

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 6 月 15 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 21 年度～平成 22 年度

課題番号：21790374

研究課題名(和文) グルココルチコイドの骨細胞及び骨芽細胞に対する作用メカニズムの解析

研究課題名(英文) Direct action of glucocorticoid on osteocyte and osteoblast

研究代表者

麓 敏雄(国立長寿医療研究センター・運動器疾患研究部・流動研究員)

研究者番号：80463206

研究成果の概要：

ステロイド誘発性骨粗鬆症の病因を解明するために、生理的、病理的条件下それぞれにおけるグルココルチコイドの骨細胞及び骨芽細胞に対する作用とそのメカニズムを分子遺伝学的手法を用いて解析した。

グルココルチコイド受容体(GR)-flox マウスと、DMP1-Cre マウスあるいは Osterix-Cre マウスをそれぞれ交配させ、骨細胞においてのみ GR を無くしたマウス、骨芽細胞系列(骨細胞及び骨芽細胞)で GR を無くしたマウスを作出した。内在性のグルココルチコイドの作用を検討するためにベースラインでの解析を行ったところ、骨芽細胞系列の GR ノックアウトマウスは対照群マウスと比べ低骨量を示した。一方、骨細胞特異的 GR ノックアウトマウスでは、8 週齢では骨量に差は認められなかったものの 12 週齢と 6 ヶ月齢では低骨量を示した。また、このノックアウトマウスでは、骨芽細胞数には変化が見られないものの骨形成速度や骨石灰化速度の低下が見られた。次に薬理量のグルココルチコイドの作用を検討するために、これらのノックアウトマウスに合成グルココルチコイドを徐放するペレットにより 1 ヶ月間継続投与し解析を行った。その結果、骨細胞特異的 GR ノックアウトマウスでは、海綿骨の骨量は対照群マウスと同様にグルココルチコイド投与により有意な減少を示したものの、皮質骨はグルココルチコイドに対し抵抗性を示した。

以上の結果から、内在性のグルココルチコイドは骨芽細胞系列の GR を介して骨量を正に調節すること、薬理量のグルココルチコイドの皮質骨に対する作用では、骨細胞の GR を介する作用が寄与することが示唆された。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成 22 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：骨・関節・筋肉・皮膚・感覚器

1. 研究開始当初の背景

過剰のグルココルチコイドが骨代謝に対して悪影響を及ぼすことは、70年以上前から認識されている (Bull. Johns Hopkins Hosp 1932)。近年、自己免疫疾患や肺及び胃腸の疾患、癌や臓器移植後の治療に合成グルココルチコイドが広く使用されるようになり、グルココルチコイド誘導性骨粗鬆症は最も罹患率の高い続発性骨粗鬆症となっている (Osteoporos Int 2007)。しかし、生理的、病理的条件下におけるグルココルチコイドの骨に対する作用機構は不明な部分が多い。

内在性のグルココルチコイドである cortisol は副腎皮質で合成・分泌され、血流を介して標的細胞に至る。体内に吸収された合成グルココルチコイドは、一部は肝臓で代謝され、他の一部は標的細胞に至る。標的細胞内では 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type2 (11 β -HSD2) による不活型グルココルチコイドへの変換、11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type1 (11 β -HSD1) による不活型から活性型への変換が行われる (J Endocrinol 2005)。活性型グルココルチコイドはグルココルチコイド受容体 (GR) と結合し、標的遺伝子の転写調節を行うことでその作用を発現する (Mol Endocrinol 2002)。

グルココルチコイドは様々な刺激に应答し、代謝・内分泌・免疫応答・神経系などの多様な生体機能を調節する。実際、GR のノックアウトマウスは呼吸障害により生後数時間のうちに死亡するが、肺や肝臓、副腎など多くの組織で異常が見られる (Genes Dev 1995)。骨代謝に関しても、グルココルチコイドは腸におけるカルシウムの吸収や腎臓におけるカルシウムの

再吸収の調節を介して、また性ホルモンの調節を介して間接的な影響を骨にあたえる (Trends Endocrinol Metab 2006)。神経系において特異的に GR をノックアウトしたマウスにおいては骨量の減少が見られることが報告されている (Nat Genet 1999)。したがって、グルココルチコイドの骨代謝に対する作用を解明するためには、それぞれの組織、細胞に対する作用機構を明らかにする必要がある。

グルココルチコイドは骨を形成する骨芽細胞、骨細胞に直接作用して、骨代謝に影響を及ぼすことが次第に明らかになりつつある。Col I プロモーターを用いて 11 β -HSD2 を骨芽細胞に特異的に発現させ、グルココルチコイドを不活性化した TG マウスでは、ベースラインで骨量の減少が見られるとの報告がある (Endocrinology 2002)。一方、Osteocalcin プロモーターを用いて 11 β -HSD2 を骨芽細胞及び骨細胞で発現させた TG マウスでは、外来性のグルココルチコイドに対して抵抗性がみられた (Endocrinology 2002)。しかし、Col I プロモーターを用いた TG マウスでみられたベースラインの骨量に変化が、Osteocalcin プロモーターを用いた TG マウスでは見られないなど不明な点が多い。

研究開始当初、グルココルチコイドの骨に対する生理的作用を、骨芽細胞および骨細胞において GR 遺伝子をノックアウトすることで完全に遮断して検討した報告はなく、in vivo においてグルココルチコイドの骨芽細胞および骨細胞に対する作用を明確に区別して検討した報告もなかった。

2. 研究の目的

グルココルチコイド誘導性骨粗鬆症では、骨密度が比較的保たれた状態でも骨折が起こることが知られており、骨代謝の異常による骨質の低下の関与が大きいと考えられている。本研究は、骨量だけでなく骨質の維持に重要な役割を果たす骨細胞に対するグルココルチコイドの直接的作用が、グルココルチコイド誘導性骨粗鬆症の病因の中心にあるという仮説のもとに、生理的および病理的条件下におけるグルココルチコイドの作用を、骨細胞と骨芽細胞に対する直接的作用を区別しなから解析することを目的とする。

3. 研究の方法

グルココルチコイド受容体(GR)-floxマウスとOsterix-Creマウスを交配させ、骨芽細胞系列（骨芽細胞及び骨細胞）においてGRをノックアウトしたマウス（GR Ob）を樹立した。また、GR-floxマウスとDMP1-Creマウスを交配することにより、骨細胞のみにおいてGRをノックアウトしたマウス（GR Ot）を樹立した。これらのマウスのベースラインでの骨の表現型を解析することにより、内在性のグルココルチコイドの骨代謝への影響と、骨芽細胞及び骨細胞の発現するGRの寄与を検討した。

また、これらのGRノックアウトマウスに合成グルココルチコイドであるプレドニゾロンのペレットを植え込んで1ヶ月間継続投与し、骨の表現型を解析した。これにより、薬理量のグルココルチコイドの骨芽細胞、骨細胞に対する直接作用と、骨芽細胞及び骨細胞の発現するGRのそれぞれの寄与を検討した。

4. 研究成果

生理的条件下における、内在性のグルココルチコイドの骨細胞及び骨芽細胞に対する直接的作用を検証するために、8週齢、12週齢、6ヶ月齢のメスのGR Ob及びGR Otの脛骨近位部の海綿骨量を、 μ CTにより検討した。その結果、骨芽細胞及び骨細胞においてGRをノックアウトしたGR Obでは、コントロールマウスに比べ、低骨量と骨梁構造の悪化を示した（図1：12週齢を示す）。

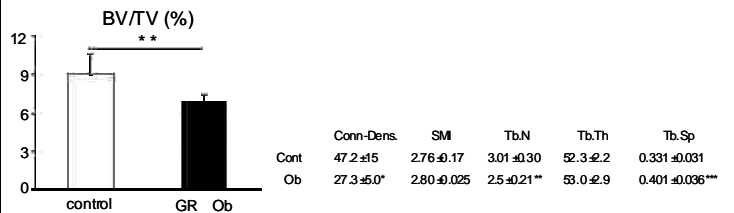


図1. 内在性グルココルチコイドの骨芽細胞を介した作用

一方、骨細胞のみにおいてGRをノックアウトしたGR Otでは、コントロールマウスに比べ、8週齢では骨量に有意な差は認められなかったものの、12週齢（図2）および6ヶ月齢で骨量の有意な低下と骨梁構造の変化を示した。

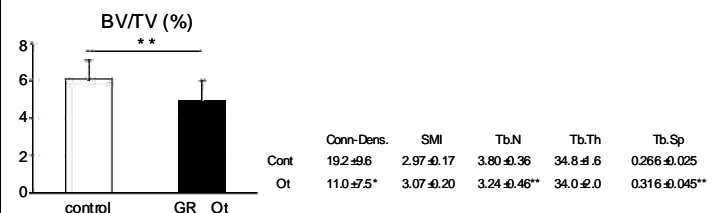


図2. 内在性グルココルチコイドの骨細胞を介した作用(1)

以上、ベースラインの骨量の解析から、内在性のグルココルチコイドが骨芽細胞系列の細胞のGRを介して骨量を正に調節すること、とりわけ骨細胞で発現するGRが骨量の維持に寄与していることが示唆された。

次に、内在性のグルココルチコイドの骨細胞に対する作用メカニズムを検討するために、12週齢メスのGR Otの脛骨近位部の海綿骨を骨形態計測法により解析した。その結果、GR Otではコントロールマウスに比べ、骨細胞数や空ラクナの数など骨細胞の指標に有意な差は認められなかった。また、吸収面や破骨細胞面、破骨細胞数など骨吸収の指標にも違いが見られなかった。一方、骨形成に関して、骨芽細胞の数自体には違いが見られなかったものの、骨形成速度や石灰化速度は有意な低下を示した(図3)。

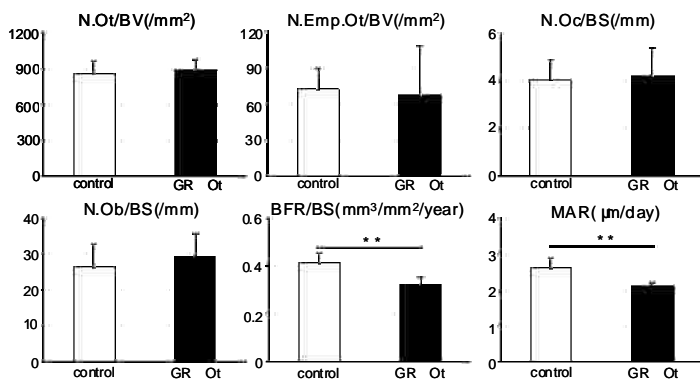


図3. 内在性グルココルチコイドの骨細胞を介した作用(2)

また、定量的 RT-PCR により骨組織における遺伝子発現を検討したところ、GR Otではコントロールマウスに比べ、DMP1 (dentin matrix protein 1)、MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein)、Phex (phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome)などの骨細胞のマーカー遺伝子の発現が低下していた。また、骨細胞で高発現し骨形成を負に調節する Sost (Sclerostin)の発現も GR Otで低下していた。

これらの結果から、内因性のグルココルチコイドは骨細胞のGRを介して骨細胞の数ではなく活性を調節することで、骨芽細胞によ

る骨形成能を調節することが示唆された。

次に、薬理量のグルココルチコイドの骨細胞に対する直接作用を検証するために、合成グルココルチコイドを5ヶ月齢から1ヶ月間継続投与した、6ヶ月齢のオスのGR Otの脛骨近位部の海綿骨量をμCTにより検討した。その結果、GR Obではコントロールマウスに比べ、ベースラインでは低骨量を示すものの、グルココルチコイド投与によりコントロールマウスと同様に、骨量低下を示した(図4)。

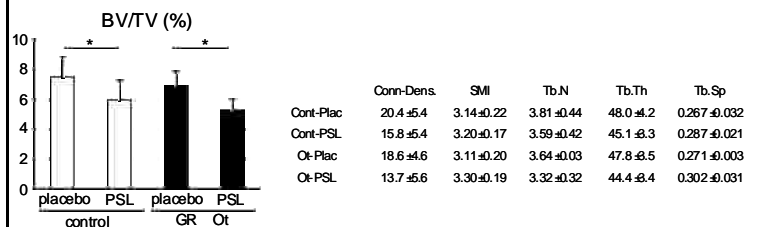


図4. 外来性グルココルチコイドの海綿骨に対する作用

グルココルチコイドの皮質骨に対する作用を検討するために、脛骨中央部の皮質骨量をμCTにより検討した。その結果、コントロールマウスではグルココルチコイド投与により皮質骨が菲薄化し骨髄面積の増加がみられ骨量が減少したが、GR Otではこうしたグルココルチコイド作用に対する抵抗性を示した(図5)。

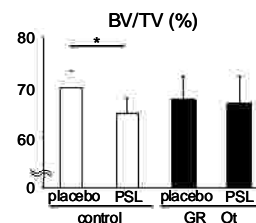


図5. 外来性グルココルチコイドの皮質骨に対する作用

これらの結果から、外来性に投与したグルココルチコイドの骨に対する作用のなかで少なくとも皮質骨に対する作用は、骨細胞のGRによって媒介されていることが示唆された。今後、生理的、病理的条件下におけるグルココルチコイドの骨細胞及び骨芽細胞に対する直接作用の分子レベルでの解析とこれらの標的細胞におけるGRの下流因子の同定が必要とされる。

最後に、マイクロCTによる骨解析を行っていただいた長崎大学病院の伊東昌子准教授に感謝します。

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)

Fumoto I, Ishii K, Takeshita S, Ito M, Shimohata N, Taketani S, Lelliott CJ, Vidal-Puig A, Aburatani H, Iwai K, Ikeda K
Expression of transferrin receptor and PGC-1 during osteoclast differentiation.

The 26th Naito Conference (Osteobiology),
November 5, 2009

Awaji Yumebutai International Conference
Center, Hyogo, Japan

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

麓 敏雄 (国立長寿医療研究センター・運動器疾患研究部・流動研究員)

研究者番号：80463206