

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791396

研究課題名（和文）アルデヒド脱水素酵素遺伝子の変異による骨代謝の恒常性破綻機構の解明
研究課題名（英文）

Elucidation of impaired bone homeostasis mechanism by mutation of Acetaldehyde Dehydrogenase2 gene (ALDH2).

研究代表者

星 淡子 (HOSHI HIROKO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：50399812

研究成果の概要（和文）：

日本人の約半数が有する、アルデヒド脱水素酵素遺伝子（*ALDH2*）の遺伝子変異と骨粗鬆症の関連性を *ALDH2* 遺伝子変異モデルマウス (*ALDH2-DAL*) を用いて明らかにした。*ALDH2-DAL* の骨は著しく骨粗鬆症の症状を呈し、骨密度の低下を示した。*ALDH2-DAL* の骨芽細胞の分化形成能が著しく低下することを示した。ヒトにおいても同様に *ALDH2* 遺伝子変異を有する骨芽細胞の形成能低下の傾向を示した。

研究成果の概要（英文）：

About half of the Japanese have a mutant *ALDH2* gene, resulting to sensitivity to alcohol. In statistical analysis report, a mutation of the *ALDH2* gene accelerates osteoporosis. However, the mechanism on how the mutated gene *ALDH2* affects bone formation is still unknown. In this study, I try to work out the relation between the mutation of the *ALDH2* gene and bone homeostasis by utilizing inactive *ALDH2* (*ALDH2-DAL*) mice. *ALDH2-DAL* mice exhibited osteoporosis and showed significantly reduced bone density. In morphometrical analysis, *ALDH2-DAL* trabecular and cortical bone thickness were thinner, and bone formation and mineralized rates were also decreased compared to that of wild type mice. Osteoblast in mice with mutated *ALDH2* gene remarkably decreased compared to wild type osteoblasts by cell staining. The expression of marker genes on osteoblast differentiation of mice with mutated *ALDH2-DAL* gene was decreased compared to wild type osteoblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：骨・軟骨代謝学、アルコール分解酵素

1. 研究開始当初の背景

(1) アルデヒド脱水素酵素 (*ALDH2*) は、アルコールやアミノ酸代謝を司る重要な酵素である。*ALDH2* 遺伝子の 487 番目のア

ミノ酸がグルタミン酸からリジンに置換されるドミナントネガティブタイプの変異型の人 (dn-*ALDH2*) は変異を有しない人と比較して有意に骨密度が低下する統計学的報

告がある。

(2) ALDH2 の遺伝子表現形の割合は人種毎に異なっていることが知られており、日本人では約半数(40%)が変異型(dn-ALDH2)を有する。

2. 研究の目的

背景に基づいて、ALDH2 遺伝子の変異がもたらす骨への影響について検討する。本研究では、ドミナントネガティブ型 ALDH2 遺伝子変異マウス(ALDH2-DAL)を用いて骨の形態学的解析と共に、骨構成細胞の分化形成能を *in vivo* 及び *in vitro* の両面から検討する。

3. 研究の方法

(1) ALDH2 遺伝子変異マウス(ALDH2-DAL)の骨解析は、8 週齢、雌のドミナントネガティブ ALDH2 遺伝子変異マウス(ALDH2-DAL)の大腿骨の軟 X 線解析、 μ CT スキャン、DEXA による骨密度測定、並びに骨形態計測を行った。骨形態計測は OLYMPUS IX-70 を用いて計測した。また、マウス脛骨切片の海綿骨組織染色は骨芽細胞については、Villanueva-goldner 染色、破骨細胞については TRAP 染色を行った。

(2) ALDH2-DAL マウスの骨芽細胞及び破骨細胞への細胞分化形成能検討の実験では、ALDH2-DAL の骨髄及び頭蓋骨より採取した細胞を骨芽細胞へ分化誘導し、骨芽細胞分化能について野生型と比較した。骨芽細胞は ALP、Von Kossa、Alizarin Red 染色を行うと共に、骨芽細胞分化マーカーである、オステオカルシン (OCN)、アルカリフォスファターゼ (ALP) 遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 及び RT-PCR によって確認した。また、破骨細胞形成能の評価は TRAP 染色を行った。

(3) ALDH2 遺伝子変異による骨形成不全の原

因物質の同定に関する実験では、ALDH2-DAL マウスの全血をより血漿中のアセトアルデヒド濃度をガスクロマトグラフィーによって測定した。また、骨芽細胞中の 4-ヒドロキシノネナール (4HNE) の検出を、モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットを行うことで確認した。

(4)アセトアルデヒド共存下における未分化細胞の骨芽細胞への分化形成能の検討に関しては、rhBMP2 誘導条件下で培養細胞を細胞染色、定量的 RT-PCR による遺伝子の発現 (OCN、ALP、Runx2、等) ウェスタンブロットティング (pSmad1,5,8, Smad1) にて検討した。

4. 研究成果

(1) ALDH2 遺伝子変異マウス(ALDH2-DAL)の骨解析では、ALDH2-DAL マウスの骨格は著しい骨粗鬆症の症状を呈していることを軟 X 線解析、 μ CT スキャン並びに骨密度測定により示した(図 1-A, B)。骨形態計測の結果、ALDH2-DAL マウスは骨梁幅、皮質骨幅、骨形成速度の各パラメーターにおいて野生型と比較し有意に減少していることを確認した(図 1-D)。以上の結果より、ALDH2 酵素遺伝子変異を優位に発現している ALDH2-DAL マウスの骨格は骨粗鬆症の症状を呈し、ALDH2 遺伝子の変異が骨に影響を及ぼしていることを示した。

図 1-A soft x-ray (左: ALDH2-DAL, 右: WT)

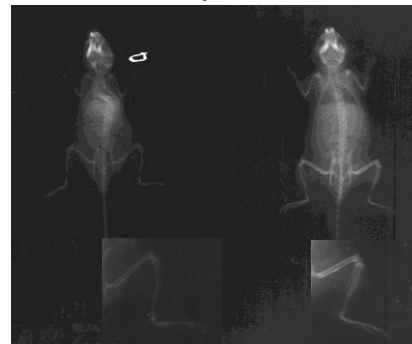


図 1-B μ CT (左: ALDH2-DAL, 右: WT)

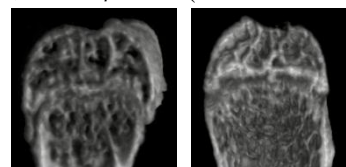


図 1-C 骨密度測定

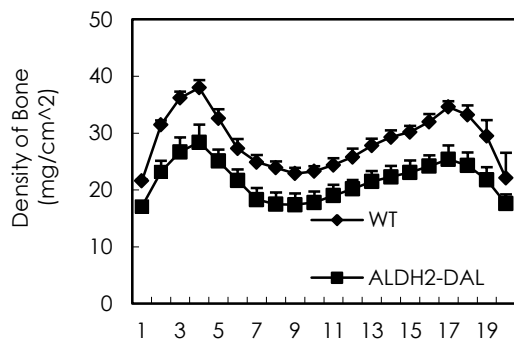
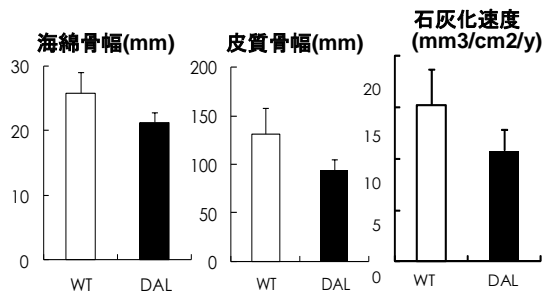


図 1-D 形態計測結果



(2) ALDH2-DAL マウス骨髄及び頭蓋骨より採取した細胞を用いた骨芽細胞及び破骨細胞への分化細胞形成能の検討の結果、破骨細胞では野生型マウスと比較して著しい差異が見られなかったが、骨芽細胞では ALDH2-DAL の野生型の骨芽細胞は著しい骨芽細胞形成能の低下を示すことを ALP、Von Kossa、Alizarin Red 等の骨芽細胞染色で確認した (図 2)。また同時に、骨芽細胞分化マーカー遺伝子である、OCN や ALP 遺伝子の発現が有意に低下することを定量的 RT-PCR 及び RT-PCR によって確認した (図 2-B)。これらの結果から、ALDH2 遺伝子の変異は骨芽細胞の分化形成に負の影響を及ぼしていることを示した。

図 2-A 骨芽細胞染色 (上から: ALP, Alizarin red, Von Kossa)、破骨細胞染色(下: TRAP) (右: 野生型、左 ALDH2-DAL)

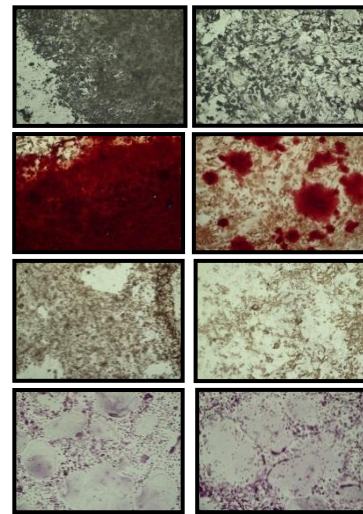
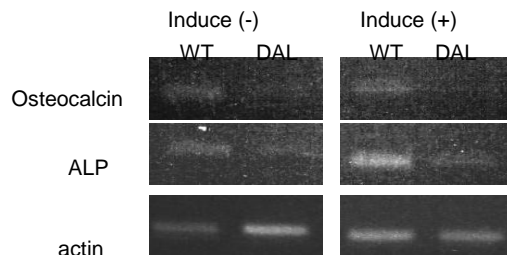


図 2-B 定量的 RT-PCR 及び RT-PCR による骨芽細胞分化マーカーの発現量変化



(3) ALDH2 酵素はアセトアルデヒドを分解する酵素であることから、遺伝子の変異に伴う ALDH2 酵素の不活性化によって体内にアセトアルデヒドやアセトアルデヒド産物が蓄積することが予測される。そこで本研究では、骨芽細胞の分化形成不全を引き起こす原因分子の同定を試みた。実験の結果、野生型マウスと比較して血漿中に有意なアセトアルデヒド濃度の上昇を認めた (図 3-A,B)。また、ALDH2-DAL の骨芽細胞中では 4HNE が野生型マウスの骨芽細胞と比較して著しく蓄積していることを確認した。これらの結果より、ALDH2-DAL マウスの骨脆弱性はアセトアルデヒド、及び 4HNE の有意な発現の上昇、蓄積によってもたらされることを示した。

図 3-A、血漿中のアセトアルデヒド濃度

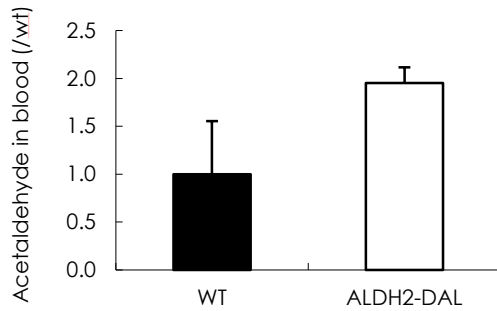
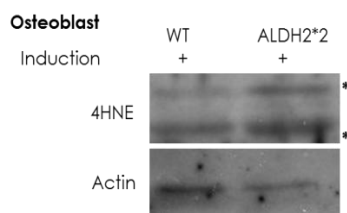


図 3-B 骨芽細胞内の 4HNE



(4) MC 3T3-E1 細胞に対して直接アセトアルデヒドを添加し骨分化形成能を検討した。その結果、ALDH2-DAL 骨芽細胞と同様に ALP や OCN の骨芽細胞分化マーカーの著しい発現量の低下を示す一方で、脂肪細胞の分化マーカーが著しく発現上昇することを確認した(図 4-A)。またこの結果は ALDH2-DAL の骨髄細胞及び組織においても同様に見られた(図 4-B)。更に、dn-ALDH2 型の遺伝子を有するヒト骨髄細胞由来の骨芽細胞においても同様に、骨芽細胞分化マーカーの発現減少と脂肪分化マーカーの発現上昇の傾向を示すことを明らかにした。

図 4-A: MC 3T3-E1 を用いたアセトアルデヒド存在下での骨芽細胞及び脂肪細胞分化マーカーの発現量の定量的 RT-PCR

(左より骨芽細胞分化マーカー(ALP, OCN), 脂肪細胞分化因子 (PPAR γ -2))

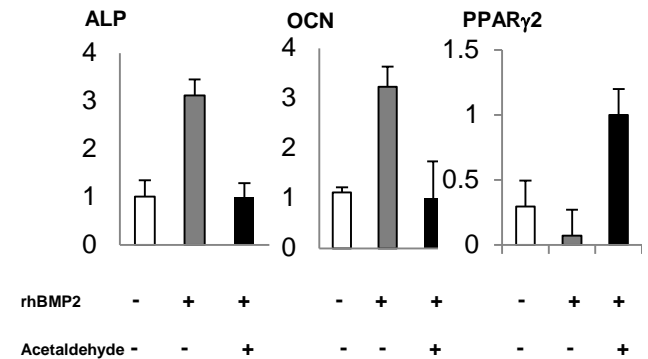
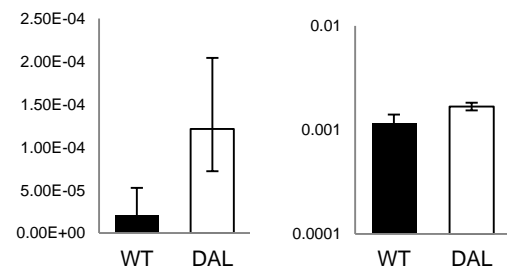


図 4-B マウス皮質骨中の脂肪分化マーカーの発現 (右: PPAR γ -2、左: aP2)



以上の結果から、ALDH2-DAL マウスは有意な血中アセトアルデヒド濃度の上昇と骨芽細胞内の過酸化脂質タンパク質 (4HNE) の蓄積によって骨芽細胞への分化阻害を引き起こし、骨粗鬆症の症状を引き起こしていることを明らかにした。

本研究により、ALDH2 遺伝子の変異が骨粗鬆症のリスクファクターとなりうることを示した。今後この結果を利用して、骨粗鬆症の効果的な予防法の開発が期待される。

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 5 件)

(1) Hiroko Hoshi Yoshiaki Toyama, Takeshi Miyamoto, et, al .
Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research.*, in press. (2012), 査読有

(2) Hiroya Miyamoto, Hiroko Hoshi, Takeshi Miyamoto, et, al.,
OC-STAMP and DC-STAMP cooperatively modulate cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells., *Journal of Bone and Mineral Research.*, in press. (2012), 査読有

(3) Hiroko Hoshi, Ken Shimawaki, Yasuhiro Takegawa, Hiroshi Hinou and Shin-Ichiro Noshimura. Molecular shuttle between extracellular and cytoplasmic space: Glycosaminoglycan biosynthesis promoted by seryglycin precursor glycopeptides in human articular chondrocytes, *Biochemica et Biophysica Acta.*, in press. (2012), 査読有

(4) Kana Miyamoto., Hiroko Hoshi. and Takeshi Miyamoto., et, al. Osteoclasts are dispensable for hematopoietic stem cell maintenance and mobilization. *Journal of Experimental Medicine.* **208**, (11) 2175-2181, (2011), 査読有

(5) Hiroko Hoshi and Takeshi Miyamoto.
Mutation of *Aldh2* gene suppresses osteoblasts differentiation by accumulation of acetaldehyde and peroxidated lipid-protein. *Osteoporosis International.*, 22., 605-606, (2011), 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. Hiroko Hoshi, Hao Wu, Yoshiaki Toyama and Takeshi Miyamoto.
“Mutation of *Aldh2* gene suppresses osteoblasts differentiation by accumulation of acetaldehyde and peroxidated lipid-protein.”,
2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting, Sep 5th, 2011, (Gold Coast, Australia)

2. 星淡子、宮本健史、他
Aldh2 遺伝子変異はアセトアルデヒド及び酸化脂質の蓄積により骨芽細胞の分化抑制をきたす。
第 29 回日本骨代謝学会学術集会、2011 年 7 月 30 日、(大阪)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

星 淡子 (HOSHI HIROKO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：50399812