

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09577

研究課題名(和文) 明らかな骨量減少をきたすItp1遺伝子トラップマウスの機能解析

研究課題名(英文) Itp1-deficient mice show reduced viability and birth rate with bone loss.

研究代表者

山口 洋一郎 (Yamaguchi, Yoichiroh)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：70822005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：現代の超高齢社会における健康寿命延伸のために、骨粗鬆症等のロコモティブシンドロームの病因病態解明は急務であり、我々は可変的な遺伝子トラップ法を用いて骨軟骨に異常をきたす新規遺伝子群のモデルマウスライブラリーを構築している。その中で著明な骨量減少を認めたInositol 1,4,5-triphosphate receptor type1(Itp1)遺伝子欠損トラップマウス解析を行ってきた。この遺伝子は細胞内Caチャンネルを介してアポトーシス・オートファジーをコントロールしていると考えられ、機能不全により著明な骨芽細胞・破骨細胞のアポトーシスをきたしているものと推測される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦で1300万人が罹患していると考えられるロコモティブシンドロームの病因・病態解析のため、著明な骨量減少を認めたInositol 1,4,5-triphosphate receptor type1(Itp1)遺伝子欠損トラップマウス解析をおこなった。これはロコモティブシンドロームの一因となる骨粗鬆症の病態を解明することでその新規治療法を開発するための礎となる研究である。

研究成果の概要(英文)：To extend healthy life expectancy in today's hyper-aged society, there is an urgent need to clarify the etiology of locomotive syndromes such as osteoporosis. We have been analyzing trap mice deficient in the Inositol 1,4,5-triphosphate receptor type1 (Itp1) gene, which has been shown to cause significant bone loss. Itp1 is thought to control apoptosis and autophagy via intracellular Ca channels, and its dysfunction is thought to cause significant apoptosis of osteoblasts and osteoclasts.

研究分野：骨軟骨代謝

キーワード：骨粗鬆症 骨軟骨代謝異常 細胞内カルシウム濃度調整

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

我々は骨粗鬆症などのロコモティブシンドロームの病因・病態解明のために、『可変型遺伝子トラップ法』により樹立した変異マウス系統を用いて、骨軟骨代謝に関する新規遺伝子探索の効率的なスクリーニングを実施している。我々はそれらトラップクローンデータを独自のデータベース『EGTC』(Database for the Exchangeable Gene Trap Clones, <http://egtc.jp>)に公開し、骨軟骨代謝に異常をきたすモデルマウスライブラリーを世界に先駆けて構築中である(平成 26-29 年度: 科研費基盤研究 C, No26462305, 平成 30-32 年度: 科研費基盤研究 C: No18K09035)。そのライブラリーマウスの中で、*Itpr1* (*inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1*) 遺伝子欠損マウスは、骨軟骨スクリーニングにおいて明らかな骨量減少、骨強度低下、骨軟骨組織発現を示す骨表現型を呈していた。したがって、*Itpr1* は骨代謝において重要な機能を担っている可能性が高いと推測される。*Itpr1* は小胞体の Ca チャネルに関する報告はあるが(Burgess, 1984)、これまで *in vivo/vitro* での骨代謝における機能について報告例はない。そこで本研究では *Itpr1* 欠損マウスを用いて、*Itpr1* 遺伝子の骨代謝を中心とした詳細な機能解析を目的とし、将来の骨粗鬆症治療への可能性を見据えて計画を遂行する。

2. 研究の目的

今回我々が作製した *Itpr1* 欠損マウスは、骨軟骨スクリーニングで明らかな骨量減少、骨強度低下を示す骨表現型を呈していた(図 1, 2)。したがって、*Itpr1* は骨代謝において重要な機能を担っている可能性が高いと推測される。*Itpr1* はイノシトール三リン酸受容体タイプ 1 のことで、主に MAM(mitochondria-associated membrane)と呼ばれるミトコンドリア・小胞体接着面に存在し、IP3 の結合によって活性化され Ca イオン放出を行うチャネルであるが(Burgess, 1984; Matsumoto, 1999)、これまでに *in vivo* で *Itpr1* の骨代謝における機能について報告例はない。そこで本研究では *Itpr1* 欠損マウスおよび各種培養細胞を用いて、骨代謝を中心とした *Itpr1* 遺伝子の機能を詳細に解析した。

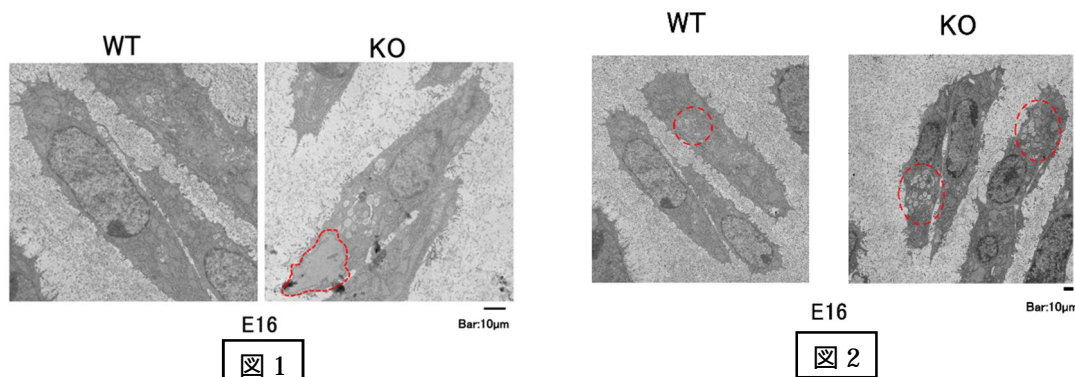
3. 研究の方法

研究設備、機器として μ CT およびそのデータ解析システムを使用した。また、力学試験装置およびリアルタイム PCR 装置を利用した。トラップマウスは前述の EGTC データベース上のマウス胚細胞を利用した。その他後述の研究解析に必要な機器は学内に設置されているものを利用し研究を行った。

4. 研究成果

我々は *Itpr1* 欠損マウスおよびその初代骨芽細胞を解析した。また、siRNA を用いたノックダウン実験も並行して実施した。

胎生 16 日でサンプリングしたエンブリオの細胞ではノックアウトマウスには膨張した小胞体が確認でき(図 1)、小胞体ストレスの存在が示唆された。同時にオートファゴソームもノックアウトマウスで顕著に多く確認できた(図 2)。



TUNEL 染色では TUNEL 陽性細胞が多く認められたアポトーシスの存在が認められた(図 3)。アポトーシス細胞が多く認められる部位は骨幹端領域に多く、骨芽細胞・破骨細胞のアポトーシスが起きていることが示唆された。

MC3T3 の siRNA によるノックダウンも実施した。培養では siRNA を導入した細胞で有意に染色性の低下を認めた (図 4)。Real Time PCR ではオートファジー関連の遺伝子である JNK, IRE1, Beclin1, LC3a の上昇が認められた (図 5)。Itp1 はミトコンドリアの MAM 上に存在しているためミトコンドリア関連のオートファジー遺伝子である JNK への影響は強く関連が示唆された。また、小胞体ストレス関連の IRE1 でも顕著な差を認めたことから胎生期に認められた小胞体の形態異常もその結果を支持することとなった。

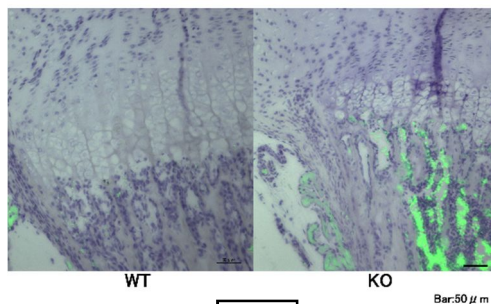


図 3

Itp1 はその機能が多種に及んでおり、その機能不全によりミトコンドリアへの Ca 刺激が障害されることでミトコンドリア内での ATP 産生が低下し、結果として飢餓ストレス状態となり AMPK 活性が上昇、オートファジーが誘導され細胞死に陥るといった報告がなされており、このパスウェイが今回の骨量減少の一因と考えられ、さらに real time PCR や TUNEL 染色の結果からアポトーシスパスウェイの関連も示唆された (図 6)。

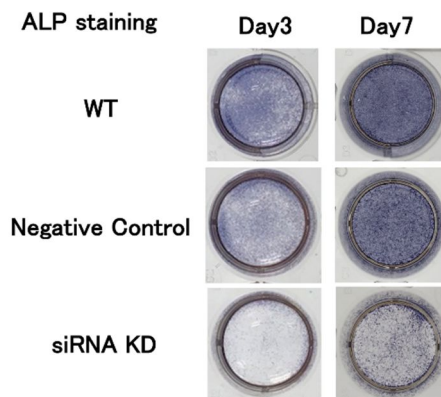


図 4

μCT で作製した全体骨格ではノックアウトマウスはワイルドに比して全体的に小さいが、明らかな骨格の異常は認められなかった (図 7)。CT から作成した BMD image ではノックアウトマウスで低値を示し、特に皮質骨密度が低い傾向にあった (図 8)。特に骨梁構造を構成する中で骨強度に大きくかかわる部分で異常が発生している可能性が示唆された。

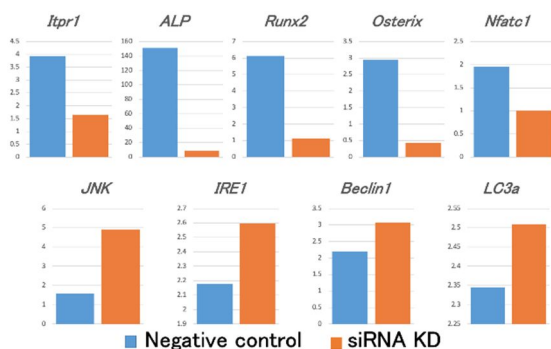


図 5

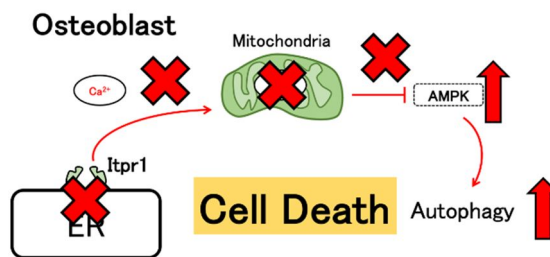


図 6



図 7

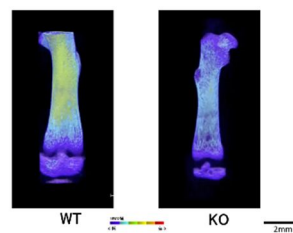


図 8

また、酸化ストレスによるアポトーシス・オートファジーも関連していると考え、予備実験を実施した。H2O2 によるストレス下で細胞ダメージの評価を行った (図 9)。

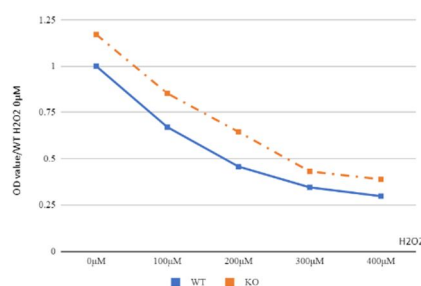


図 9

現在まで得られた知見をもとに追加実験を進めさらなる病態解明を目標に引き続き研究作業を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 洋一郎
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法で作製したItpr1遺伝子欠損トラップマウスは著明な骨量減少を呈する
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口 洋一郎、関本 朝久、永井琢哉
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法で作製したItpr1遺伝子欠損トラップマウスは著明な骨量減少を呈する
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術集会(パシフィコ横浜)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 洋一郎、関本 朝久、永井琢哉
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法で作製したItpr1遺伝子欠損トラップマウスは著明な骨量減少を呈する
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会(パシフィコ横浜)
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
研究分担者	帖佐 悦男 (Chosa Etsuo) (00236837)	宮崎大学・医学部・教授 (17601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	関本 朝久 (Sekimoto Tomohisa) (60305000)	宮崎大学・医学部・講師 (17601)	
研究分担者	田島 卓也 (Tajima Takuya) (80549056)	宮崎大学・医学部・助教 (17601)	
研究分担者	荒木 正健 (Araki Masatake) (80271609)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授 (17401)	
研究分担者	荒木 喜美 (Araki kimi) (90211705)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授 (17401)	

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