

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591074
 研究課題名（和文） カルシニューリン調節蛋白を介した甲状腺ホルモンの骨形成・代謝に及ぼす作用
 研究課題名（英文） Effect of thyroid hormone on bone formation and metabolism by regulating the expression of the calcineurin-regulating protein
 研究代表者
 村田 善晴（Murata Yoshiharu）
 名古屋大学・環境医学研究所・教授
 研究者番号：80174308

研究成果の概要：

甲状腺ホルモン(T3)は骨の形成・代謝に大きな影響を及ぼす。T3により発現が増加する RCAN2 は、骨の形成・代謝にも重要な作用を及ぼすカルシニューリンの調節蛋白であることから、T3の骨に対する作用が RCAN2 発現調節を介するものであるかを検討した。その結果、新生仔期に於いては T3 が骨での RCAN2 発現を調節し、RCAN2 ノックアウトマウスで骨形成が遅延することが示された。したがって、新生仔期における T3 の骨形成に対する作用の一部は RCAN2 の発現調節を介していると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：甲状腺ホルモン、カルシニューリン、ノックアウトマウス、骨形成、骨代謝、RCAN2

1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモンが正常な骨の発達に不可欠であることは良く知られており、胎児期から小児期にかけての甲状腺機能低下症は、骨の発育および鉱化作用 (mineralization) の低下、骨年齢の遅延、骨端の形成不全をもたらす、著しい低身長など特徴的な体型を呈する結果となる。また、成人においても甲状腺ホルモンは骨代謝に影響を及ぼし、甲状腺機能亢進症患者では骨密度 (bone mineral density, BMD) が 12～15%減少すると報告されている。しかしながら、甲状腺ホルモンの骨形成および代謝に及ぼす作用の分子機構に関しては未だ解明されてい

ない部分が多い。

我々は、1996年、培養ヒト皮膚線維芽細胞において、その遺伝子発現が甲状腺ホルモン添加により転写レベルで増加する遺伝子、*ZAKI-4* のクローニングに成功した。そして、最近、*ZAKI-4* 遺伝子がコードする *ZAKI-4* 蛋白が、カルシニューリン (CN) の内因性調節因子であることが明らかにされた。このことから、*ZAKI-4* は、Regulator of Calcineurin2 (RCAN2) と新たに命名された。我々は、RCAN2 蛋白の生体内での機能を明らかにする目的で *RCAN2* 遺伝子のノックアウトマウス (*RCAN2*^{-/-}) の作製に着手し、2006年、その作製に世界で初めて成功した。

一方、我々は、RCAN2^{-/-}を作製するに当たり、ターゲティングベクターにβガラクトシダーゼ(LacZ)遺伝子を組み込み、RCAN2 遺伝子発現を胎生期より観察できるようにした。その結果、RCAN2 遺伝子は、これまでの報告のように、中枢神経系で早期に発現しているばかりでなく、骨でも胎生期より発現していることが示された。CNは、カルシウム/カルモジュリン依存性のフォスファターゼで、行動・学習など脳の機能に重要な作用を及ぼすことが知られているが、最近、CNが骨形成および代謝にも重要な役割を演ずることが報告された。そこで、我々は、活性型甲状腺ホルモン(T3)が RCAN2 発現調節を介して CN の活性を制御し、骨形成および代謝に作用するのではないかという機序を着想するに至った。

2. 研究の目的

(1) マウス骨組織における T3 の RCAN2 mRNA 発現に及ぼす作用

我々は T3 がヒト皮膚線維芽細胞および齧歯類の脳において RCAN2 mRNA の発現を促進することを報告してきた。しかしながら、T3 の RCAN2 mRNA 発現調節は、組織によって異なることから、骨組織において T3 が RCAN2 mRNA の発現を調節しているかは明かでない。そこで、新生仔および成獣マウスの骨組織における T3 の RCAN2 mRNA 発現に及ぼす作用を明らかにすることを目的とした。

(2) RCAN2^{-/-}の骨組織に於ける形態学的特徴骨の形成・発達および成獣における骨代謝に RCAN2 がどのように関わっているかを研究する目的で、RCAN2^{-/-}の骨組織を走査電顕による解析も含めて詳細な検討を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス骨組織における T3 の RCAN2 mRNA 発現に及ぼす作用

① 新生仔マウスの骨組織に於ける検討

妊娠 14 日目より出産まで ICR マウス母獣に甲状腺ホルモン合成阻害薬であるメチマゾール(MMI)を実験終了まで(生後 10 日, P10)経口投与し、甲状腺機能低下新生仔を得る(MMI 群, n=6-8)。一方、無処置の新生仔を Control 群(n=8)とした。P10 のマウスより、扁平骨である頭蓋冠、および長幹骨である脛骨・腓骨を取り出し、RNA を抽出、リアルタイム PCR により RCAN2 mRNA を定量した。

② 成獣マウス骨における RCAN2 mRNA の発現に及ぼす甲状腺機能の影響

生後 10 週齢の ICR マウスを 3 群に分けた。即ち、MMI 経口投与で甲状腺機能低下にした群(Hypo 群)、T3 のプロホルモンである T4 を腹腔内投与(一回につき 4 μg を週 2 回)し、甲状腺機能亢進状態とした群(Hyper 群)及び、

vehicle のみを T4 投与同様のスケジュールで腹腔内投与した群(Control 群)とした。以上の処置を 4 週間続けた後、頭蓋冠、脛骨・腓骨を取り出し、RT-PCR により RCAN2 mRNA の発現を検討した。なお、①および②では共にそれぞれの群で計画通りの甲状腺機能が得られたか否かは、下垂体における TSH β mRNA 発現量を測定し、確認した。

(2) RCAN2^{-/-}の骨組織に於ける形態学的特徴 RCAN2^{-/-} の遺伝背景を均一化するために、近交系マウス(C57BL/6J)への戻し交配を行い、本実験には N6 または N7 の野生型(WT)、ヘテロ接合体(RCAN2^{+/-}, HET)、及びホモ接合体(RCAN2^{-/-}, HOZ)を用いた。生後 1 日目(P1)のマウスは頸椎脱臼で屠殺後、直ちに 70%エタノールで全体を固定した。P28 及び P112 のマウスは、四肢を分離後、一部はホルマリン固定後 70%エタノール中で保存し、その他の部位は直接 70%エタノール中で固定・保存した。これらの固定骨標本に対し、以下に述べる解析を加えた。なお、すべての群でマウス 4 匹(n=4)を解析に供した。

① 骨の形成・発達に関する解析

P1 マウスより得られた標本の軟骨部をアルシヤンブルーで、骨部をアリザリンレッドで染色後解析した。

② 骨端軟骨板の発達

成長期にあるマウス(P28)の骨端部をアルシヤンブルー及びアリザリンレッド染色して解析した。

③ 成体長幹骨の走査電顕による構造解析

P112 マウスの大腿骨遠位端および、脛骨近位端を反射電子型走査電顕で観察し、皮質の厚さ及び骨梁の構造を解析した。

④ 骨のミネラル含量の解析

P28 と P112 の上腕骨及び椎体骨を Faxitron X 線で解析し、ミネラル含量を定量した。

⑤ 破骨細胞による骨吸収

P112 の長幹骨及び扁平骨を用いて反射電子型走査電顕及び TRAP 染色により、破骨細胞活性とこれによる骨吸収像を解析した。

以上の骨組織に対する形態学的解析はこの技法に精通しているロンドンインペリアルカレッジの Graham R. Williams 教授の協力を得て行った。

4. 研究成果

(1) マウス骨組織における T3 の RCAN2 mRNA 発現に及ぼす作用

① 新生仔マウスの骨組織に於ける検討

Control 及び MMI 各群の甲状腺機能を確認するため下垂体 TSH β mRNA を定量したところ、MMI 群では Control 群の 20 倍以上に増加しており、MMI 群の各個体は著明な甲状腺機能低下症となっていることが確認された。図 1 に示すように、RCAN2 mRNA の発現は MMI 群では

有意に低下していることが明らかとなった。従って、ヒト皮膚線維芽細胞で観察されたと同様、新生仔期には T3 が RCAN2 の発現を促進することが示唆された。一方、図 2 に示すように、MMI 群の脛骨近位端においては、2 次骨化中心形成が認められず、骨芽細胞の成熟が著しく遅延していることが示された。事実、骨芽細胞機能を反映する osteocalcin, RNCL, 及び Indian hedge hog の各 mRNA の発現も MMI 群では著明に低下していることが確認された。

図 1 新生仔マウス (P10) の骨組織に於ける RCAN2 mRNA の発現に及ぼす甲状腺機能の影響

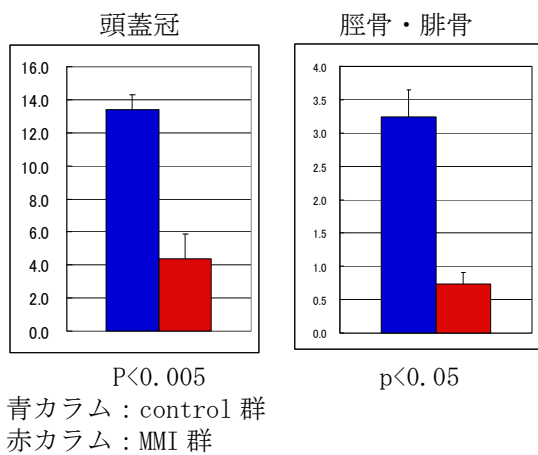
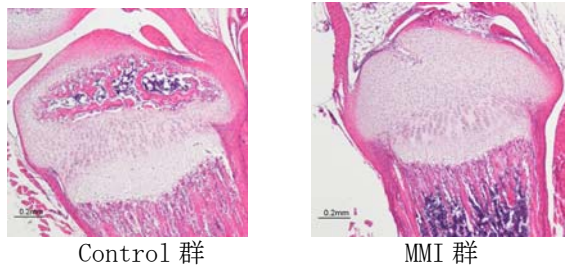


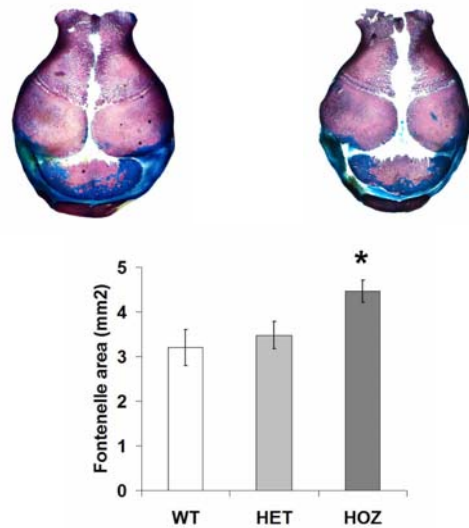
図 2 脛骨近位端の組織所見 (HE 染色) P10



② 成獣マウス骨における RCAN2 mRNA の発現に及ぼす甲状腺機能の影響

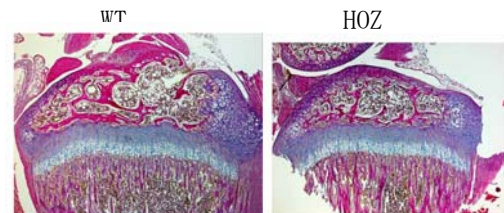
下垂体 TSH β mRNA の発現、および TSH でその発現が誘導されるナトリウム・ヨード共輸送体 (NIS) mRNA を RT-PCR で検討した結果、その発現は Hypo 群で高く、Hyper 群では低下していたことから、甲状腺機能は計画通りのものが得られたと判断出来た。RCAN2 mRNA の発現は、頭蓋冠、及び脛骨・腓骨で脳の視床下部での発現に比べて非常に低く、Control, Hyper, Hypo の各群において、その発現に有意さが認められなかった。従って、RCAN2 mRNA の発現は、新生仔期では甲状腺機能状態に応じて変化するものの、成獣ではその発現自体が非常に低く、甲状腺機能に応じた変化は示さないことが明らかとなった。

(2) RCAN2^{-/-}の骨組織に於ける形態学的特徴
① 骨の形成・発達に関する解析 (図 3)



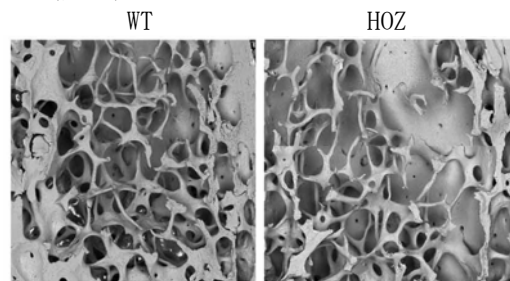
新生仔 (P1) 頭蓋冠に対する解析結果を上図 (図 3) に示した。HOZ (RCAN2^{-/-}) における泉門は有意に拡大しており、この結果より、HOZ では、膜性骨化が遅延していることが明らかとなった。

② 骨端軟骨板の発達 (図 4)



P28 マウス脛骨において検討した結果、骨端軟骨板の発達は、WT と HOZ の間に有意な違いは見られなかった。

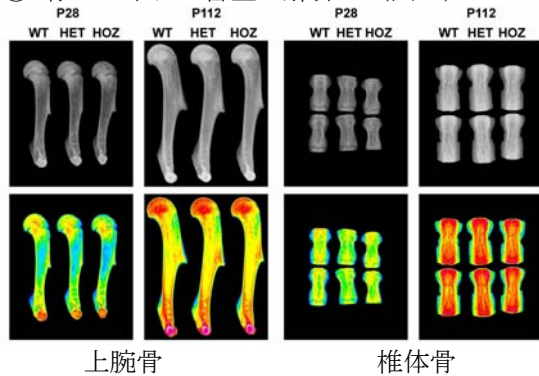
③ 成体長幹骨の走査電顕による構造解析 (図 5)



反射電子型走査電顕を用いて、P112 大腿骨遠位部及び脛骨近位端の骨の微細構造を解析した。その結果、成獣マウス長幹骨の微細構造は、WT と HOZ の間で有意な差は認められな

かった。図5には大腿骨遠位部の解析結果を示した。

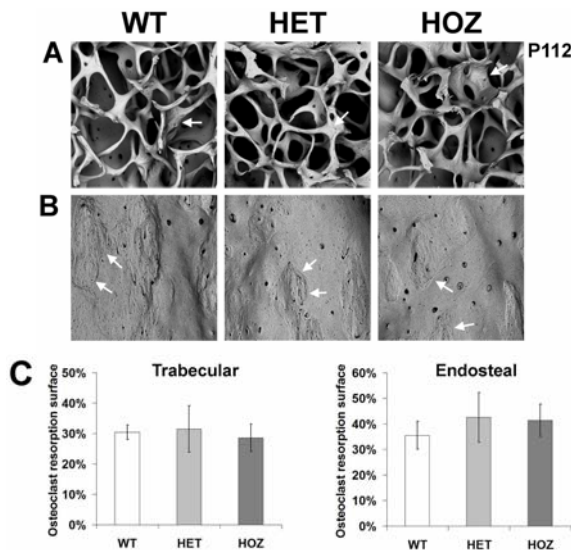
④ 骨のミネラル含量の解析 (図6)



P28 と P118 の上腕骨及び椎体骨を Faxitron X 線で解析し、ミネラル含量を定量した。その結果、P112 HET に於いて骨ミネラル含量が増加する傾向を示したものの、WT と HOZ との間には有意な差は見られなかった。

⑤ 破骨細胞による骨吸収

(図7A: 梁柱 B: 骨内膜 C: 吸収面積)



P112 の長幹骨及び扁平骨を用いて反射電子型走査電顕により骨吸収面の面積を解析した。図7に示すように、骨吸収面(矢印)の面積は3群で差は認められなかった。また、TRAP染色により破骨細胞活性を検討したが、これも有意な差は認められなかった。

(3) 研究成果の総括

RCAN2 mRNA の骨に於ける発現と甲状腺機能との関連を検討したところ、新生仔期においては、RCAN2 mRNA の骨に於ける発現は、甲状腺機能低下マウスで有意に低下していたことから、甲状腺ホルモンは *in vivo* の骨組織に於いても RCAN2 mRNA の発現を促進すること

が示唆された。一方、成獣マウスの骨組織では、RCAN2 mRNA の発現は非常に低く、甲状腺機能の変化に応じた変動も示さなかった。RCAN2 ノックアウトマウス骨の形成・発達、及び機能を形態学的に解析した結果、RCAN2 ノックアウトマウスにおいては扁平骨の骨形成が遅延することが明らかとなった。

以上の結果より、RCAN2 は、主として生後間もない新生仔期に骨の形成・発達に関与し、この時期に甲状腺ホルモン不足によりその発現が著しく低下することから、甲状腺機能低下症による骨形成・発達遅延の発症機構の一部に甲状腺ホルモンによる RCAN2 発現調節が関与している可能性が示唆された。

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5件)

1. Shi R, Lee J-K, Hayashi Y, Takeuchi Y, Kambe F, Futaki S, Seo H, Murata Y, Kodama I: Long-term amiodarone treatment causes cardioselective hypothyroid-like alteration in gene expression profile. *European Journal of Pharmacology* 578(2-3): 270-278, 2008. (査読有り)
2. Sun X-y, Chen Z-y, Hayashi Y, Kanou Y, Takagishi Y, Oda S, Murata Y: Insertion of an intracisternal A particle retrotransposon element in plasma membrane calcium ATPase 2 gene attenuates its expression and produces an ataxic phenotype in *joggle* mutant mice. *Gene* 411(1-2):94-102, 2008. (査読有り)
3. Sato N, Sugimura Y, Hayashi Y, Murase T, Kanou Y, Kikkawa F, Murata Y: Identification of genes differentially expressed in mouse fetuses from streptozotocin-induced diabetic pregnancy by cDNA subtraction. *Endocrine Journal* 55(2): 317-323, 2008. (査読有り)
4. Kanou Y, Hishinuma A, Tsunekawa K, Seki K, Mizuno Y, Fujisawa H, Imai T, Miura Y, Nagakawa T, Yamada C, Ieiri T, Murakami M, Murata Y: Thyroglobulin gene mutations producing defective intracellular transport of thyroglobulin are associated with increased thyroidal type 2 iodothyronine deiodinase activity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92(4): 1451-1457 2007. (査読有り)
5. Takagishi Y, Hashimoto K, Kayahara T, Watanabe M, Otsuka H, Mizoguchi A, Kano M, Murata Y: Diminished climbing fiber innervation of Purkinje cells in the cerebellum of myosin Va mutant mice and

rats. *Developmental Neurobiology* 67(7) : 909-923, 2007 (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

1. 加納安彦, 早坂 静, 孫 暁陽, 唐 亜平, 高岸芳子, 林 良敬, 村田善晴: 甲状腺ホルモン応答性遺伝子 ZAKI-4 の脳発達過程における発現と高次機能における役割: ZAKI-4 ノックアウトマウスを用いた検討. 第 80 回日本内分泌学会学術総会 (シンポジウム), 2007 年 6 月 14 日, (東京)
2. Takagishi Y, Sun X-y, Hayashi Y, Murata Y: Altered expression and distribution of mRNA-binding motif protein 3 (RBM3) in the brain of myosin Va null mutant rats. Society for Neuroscience, 2007, 11 月 4 日 (San Diego, California, U.S.A.)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 善晴 (MURATA YOSHIHARU)

名古屋大学・環境医学研究所・教授
研究者番号: 80174308

(2) 研究分担者

加納 安彦 (KANOU YASUHIKO)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号: 50252292
高岸 芳子 (TAKAGISHI YOSHIKO)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号: 50024659
林 良敬 (HAYASHI YOSHITAKA)
名古屋大学・環境医学研究所・准教授
研究者番号: 80420363
神部福司 (KAMBE FUKUSHI)
名古屋大学・環境医学研究所・准教授
研究者番号: 00211871

(3) 連携研究者: なし

(4) 研究協力者

Graham Williams
インペリアルカレッジロンドン校・教授