

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09513

研究課題名(和文)新規シグナル分子8-ニトロ-cGMPの骨リモデリングとその破綻における機能の解明

研究課題名(英文) Study on the physiological and pathological function of 8-nitro-cGMP in bone remodeling.

研究代表者

宮本 洋一 (Miyamoto, Yoichi)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：20295132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨の形態と強度は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成からなる骨リモデリングにより維持される。一酸化窒素(NO)と活性酸素種(ROS)の骨吸収・骨形成における役割には不明な点が多い。本研究では、NOとROSの下流シグナル分子として発見された8-ニトロ-cGMPの骨リモデリングにおける役割を明らかにするために、破骨細胞、骨芽細胞および骨細胞における同物質の生成および機能を解析した。破骨細胞、骨芽細胞および骨細胞は8-ニトロ-cGMPを生成した。8-ニトロ-cGMPは、破骨細胞分化を抑制し、骨芽細胞による石灰化を抑制したことから、骨リモデリングを骨吸収優位にするシグナル分子と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

8-ニトロ-cGMPが骨吸収を促進し、骨形成を抑制することが示唆された。生体内での8-nitro-cGMPの生成経路、シグナル伝達様式および不活性化経路は、すでに明らかになっている。骨粗鬆症では、骨吸収が骨形成に対して優位になることで骨量が減少する。8-ニトロ-cGMPの生成を抑制あるいは不活性化を促進することで、骨吸収を抑制し、骨形成を促進できれば、骨粗鬆症の病態を改善できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Bones' shape and mechanical strength are maintained through bone remodeling composed of bone resorption by osteoclasts and bone formation by osteoblasts. The roles of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) in bone remodeling have not been fully clarified. In this study, we examined the production and function of 8-nitro-cGMP, a novel signaling molecule of NO and ROS, in osteoclasts, osteoblasts, and osteocytes. All the three types of cells examined produced 8-nitro-cGMP. 8-nitro-cGMP promoted osteoclast differentiation and suppressed mineralization by osteoblasts. These results indicate that 8-nitro-cGMP is a regulator that supports bone resorption and suppresses bone formation.

研究分野：生化学

キーワード：骨リモデリング 破骨細胞 骨芽細胞 一酸化窒素 活性酸素種

## 1. 研究開始当初の背景

骨の形態と強度は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返す骨リモデリングにより維持される。骨吸収が骨形成と比較して優位になると、骨量が減少する。骨リモデリングを調節する因子のひとつと考えられる一酸化窒素(NO)は、骨吸収抑制と骨形成促進により骨粗鬆症での骨量減少を抑制した。また、NOによる骨芽細胞の増殖・分化の促進と破骨細胞分化誘導因子RANKLの発現低下が報告されている。NOには、破骨細胞分化促進と抑制の報告もある。活性酸素種(ROS)は、破骨細胞分化の促進と骨密度の低下をもたらすと言われる。しかし、NOやROSは化学的・生物学的に不安定な物質のため、詳細な研究が難しかった。

連携研究者の赤池らは、NOとROSの細胞内下流シグナル分子として8-ニトロ-cGMPの生成を発見し、そのシグナル伝達機構として、タンパク質のシステイン(Cys-SH)残基のS-グアニル化(Cys-S-cGMP形成)によるタンパク質の機能改変を解明した(Sawa T et al., Nat Chem Biol 3:727-35, 2007)。さらに、遊離のCys-SHやグルタチオン(GSH)等のSH基に過剰にイオウ原子が結合したシステインパースルフィド(Cys-SSH)やグルタチオンパースルフィド(GSSH)等の活性イオウ分子種(RSS)による8-ニトロ-cGMPの分解・不活性化を明らかにした(Nishida M et al., Nat Chem Biol 8:714-24, 2012; Ida T et al., Proc Natl Acad Sci USA 111:7606-11, 2014)。また、Cys-SSH合成酵素も赤池らによって同定された(Akaike T et al., Nat Commun 8:1177, 2017)。我々は、これらの発見に基づき、従来からNOの関与が示唆されていた骨成長に関し、成長板軟骨で生じる8-ニトロ-cGMPが軟骨細胞の増殖促進により骨伸長を促すことを発見した(Hoshino M, Kaneko K et al., Free Radic Biol Med 110:63-71, 2017)。我々は、NOやROSによる骨リモデリングの調節が、8-ニトロ-cGMPの活性により説明できる可能性があると考えた。そこで、本研究計画提出前に予備実験を行い、外因性の8-ニトロ-cGMPが破骨細胞分化を促進し、骨芽細胞による石灰化を抑制することを観察した。

## 2. 研究の目的

8-ニトロ-cGMPが生理的・病的骨リモデリングを調節する内因性シグナル分子として機能するのか、機能するとしたら、それはどのような機序で骨リモデリングを調節するのかを明らかにしたいと考えた。これらを明らかにすることで、8-ニトロ-cGMPの生成・分解・活性発現の調節をすることで、種々の骨代謝疾患の新たな予防・治療方の開発に向けた基盤となる知見が得られる可能性がある。そこで本研究は、8-ニトロ-cGMPの骨リモデリングにおける役割を明らかにし、骨代謝疾患の発症機序の解明と治療戦略の基盤を提案することを目的とした。

## 3. 研究の方法

骨組織ならびにin vitro培養系の破骨細胞、骨芽細胞および骨細胞における8-ニトロ-cGMPの生成とタンパク質-S-グアニル化を8-ニトロ-cGMPおよびS-グアニル化タンパク質に対する抗体を用いて検出した。種々のサイトカイン類、副甲状腺ホルモン(PTH)、プロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)等を培養系に添加し、8-ニトロ-cGMPおよびS-グアニル化タンパク質の生成に対するこれらの液性因子の影響を解析した。

マウス骨髄マクロファージからの破骨細胞分化培養系、マウス初代培養骨芽細胞、マウス骨細胞株の培養系に化学合成8-ニトロ-cGMPあるいは8-ニトロ-cGMPのアンチドットとして活性イオウ分子種RSSを添加し、破骨細胞分化、骨芽細胞による石灰化、骨細胞によるスクレロスチン産生の変化を解析した。また、RSS産生酵素(CPERS/CARS2)のヘテロ遺伝子欠損マウスから分離した上記の細胞あるいはCPERS/CARS2の発現をRNA干渉で抑制した上記細胞における破骨細胞分化、骨芽細胞による石灰化、骨細胞機能に対するRSSの役割を解析することで、8-ニトロ-cGMPの機能を解析した。

## 4. 研究成果

破骨細胞分化過程における8-ニトロ-cGMPの生成および破骨細胞分化に対する8-ニトロ-cGMPの影響について検討した。今回の解析では、破骨細胞前駆細胞であるマウス骨髄マクロファージおよび破骨細胞で8-ニトロ-cGMPの生成が確認され、IL-1やTNF-などの炎症性サイトカインは、その生成を促進した(Kaneko K, et al., Nitric Oxide 72: 46-51, 2018)。マウス初代培養骨芽細胞も8-ニトロ-cGMPの生成しており、IL-1とTNF-の両方で刺激することで、その生成が促進された。さらに、マウス骨細胞様細胞株Ocy454細胞における8-ニトロ-cGMPの生成が検出できた。破骨細胞や骨芽細胞と異なり、Ocy454細胞では、炎症性サイトカインによる8-ニトロ-cGMP生成の亢進は認められなかった。一方、PTHおよびPGE<sub>2</sub>によって8-ニトロ-cGMPの生成が促進された(Nagayama K et al., In Vitro Cell Dev Biol Animal 55:45-51, 2019)。

外来性の8-nitro-cGMPは骨髄マクロファージからRANKL依存的な破骨細胞への分化を促進した。一方、ニトロ化されていないcGMPにはそのような活性は認められなかった(Kaneko K, et al., Nitric Oxide 72: 46-51, 2018)。骨芽細胞培養系に8-ニトロ-cGMPを添加したところ、骨芽細胞マーカーであるアルカリホスファターゼおよびオステオカルシンの発現および石灰化が抑制された。一方、8-プロモ-cGMPは、逆にアルカリホスファターゼおよびオステオカルシンの発現および石灰化を促進した。

Ocy454 細胞培養系に 8-ニトロ-cGMP を添加したが、PTH 存在下・非存在下におけるスクレロスチンあるいは RANKL の発現は変化しなかった。

8-ニトロ-cGMP の細胞内における分解・不活性化は、イオウ原子が複数連結したパースルフィドあるいはポリスルフィドなどの RSS との反応で開始されることが明らかとなっている。そこで、RSS ドナー ( $\text{Na}_2\text{S}_n$ ,  $n$  は 2-4) は RANKL 誘導性の破骨細胞分化を促進した。その強さは、S の鎖長が長いほど強かった。RANKL 添加 24 時間以内に発揮された。RSS の産生酵素 CPERS/CARS2 の遺伝子ヘテロ欠損マクロファージの破骨細胞分化は野生型に比べ抑制されていたが、 $\text{Na}_2\text{S}_4$  の添加で回復した。以上の結果から、RSS は 8-ニトロ-cGMP とは独立した機序で破骨細胞分化を促進する内因性因子と考えられた。また  $\text{Na}_2\text{S}_n$  の破骨細胞分化促進作用が RANKL 刺激 24 時間以内に発揮されたことから、RSS は破骨細胞分化の運命付けに関わることが示唆された。初代培養マウス骨芽細胞において、CPERS/CARS2 の遺伝子をノックダウンしたところ、骨芽細胞分化マーカーの発現が低下し、石灰化が抑制された。このことは、8-ニトロ-cGMP が骨芽細胞による石灰化を抑制したと矛盾しない。骨芽細胞においては、CPERS/CARS2 によって産生される RSS は 8-ニトロ-cGMP の不活性化を介して、石灰化を維持している可能性が考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takimoto R, Suzawa T, Yamada A, Sasa K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Sasama Y, Tanaka M, Kinoshita M, Ikezaki K, Ichikawa M, Yamamoto M, Shiota T, Kamijo R	4. 巻 162
2. 論文標題 Zoledronate promotes inflammatory cytokine expression in human CD14-positive monocytes among peripheral mononuclear cells in the presence of T cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunology	6. 最初と最後の頁 306-313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imm.13283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Izumida E, Suzawa T, Miyamoto Y, Yamada A, Otsu M, Saito T, Yamaguchi T, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Yoshimura K, Sasa K, Takimoto R, Uyama R, Shiota T, Maki K, Kamijo R	4. 巻 99
2. 論文標題 Functional analysis of PTH1R variants found in primary failure of eruption.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dent Res	6. 最初と最後の頁 429-436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0022034520901731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 笹清人, 吉村健太郎, 宮本洋一, 上條竜太郎	4. 巻 29
2. 論文標題 モノカルボン酸トランスポーターによる骨・軟骨代謝の調節	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 口腔組織培養学会誌	6. 最初と最後の頁 49-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto A, Takami M, Urano E, Nakamachi T, Yoshimura K, Yamada A, Suzawa T, Miyamoto Y, Baba K, Kamijo R	4. 巻 62
2. 論文標題 Lipopolysaccharide (LPS) inhibits ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2 and TGF-beta1 through IL-1beta production.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Oral Bioscience	6. 最初と最後の頁 44-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2020.01.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sugisaki R, Miyamoto Y, Yoshimura K, Sasa K, Kaneko K, Tanaka M, Itose M, Inoue S, Baba K, Shirota T, Chikazu D, Kamijo R	4. 巻 132
2. 論文標題 Possible involvement of elastase in enhanced osteoclast differentiation by neutrophils through degradation of osteoprotegerin.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.115216.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Imai H, Yoshimura K, Miyamoto Y, Sasa K, Sugano M, Chatani M, Takami M, Yamamoto M, Kamijo R	4. 巻 9
2. 論文標題 Roles of monocarboxylate transporter subtypes in promotion and suppression of osteoclast differentiation and survival on bone.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 15608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52128-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Manome Y, Suzuki D, Nishida R, Yamada A, Miyamoto Y, Funatsu T, Kamijo R	4. 巻 16
2. 論文標題 Immunotherapy for malignant tumor with focus on toll-like receptors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oral Sci Int	6. 最初と最後の頁 3-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/osi2.1011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagayama K, Miyamoto Y, Kaneko K, Yoshimura K, Sasa K, Akaike T, Fujii S, Izumida E, Uyama R, Chikazu D, Maki K, Kamijo R	4. 巻 55
2. 論文標題 Production of 8-nitro-cGMP in osteocytic cells and its upregulation by parathyroid hormone and prostaglandin E2.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	6. 最初と最後の頁 45-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11626-018-0304-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko K, Miyamoto Y, Tsukuura R, Sasa K, Akaike T, Fujii S, Yoshimura K, Nagayama K, Hoshino M, Inoue K, Maki K, Baba K, Chikazu D, Kamijo R	4. 巻 72
2. 論文標題 8-Nitro-cGMP is a promoter of osteoclast differentiation induced by RANKL.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nitric Oxide	6. 最初と最後の頁 46-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.niox.2017.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 宮本 洋一, 金子 児太郎, 上條 竜太郎	4. 巻 36
2. 論文標題 骨粗鬆症の酸化ストレス病態.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 837-842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Sasama Y, Yoshimura K, Miyamoto Y, Sasa K, Akaike T, Morita M, Matsunaga T, Shirota T, Kamijo R
2. 発表標題 Respiration using hydrogen sulfide promotes chondrocyte proliferation and bone growth.
3. 学会等名 第67回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oshio A, Miyamoto Y, Sasa K, Yamada A, Yoshimura K, Kamijo R
2. 発表標題 Gelated ozone suppresses osteoclast differentiation and periodontal bone loss.
3. 学会等名 第67回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyamoto Y, Tsukuura R, Akaike T, Morita M, Chikazu D, Kamiyo R
2. 発表標題 Promotion of osteoclast differentiation by reactive sulfur species.
3. 学会等名 1st International Conference on persulfide and sulfur metabolism in biology and medicine. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉崎リサ、宮本洋一、赤池孝章、近津大地、上條竜太郎
2. 発表標題 破骨細胞分化は活性イオウ分子種によって促進される
3. 学会等名 第19回 日本NO学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子児太郎、宮本洋一、赤池孝章、杉崎リサ、小川 隆、近津大地、上條竜太郎
2. 発表標題 8-NO2-cGMPによる骨芽細胞分化の抑制と破骨細胞分化の促進
3. 学会等名 第19回 日本NO学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉田恵理、須澤徹夫、山口徹太郎、宮本洋一、上條竜太郎、榎 宏太郎
2. 発表標題 原発性萌出不全特異的iPS細胞を用いた同疾患発症機序の解明
3. 学会等名 第29回 日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村健太郎、宮本洋一、笹清人、山田篤、茶谷昌宏、高見正道、上條竜太郎
2. 発表標題 歯周病性骨破壊に対するオゾンジェルの効果
3. 学会等名 第2回 オゾン医療・審美学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧本 玲子、宮本 洋一、山田 篤、須澤 徹夫、笹 清人、上條 竜太郎、代田 達夫
2. 発表標題 ビスホスホネートのヒト末梢血単核細胞に対する作用の解析
3. 学会等名 第65回 昭和大学学士会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井 裕子、吉村 健太郎、宮本 洋一、茶谷 昌宏、高見 正道、上條 竜太郎、山本 松男
2. 発表標題 破骨細胞におけるモノカルボン酸トランスポーター(MCT)の役割について
3. 学会等名 第65回 昭和大学学士会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子児太郎、宮本洋一、杉崎リサ、宇山理紗、赤池孝章、小川隆、近津大地、上條竜太郎
2. 発表標題 レドックス・シグナルによる骨リモデリングの調節 - 8-Nitro-cGMPによる破骨細胞分化促進と骨芽細胞分化抑制 - .
3. 学会等名 第33回日本酸化ストレス学会関東支部会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片岡真理江、宮本洋一、金子児太郎、赤池孝章、近津大地、馬場一美、上條竜太郎
2. 発表標題 新規シグナル分子8-ニトロ-cGMPは骨の成長を促進した。
3. 学会等名 第33回日本酸化ストレス学会関東支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉崎リサ、宮本洋一、笹清人、吉村健太郎、山田篤、宇山理紗、須澤徹夫、近津大地、赤池孝章、上條竜太郎
2. 発表標題 活性イオウ分子種は破骨細胞分化を促進する。
3. 学会等名 第33回日本酸化ストレス学会関東支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長山和弘、宮本洋一、吉村健太郎、赤池孝章、藤井重元、上條竜太郎
2. 発表標題 骨細胞様細胞における8-nitro-cGMPの生成と機能。
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学歯学部 口腔生化学講座 <a href="http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/index.html">http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/index.html</a> 昭和大学h歯学部口腔生化学講座 <a href="http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/">http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/</a>
--

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
---------	---------