

機関番号：12605
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590053
 研究課題名（和文） 骨粗鬆症の発症におけるコラーゲン分解と
 3型コラゲナーゼ/MMP13の関与
 研究課題名（英文） Roles of Collagenase-3/MMP13 for Collagenolysis in
 On-set Osteoporosis
 研究代表者
 稲田 全規 (INADA MASAKI)
 東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
 研究者番号：80401454

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、骨に発現する3型コラゲナーゼであるMMP13遺伝子欠損マウスを用いた、骨リモデリングと骨疾患への関与を検討した。骨粗鬆症モデルを用いた検討において、MMP13KOマウスでは野生型マウスに比して、骨破壊が抑制される可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This proposal investigated roles of bone cell expressed collagenase 3 on bone remodeling and its related diseases using MMP13 gene deficient mice (MMP13KO). In the mouse models of osteoporosis, the result indicates suppressive phenotypes of bone resorption in MMP13KO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：骨粗鬆症、病態生理学、マトリックス、コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は骨破壊の進行によって四肢脊椎の骨折をきたし、寝たきりや要介護者の増加の主因となる骨の病気である。罹患者は1100万人を超え、本疾患の発症機序の解明は急務である。特に、更年期の女性の性ホルモン欠乏に起因する骨破壊は急速であり、骨折の頻度とコラーゲン分解は疫学的に正の相関を示す。しかし、エストロゲン欠乏によるコラーゲン代謝と骨破壊・骨質低下の関係は不明である。そこで、本研究では、コラーゲンの分解酵素であるコラゲナーゼを欠損させたMMP13KOマウスにエストロゲン欠乏を誘導し、骨粗鬆症の発症における骨吸収と

コラーゲン分解の関与を調べる着想に至った。骨の破壊において、破骨細胞によるヒドロキシアパタイトの溶解が必須であることは既知である。一方、基質であるコラーゲン分解の機序は不明な点が多い。骨粗鬆症の患者では、コラーゲンの分解産物であるI型コラーゲンのN及びC末端ペプチドの尿中レベルが上昇し、有効な臨床診断マーカーとして頻用されている。しかし、コラーゲン分解が骨粗鬆症の発症に必須であるか否かは不明であった。

研究開始にあたり、申請者らはMMP13KOマウスの解析により、発症期における内軟骨性骨化における血管侵入に伴った骨髄形成

が遅延すること、また、II型コラーゲンを多く含む軟骨層の異常過形成を見出し、それらの表現型を論文報告した(Inada, M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101:17192-17197, 2004)。さらに、MMP13KOマウスの大腿骨を解析したところ、軟骨成長に連続する骨の成長に影響を及ぼし、短小かつ骨太な異常な骨の形態を示すことを明らかにした。これら骨の変形は成長軟骨板直下の海綿骨の著しい増加に伴い進行することから、MMP13が骨量維持や骨粗鬆症に関与すると考えられた。これら生物学的表現型はコラーゲン代謝が抑制されるMMP13KOマウスでは、コラーゲン新陳代謝の不全により、エストロゲン誘導性の骨吸収が起りにくく、骨量が維持されることが考えられた。そこで、本研究課題では、MMP13KOマウスを用いてエストロゲン欠乏マウスを作製し、骨粗鬆症の発症における骨吸収亢進、コラーゲン分解、及び骨強度変化におけるMMP13の役割を解析した。

2. 研究の目的

- (1) MMP13KOマウスの骨組織の解析を行い、生理的な骨代謝及び骨リモデリングにおけるコラーゲン代謝とMMP13の関与を明らかにする。
- (2) 破骨細胞及び骨芽細胞におけるコラーゲン分解とMMP13の関与を細胞生物学的に明らかとし、MMP13の欠損状態における骨吸収について培養系を駆使して機能解析する。
- (3) MMP13KOマウスにOVXを施し、骨粗鬆症の発症の有無を調べ、骨量と骨質の変化におけるMMP13の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MMP13の骨リモデリングへの関与の解析

①組織化学的解析：

MMP13遺伝子欠損による骨・軟骨の組織変化を明らかとするためマッソントリクローム染色やヘマトキシリン染色を施し、コラーゲナーゼ欠損における骨の形態学的な解析をおこなう。

②破骨細胞による骨吸収の機能解析：

MMP13KOマウスおよび野生型マウス由来の細胞を用いて破骨細胞の分化と機能を調べ、MMP13の骨吸収への関与を調べる。両マウスより骨髓細胞を採取し、骨吸収性サイトカインの存在下で、骨芽細胞との共存培養を行ない、破骨細胞の分化誘導を調べる。機能試験として、骨片、象牙質片を用いた培養により、骨吸収により形成される吸収窩の性状を調べ、MMP13KOマウス由来の破骨細胞の機能が低下しているか否かを解析する。

(2) 骨粗鬆症の発症におけるMMP13の関与

①卵巣摘出モデルを用いた骨粗鬆症モデル：

野生型およびMMP13KOマウスに卵巣摘

出を施し、骨粗鬆症モデルとして、エストロゲン欠乏性のOVXモデルを作製し、術後2週後、4週後に大腿骨を摘出し、DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry) 法を用いた骨量測定、マイクロCTを用いた骨の3次元構造解析を行う。

②卵巣摘出骨粗鬆症モデルを用いた3次元の骨形態計測：

野生型およびMMP13KOマウスに卵巣摘出を施し、3次元の骨形態計測を行い、骨量と骨構造の変化における特徴を判定する。

4. 研究成果

(1) MMP13KOマウスの骨組織の解析

①組織化学的解析

野生型マウスおよびMMP13KOマウスより大腿骨を摘出し、固定後に透徹操作を経てメタクリレート系レジンに包埋した。ダイヤモンドナイフを用いて薄切切片を連続的に作製し、同一部位の切片にヘマトキシリン-エオジン(HE)染色、マッソントリクローム染色を施した。その結果、エオジン陽性の骨組織の著しい増加が野生型マウスに比してMMP13KOマウスで観察された(図1)。

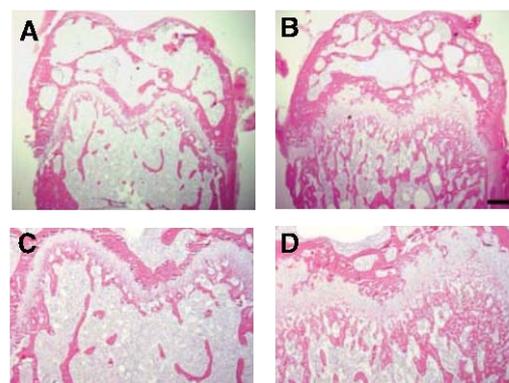


図1. ヘマトキシリン-エオジン染色による骨の組織化学的染色による解析：Wtマウス由来大腿骨(A,C)、MMP13KOマウス由来大腿骨(B,D) 下段は拡大視野

また、MMP13KOマウスでは、骨量の増加により、ヘマトキシリン陽性で好塩基性の血球細胞が、減少した骨髓腔に認められた。成長軟骨部位の肥厚も認められ、コラーゲナーゼの機能不全による、骨・軟骨マトリックス代謝の低下が示唆された。マッソントリクローム染色の結果では、新生コラーゲンの増加が確認され、骨形成の増加が示唆される組織像が認められた。

②破骨細胞による骨吸収の機能解析：

MMP13KOマウスおよび野生型マウス由来の骨髓細胞と骨芽細胞を象牙質上に共存培養し、PTH処理による破骨細胞の誘導によるPit Assayを検討した。象牙質は培養後に破

骨細胞が骨吸収にて形成する骨吸収窩をヘマトキシリン染色により観察した。野生型マウス由来の共存培養系では種々の大きさの骨吸収窩が観察され、連続的な破骨細胞の骨吸収が認められた一方、MMP13KO マウスでは、少数の不連続な骨吸収窩が観察され、破骨細胞による骨吸収の機能低下が観察された (図2)。

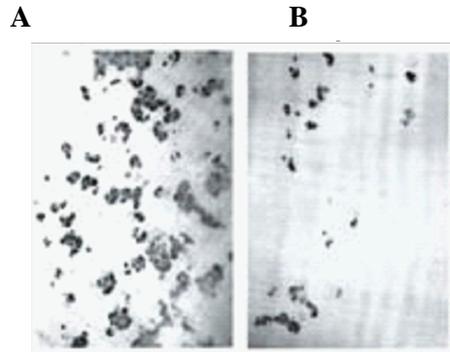


図2 象牙片を用いた骨吸収試験: 破骨細胞による骨吸収窩の検出: Wt マウス由来破骨細胞 (A)、MMP13KO マウス由来破骨細胞 (B)

(2) 骨粗鬆症の発症における MMP13 の関与

① 卵巣摘出モデルを用いた骨粗鬆症モデル:

卵巣摘出 (OVX) を用いた閉経後骨粗鬆症モデルを野生型および MMP13KO マウスに卵巣摘出を施した。術後 2 週間、4 週後に大腿骨を摘出し、DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry) 法を用いた骨量測定、3 次元画像解析をマイクロ CT 法を用いて行った。

骨密度解析: 野生型マウスにおける観察では、OVX により大腿骨における骨量低下が認められ、術後 4 週後の解析では著しい骨密度の低

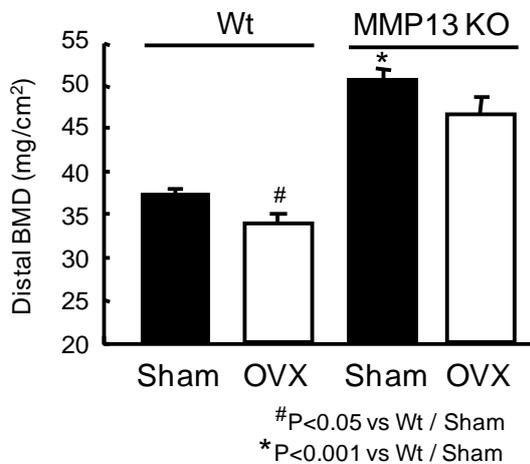


図3. DEXA法による骨密度解析:野生型マウス(Wt)および MMP13KO マウスの偽手術(Sham)および卵巣摘出 (OVX) による大腿骨骨密度への影響

下を示した。一方、MMP13KO マウスでは、OVX による骨の顕著な破壊と骨量減少が観察されず、骨密度は維持された (図3)。

マイクロ CT 縦断解析: 野生型マウスにおける術後 2 週後の観察では、大腿骨における二次海綿骨の著しい亢進が認められ、術後 4 週後の解析では成長軟骨板直下の二次海綿骨は顕著に消失した (図 4A 上段)。

一方、MMP13KO マウスでは、骨の顕著な破壊は観察されず、成長軟骨板直下二次海綿骨の骨梁とその連続性は維持されていた (図 4B 上段)。

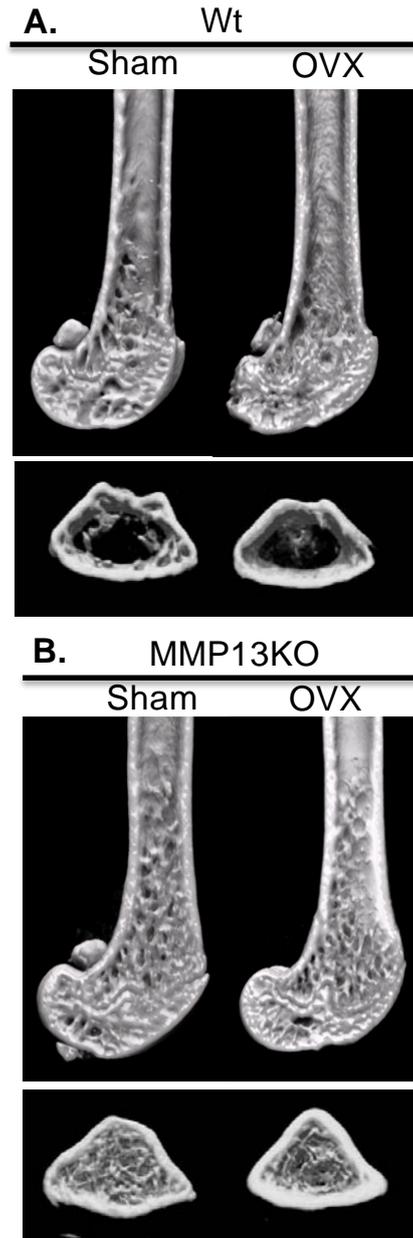


図4. マイクロ CT による骨形態解析: Wt マウス由来大腿骨 (A)、MMP13KO マウス由来大腿骨 (B) 上段 縦断画像、下段 横断画像

マイクロCT横断解析：大腿骨の縦断解析の結果と同様に、野生型マウスにおけるOVX術後4週後の解析では成長軟骨板直下の二次海綿骨の著しい減少と皮質骨より連続する海綿骨の分断が観察された(図4A下段)。一方、MMP13KOマウスでは、OVXによる骨の破壊が観察されず、二次海綿骨の骨量と骨梁の連続性は維持されていた(図4B下段)。

②卵巣摘出骨粗鬆症モデルを用いた3次元の骨形態計測：

卵巣摘出(OVX)を用いた閉経後骨粗鬆症モデルを野生型及びMMP13KOマウスに施し、術後4週後に大腿骨を摘出し、3次元画像解析による骨の形態計測を行った。その結果、野生型マウスにおけるOVX術後4週後の観察では、大腿骨量の指標であるBV/TVが低下し、骨吸収の指標であるTb/Spが著しく増加した。野生型マウスでは、OVXにより、大腿骨における骨吸収と骨量の著しい減少が観察された。一方、MMP13KOマウスでは、OVX術後4週後においてもBV/TVおよびTb/Spの著しい変化は認められなかった。Tb.NoおよびTb.Thは野生型マウスに比して、MMP13KOマウスにおいて著しい増加が認められ、OVXによる変動はごく軽微であった。

考察

本研究課題ではコラーゲン分解が骨量維持に関与するか、また、コラーゲナーゼであるMMP13が骨粗鬆症の発症に関与するかを主眼として検討を進め、In vitro および In vivo における種々の解析法を駆使して検討をおこなった。その結果、MMP13KOマウスは野生型マウスに比して、組織化学検討においても、3次元画像解析においても大腿骨の骨量増加が観察された。また、卵巣摘出術を用いた骨粗鬆症モデルの検討において、MMP13KOマウスでは、骨破壊による骨量低下が起こりにくい、または起こらない可能性が示唆された。これらは破骨細胞の機能低下を主因とし、骨吸収におけるMMP13によるコラーゲン分解が関与することが明らかになった(論文投稿準備中)。本課題の研究結果により、エストロゲン欠乏による骨吸収の原因遺伝子としてのMMP13の関与が明らかとなり、硬組織破壊におけるコラーゲン分解の重要性が明らかとなった。現在、破骨細胞が分泌するカテプシン阻害薬の開発が進められているが、骨マトリックス破壊におけるコラーゲナーゼ阻害剤の開発を視野に入れた、画期的な骨粗鬆症治療薬の開発につなげたい。

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10件)

1. Harada S, Tominari T, Matsumoto C, Hirata M, Takita M, Inada M, Miyaura C: Nobiletin, a polymethoxy flavonoid, suppresses bone resorption by inhibiting NF κ B-dependent prostaglandin E synthesis in osteoblasts and prevents bone loss due to estrogen deficiency. *J. Pharmacol. Sci.* ;115(1):89-93, 2011 査読有
2. Hirata M, Kobayashi M, Matsumoto C, Miyaura C, Asakura T, Inada M: Cell Shape and Matrix Production of Fibroblasts cultured on fibroin-organized scaffold with type-II β -turn structured (Ala-Gly-Ala-Gly-Ser-Gly)_n sequences. *J. Health Sci.* 56(6): 1-7, 2010 査読有
3. Kim J, Kobayashi M, Fukuda M, Ogasawara D, Kobayashi N, Han S, Nakamura C, Inada M, Miyaura C, Ikebukuro K, Sode K: Pyrroloquinoline quinone inhibits the fibrillation of amyloid proteins. *Prion.* 4(1):26-31, 2010 査読有
4. Hirata M, Harada S, Matsumoto C, Takita M, Miyaura C, Inada M: Role of prostaglandin E in Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL) expression in osteoblasts induced by cell adhesion to bone marrow B-lymphocytes. *J. Health Sci.* 55(5):832-837, 2009 査読有
5. Hirata M, Kobayashi M, Takita M, Matsumoto C, Miyaura C, Inada M: Hyaluronan inhibits bone resorption by suppressing prostaglandin E synthesis in osteoblasts treated with interleukin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381: 139-143, 2009 査読有
6. Hirata M, Matsumoto C, Takita M, Miyaura C, Inada M: Naringin suppresses osteoclast formation and enhances bone mass in mice. *J. Health Sci.*55(3): 1-5, 2009 査読有
7. Hirata M, Inada M, Matsumoto C, Takita M, Ogawa T, Endo Y, Miyaura C: A novel carborane analog, BE360, with a carbon-containing polyhedral boron-cluster is a new selective estrogen receptor modulator for bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380: 218-222, 2009 査読有
8. Takita M, Hirata M, Tsukamoto K, Nagasawa K, Miyaura C, Inada M: 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactam, a novel vitamin D₃ analog, acts as a vitamin D₃ antagonist in human prostate cancer cells. *J. Health Sci.* 54(4): 497-502, 2008 査読有

9. Inada M, Tsukamoto K, Hirata M, Takita M, Nagasawa K and Miyaura C: Novel vitamin D₃ analogs, 1 α ,25(OH)₂D₃-26,23-lactam (DLAMs), antagonize bone resorption via suppressing RANKL expression in osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372:434-439, 2008 査読有
10. Krane SM, Inada M: Matrix metalloproteinases and bone. *Bone* 43:7-18, 2008 査読有

〔学会発表〕(計 56 件 6 件抜粋)

1. Yokoyama S, Takita M, Maruyama T, Miyaura C, Inada M: Role of prostaglandin E receptor EP4 in breast cancer growth and osteolysis due to bone metastasis, tumor growth and bone metastasis of cancer, The American Society for Bone and Mineral Research, October 17, 2010, Toronto, Ontario, Canada
2. Takita M, Yokoyama S, Inada M, Miyaura C: Disruption of prostaglandin E biosynthesis and its receptor EP4 attenuated angiogenesis, tumor growth and bone metastasis of cancer, The American Society for Bone and Mineral Research, October 16, 2010, Toronto, Ontario, Canada
3. Takita M, Inada M, Yokoyama S, Maruyama T, Miyaura C: Prostaglandin E2 promotes bone metastasis and osteolysis via PGE receptor EP4 but not EP1 and EP3 in host cells. The American Society of Bone and Mineral Research, September 14, 2009, Colorado, USA
4. Hirata M, Kobayashi M, Tominari T, Matsumoto C, Miyaura C, Inada M: Hyaluronan attenuated IL-1 induced prostaglandin E2 production and osteoclast differentiation via CD44 mediated NF κ B inactivation in osteoblast. American Society of Bone and Mineral Research, September 13, 2009, Colorado, USA
5. Inada M, Tominari T, Hirata M, Matsumoto C, Takita M, Endo Y, Miyaura C: Carborane BE360, one of the carbon-containing polyhedral boron-cluster compounds, is a new type of selective estrogen receptor modulator. American Society of Bone and Mineral Research, September 12, 2008, Montréal, Québec, Canada
6. Hirata M, Kobayashi M, Yoshida A, Miyaura C, Asakura T, Inada M: (Ala-Gly)_n sequences configured silk protein scaffold induces osteoblast differentiation and bone formation via increased cbfa1 and osterix expression.

American Society of Bone and Mineral Research, September 12, 2008, Montréal, Québec, Canada

〔図書〕(計 3 件)

1. 稲田全規、宮浦千里: 卵巣摘出動物および精巣摘出動物 *Clinical Calcium* 21 : 164-170, 2011
2. 稲田全規、宮浦千里: サイトカインと閉経後骨粗鬆症 *Clinical Calcium* 20 : 19-24, 2010
3. 稲田全規、松本千穂、宮浦千里: 性ホルモンの骨作用と骨疾患 *細胞* 41: 12-15, 2009

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称 : 歯周病発症の評価システム
 発明者 : 宮浦千里、稲田全規
 権利者 : 国立大学法人東京農工大学
 種類 : 特許
 番号 : 特許第 4662043 号
 取得年月日 : 平成 23 年 1 月 14 日
 国内外の別 : 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲田 全規 (INADA MASAKI)
 東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
 研究者番号 : 80401454

(2)連携研究者

宮浦 千里 (MIYAURA CHISATO)
 東京農工大学・大学院工学研究院・教授
 研究者番号 : 20138382