

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月22日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591951

研究課題名（和文） オステオポンチンの機能解析から骨粗鬆症の予防・治療薬の開発へ

研究課題名（英文） From analysis of osteopontin function to development of preventive and medical treatment for osteoporosis.

研究代表者

樋口 安典（HIGUCHI YASUNORI）

大分大学・全学研究推進機構・教授

研究者番号：60040284

研究成果の概要（和文）：

骨芽細胞に強く発現する蛋白のオステオポンチン(OPN)を過剰発現する遺伝子改変(OPN-TG)マウスを樹立、解析した。正常マウスに比し、血中のカルシウムやI型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTx)が上昇し、大腿骨のCT検査で骨密度の低下を認め、骨粗鬆症のモデルマウスとして有用である。しかし、OPNの骨髄培養細胞への添加実験や詳細な骨形態計測結果から、OPNの作用機序は複雑で、今後はOPNあるいは機能ドメインの蛋白、ペプチドを用いて、細胞レベルでの解析が必要となる。

研究成果の概要（英文）：

We generated transgenic (OPN-TG) mice expressing osteopontin (OPN) which is a phosphoglycoprotein secreted by osteoblasts mainly. We found that an increase of calcium and type I collagen cross linked N teropeptide (NTx) in serum of OPN-TG mice, compared with normal mice. OPN-TG mice showed a decrease of bone density obtained by QCT and so is a useful model of human osteoporosis. Furthermore, we need in vitro analysis of the bone marrow cells with OPN-related proteins or peptides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、整形外科学

キーワード：オステオポンチン、骨粗鬆症、トランスジェニックマウス、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症の病態は骨基質そのものの組成は正常であるが、骨量が異常に減少したものとされており、X線上骨陰影濃度の低下、骨皮質の菲薄化・骨海綿骨化を呈し、骨梁構造が粗になる状態を特徴とする。その成因としてカルシウム摂取量の不足（発育時を含め

て)、加齢・閉経によるエストロゲンの欠如、腸管カルシウムの吸収能の低下、副甲状腺ホルモンとカルシトニンの不均衡など多種多様の説があるが、なおその本体は明らかでない。

オステオポンチン(OPN)は骨芽細胞に強く発現する分子量69kDの分泌糖蛋白で、分

子の中央に gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) 配列を持つユニークな構造を示す。OPN の機能は多彩で、これまで免疫、アレルギーに関係する報告が多い。OPN と骨代謝に関する報告としては、(1)破骨細胞表面に存在するピトロネクチンレセプター(インテグリンの $\alpha v \beta 3$ で OPN のレセプターでもある)が活性化に関与する事、さらに卵巣摘出後の骨吸収に対して抵抗性で、Ca(-)の餌による飼育マウスの骨からの Ca 喪失に抵抗性を示す。(2) OPN は破骨細胞表面の CD44(破骨細胞の運動と骨吸収に関与する)発現を促し、破骨細胞数を増加させる。(3)in vitro 実験で、OPN は破骨細胞から分泌され、 $\alpha v \beta 3$ と CD44 に結合する。(4) OPN と骨粗鬆症に関して、人工的大腿骨重力解除状態の OPN-KO マウスでは骨量の減少は無い、等の報告がある。すなわち、OPN は骨組織の代謝維持、特に骨吸収に重要な役割を果たしている事は明らかである。

2. 研究の目的

我々はマクロファージに発現する種々の遺伝子を分離解析する過程でマウス OPN ゲノム遺伝子の分離と全構造を明かにした。OPN 機能を in vivo 解析する目的で、OPN を過剰発現するトランスジェニック (OPN-TG) マウスを作成し、CD4⁺ T細胞の増殖と遅延型アレルギー反応が増強することを報告した。この TG マウスは外見上、生後数ヶ月は変化を認めないが、6-8 ヶ月を過ぎると正常マウスに比し、早期から脱毛、皮膚潰瘍、白内障等の老化現象を認めるようになる(図 1)。



正常マウス(上)とOPN-TGマウス(下)(9ヵ月、♀)

図 1

この TG マウス大腿骨の quantitative computed tomography (QCT) 検査では著しい骨量の減少と骨強度の低下を認める。すなわち、この TG マウスは骨粗鬆症のモデルマウスとして有用である。しかも、OPN との関係が明白であり、OPN の機能ドメインを明確にし、その機能抑制効果を示す蛋白(あるいはペプチド)を同定することで、新しい予防・治療薬開発に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) OPN-TG マウスと正常マウスとの差異を生化学的、放射線学的に検索し、骨粗鬆症発

症における OPN の関与を明らかにする。

(2) 骨髄細胞を培養し、OPN 添加により破骨細胞に影響を与えるか否かを検討する。

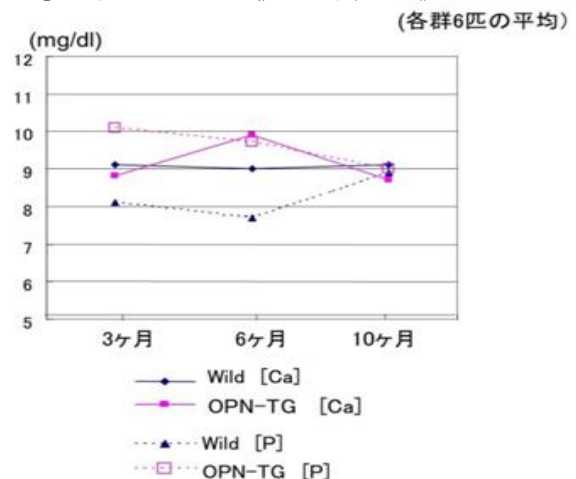
(3) マウス用カルセインを用いて OPN-TG マウスと正常マウスとの差異を組織学的に詳細に比較検討する。

(4) OPN の全長および各機能ドメインのリコンビナント蛋白あるいはペプチドを作製後、正常マウスに投与し、骨粗鬆症発症効果を示す蛋白を同定する。

4. 研究成果

(1) OPN-TG マウスと正常マウスの比較

① 血中 Ca および P 値の時間的推移(図 2)



月齢 6 ヶ月では Ca、P いずれも有意に上昇していたが、9 ヶ月では差異は認められなかった。

② 血中 I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (NTx) の時間的推移(図 3)

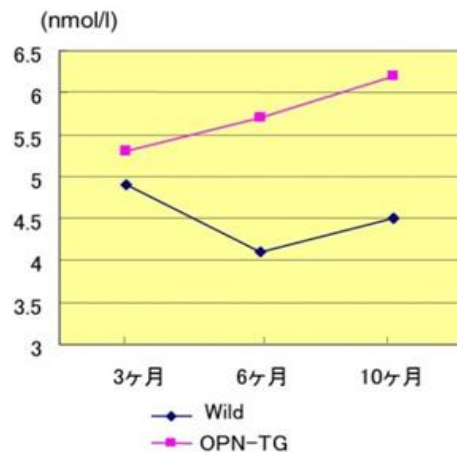


図 3

NTx は骨特異性が高く、骨粗鬆症の指標とされているが、OPN-TG マウスでは時間的経過と共に NTx 値は上昇する。すなわち、骨吸収が亢進していることを示す。一方、正常マウスではむしろ漸減傾向を

示す。

③大腿骨 QCT 検査による月齢 9 ヶ月での骨密度比較(図 4)

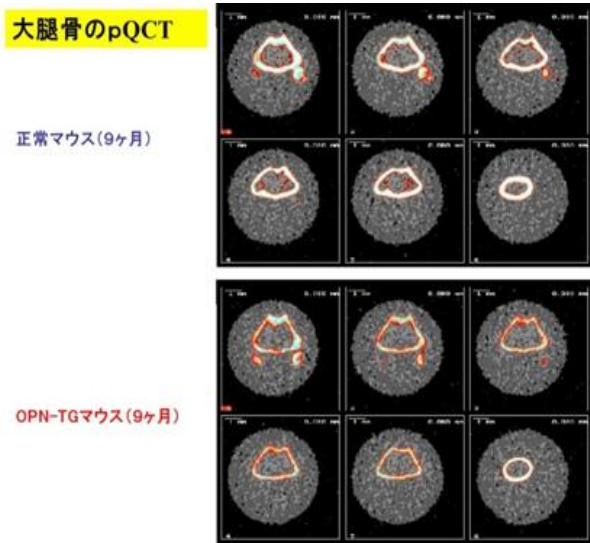
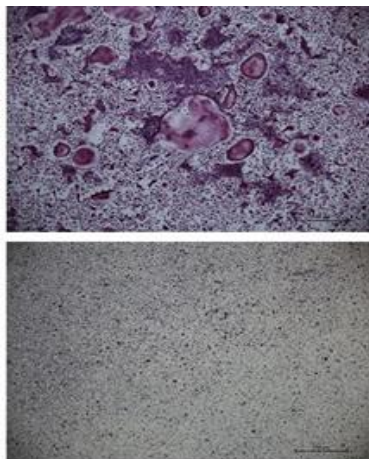


図 4

図 4 に示すように、OPN-TG マウスは正常マウスに比し明らかに骨密度の低下を認めた。

(2) 骨髄細胞培養での OPN が破骨細胞に及ぼす影響(図 5)



リコンビナント OPN 添加実験
上: OPN(-), 下: OPN(+)

図 5

図 5 に示すようにリコンビナント OPN を添加培養した骨髄細胞には破骨細胞への分化がほとんど認められなかった。予想外の結果であったが、生体内よりも過剰量の OPN が細胞の凝集を阻害している可能性、また細胞外にある OPN により細胞内での

OPN 合成が抑制されている可能性も考えられる。しかし、この結果が正しいか否かは更なる検討が必要である。

(3) 骨形態計測結果(表 1)

骨形態計測結果

	単位骨量 BV/TV (%)	骨梁幅 Tb.Th (μm)	骨梁数 Tb.N (/mm)	骨梁間隙 Tb.Sp (μm)	
正常マウス	1.782	37.503	0.475	2,732.468	
OPN-TG	1.881	38.191	0.482	2,880.603	
	類骨量 OV/BV (%)	類骨面 OS/BS (%)	類骨厚 O.Th (μm)	骨芽細胞面 Ob.S/BS (%)	
正常マウス	1.448	10.778	2.506	13.359	
OPN-TG	1.443	11.066	1.744	15.049	
	吸収面 ES/BS (%)	破骨細胞数 Oc.N/B.Pm (/100mm)	破骨細胞面 Oc.S/BS (%)		
正常マウス	2.680	203.355	1.619		
OPN-TG	1.951	189.038	0.772		
	石灰化速度 MAR (/day)	石灰化面 MS/BS (%)	骨形成率 BFR/BS mm ³ /mm ² /	二重標識面 dLS/BS (%)	一重標識面 sLS/BS (%)
正常マウス	0.786	16.908	0.050	8.453	16.911
OPN-TG	0.953	21.615	0.078	11.638	19.953

表 1

月齢 6 ヶ月での結果が不明確であったので月齢 9 ヶ月のマウス各 5 匹ずつを計測した。その結果を表 1 に示す。類骨数、面は 3 倍に増加。破骨細胞数は 3 倍に増加。石灰化面は 3 倍に増加。二重標識面は 4 倍に増加。すなわち、本実験結果では破骨細胞の数は増加しており、類骨が増加していることを考えれば、OPN-破骨細胞-骨芽細胞-類骨形成の関係が何れ、骨代謝が亢進していることが推測される。二重標識面が 4 倍に増加していることも、これを裏付けている。しかし、単位骨量は同じである点が疑問である。可能性として破骨細胞活性がおこっているが、吸収面が同じであること、破骨細胞面がおなじであることから、骨への接着に問題があり、骨吸収が起こりえないのではないかと考える。

(4) 機能ドメインのリコンビナント蛋白およびペプチドの作製と効果判定

OPN 機能ドメインのリコンビナント作製は 6 種類を作ろうとしたが、2 種類しか成功しなかった。そこで、活性中心になると考えた各ペプチドの合成を行った。骨髄細胞に各ペプチドの添加培養を行ったが、結果を公表するまでには至っていない。

当初 OPN が破骨細胞の分化、活性化を促進して骨吸収を亢進、促進することで骨粗鬆症発症を早めると予想していた。しかし、OPN の骨髄培養細胞への添加実験や詳細な

骨形態計測結果から、OPN の作用機序は考えていた程単純ではなさそうだ。

しかし、この OPN-TG マウスは明らかに骨粗鬆症を発症しており、OPN が関与していることは明白である。今後はどのように作用するかを OPN あるいは機能ドメインの蛋白、ペプチドを用いて、細胞レベルでの解析が必要となる。それらを明らかにすることでヒトの骨粗鬆症発症予防や治療薬開発が期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 片岡晶志、樋口安典、津村弘、オステオポンチンが破骨細胞に及ぼす影響—オステオポンチントランスジェニックマウスの解析—、第 24 回日本整形外科基礎学術集会、2009 年 11 月 5 日、横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 安典 (HIGUCHI YASUNORI)

大分大学・全学研究推進機構・教授

研究者番号：60040284

(2) 研究分担者

片岡 晶志 (KATAOKA MASASHI)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：40301379

(3) 連携研究者

なし