

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11010

研究課題名(和文) エストロゲンとその標的因子による破骨細胞のアポトーシス抑制と骨吸収制御機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of regulation by estrogen and estrogen target factors to osteoclastic apoptosis and bone resorption

研究代表者

樋山 伸二 (Hiyama, Shinji)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・助教

研究者番号：60314754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：雄ウズラの骨髓骨形成モデルからエストロゲン応答遺伝子を見出し、破骨細胞の機能調節と骨代謝の関係を解明を試みた。

ウズラ破骨細胞分化過程で17 β -エストラジオール(17 β -E)を添加した結果、発現量の変動、タンパク質の増減を確認した。その変動は17 β -Eの添加時期で異なった。DNAマイクロアレイ解析からエストロゲン応答遺伝子の候補を選出し、いくつかの遺伝子で変動が認められた。応答遺伝子の候補が見出されたことから、マウス骨髓細胞の破骨細胞の培養を確立した。

哺乳動物の破骨細胞で認められていない骨髓骨のエストロゲン応答遺伝子の候補の解析は哺乳動物の破骨細胞および骨代謝の研究に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied about the relationship of estrogen response genes and mechanism of osteoclasts and bone metabolism using medullary bone formation model of male quail. During bone marrow culture for osteoclastogenesis, 17 β -estradiol (17 β -E) added into media and induced the change of expression of some genes and proteins. Some candidate genes from the results of DNA microarray were recognized the expression change during osteoclastogenesis. Then, culture model of mice osteoclasts was established at our lab.

There are suggested that estrogen response genes of medullary bone will be helpful to find new estrogen response genes in mammalian osteoclasts and bone metabolism.

研究分野：解剖学(歯科)

キーワード：破骨細胞 骨代謝 エストロゲン 骨髓骨

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた現在の日本において、骨粗鬆症患者の増大は大きな社会問題の1つである。女性では、閉経によるエストロゲン欠乏による急激な骨吸収が起こり、脊椎や下肢だけでなく、歯科領域となる顎骨、さらには頭頸部の骨の非薄化を招き、咀嚼・嚥下機能の低下および骨折を誘発している。男性においても、更年期障害による男性ホルモン低下および高齢化に伴う骨吸収の促進もあり、骨粗鬆症のリスクは非常に高くなっている。この治療薬に、ビスホスホネートおよびデノスマブがあげられる。ビスホスホネートは破骨細胞のアポトーシスを誘導し骨吸収を抑制するため、非常に有効性は高いが、顎骨壊死や骨質不良による骨折を誘発するという問題を抱えている。デノスマブは破骨細胞の分化を阻害し、破骨細胞数を減らすことにより、骨吸収を抑制する。しかしながら、重度の低カルシウム血症とともに、顎骨壊死や骨折を引き起こすことが報告されている。また、選択的エストロゲン調節薬も、乳ガンや子宮頸ガンなどの副作用を完全に回避できていない。それゆえ、骨量の維持と増加はもとより、副作用の無い治療薬または予防薬による正常な骨代謝、すなわち骨質の改善はQOL向上のため可及的速やかに実施されなければならない。

このような背景のもと、哺乳動物に比べ、飛躍的にエストロゲンに高い応答性を示す鳥類の骨髄骨を用いて、骨代謝におけるエストロゲンの役割の解明に取り組んで来た。骨髄骨とは、卵殻のカルシウムの供給源として骨髄中に形成される特異組織であり、産卵周期における血中エストロゲン値の増減に応じて迅速にリモデリングを繰り返している。また、実験的エストロゲン投与により、骨髄骨は容易に形成され、その後速やかに吸収される。このリモデリング過程

で、血中エストロゲン値の高い骨形成期には、破骨細胞は休止状態で骨表面に存在し、エストロゲン値が低くなると再び活発に骨吸収を行なう。近年の申請者らの研究から、エストロゲンは骨髄骨の破骨細胞の分化およびアポトーシス誘導に影響を与えないが、骨吸収を抑制している可能性が示唆された。さらに、エストロゲンは骨吸収に必須のプロトンポンプのV-ATPaseを減少させ、アクチンリングの形成不全を起こさせることを見出した。DNAマイクロアレイ解析から、エストロゲンにより著しく発現が変動する遺伝子群に、哺乳動物の骨および破骨細胞に関連する既知の遺伝子だけでなく、骨との関連が報告されていない遺伝子も多数認められた。

これらの結果は、これまでの哺乳動物の破骨細胞の報告と異なること、また報告が無いことから、骨髄骨、特に破骨細胞へのエストロゲンの作用の追求は、骨粗鬆症のような骨吸収亢進型の疾病に対し、選択的エストロゲン調節薬やビスホスホネート、デノスマブとは作用機序の異なる、副作用の無い、より安全な予防薬または治療薬の開発につながる可能性があると期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨代謝、特に破骨細胞の機能制御に関わるエストロゲンに特異的に応答する遺伝子(エストロゲン応答遺伝子)を見出し、その調節機構を明確にすることである。まず、エストロゲンに高い応答性を示す鳥類の骨髄骨の破骨細胞の機能制御に関わるエストロゲン応答遺伝子の同定を試みる。次に、哺乳動物の骨代謝におけるエストロゲン応答遺伝子の機能を解明する。

<具体的な目的>

- 1) エストロゲンは、骨髄骨の破骨細胞のアポトーシスを誘導せず、骨吸収の抑制に働く

ことから、破骨細胞におけるエストロゲン応答遺伝子を同定し、その作用機序および機能解析を行なう。

- 2) 哺乳動物の破骨細胞または骨組織におけるエストロゲン応答遺伝子の発現と機能を検証する。

哺乳動物の高回転型骨代謝において、エストロゲン応答遺伝子が骨髄骨の破骨細胞と同様に骨吸収を抑制するか、またその作用機序について解析を行なう。

3. 研究の方法

本研究において最初に用いる鳥類の骨髄骨は、エストロゲンの支配を強く受けてリモデリングを繰り返すため、骨髄骨に関わる細胞にはエストロゲンに特異的に応答する遺伝子（エストロゲン応答遺伝子）があると考えられる。これまでの研究結果、特に破骨細胞に関する結果をもとに、骨髄骨リモデリングにおけるエストロゲン応答遺伝子を同定し、哺乳動物の骨リモデリングにおけるエストロゲンとエストロゲン応答遺伝子の役割を明らかにする。

雄ウズラへのエストロゲン単回投与により、一過性に骨髄骨は形成され、速やかに吸収される。申請者はこれまでに、この骨髄骨形成モデルを用いた破骨細胞の培養方法を構築した。これらの手法を用いて、エストロゲンが破骨細胞のアポトーシスを誘導しないが、骨吸収を抑制することを報告した。また、DNAマイクロアレイ解析から、破骨細胞におけるエストロゲン応答遺伝子と想定される遺伝子を見出した。これらの結果をもとに、骨髄骨におけるエストロゲン応答遺伝子を同定し、エストロゲンとその応答遺伝子の役割を解明するため実験を行なった。

哺乳動物の破骨細胞および骨代謝におけるエストロゲンとエストロゲン応答遺伝子の役割を解明するため、骨髄骨の研究で

得られたエストロゲン応答遺伝子と、これまで報告されている哺乳動物の骨代謝とエストロゲンの研究結果を参考にし、実験を行なった。

4. 研究成果

骨代謝、特に破骨細胞の機能制御に関わるエストロゲンに特異的に応答する遺伝子を見出し、その調節機構を解明するため、エストロゲン（E2）を単回投与した雄ウズラの骨髄骨形成モデルを用いて、以下の実験を行なった。

<平成27年度>

1. ウズラ骨髄骨の破骨細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の同定を行なうため、E2投与3日後の骨髄細胞を採取し、RANKL/M-CSFにより破骨細胞へ分化させた。培養期間中、培養中期、ならびに培養終了直前に 17β -エストラジオール(17β -E)を添加した結果、 17β -Eによりアクチンリングの形成不全あるいは崩壊、ならびに骨吸収に関連する酵素の分泌の減少などが認められた。これらの結果とDNAマイクロアレイ解析で得られた候補遺伝子と照らし合わせ、いくつかの遺伝子をエストロゲン応答遺伝子の候補とした。

2. 破骨細胞の分化過程におけるエストロゲン応答遺伝子の候補遺伝子の発現をRT-PCRにより検討したところ、 17β -Eにより発現量に大きな変動が見られないが、タンパク質の発現の減少が認められたもの、mRNAの発現が増減したものが確認された。さらに、それらの変動は 17β -Eの添加時期によって異なっていた。

3. エストロゲン応答遺伝子と考えられる遺伝子が見出されたことから、哺乳動物の破骨細胞におけるこれらの遺伝子の解析を速やかに行なうため、マウス骨髄細胞を用いた破骨細胞の培養に着手した。

以上の結果から、骨髄骨の破骨細胞にお

いて、エストロゲン応答遺伝子の候補がいくつか見出された。これらの遺伝子には、哺乳動物の破骨細胞で発現が認められているものもあるが、エストロゲンとの関係が未だ明確になっていないものもあった。したがって、骨髄骨の破骨細胞で見出されたエストロゲン応答遺伝子の解析は、哺乳動物の破骨細胞のみならず骨代謝の研究にたいへん有意義な結果をもたらすと考えらえる。

<平成28年度>

- 1.ウズラ骨髄骨の破骨細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の同定を行なうため、E2投与3日後の骨髄細胞を採取し、RANKL/M-CSFにより破骨細胞に分化させた。また、RANKL/M-CSFと同時、培養中期、ならびに培養終了直前に17 β -エストラジオール(17 β -E)を添加した。この過程において、17 β -Eにより、E-カドヘリン、Ephrinとその受容体Eph、TIAM2などの遺伝子の変動が認められた。DNAマイクロアレイ解析から、さらにいくつかの遺伝子をエストロゲン応答遺伝子の候補とした。
- 2.破骨細胞の分化過程におけるエストロゲン応答遺伝子の候補遺伝子の発現を検討したところ、17 β -Eにより発現量が大きく変動したものの、タンパク質の発現に増減を示したものが確認された。さらに、それらの変動は17 β -Eの添加時期によって異なっていた。
- 3.エストロゲン応答遺伝子の候補が見出されたことから、哺乳動物の破骨細胞におけるこれらの遺伝子の解析を速やかに行なうため、マウス骨髄細胞を用いた破骨細胞の培養方法の確立に着手した。

以上の結果から、骨髄骨の破骨細胞において、さらにエストロゲン応答遺伝子の候補がいくつか見出された。これらの遺伝子には、哺乳動物の破骨細胞で発現が認めら

れているものもあるが、エストロゲンとの関係は未だ報告がなされていないものもある。したがって、骨髄骨の破骨細胞で見出されたエストロゲン応答遺伝子の解析は、哺乳動物の破骨細胞のみならず骨代謝の研究にたいへん有意義な結果をもたらすと考えらえる。

<平成29年度>

- 1.E2投与3日後のウズラの骨髄細胞を破骨細胞に分化させた。また、RANKL/M-CSFと同時、培養中期、ならびに培養終了直前に17 β -エストラジオール(17 β -E)を添加した。この過程において、17 β -Eにより、E-カドヘリン、Ephrinとその受容体Eph、TIAM2などの遺伝子の変動が認められた。DNAマイクロアレイ解析では、さらにいくつかの遺伝子をエストロゲン応答遺伝子の候補とした。
- 2.破骨細胞の分化過程におけるエストロゲン応答遺伝子の候補遺伝子の発現を検討した結果、17 β -Eにより発現量が大きく変動したものの、タンパク質の発現に増減を示したものが確認された。さらに、それらの変動は17 β -Eの添加時期により異なっていた。
- 3.エストロゲン応答遺伝子の候補が見出されたことから、哺乳動物の破骨細胞における解析を行なうため、マウス骨髄細胞を用いた破骨細胞の培養方法の確立した。実験1で見出されたエストロゲン応答遺伝子の候補の発現変動を検討したところ、いくつかの遺伝子でわずかな変動が認められた。
- 4.ウズラ骨髄骨の破骨細胞のDNAマイクロアレイ解析の結果から、再度、エストロゲン応答遺伝子の候補を検討し直した。

以上の結果から、骨髄骨の破骨細胞で見出されたエストロゲン応答遺伝子の候補には、哺乳動物の破骨細胞で発現が認められているものもあるが、エストロゲンとの関係は未だ報告がなされていないものもある。したがって、骨髄骨の破骨細胞で見出され

たエストロゲン応答遺伝子の解析は、哺乳動物の破骨細胞のみならず骨代謝の研究にたいへん有意義な結果をもたらすと考えられる。本研究では、哺乳動物の破骨細胞を用いて、骨髄骨の破骨細胞から見出されると予想されたエストロゲン応答遺伝子の候補の検出まで至ることが難しかった。その理由としては、骨髄骨におけるエストロゲン応答遺伝子の候補とさえる遺伝子数が膨大にあり、短期で網羅的に検出を行うことが困難であったためと考えられる。しかしながら、これらのデータを元に、今後、解明されていくものと想定される。

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)

[学会発表](計 4件)

横井美有希、呉本晃一、樋山伸二、阿部泰彦、津賀一弘・FGFR2 シグナルが象牙質形成に与える影響・日本補綴学会支部学術大会・2017

樋山伸二、中守貴一、渡邊峰朗、内田隆・エストロゲンによる鳥類骨髄骨の破骨細胞の機能制御・第121回日本解剖学会総会・全国学術集会・2016

Shinji Hiyama, Ki-ichi Nakamori, Mineo Watanabe, Takashi Uchida・Estrogen regulates the activity of avian medullary bone osteoclasts through Eph/ephrin signaling. American Society for Bone and Mineral Research・2015

樋山伸二、渡邊峰朗、内田隆・エストロゲンによる鳥類骨髄骨の破骨細胞の機能およびアポトーシス制御について・歯科基礎医学会・2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

樋山 伸二 (HIYAMA Shinji)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・助教

研究者番号：60314754

(2)研究分担者

吉子 裕二 (YOSHIKO Yuji)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教授

研究者番号：20263709