

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18511

研究課題名(和文) ミトコンドリア転写因子Aによるステロイド関連骨壊死の新しい予防法の開発

研究課題名(英文) New prevention of steroid-induced osteonecrosis with mitochondrial transcription factor A

研究代表者

植田 修右 (UEDA, Shusuke)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：10759583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイド関連大腿骨頭壊死症の原因として酸化ストレスの関与が報告されていることから培養骨細胞を同等の環境にし、細胞レベルでも酸化ストレスが発現していることを確認した。また、酸化障害の影響を受けやすいミトコンドリア転写因子A(TFAM)に注目し、培養骨細胞のTFAMをノックダウンさせ、TFAMが消失した状態ではミトコンドリアが消失し、ミトコンドリアの機能が保てないことを確認した。さらに、培養骨細胞にTFAMを付加させることで、骨壊死と同等の環境下においても酸化障害と骨細胞死が有意に低下したことが示された。このことから、ステロイド関連大腿骨頭壊死症においてミトコンドリア障害の関与が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ステロイド関連大腿骨頭壊死症は難治性疾患とされており、その機序解明や予防法の確立は非常に重要である。また、骨壊死が発生した場合不可逆性であり、骨頭の圧壊が発生してしまうと外科的な処置が必要になる。本研究は骨壊死においてミトコンドリアの関与を示しており、ミトコンドリアを保護することで骨壊死の治療や予防に期待できる。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress has been implicated as one of the causes of glucocorticoid-associated osteonecrosis of the femoral head. We have confirmed that oxidative stress is also expressed at the cellular level by creating an equivalent environment for cultured osteocytic cells. We also focused on mitochondrial transcription factor A (TFAM), which is susceptible to oxidative damage. By knocking down TFAM, we confirmed that mitochondria were not preserved, and mitochondrial function could not be maintained. Furthermore, the addition of TFAM to cultured osteocytes significantly reduced oxidative damage and osteocytic cell death in an environment equivalent to osteonecrosis. This suggests the involvement of mitochondrial dysfunction in glucocorticoid-associated osteonecrosis of the femoral head.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ステロイド関連大腿骨頭壊死症 ミトコンドリア転写因子A TFAM knockdown 酸化障害 骨髄由来間葉系幹細胞 ミトコンドリア障害 骨細胞死

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。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

優れた薬効作用を持つステロイド剤が大腿骨頭壊死を誘発することは大きな問題であり、ステロイド剤を安心して使用できるようにするためにステロイド関連大腿骨頭壊死症の予防法確立に対する社会的要望は大きい。その基盤となるステロイド関連大腿骨頭壊死症の発症機序の解明に関する研究が精力的に行われきたが、詳細な分子機構や予防法の確立には未だ至っていない。ステロイド剤による大腿骨頭壊死発生機序には、ステロイド自身の骨細胞への影響と血管障害による低酸素の2つの因子を考慮する必要があった。そのため培養骨細胞(MLO-Y4)を用いて、骨細胞壊死におけるステロイドによる細胞自身に対する障害と低酸素の影響を実証した。さらに、骨細胞壊死にかかわる低酸素負荷の程度とステロイド投与時期のより詳細な関係を明らかにすることが重要な課題となった。

ミトコンドリアDNAは酸化障害に対し非常に脆弱であるとともに、酸化障害をうけたミトコンドリアDNAはミトコンドリアゲノム異常をきたし、細胞の生存と機能に重大な支障をきたす。ステロイド投与に伴う酸化障害や酸化ストレスの発生を報告しており、ステロイド関連大腿骨頭壊死症にもミトコンドリアの酸化障害が関与していると考えられた。ミトコンドリア転写因子A(TFAM)はミトコンドリアDNAの修復機能を有し、細胞の生存や機能に重要な役割を果たしているミトコンドリアDNAの維持や安定化に寄与し、ミトコンドリアDNA障害に起因する細胞死に影響を与えると報告されている。すなわち、ミトコンドリアDNAの維持や安定化に寄与するTFAMをノックダウンしてミトコンドリアの機能と細胞死の関係を解明することができればTFAM付加による骨細胞壊死の予防が可能となる。そこで、TFAMのミトコンドリアDNA障害に対する修復機能についての検討が重要な課題となった。また、*in vivo*での動物モデルを使用した検証も研究課題となった。

### 2. 研究の目的

ステロイド関連大腿骨頭壊死症の病態や治療、予防法に関しては確立した見解は得られていない。虚血が主要原因と考えられており、酸化ストレスの関与も注目されている。そこで、培養骨細胞を用いてステロイドによる骨細胞の壊死が低酸素負荷により促進されることを実証した。ミトコンドリア転写因子A(TFAM)は酸化障害をうけやすく、その障害は細胞の生存と機能に重大な支障をきたす。TFAMはミトコンドリアDNAを修復する機能を有し、細胞傷害の抑制効果が報告されている。本研究では、培養骨細胞を用いて、骨細胞壊死を惹起する低酸素負荷とステロイド投与時期の詳細な関係を明らかにするとともにTFAMを用いた骨細胞壊死阻止に向けた基礎データを収集した。さらに、*in vitro*における培養骨細胞MLO-Y4を用いてTFAM付加による骨細胞壊死の抑制効果を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 低酸素負荷量とステロイド投与時期の骨細胞壊死に関わる詳細な相互関係の解明のためにステロイドを添加する期間、低酸素環境の持続時間を経時的に変え、骨細胞壊死数を比較した。

#### Cell culture

Murine Osteocyte-like Cell Line MLO-Y4: kerfast (USA)より入手。マウス由来の培養骨細胞。細胞は型コラーゲンコートedのディッシュ(BD Biosciences, Bedford, USA)に2.5%FBS、2.5%FCS、ストレプトマイシン、ペニシリンを加えたMEMで培養。低酸素負荷のために94%N<sub>2</sub>に5%CO<sub>2</sub>と1%O<sub>2</sub>に設定したインキュベーター(Astec, Fukuoka, Japan)で細胞を培養した。

#### Cell viability assay

MLO-Y4を型コラーゲンコートした4チャンバーカルチャースライド(BD Biosciences, Bedford, USA)でオーバーナイト培養し、1 μM デキサメサゾン(Dex)(MSD, Tokyo, Japan)を添加した群、低酸素環境下(1% O<sub>2</sub>)で培養した群に分け、培養時間はそれぞれ6時間(6h群)、9時間(9h群)、12時間(12h群)、24時間(24h群)、48時間(48h群)、72時間(72h群)で培養する。測定方法はマニュアルに則ってApoptotic/Necrotic Cells Detection Kit(PromoKine, Heidelberg, Germany)で染色し、総細胞数に対する細胞死数の割合を計測した。アポトーシス細胞はannexin V、ネクローシス細胞はEthidium homodimerで染色した。顕微鏡はAxiovert, A1 FL-LED(Carl Zeiss, Jena, Germany)を用い、蛍光陽性細胞をphase contrastと蛍光染色によって評価する。また、低酸素の指標であるHypoxia Inducible Factor-1(HIF-1)と酸化ストレスマーカーである8-Hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG)の免疫蛍光染色とwestern blotを行い、それぞれの低酸素と酸化障害の程度を評価した。対照群として、Dexを添加し、MLO-Y4を低酸素環境下(1% O<sub>2</sub>)でそれぞれの時間で培養した。

(2) ミトコンドリアDNA傷害修復作用を有するTFAMを骨細胞からノックダウンし、野生型細胞と比較することで骨細胞壊死とミトコンドリア障害の関連を明らかにし、TFAM付加による骨細

胞壊死阻止効果を評価した。siRNA TFAM の作製はリポフェクション法による siRNA 導入を行い、MLO-Y4 からミトコンドリア転写因子 A (TFAM) をノックダウンさせ、ミトコンドリア数や機能、膜電位消失によるアポトーシス細胞の有無について解析を行った。

野生型と TFAM をノックダウンした骨細胞をミトコンドリア標識プローブと、膜電位依存的に標識されるプローブを用いて比較する。TFAM のノックダウンによるミトコンドリアの数や機能の変化について解析し、ミトコンドリア DNA 傷害によるミトコンドリアの膜電位消失を確認した。

ミトコンドリア機能に関与する重要な酵素の 1 つである ATP 合成酵素 (ATP5A) の蛍光免疫染色・western blot による蛋白発現解析を行い、TFAM がミトコンドリア機能の一つである ATP 産生に関与しているかを検討した。

アポトーシスによるミトコンドリアの膜電位差の変化を蛍光検出できるキット (JC-1 mitochondrial membrane potential assay kit) を用いて、生細胞において野生型と TFAM をノックダウンした細胞群におけるアポトーシス細胞の蛍光検出を行った。

Dex を添加し、低酸素環境とする際に TFAM (LifeSpan BioSciences, Seattle, USA) を添加した (TFAM 群)。研究方法 (1) と同様の方法で培養し、Apoptotic/Necrotic Cells Detection Kit (PromoKine, Heidelberg, Germany) で染色し、総細胞数に対する細胞死数の割合を計測した。また、Dex を添加し、低酸素環境下 (1% O<sub>2</sub>) で培養した群を control 群とし、培養時間はそれぞれ 6 時間 (6h 群)、9 時間 (9h 群)、12 時間 (12h 群)、24 時間 (24h 群) で培養した。培養したものを酸化ストレスマーカーである 8-OHdG と低酸素の指標である HIF-1 を用いて免疫細胞化学的検討と Western blot 法 (WB) を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 低酸素下ステロイド付加骨細胞における酸化障害の関与の検討。

低酸素下での培養時間を変更し、細胞死数の増加の有無、同条件下での酸化障害の有無について検討した。

1 $\mu$ M デキサメサゾン を添加し、1% 低酸素下にて培養時間をそれぞれ 6 時間 (6h 群)、9 時間 (9h 群)、12 時間 (12h 群)、24 時間 (24h 群)、48 時間 (48h 群)、72 時間 (72h 群) で培養し、細胞死数を確認したところ、6h、9h、12h 群では細胞死数の変化はほとんど認めなかったが、24h 群では有意に細胞死数の増加を認めた。48h 群、72h 群は細胞自体が培地から遊離した状態がほとんどで、細胞死の評価ができない状況となった。

酸化ストレスマーカーである 8-OHdG と低酸素の指標である HIF-1 を用いて免疫組織化学的検討とウエスタンブロットを施行したところ、1% 低酸素下のみ、1 $\mu$ M デキサメサゾン添加のみでは 8-OHdG、HIF-1 とともにわずかに発現を認めたのみで、1% 低酸素環境下ステロイド添加骨細胞においてはともに発現の増強を認めた。

(2) 培養骨細胞 MLO-Y4 におけるミトコンドリア転写因子 A (TFAM) の機能解析。

リポフェクション法による siRNA 導入を行うことで、MLO-Y4 から TFAM をノックダウンさせ、TFAM を失った骨細胞のミトコンドリアの機能を検討した。

野生型と TFAM siRNA を western blot による蛋白発現解析を行い、TFAM siRNA の発現が消失していることを確認し、TFAM がノックダウンされていることを確認した。

野生型と TFAM ノックダウン骨細胞をミトコンドリア標識プローブと膜電位依存標識プローブを用いて比較し、TFAM ノックダウン骨細胞のミトコンドリア膜電位の消失とミトコンドリア機能の一つである ATP 産生の減少を認めた。

JC-1 を用いることで、TFAM siRNA によるミトコンドリア膜電位の消失が骨細胞のアポトーシスを発生させる要因であることが確認できた。

(3) 培養骨細胞 MLO-Y4 におけるミトコンドリア転写因子 A (TFAM) の骨細胞壊死抑制効果。

24h 群にて TFAM 群は control 群と比較して免疫細胞化学的検討と WB とともに有意に酸化障害を抑制した。また培養した細胞を Apoptotic/Necrotic Cells Detection Kit (PromoKine, Heidelberg, Germany) を用いて染色し、総細胞数に対する細胞死数の割合を計測したところ、control 群と比較して apoptosis、necrosis とともに有意に細胞死が抑制された。

また TFAM の効果が骨細胞の特有の反応であるか評価するために培養腱細胞を用いて同様に検討を行った。しかし、腱細胞においては Dex を添加し、低酸素環境下で 24 時間培養したが、TFAM の発現の低下がほとんど認めなかったため比較検討できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 植田修右, 市堰 徹, 相馬大輔, 土屋雅信, 平田寛明, 兼氏 歩, 川原範夫	4. 巻 46
2. 論文標題 低酸素環境下ステロイド性骨細胞壊死に対するミトコンドリア転写因子Aによる細胞保護作用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hip Joint	6. 最初と最後の頁 34-37
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 無
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 植田修右, 市堰 徹, 兼氏 歩	4. 巻 40
2. 論文標題 ステロイド関連骨壊死に対する病態研究の最新情報	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 関節外科	6. 最初と最後の頁 1261-1265
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 無
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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植田修右, 市堰 徹, 相馬大輔, 平田寛明, 川原範夫
2. 発表標題 ミトコンドリア転写因子Aは低酸素環境下ステロイド性骨細胞壊死を抑制する
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市堰 徹, 植田修右, 相馬大輔, 平田寛明, 島崎 都, 上田善道, 川原範夫
2. 発表標題 ステロイド誘発骨壊死環境下における骨細胞と間葉系幹細胞のミトコンドリア機能
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植田修右, 市堰 徹, 相馬大輔, 平田寛明, 川原範夫
2. 発表標題 骨髄由来間葉系幹細胞の全身投与における傷害部位へのhoming およびステロイド性骨壊死の予防
3. 学会等名 第58回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植田修右, 市堰 徹, 相馬大輔, 土屋雅信, 平田寛明, 川原範夫
2. 発表標題 ステロイド添加骨細胞の酸化ストレスによるミトコンドリア障害
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植田修右, 市堰 徹, 相馬大輔, 土屋雅信, 平田寛明, 兼氏 歩, 川原範夫
2. 発表標題 低酸素環境下ステロイド添加骨細胞におけるHIF1- とミトコンドリア障害
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 植田修右, 市堰 徹, 相馬大輔, 土屋雅信, 平田寛明, 兼氏 歩, 川原範夫
2. 発表標題 低酸素環境下ステロイド性骨細胞壊死に対するミトコンドリア転写因子Aによる細胞保護作用
3. 学会等名 第46回日本股関節学会学術集会
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
---------	---------