

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(A)
研究期間：2011～2013
課題番号：23689067
研究課題名(和文)一酸化炭素を介した骨組織細胞間ネットワークの解明

研究課題名(英文)Effects of carbon monoxide on bone metabolism.

研究代表者

中村 貴(Nakamura, Takashi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80431948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,900,000円、(間接経費) 6,270,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では骨組織における一酸化炭素の役割を調べる目的で破骨細胞特異的な一酸化炭素産生酵素・ヘムオキシゲナーゼの遺伝子破壊動物を作成した。その結果、作出したマウスは破骨細胞分化に異常は見られないものの、正常動物では観察されない異所性の骨形成が観察されたことから、一酸化炭素は骨リモデリングの制御分子として機能していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Carbon monoxide has been recognized as a gaseous mediator with a variety of physiological functions. However, its role in the control of skeletal function is unknown. Carbon monoxide can be physiologically generated by enzymes, heme oxygenase (HO). To define the physiological function of carbon monoxide in the skeletal tissue, we performed functional analysis of bone metabolism in osteoclast-specific HO knockout mice. The knockout mice showed ectopic bone formation. These results suggest that carbon monoxide is essential for normal bone remodeling.

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：骨代謝 ガスバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

DNA やヒストンのメチル化はエピゲノム制御機構の一つであり、そのメチル基(-CH3)源はメチオニン代謝経路によって供給される。一方、メチオニン代謝酵素群の変異の多くは、体内で過剰のホモシステイン(および二量体型のホモシステイン)が蓄積するホモシステイン尿症とよばれる先天性のアミノ酸代謝異常を引き起こす。なかでもヒト CBS 遺伝子欠損変異は、高身長・四肢指伸長・漏斗胸などの軟骨形態異常と続発性骨粗鬆症を呈する。これらの骨組織異常は、CBS 欠損に伴う血中ホモシステイン濃度上昇に起因するコラーゲン繊維の架橋異常によるものと考えられている。しかし、CBS の上流反応を司る MTHFR 遺伝子の変異個体では、ホモシステイン尿症を呈するにもかかわらず骨密度変化を示さない。この事は CBS 変異個体における骨組織異常がホモシステイン蓄積以外のメカニズムによって引き起こされる事を示している。また、CBS の抑制分子である一酸化炭素・CO はマクロファージ系細胞で高発現するヘムオキシゲナーゼ-1 (H0-1) によって産生され、破骨細胞においても炎症刺激によって H0-1 の著しい発現増加が観察される。これらの知見から、炎症性破骨細胞で発現する H0-1 により産生された CO 分子が、破骨細胞・骨芽細胞・軟骨細胞内の CBS を介して骨代謝制御因子の遺伝子発現をエピジェネティックに制御している可能性が考えられた。そこで本研究では、破骨細胞内 H0-1 と、骨組織の細胞で発現する CBS 間の CO 分子を介した機能的関連の証明と骨組織細胞における CBS 依存のエピゲノム制御標的分子の同定を重点目標とする。

2. 研究の目的

ヒトのシスタチオニン 合成酵素(CBS) 遺伝子欠損は軟骨形態異常・骨粗鬆症などの骨組織異常を示すが、その発症メカニズムは不明である。本研究では CBS と、そのアロステリック阻害分子である一酸化炭素(CO)に着目し、炎症性骨破壊におけるガスメディエーターを介した骨代謝制御機構の解明を目的とする。特に、マウス遺伝学的手法を駆使する事で個体レベルでの細胞間遺伝的相互作用の解明を目指すとともに、次世代型分子イメージング技術・質量顕微鏡法を用いて、細胞レベルにおける CBS 代謝分子の可視化と、代謝分子を介した骨代謝制御因子のエピゲノム制御について解明を試みる。具体的には Cathepsin K-Cre マウスと floxed H0-1 マウスを交配する事で破骨細胞特異的 H0-1KO マウスを作成し、正常骨組織における破骨細胞内の H0-1 生理機能を調べるほか、H0-1 のアイソフォームである H0-2 を時期組織特異的に破壊可能な floxed H0-2 マウス、同様に時期組織特異的に CBS 遺伝子を破壊可能な

floxed CBS マウス、骨細胞特異的な遺伝子破壊を可能とする Dmp1-T2A-Cre マウスの作出と、これらの交配による H0, CBS の骨組織特異的機能の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1)破骨細胞特異的 H0-1 KO マウスの解析

Cathepsin K-Cre マウスと floxed H0-1 マウス(東北大学 山本雅之教授より分与)の交配により、破骨細胞特異的 H0-1 遺伝子ノックアウトマウスを作成し、骨組織の表現型を μ CT 及び組織切片作成、マーカー遺伝子の発現変動により評価する。特に CBS 変異で異常が観察される軟骨組織・骨密度変化に着目して解析を行う。また、野生型・KO マウス骨組織に LPS 投与を行なう事で、炎症性骨破壊時における H0-1 の機能についても調べる。

(2)floxed H0-2 マウスおよび floxed CBS マウス、骨細胞種特異的 Cre 発現マウス系統の作出

floxed H0-2 の標的ベクターを作成し、相同組換え体クローンを用いてキメラマウスの作出を行う(図1)。

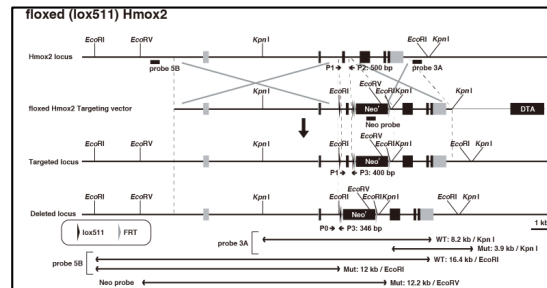


図1. floxed H0-2 マウス遺伝子地図

さらに、骨細胞特異的遺伝子座に Cre 遺伝子をノックインした Dmp1-cre マウス系統の樹立を行なう(図2)。

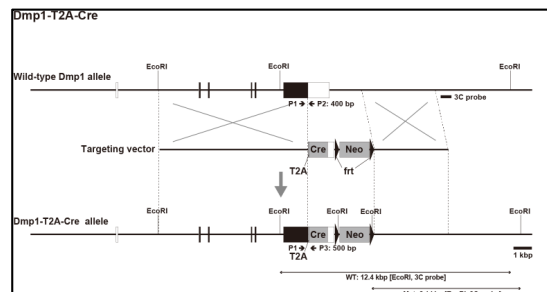


図2. Dmp1-T2A-Cre マウス遺伝子地図

また、floxed CBS マウスの作出も同様に試みる。

(3)骨組織における H0-1 と H0-2 の高次機能

解析

樹立した floxed H0-2 マウスと破骨細胞特異的 Cre 発現マウスである Cathepsin K-Cre あるいは骨細胞種特異的な Cre 発現マウスである Dmp1-Cre を交配する事で骨細胞種特異的な H0-1 あるいは H0-2、更には H0-1/2 の二重遺伝子破壊マウスを作出し、骨組織での H0-1、H0-2 の高次機能解析を行う。

4. 研究成果

一酸化炭素産生酵素であるヘムオキシゲナーゼは骨組織においてマクロファージ系の骨吸収細胞である破骨細胞では H0-1 が、また間葉系幹細胞から分化する骨細胞では H0-2 が高発現している。これらの細胞から放出された CO 分子が骨代謝を制御しているか否かについて解明する目的で、生体骨組織における H0 高次機能の解明を試みている。これまでに Cre/loxP システムを用いた破骨細胞特異的 H0-1 ノックアウトマウスを作成し、その骨組織を解析したところ、皮質骨の一部において異常な骨形成亢進が認められたため、現在そのメカニズムを解析中である。また、骨細胞内の H0-2 機能を明らかにする目的で、floxed H0-2 ノックアウトマウスと骨細胞特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスの作出を試み、両系統の樹立に成功した。このうち、骨細胞特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスとして樹立した Dmp1-T2A-Cre 系統は、2A 配列を用いる事で Dmp1 遺伝子と Cre 遺伝子の両方を含むバイシストロン性 mRNA を発現するノックインマウスとして樹立した事で、この試みにより、従来の Cre トランスジェニックマウスや Cre 或いは IRES-Cre ノックインマウスで問題となっていた発現特異性の低下や内在遺伝子欠損による異常、Cre 遺伝子の発現低下を回避し、Cre リコンビナーゼを骨細胞種特異的に高発現する極めて理想的な Cre 発現マウスとして樹立する事に成功した(図3)。

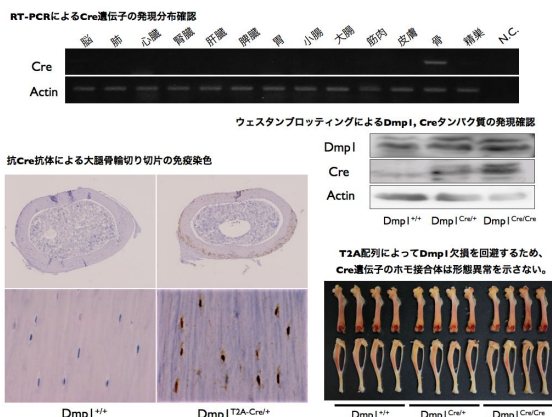


図 3. 申請者が新たに樹立に成功した Dmp1-T2A-Cre ノックインマウス. 2A 配列によって内在の Dmp1 遺伝子の発現量に影響を

与える事なく、Cre 遺伝子を骨細胞特異的に高発現するマウス系統の樹立に成功した。従来の Cre トランスジェニックマウスや Cre ノックインマウス、IRES-Cre ノックインマウス等の欠点である発現特異性の低下や発現量不足、内在遺伝子欠損を克服し、非常に使い勝手の良い新たな Cre 発現マウス系統の作出が可能となった。

現在これらの系統を交配し、骨細胞特異的 H0-2KO マウスの樹立を行なっている。H0 による骨代謝制御機構について、生体レベルで解析を行った報告は皆無であり、本研究で得られた知見はガス分子による骨代謝制御機構の理解に貢献するものと考えられる。

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 3件)

1. 加藤 茂明、中村 貴
エストロゲン受容体ノックアウトマウスを用いた研究の発展
O.l.i.v.e.-骨代謝と生活習慣病の関連-
査読無し
2013年
52-55
http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J71_03_02

2. Yoshikazu Hirose, Eiko Saijou, Yasuyoshi Sugano, Fumitaka Takeshita, Satoshi Nishimura, Hidenori Nonaka, Yen-Rong Chen, Keisuke Sekine, Taketomo Kido, Takashi Nakamura, Shigeaki Kato, Toru Kanke, Koji Nakamura, Ryoza Nagai, Takahiro Ochiya, Atsushi Miyajima.
Inhibition of Stabilin-2 elevates circulating hyaluronic acid levels and prevents tumor metastasis.
Proceedings of National Academy of Science U S A.
査読有り
109(11), 2012: 4263-4268
DOI: 10.1073/pnas.1117560109.

3. Norio Miyamura, Takashi Nakamura, Naoko Goto-Inoue, Nobuhiro Zaima, Takahiro Hayasaka, Tokiwa Yamasaki, Shuji Terai, Isao Sakaida, Mitsutoshi Setou, Hiroshi Nishina.
Imaging mass spectrometry reveals characteristic changes in triglyceride and phospholipid species in regenerating mouse liver.
Biochemical and Biophysical Research

Communications

査読有り

408(1): 120-125

DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.03.133.

〔学会発表〕(計 2件)

(1)上原 俊介、山下 照仁、中村 貴、加藤 茂明、宇田川 信之、高橋 直之、小林 泰浩

Wnt5a-Ror2 シグナルは、Daam2-Rho を介して骨吸収機能を促進する

第 32 回日本骨代謝学会学術集会

2014 年 7 月 24～26 日

大阪国際会議場

(2)Tomohiro Matsumoto, Yasunari Takada, Takashi Nakamura, Makoto Suematsu, Keiji Inohaya, Akira Kudo, Atsushi Shimizu, and Koichi Matsuo

Transgenic expression of mouse Fra-1 in osteoblasts reduces bone mineralization in medaka fish

18th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting
22-23 September 2012

Kyoto University

〔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

慶應義塾大学医学部医化学教室

<http://www.gasbiology.com/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 貴 (NAKAMURA TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 80431948

(2)研究分担者 なし

()

研究者番号:

(3)連携研究者 なし

()

研究者番号: