

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659686

研究課題名(和文) 内因性硫化水素による骨芽細胞機能制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Physiological function of hydrogen sulfide in osteoblasts.

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) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではガスメディエーターによる骨代謝制御機構の解明を目的として、骨組織における内因性硫化水素の役割に注目し、硫化水素産生酵素であるシスタチオンシン 合成酵素(CBS)の遺伝子破壊マウスの解析を行った。その結果、CBS遺伝子破壊マウスでは様々な骨代謝異常が観察された。以上の結果から、硫化水素は正常な骨組織の維持に重要な役割を担っていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen sulfide has been recognized as a gaseous mediator with a variety of physiological functions. However, its role in the control of skeletal function is unknown. Hydrogen sulfide can be physiologically generated by enzymes, cystathionine beta-synthase (CBS). To define the physiological function of hydrogen sulfide in the skeletal tissue, we performed functional analysis of bone metabolism in CBS knockout mice. The knockout mice showed significant growth retardation and various skeletal disorders. These results suggest that hydrogen sulfide is essential for normal bone metabolism.

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

硫化水素はミトコンドリア呼吸鎖のシトクロム c オキシダーゼを阻害する猛毒のガスとして有名であるが、最近では生体内において産生される重要なガス状の情報伝達物質(ガスメディエーター)としての機能が発見され、その生理活性と作用メカニズムに対する関心が高まりつつある。しかしながら試験管レベルの研究が中心であり、個体レベルにおける硫化水素の明確な生理機能の報告は極めて少ない。特に骨組織での硫化水素機能に関する報告は *in vitro* と *in vivo* どちらについても皆無である。一方、糖尿病性骨粗鬆症の一因として血中ホモシスチン濃度の上昇に伴うコラーゲン架橋の阻害が提唱されているが、臨床試験で見られたオステオカルシン値の低下はコラーゲン架橋異常とは直接関連があるとは考えにくい。以上の知見を元に、申請者はホモシスチンの代謝によって産生される硫化水素により骨芽細胞分化が制御されている可能性を考えた。実際に、ホモシスチン代謝酵素である CBS の遺伝子ノックアウトマウスでは内軟骨性骨化遅延を示唆するデータが報告されている。しかしながら全身性 CBS 遺伝子ノックアウトマウスは生後間もなく致死となるうえ、肝機能低下によるホモシスチン尿症を呈するため、観察される表現型が血中ホモシスチンの増加と硫化水素産生低下のどちらに依るものなのか、更には、骨組織異常がどのような細胞機能障害によって引き起こされているのか詳細な解明が困難である。この点を克服するため、本研究では Cre/loxP システムを用いる事で、骨細胞種特異的な遺伝子破壊を行い、全身性遺伝子欠損によるホモシスチン蓄積を回避することで、骨組織局所における硫化水素産生部位の特定と、骨芽細胞に対する硫化水素作用メカニズムの解明を目指す。

2. 研究の目的

糖尿病性骨粗鬆症では骨形成低下に伴う骨量減少が観察され、近年我が国で行われた大規模臨床試験でも糖尿病患者における骨形成マーカーである血中オステオカルシン値の低下が報告されている。また、最近の研究によって骨組織が産生するホルモンを介したグルコース・エネルギー代謝制御機構の存在が示された (Ferron M. et al., Cell, 2010)。以上のことはグルコース・エネルギー代謝と骨代謝が密接な相互作用によって制御されている可能性を示唆している。しかしながら、糖尿病性骨粗鬆症の具体的な発症メカニズムは明らかにされていない。

申請者はこれまでガスメディエーターである一酸化炭素 (CO) の産生を骨組織特異的に抑えた遺伝子改変動物の作出に成功し、一

酸化炭素による骨代謝制御機構の存在を発見した。一方で、一酸化炭素がエネルギー代謝と深く関わるメチオン代謝経路の制御分子であることが申請者の所属グループによって明らかとなっている (Shintani T. et al., Hepatology, 2009)。加えて、分子メカニズムは不明であるものの、メチオン代謝の律速酵素である CBS の遺伝子欠損マウスでは、骨芽細胞機能低下に伴う骨密度の減少が起こる事が報告されている (Robert K., et al., Anat Rec Discov Mol Cell Evol Biol, 2005)。CBS はホモシスチンを基質として硫化水素を産生する酵素であり、この反応は一酸化炭素によってアロステリック阻害を受けるほか、補酵素として V. B6 を必要とする。糖尿病では糖代謝異常により V. B6 欠乏状態となる事から、CBS 代謝産物を介した骨組織の制御システムの存在が考えられた。即ち、V. B6 欠乏による CBS 機能低下に伴う硫化水素産生減少が骨芽細胞機能の低下を引き起こす事で糖尿病性骨粗鬆症が発症するとの独自の仮説を考えた。これを証明するため、本研究では骨細胞種特異的 CBS ノックアウトマウスを新たに作出する事で骨組織における硫化水素機能の解明を試みる。

3. 研究の方法

骨組織特異的 CBS KO マウス系統の作出・解析による骨組織における CBS 高次機能解析が研究の中心を成す。まず、全身性 CBS KO マウスの骨組織表現型を解析するとともに、その表現型を元に特定の骨組織細胞種特異的 CBS KO マウスを新たに樹立し、CBS が産生する硫化水素分子の骨組織での機能を明らかにするとともに、質量顕微鏡法を用いた分子イメージングにより、V. B6 と硫化水素分子の骨組織内での局在を明らかにする。更に異常骨組織での遺伝子発現解析により、硫化水素の標的分子を特定する事で、硫化水素による骨代謝制御機構の解明を目指す。

(1) 全身性 CBS KO マウスの解析

全身性 CBS KO マウスの骨組織の表現型をマイクロ CT 及び組織切片作成、マーカー遺伝子の発現変動解析により詳細な骨組織の表現型を解析する。また、KO マウス由来の骨芽細胞・破骨細胞を用いた初代培養を行い、*in vitro* における細胞機能の変化を調べる。

(2) floxed CBS マウスおよび骨組織特異的 CBS 遺伝子破壊マウス系統の作出

floxed CBS 相同組換え体 ES クローンを用いてキメラマウスの作出を行い、サザンブロッティングに依る生殖細胞系列への移行確認を行う。作出したマウスを交配することで、骨細胞種特異的な CBS KO マウスの作出を行う。

4. 研究成果

硫化水素産生酵素である CBS の遺伝子欠損は骨粗鬆症をはじめとする多彩な表現型を示すが、個々の異常が起こるメカニズムについてはその多くが不明である。そこで硫化水素がもつ新たな生理機能の発見を目的とし、CBS 欠損によって引き起こされる骨粗鬆症の発症メカニズムについて解析を進めた。まずは骨組織特異的な CBS 遺伝子破壊マウスを樹立する目的で、ジーンターゲット法による条件付き CBS KO マウスの作出を試みた。しかしながら、完全な相同組換えを起こした ES 細胞クローンの取得効率が低かったため、新たなターゲットベクターを構築し、現在も引き続き条件付き CBS KO マウス系統の作出を行なっている。一方で、全身性 CBS ノックアウトマウスの骨代謝に関連する表現型について詳細な解析を行なった。まずは骨芽細胞分化能に関する異常の有無を調べるため、新生仔マウスの頭蓋骨由来骨芽細胞を単離し、骨芽細胞用の分化培地で 4 週間継続培養の後、アリザリンレッド染色による Bone nodule formation assay を行なった。その結果、野生型由来の骨芽細胞と CBS ノックアウトマウス由来の骨芽細胞で分化度合いの違いは観察されなかった。このことから、CBS は骨芽細胞分化に直接関与していないと考えられた。そこでつぎに、破骨細胞分化への影響を調べる目的で成体マウス大腿骨および脛骨から骨髄マクロファージを単離し、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 存在下において破骨細胞分化誘導因子である RANKL 刺激を加えることで、in vitro での破骨細胞分化を観察した。分化した破骨細胞は TRAP 染色によって特異的染色を行い、形成された破骨細胞数の計測を行なった。その結果、野生型の骨髄マクロファージと CBS KO 由来の骨髄マクロファージで破骨細胞形成数に差は見られなかった。以上の結果から、CBS KO で観察される骨減少は、骨芽細胞分化や破骨細胞分化などの骨組織における細胞自律的な直接作用が原因ではないと考えられた。そこで次に、野生型マウスと CBS KO マウスでの骨組織における遺伝子発現量を比較する為、定量的 PCR によって骨代謝マーカー遺伝子群の発現量を解析した。その結果、骨芽細胞分化マーカーであるオステオカルシン遺伝子や、破骨細胞分化阻害因子である OPG の発現量低下が観察された。今後はこれらの変化が起きた原因を明らかにするため、引き続き詳細な解析を進める予定である。

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 2 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.

[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：