

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780293

研究課題名(和文) 骨リモデリングを調節するコンドロイチン硫酸種の同定と機能の解析・骨量の制御

研究課題名(英文) Identification and analysis of chondroitin sulfates which regulate bone remodeling, and control of bone mass

研究代表者

保坂 善真 (HOSAKA, Yoshinao)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：00337023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：CSが破骨細胞の分化と機能に与える影響とその機構を解析した。検索したCS種のうちCS-E処理群では破骨細胞への分化が強く抑制され、骨吸収部位の面積も陽性対照と比較して有意に減少した。CSと破骨細胞分化関連因子との結合性を解析すると、CSは破骨細胞分化に必須な因子であるRANKLと結合したが、その受容体のRANKや破骨細胞の生存に必要なM-CSFとは結合しなかった。またRANKシグナル伝達がCS添加で抑制されていた。これらのことからCSはRANKLと結合してRANK-RANKL複合体の形成を阻害し、RANKシグナルの活性化を抑制することで破骨細胞の分化を調節し、骨吸収活性を抑制したと結論した。

研究成果の概要(英文)：In present study, I investigated the osteoclast inhibition ability in CS and the mechanism how CS inhibit osteoclast differentiation in vitro. CS was significantly inhibited the number of tartrate-resistance acid phosphatase (TRAP)-positive multinucleated cells and bone resorption activity in pit formation assay. In quartz-crystal microbalance method, CS revealed the binding ability to RANKL and interrupted binding of RANK to RANKL. Furthermore, CS reduced the phosphorylation of extracellular ERK in pre-osteoclast cells. These results indicate that CS suppress osteoclast size and osteoclastogenesis by binding to RANKL and inhibited RANK signal pathway.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：破骨細胞 骨芽細胞 コンドロイチン硫酸 骨リモデリング 分化 RANKL RANK 骨吸収能

1. 研究開始当初の背景

コンドロイチン硫酸(CS)を骨芽細胞に作用させると分化が促進し骨形成機能が増強する。一方、破骨細胞は逆に分化が抑制され骨吸収機能が低下するようだ。しかし、CS がどのような機構で破骨細胞に作用してその機能を維持、発揮しているのかは、未解明のままであった。

2. 研究の目的

本研究ではおもに CS の破骨細胞への機能と作用機構を解明すること、そして、その CS の機能を応用して骨量制御を試みることを目的とした。

具体的には、以下の課題 破骨細胞分化を抑制する CS の同定と細胞応答の解明、分化誘導した破骨細胞の性状の解析、CS と破骨細胞分化関連因子との結合能と作用機構の解明、そして CS による骨代謝改善(骨量制御)の試みとその作用機構の解明、に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞分化を抑制する CS の同定と細胞応答の解明

破骨細胞の分化への関与が濃厚と考えられる CS 種を選定しその存在下で破骨細胞に分化誘導した。得られた細胞の応答と性状を比較、解析し、破骨細胞への分化を強力に抑制する糖鎖(CS)を決定するとともに、分化誘導した細胞の性状を解析した。

CS-A、B、C、D および E の存在下で破骨細胞前駆細胞である RAW264 細胞を破骨細胞に分化誘導したところ、CS-E を加えた場合、破骨細胞への分化(酒石酸耐性酸性ホスファターゼ:TRAP 陽性かつ 3 核以上を指標)が有意に抑制されていたことより、CS-E を実験に用いることとした。これに加え、硫酸基を持たない CS-0、CS (CS-E および CS-0) をコンドロイチナーゼ ABC で処理した二単糖 CS を使用した。骨吸収能は、破骨細胞を骨基質上で培養し、その吸収面積を計測、比較することで評価した (Pit assay)。

(2) CS と破骨細胞分化関連因子との結合能と作用機構の解明

CS と破骨細胞分化関連因子 (RANKL, RANK および M-CSF) とが結合し、破骨細胞の分化を制御していると考え、水晶発振子マイクロバランス法(QCM)で結合の度合いを測定した。その結果、CS と RANKL との結合が確認できたことから、RANKL の

受容体である RANK の細胞内シグナルの変化 (ERK のリン酸化を指標) をフローサイトメトリー (FCM) で解析、定量した。

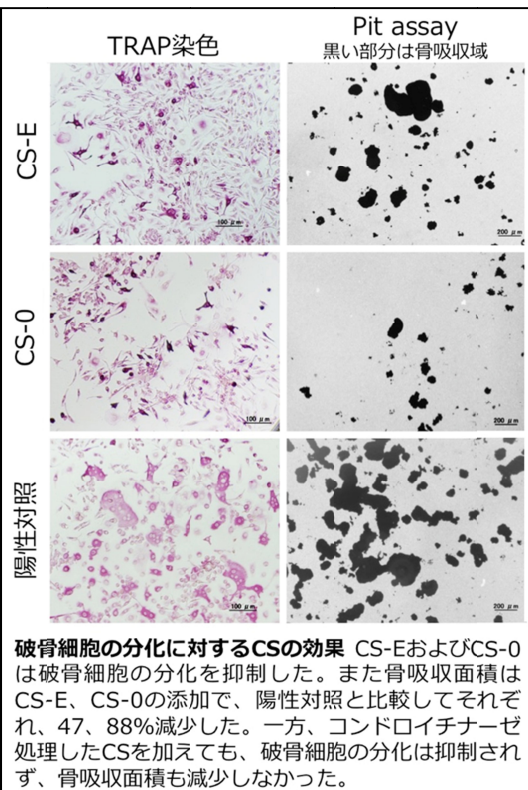
(3) CSによる骨代謝改善(骨量制御)の試みとその作用機構の解明

卵巣摘出後に低カルシウム飼料を一定期間投与することで閉経後骨粗鬆症モデルラット (OVXラット) を作成した。その後CS を腹腔内に投与し12週間飼育した。飼育終了時に動物から血液を採取し、血清中の骨形成および分解マーカー (オステオカルシン、ALP、NTx) をELISAで計測するとともに、脛骨の形態計測を行った。

4. 研究成果

(1) TRAP 陽性を示す多核細胞の形成は CS-E の添加により陽性対照と比較して抑制され、Pit assay の結果でも骨吸収部位の面積は陽性対照と比較して有意に減少した。CS-0を加えたものは多核でTRAP陽性の細胞を多数確認できたが、骨吸収面積の値はCS-E よりも低くなった。

この結果から、CS-E および CS-0 は硫酸基の有無に関わらず破骨細胞への分化を抑制するものの CS-E と CS-0 の間には、骨吸収の機能発現に違いがあることが考えられた。



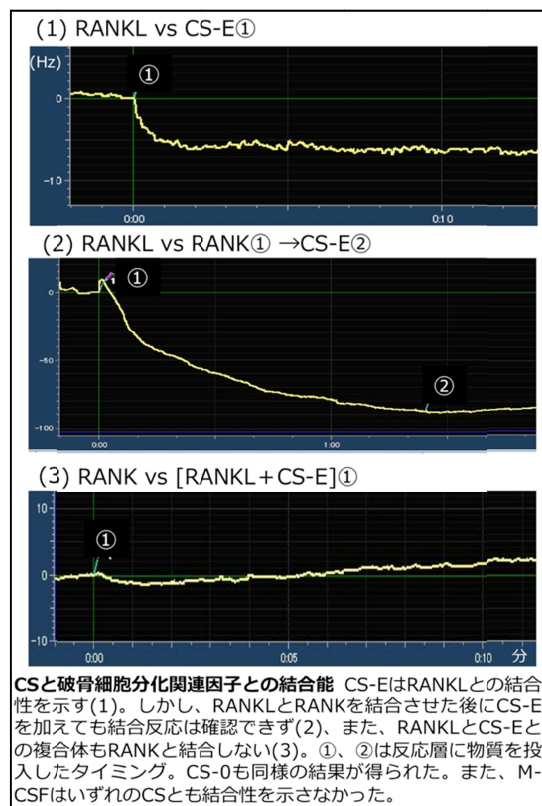
また、二単糖 CS を添加した場合、TRAP 陽性多核細胞数は、陽性対照のレベルまで回復したことから、二単糖では破骨細胞の

分化抑制活性はないと考えた。すなわち、糖鎖の「長さ」も、破骨細胞の分化を決定する一因なのだろう。

(2) QCM で CS の作用部位を検索したところ、CS-E および CS-0 はともに破骨細胞分化の必須因子である RANKL と結合性を示し RANK シグナル伝達を抑制した。しかし、CS (CS-E、CS-0 とともに) は RANKL の受容体である RANK にも、破骨細胞の生存に関与する M-CSF にも結合性を示さなかった。よって CS は RANK および M-CSF の機能を直接的には阻害しないと考えた。

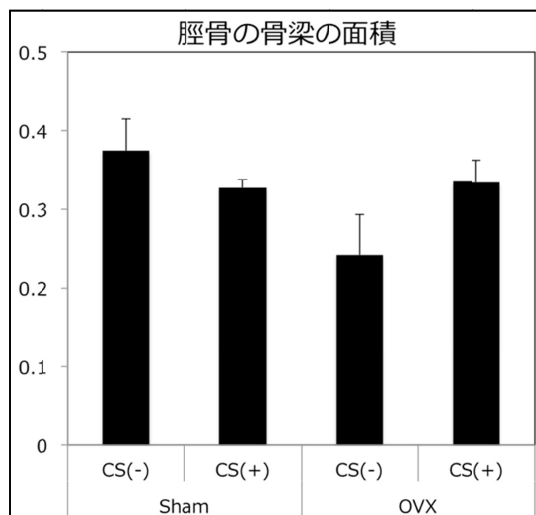
FCM による解析の結果、RANK シグナルである ERK のリン酸化が CS 添加によって抑制された。

これらの結果から、CS は RANK のリガンドである RANKL と複合体を形成することで、細胞膜上の RANK へのアクセスを阻害し、シグナルの活性化を抑制したと考えた。



(3) 動物実験期間終了時の血清中の骨形成マーカー(オステオカルシン、ALP)の濃度は、OVXラット(OVX処理/CS無投与)のそれらと比較して上昇した。一方、RANKL量はOVXラットよりも低下した。また、破骨細胞の機能を反映するNTxの量も減少した。OVXラットの骨梁面積は対照(Sham/CS無投与)のおよそ64%まで減少したが、CS投与(OVX処理/CS投与)によって対照の90%まで回復した。

これらのことを総合的に考えると、OVXラットの体内では、CSが骨芽細胞の機能を亢進させる一方で、RANKLの機能発現を直接的あるいは間接的に調節しながら破骨細胞の分化を抑制し、骨量を制御することで骨代謝を改善したと推測した。



CSによる骨梁面積の回復効果 閉経後骨粗鬆症を実験的に作成したラットに、CSを投与して12週間飼育し、脛骨の骨梁面積を測定した。OVXラット(OVX/CS(-))の骨梁面積は、対照(Sham/CS(-))のおよそ64%程度まで減少していたが、CS投与(OVX/CS(+))によってその面積は約90%まで回復した。

以上より、CSは骨芽細胞に働きかけてRANKL量の産生を抑制させること、そして、RANKLと結合してRANK-RANKL複合体の形成を阻害し、RANKシグナルの活性化を抑制することで破骨細胞の分化を調節し、骨吸収活性を抑制していると結論した。

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 1 件)

Hosaka YZ, Iwai Y, Tamura J, Uehara M. Diamond squid (*Thysanoteuthis rhombus*)-derived chondroitin sulfate stimulates bone healing within a rat calvarial defect. *Marine Drugs*, 11: 5024-5035, 2013

[学会発表](計 2 件)

近藤竜明、保坂善真、田村純一、上原正人 破骨細胞の分化と骨吸収能をコンドロイチン硫酸は抑制する 第156回日本獣医学会学術集会(岐阜市、平成25年9月20日)

朝倉ひとみ、保坂善真、田村純一、上原正人 コンドロイチン硫酸の骨形成能生体内での検証 第156回日本獣医学会学術集会(岐阜市、平成25年9月20日)

[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

<http://staff.muses.tottori-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保坂 善真 (HOSAKA, Yoshinao)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：00337023