胞分化課程における遺伝子発現量をリアルタイムPCRにより定量した。その結果、酸化ストレスであるTXNIPの発現量が、自然加齢モデル群ではControlに比べ有意に増加していた。

このことより、加齢によるTXNIPの発現上昇が、破骨細胞への分化過程において破骨細胞への分化を抑制することで骨代謝機能の低下を惹起することが推測された。

#### 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0件)

[学会発表] (計0件)

[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 小俣 和彦 (OMATA KAZUHIKO) 日本歯科大学・生命歯学部・非常勤講師

研究者番号：00434142

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：