

令和元年9月4日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20528

研究課題名(和文) コラーゲンからみた酸化ストレスによる骨脆弱化のメカニズム

研究課題名(英文) Oxidative stress affects collagen fiber formation and LOX expression cultured by osteoblasts

研究代表者

山口 雄一郎 (Yuuichiro, Yamaguchi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：50757945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは骨芽細胞の分化と石灰化を抑制し、骨基質中のコラーゲン線維を細くした。現在コラーゲン線維形成に関与することが分かっている分子群の、酸化ストレスによる遺伝子発現の変化を調べたところ、基質タンパクである型コラーゲンやデコリンには変化がなく、コラーゲン分子の三重螺旋形成やコラーゲンのリジン残基の水酸化や糖添加に関与する分子群にも変化がなかった。しかし、コラーゲン架橋形成開始酵素の中の lysyl oxidase (LOX) と LOX-like protein 1 (LOXL-1) の遺伝子発現は増加した。酸化ストレスはコラーゲンの翻訳後修飾因子に影響を与えて、骨を脆弱化させる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症の原因論として酸化ストレスが提唱されてきたが、本研究は酸化ストレスによって実際に細胞レベルで分泌された骨基質の脆弱化とそれに関連する分子の発現の変化を明らかにした。これは、酸化ストレスが骨量を減少させるだけでなく、骨質をも低下させる様相を明らかにしたものである。

研究成果の概要(英文)： Oxidative stress suppressed osteoblast differentiation and matrix mineralization in which collagen fibril formation was diminished. All of the molecules well-known as regulators for collagen fibril formation were tested for alteration of gene expression after oxidative stress. The stress did not affect the expression of matrix proteins such as type V collagen and decorin, and did not that of the molecules which regulate triple helical formation of collagen molecules or hydroxylation/glycosylation of specific lysine residues of collagen. Among the enzymes which start the reaction of collagen cross-linking, the stress enhanced the expression of lysyl oxidase (LOX) and LOX-like protein 1 (LOXL-1) only. Oxidative stress diminishes bone matrix through effect on molecular expression for collagen posttranslational modification.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：コラーゲン線維形成 酸化ストレス コラーゲン翻訳後修飾 骨芽細胞 骨基質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症の病因論は、古典的なホルモンの分泌低下による骨形成と吸収のアンバランスによる骨量の減少の理論から、酸化ストレスによる種々の現象の結果として骨量と骨質の低下が起こるという理論にスイッチしてきた。骨量の減少に関しては酸化ストレスによるメカニズムの追求が盛んに行われているが、骨質の低下に関しては未だ不明な部分が多い。今のところ、細胞内の活性酸素を分解する酵素である superoxide dismutase (SOD) の一つである SOD1 のノックアウトマウスの骨組織での研究によって、コラーゲン分子間の生理的架橋の減少と糖添加による非生理的架橋の増加によって骨の脆弱化が起こると説明されている。コラーゲンの架橋形成の開始は lysyl oxidase (LOX) による酵素反応によって起こるが、コラーゲン架橋形成はこの酵素の働きのみではなされない。Lysyl hydroxylase (LH) などによるコラーゲン分子の特異的な部位のリジン残基の水酸化とその後の糖添加はコラーゲン線維形成を抑制的に制御し、そのみならずコラーゲン架橋形成部位の三次元構造の変化などによって架橋形成も変化させうる。酸化ストレスの増加によってそれらの因子がどう変化するかについては未だ不明である。それらの様相が酸化ストレスの単純な実験系である、in vitro での過酸化水素による骨芽細胞が分泌する骨基質への影響を調べる実験系で明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

過酸化水素を作用させることによる酸化ストレスが骨芽細胞の分化および石灰化、骨芽細胞が分泌した骨基質中のコラーゲン線維の様相、とコラーゲンの架橋形成および線維形成に関連した翻訳後修飾を媒介する酵素の遺伝子発現の様相を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞：マウス由来の骨芽細胞様株化細胞である MC3T3-E1 細胞を用いた。

(2) 骨芽細胞に作用させる過酸化水素の濃度の決定：骨芽細胞をディッシュ内でコンフルエントになるまで培養した後、系列希釈した過酸化水素を含んだ石灰化誘導液体培地中で骨芽細胞を数日培養し、細胞が死なない最高濃度を調べた。

(3) 骨芽細胞の分化の測定：(2) で調べた細胞が死なない最高濃度以下の系列希釈した過酸化水素含有石灰化誘導液体培地中で1週間骨芽細胞を培養し、細胞と骨基質を回収した後、アルカリフォスファターゼ活性を測定した。

(4) 骨芽細胞の石灰化の測定：同上の培養条件で骨芽細胞を50日間培養した後、形成された骨基質をアルザリンレッド染色して、その染色を観察し、分光光度計でその染色状態を定量した。

(5) コラーゲン線維の太さの推定のためのピクロシリウスレッド染色後の偏光顕微鏡下での観察：同上の培養条件で2週間培養し、骨基質をピクロシリウスレッドで染色した後、偏光顕微鏡下でその色彩を観察した。観察される色彩は、オレンジ色、黄色、緑色であるが、オレンジ色であればコラーゲン線維は太く、密な状態であることを示しており、緑色になるほど、コラーゲン線維は細く、線維が疎な状態であることを示す。この色彩から、コラーゲン線維の太さを判定した。

(6) 遺伝子発現量の定量：コラーゲン線維の狭小化が認められた 200 μ M の過酸化水素を含む石灰化誘導液体培地中で2日間培養した骨芽細胞の mRNA 量をリアルタイム PCR で定量し、コントロール（過酸化水素を含まない条件）と比較した。調べる分子は、型コラーゲン、デコリン、コラーゲン分子の三重螺旋形成に関与する peptidylprolyl isomerase (Ppib), prolyl 3-hydroxylase 1 (P3h1), cartilage associated protein (Crtap), serpin family H member 1 (Serpinh1), FK506 binding protein 10 (Fkbp10)、コラーゲンのリジン残基の水酸化とその後の糖添加に関与する LH1, LH2, LH3 および glycosyltransferase family 25 domain 1

(GLT25D1) と、コラーゲン架橋形成に関与する LOX, lysyl oxidase-like protein 1 (LOXL-1), LOXL-2, LOXL-3 および LOXL-4 とした。House keeping gene を β -actin として mRNA を相対的に定量した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞に作用させる過酸化水素の濃度の決定：骨芽細胞は 400 μ M の過酸化水素の混入によって翌日には死に至るが、300 μ M では細胞がはがれるなどの影響が認められなかった。従って、300 μ M 以下の系列希釈した過酸化水素を用いて酸化ストレスによる影響を調べることとした。

(2) 酸化ストレスが及ぼす骨芽細胞の分化への影響：過酸化水素の作用によって濃度依存的にアルカリフォスファターゼ活性の低下が認められ、100 μ M 以上の濃度で有意に低い活性値が認められた (図 1)。従来の報告通り、酸化ストレスが骨芽細胞の分化を抑制することが示された。

(3) 酸化ストレスが及ぼす骨芽細胞が分泌した骨基質の石灰化への影響：アルザリンレッドの染色の程度は過酸化水素濃度依存的に薄くなり、50 μ M 以上の濃度で有意に薄くなった。しかし、300 μ M でも完全に染色がなくなるわけではなかった (図 2)。従来の報告通り、酸化ストレスが石灰化を抑制することが示された。

(4) 酸化ストレスが及ぼす骨芽細胞が分泌した骨基質のピクロシリウスレッド染色後の偏光顕微鏡下での色彩への影響：コントロールと25 μMの過酸化水素存在下では骨基質色彩はオレンジと黄色が主体であったが、50 μMで緑色の骨基質が増え、200 μM以上では緑色のみとなった(図3)。この現象は、25 μMの過酸化水素存在下まではコラーゲン線維の形成が抑制されていないが、50あるいは100 μMの濃度でコラーゲン線維形成の抑制が始まっていることを示している。また、この色彩の差異は我々が以前報告した骨粗鬆症モデルマウスの骨とコントロールマウスの骨が示す色彩の差異と非常に類似している¹⁾。従って、酸化ストレスを受けた骨は、骨粗鬆症の骨と同じように骨コラーゲン線維形成を抑制している可能性が示唆された。

(5) 酸化ストレスが及ぼす型コラーゲン、デコリン、コラーゲン分子の三重螺旋形成に関与する分子群の遺伝子発現への影響：
-actinをhouse keeping geneとした場合のコントロールと200 μMの過酸化水素存在下での相対的なmRNAのそれぞれの量(平均値±SD)は、型コラーゲンで 0.98 ± 0.029 と 0.95 ± 0.28 であり、デコリンで 0.47 ± 0.10

と 0.38 ± 0.10 であり、Ppibで 0.67 ± 0.14 と 0.66 ± 0.15 であり、P3h1で 29.88 ± 9.16 と 26.23 ± 12.81 であり、Crtapで 18.72 ± 3.99 と 18.88 ± 6.12 であり、Serpinh1で 12.81 ± 2.73 と 11.50 ± 2.81 であり、Fkbp10で 11.95 ± 2.16 と 11.07 ± 2.38 であった。いずれの分子も過酸化水素による有意な発現の変化を受けなかった。

(6) 酸化ストレスが及ぼすコラーゲン線維形成および架橋形成に関連するコラーゲン翻訳後修飾を媒介する酵素の遺伝子発現への影響：コラーゲン線維形成の関与する酵素の-actinをhouse keeping geneとした場合のコントロールと200 μMの過酸化水素存在下での相対的なmRNAのそれぞれの量(平均値±SD)は、LH1で 2.10 ± 0.91 と 1.74 ± 0.86 であり、LH2で 1.29 ± 0.33 と 1.10 ± 0.28 であり、LH3で 0.29 ± 0.06 と 0.28 ± 0.08 であり、GLT25D1で 25.79 ± 9.55 と 25.27 ± 10.92 であった。いずれの酵素の発現も過酸化水素による有意な変化を受けなかった。

一方、コラーゲン架橋形成に関与する酵素では、コントロールと200 μMの過酸化水素存在下でのmRNA量はそれぞれLOXで 3.41 ± 1.71 と 5.52 ± 2.01 であり、LOXL-1で 0.91 ± 0.13 と 1.134 ± 0.25 であり、LOXL-2では従来からの報告が示す通り、双方ともに検出されず、LOXL-3で 1.00 ± 0.14 と 1.10 ± 0.20 であり、LOXL-4で 1.83 ± 0.44 と 1.88 ± 0.48 であった。コントロールと過酸化水素存在下でのmRNA量の間有意差が認められたのはLOXとLOXL-1であり、いずれも過酸化水素処理によってmRNAが増加した。

過酸化水素処理によって予想外の結果であったが、架橋形成開始に関与するLOXとLOXL-1の発現が増加することが分かった。骨粗鬆症の骨ではコラーゲン分子間の生理的な架橋が減少し、その原因はLOXの活性の低下か、発現の減少が関与しているのではないかと推測されているが、実際にヒトの骨粗鬆症の骨あるいは骨粗鬆症モデル動物での骨におけるLOXの発現あるいはLOXの活性を調べた研究はない。今回の酸化ストレス下におけるLOXとLOXL-1の遺伝子発現の増加は従来の見解に反する結果である。タンパクレベルあるいは活性レベルを調べていないため、遺伝子発現が増加しているようにみえても、実際にタンパクとして分泌されていないか、あるいは何らかの影響で活性自体が低下している可能性もありうる。しかし、この発現の増加によって実際のタンパクレベルも増加していても、骨粗鬆症様の脆弱化した骨基質ができるかもしれない。あくまで推測の域を出ないが、過剰に形成された分子間架橋によって、分子間の三次元構造が変化し、コラーゲン線維形成が抑制されたり、石灰化が抑制される可能性はありうる。今後、過剰なLOX発現が骨粗鬆症様骨基質を作りうるのかどうか検証を進める予定である。

<引用文献>

- 1) Tokutomi K, Matsuura T, Atsawasuwan P, Sato H, Yamauchi M. Characterization of mandibular bones in senile osteoporotic mice. *Connect Tissue Res* 2008;49:361- 366.

5. 主な発表論文等

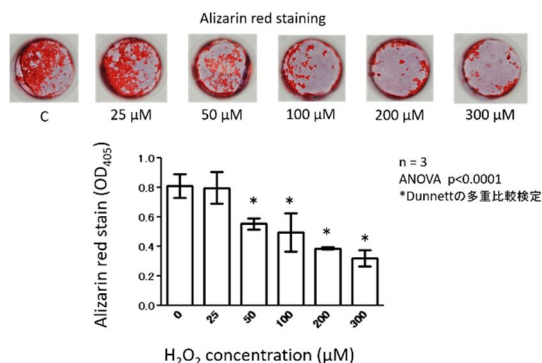


図2 過酸化水素が及ぼす骨芽細胞が分泌した骨基質の石灰化への影響

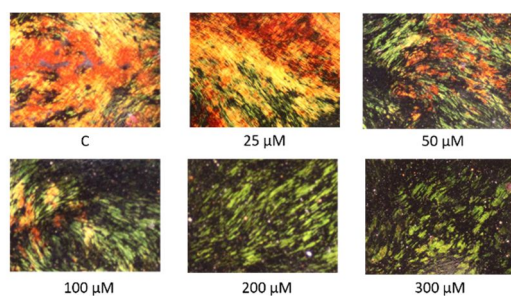


図3 過酸化水素が及ぼす骨芽細胞が分泌する骨基質のピクロシリウスレッド染色後の偏光顕微鏡下での色彩への影響

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

松浦尚志, 有馬裕子, 山口雄一郎, 佐藤博信: 骨粗鬆症におけるコラーゲンの翻訳後修飾と線維形成. 第 23 回日本歯科医学会総会. 2016 年 10 月, 福岡.

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし