

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09088

研究課題名(和文)骨修復過程において性ホルモンを介してNOが果たす役割の解明

研究課題名(英文)The role of estradiol-mediated Nitric Oxide in the bone-repair process

研究代表者

佐羽内 研 (Sabanai, Ken)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：70644863

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)：Nitric Oxide Synthase (NOS) システム完全欠損マウスに大腿骨ドリル開孔モデルを組み合わせて、骨修復過程における性ホルモンを介した Nitric Oxide (NO) が果たす役割を調査した。本研究成果により、骨孔部の皮質骨修復は血清エストラジオール (E2) 濃度に依存していることが明らかとなり、骨修復に与える E2 のアナボリックな効果は NO を介していることが示唆された。今後、更なる解析を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会では骨折患者が増加し、医療経済的に大きな問題となる。骨粗鬆症治療による骨折予防も重要であるが、骨修復過程における調節因子の働きを理解してコントロールすることで骨折治癒期間を短縮できれば、早期に日常生活動作能を再獲得できる可能性がある。骨修復過程における性ホルモンを介した Nitric Oxide が果たす役割に関しては未だ解明されておらず、本研究結果については、社会的意義、学術的意義ともに大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of estradiol (E2)-mediated Nitric Oxide (NO) in the cortical-bone-repair process using wild-type mice/triple Nitric Oxide Synthase (NOS) knockout mice after drill-hole injury. It was revealed in our study that cortical-bone repair depends on serum E2 concentration, and suggested that the anabolic effect of E2 on cortical-bone repair was mediated by NO. Further analysis will be conducted in the future.

研究分野：骨代謝

キーワード：一酸化窒素合成酵素 NOS 骨修復過程 骨折 性差 性ホルモン エストラジオール テストステロン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会では骨折患者が増加し、医療経済的に大きな問題となる。骨粗鬆症治療による骨折予防も重要であるが、骨修復過程における調節因子の働きを理解してコントロールすることで骨折治癒期間を短縮できれば、早期に日常生活動作能を再獲得できる可能性があり、社会的意義も大きい。

骨折治癒の過程は炎症反応とそれに続く骨リモデリングからなる。骨折直後は骨折部位の血腫に免疫細胞が集積し、サイトカイン等を産生して炎症を惹起する。炎症が消退すると間葉系幹細胞が軟骨細胞や骨芽細胞に分化、増殖して仮骨を形成する。その後、骨芽細胞と破骨細胞によってリモデリングが行われて骨折部の治癒に至る。この炎症とリモデリングの過程には、調節因子の一つとして **NO 合成酵素 (Nitric Oxide Synthase: NOS)** が関与している。

NOS により発現される **Nitric Oxide (NO)** は生体内での血管新生や創治癒、神経伝達、平滑筋弛緩、炎症などに関わり、多様な役割を果たしている (**Honold J, et al. Nitric Oxide. 2000**)。 **NO** は骨代謝動態を担う骨芽細胞や破骨細胞の分化にも関与しており、その発現濃度によっても細胞分化に与える影響が異なっている (**Ralston SH, et al. J Bone Miner Res. 1995**)。

さらに、骨のリモデリングを担う破骨細胞および骨芽細胞にも **NOS** が発現していることが報告されており、**NO** は骨代謝において重要な調節因子の一つであると考えられている (**van't Hof RJ, et al. Immunology. 2001**)。生体内の **NOS** システムは、主に血管内皮細胞に発現している内皮型 **NOS (eNOS)**、主に神経系に発現している神経型 **NOS (nNOS)**、そして炎症性刺激や機械的刺激で誘導される誘導型 **NOS (iNOS)** の3種類の異なったアイソフォームから成り立っている (**Moncada S, et al. Pharmacol Rev. 1991**)。

我々は、**NOS** システムに由来する **NO** の役割を解明するために、**NOS** システム完全欠損 (**Triple NOS KO**) マウスを世界に先駆けて開発した (**Morishita T, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005**)。さらに、**Triple NOS KO** マウスにレニン・アンジオテンシン系 (**RAS**) の活性化が存在することを見出した (**Nakata S, et al. Circulation. 2008**)。

また、**Triple NOS KO** マウスは野生型マウスに比し骨形成優位の骨代謝回転を示し、有意な骨密度 (**BMD**) の増加が認められた。そこで、骨における **RAS** の動態を検討した。大腿骨のアンジオテンシン変換酵素 (**ACE**) 活性およびアンジオテンシン II 1 型 (**AT₁**) 受容体の発現レベルは、野生型マウスに比し **Triple NOS KO** マウスで有意に高値を示した。重要なことに、選択的 **AT₁** 受容体拮抗薬であるオルメサルタンを長期投与したところ、**Triple NOS KO** マウスに見られた上記の骨異常所見は、すべて有意に改善された。また、**AT₁** 受容体に対する免疫染色を行った脛骨近位の組織標本では、肥大軟骨細胞層に **AT₁** 受容体が高度に発現していることがわかった。これらの結果より、**Triple NOS KO** マウスにおける骨代謝異常の発現には、**AT₁** 受容体を介した経路が関与していることが示唆された (**Sabanai K, et al. J Bone Miner Res. 2008**)。

この **Triple NOS KO** マウスで骨損傷が生じた場合に、どのような修復過程を経るのかは未だ不明である。骨における **NO** の発現にはエストロゲン等の性ホルモンも関与しており、**17β-estradiol** は **eNOS** の発現を増加させ持続的に **NO** を産生することで骨芽細胞の分化増殖を促すことがわかっている (**O'Shaughnessy MC, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2000**)。今回、大腿骨ドリル開孔モデルを用いて、皮質骨欠損部位の骨修復過程および骨代謝動態を評価することを試みた。

2. 研究の目的

骨折治癒の過程は炎症反応とそれに続く骨リモデリングからなる。炎症期では骨折部位に様々な免疫応答や血管新生が生じて仮骨が形成され、破骨細胞と骨芽細胞によってリモデリングされて治癒に至る。これらの一連の過程には調節因子として **NOS** により発現される **NO** が関与していると考えられる。本研究の目的は、我々が開発した **NOS** システム完全欠損マウスに大腿骨ドリル開孔モデルを組み合わせて、骨修復過程における性ホルモンを介した **NO** が果たす役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 実験動物の準備

- ・野生型マウス
- ・**Triple NOS KO** マウス

- ・卵巣摘出 (OVX) 後の野生型マウス
- ・OVX 後の Triple NOS KO マウス
- ・精巣摘出 (ORX) 後の野生型マウス
- ・ORX 後の Triple NOS KO マウス

(2) 大腿骨ドリル開孔モデルの作製

全身麻酔下にて大腿骨骨幹端部前面に径 1 mm ドリルで骨孔を作成する。

(3) マイクロ CT 画像や組織標本による評価

マイクロ CT を用いて、術後 1, 2, 4 週目の骨孔部の骨修復過程を経時的に観察する。また、非脱灰標本を作成し、骨孔部の骨修復過程や骨代謝動態を観察する。

(4) 性ホルモンの測定

OVX や ORX 後に行う。血清 estradiol (E2) や testosterone (T) を測定する。

(5) 性ホルモンによる介入

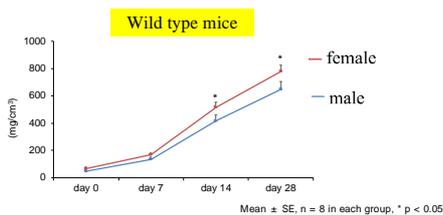
6 週齢で OVX または ORX を行った野生型マウスと Triple NOS KO マウスに、皮下埋め込み型の除放 E2, T, dihydrotestosterone (DHT) ペレットによって性ホルモンの補充を行う。雌は、偽手術 (sham) 群、OVX 群、OVX + E2 投与群、雄は、sham 群、ORX 群、ORX + T 投与群、ORX + DHT 投与群に振り分けた。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスにおける大腿骨ドリル骨孔部の骨修復は雄よりも雌が良好である。

野生型マウスの大腿骨ドリル骨孔部をマイクロ CT で経時的に追跡したところ、雄よりも雌の方がドリル骨孔部の BMD が有意に高い値を示した (術後 2 週と 4 週時点) (図 1)。さらに、ドリル骨孔部の組織標本を観察したところ、雄よりも雌の方がドリル骨孔部の骨量 (BV/TV)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨石灰化速度 (MAR) が有意に高い値を示した (術後 1 週時点) (図 2)。

ドリル開孔部 BMD の経時変化および性差



Wild type mice ではメスの方が drill hole 部の BMD が有意に高い

図 1 : 野生型マウスの大腿骨ドリル骨孔部骨密度の経時変化および性差

術後 2 週と 4 週時点で、雄よりも雌の方がドリル骨孔部の骨密度が有意に高い値を示した。

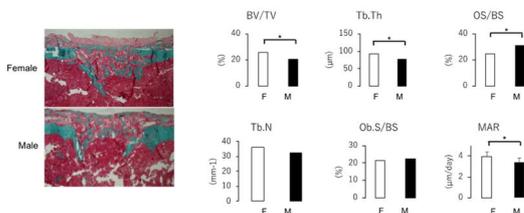


図 2 : 大腿骨ドリル骨孔部 BMD の経時変化および性差

非脱灰標本上では、術後 1 週時点で、雄よりも雌の方がドリル骨孔部の骨量 (BV/TV)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨石灰化速度 (MAR) が有意に高い値を示した。

(2) Triple NOS KO マウスでは大腿骨ドリル骨孔部の骨修復に性差はない。

Triple NOS KO マウスの大腿骨ドリル骨孔部をマイクロ CT で経時的に追跡したところ、ドリル骨孔部の BMD に性差はなかった (図 3)。

ドリル開孔部 BMD の経時的変化および性差

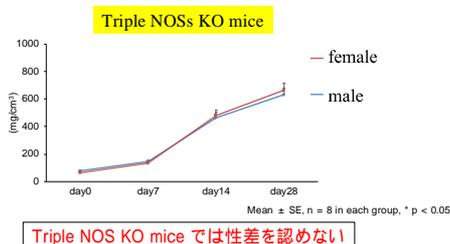


図 3 : Triple NOS KO マウスの大腿骨ドリル骨孔部 BMD の経時的変化および性差

骨における NO の発現には性ホルモンが関与しており、17 β -estradiol は eNOS の発現を増加させ持続的に NO を産生することで骨芽細胞の分化増殖を促すことがわかっている (O'Shaughnessy MC, Biochem Biophys Res Commun. 2000)。NOS システムを完全に欠損させたマウスでは、野生型マウスで認めたような皮質骨修復における雌の優位性はなかった。

(3) 野生型マウスでは、血清 E2 濃度は雌の方が高く、血清 T 濃度は雄の方が高い (図 4)

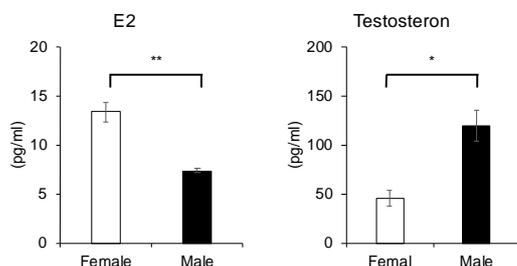


図 4 : 血清 E2 濃度と T 濃度の性差

(4) 雌では、血清 E2 濃度は OVX 後に低下して、E2 投与により改善する。雄では、血清 E2 濃度は ORX 後に低下して、T 投与により改善するが、E2 に変換されない DHT 投与では血清 E2 濃度は改善しない (図 5)

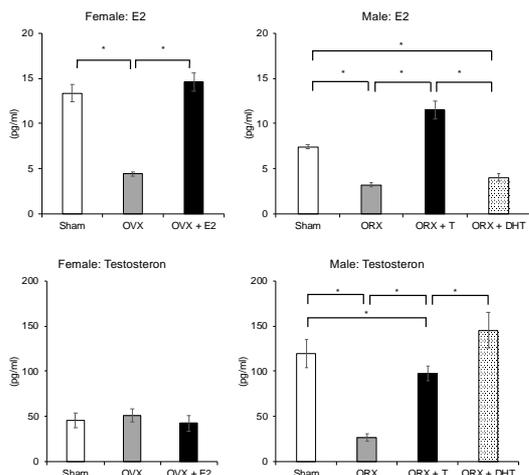


図 5 : OVX や ORX、性ホルモン補充による血清 E2 や T 濃度の変化

(5) 大腿骨ドリル骨孔部の骨修復は血清 E2 濃度に依存する

野生型マウスの雌の各時点 (術後 2 週、4 週) のドリル骨孔部 BMD は雄に比べて有意に高かった (図 1)。雌は、sham 群と比較して、OVX により術後 4 週の骨孔部 BMD は低下し、E2 投与により sham 群と同等にまで改善した。一方、雄は、sham 群と比較して、ORX により術後 4 週の骨孔部 BMD は低下し、T 投与により sham 群と同等にまで改善したが、E2 に変換されない DHT 投与では改善しなかった (図 6)。血清 E2 値は雌で有意に高く (図 4)、術後 4 週の骨孔部 BMD は血清 E2 値と相関したが、血清 T 値は術後 4 週の修復部 BMD と相関していなかった。(図 7)

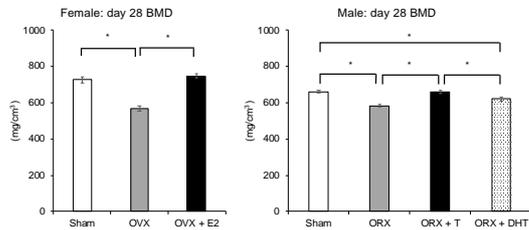


図6：骨修復に対する性ホルモンの影響

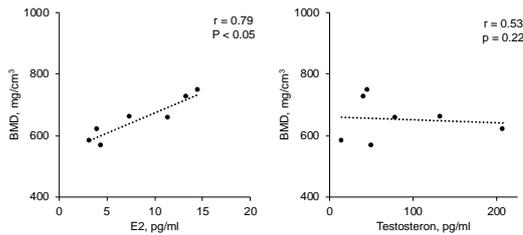


図7：骨孔部 BMD と血清 E2 または T 濃度との相関関係

<引用文献>

- Honold J, et al. Production and excretion of nitrate by human newborn infants: neonates are not little adults. Nitric Oxide. 2000 Feb;4(1):35-46.**
- Ralston SH, et al. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. J Bone Miner Res. 1995 Jul;10(7):1040-9.**
- van't Hof RJ, et al. Nitric oxide and bone. Immunology. 2001 Jul;103(3):255-61.**
- Moncada S, et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991 Jun;43(2):109-42.**
- Morishita T, et al. Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jul 26;102(30):10616-21.**
- Nakata S, et al. Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. Circulation. 2008 Apr 29;117(17):2211-23.**
- Sabanai K, et al. Genetic disruption of all NO synthase isoforms enhances BMD and bone turnover in mice in vivo: involvement of the renin-angiotensin system. J Bone Miner Res. 2008 May;23(5):633-43.**
- O'Shaughnessy MC, et al. Nitric oxide mediates 17beta-estradiol-stimulated human and rodent osteoblast proliferation and differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Nov 2;277(3):604-10.**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田北斗, 筒井正人, 中村英一郎, 佐羽内研, 塚本 学, 坂梨まゆ子, 岡田祥明, 酒井昭典
2. 発表標題 ドリル開孔術後のマウス大腿骨皮質骨の骨修復はメスがオスよりも良好である
3. 学会等名 第4回 黒潮カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田北斗, 筒井正人, 中村英一郎, 佐羽内研, 塚本 学, 坂梨まゆ子, 岡田祥明, 酒井昭典
2. 発表標題 ドリル開孔術後のマウス大腿骨皮質骨の骨修復はメスがオスよりも良好である
3. 学会等名 第37回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------