

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791963

研究課題名(和文)骨代謝改善を担う破骨細胞の機能制御に関するエストロゲンとその標的因子の解明

研究課題名(英文)The elucidation of functional regulation of osteoclasts and improvements of bone metabolism by estrogen and estrogen responsive genes

研究代表者

樋山 伸二(Hiyama, Shinji)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：60314754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン(E2)投与した雄ウズラの骨髓細胞から分化した破骨細胞はE2によりアポトーシスは誘導されないが、形態変化とV-ATPaseの発現抑制による骨吸収の抑制が認められた。DNAマイクロアレイの結果から、E2によって発現量が著しく変動した遺伝子は多数見出され、一部の遺伝子は発現抑制により、E2の有無に関わらず破骨細胞数を減少させた。以上の結果から、哺乳動物と異なり、骨髓骨の破骨細胞はE2によりアポトーシスは誘導されないが、機能は抑制されると考えられる。また、顕著に変動した多数の遺伝子の中には、エストロゲン応答遺伝子としてアポトーシス抑制に関わるものもあると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Estrogen inhibited bone resorption, but did not induce apoptosis of osteoclasts that derived from bone marrow cells of estrogen-treated male quails. Further, the morphology of osteoclasts and the expression of ATPase in these cells were affected by estrogen administration. As a result of DNA microarray, a lot of genes that were significantly up- or down-regulated by estrogen administration were identified in these osteoclasts. Osteoclastogenesis from bone marrow cells were suppressed by knock-down of some of genes with/without estrogen. Taken together with these results, estrogen has no effects on the apoptosis of medullary bone osteoclasts, but rather suppress bone resorption. Additionally, it is suggested that many genes that indicated significant regulation of expression are related to the inhibition of apoptosis as estrogen responsive genes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード：口腔解剖学 骨代謝 エストロゲン 破骨細胞 エストロゲン応答遺伝子

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の訪れとともに、骨粗鬆症患者の増大が大きな社会問題となっている。特に女性においては、閉経によるエストロゲン欠乏が骨吸収を亢進させ、脊椎や下肢だけでなく、歯科領域となる顎骨、さらには頭頸部の骨の非薄化を招き、咀嚼機能の低下および骨折を誘発している。その治療薬として使用されているビスホスフォネートは、破骨細胞のアポトーシスを誘導することで骨吸収を抑制するが、顎骨壊死や骨質不良などを誘発し、その結果、骨折に至るといった新たな問題が浮き彫りになっている。エストロゲン欠乏が原因とされることから、エストロゲン投与による治療も行なわれた。しかしながら、乳ガンや子宮頸ガンなどのリスクが高まることから、選択的エストロゲン調節薬も使用されているものの、同様のガンの誘発といった副作用は完全に回避出来ていない。それゆえ、骨量の維持および増加はもとより、副作用の無い治療薬による正常な骨リモデリングおよび骨量の改善は QOL 向上のため、可及的速やかに解決されなければならない。

哺乳動物の破骨細胞において、エストロゲンがその受容体を介してアポトーシスを誘導することが報告されている。このことから、破骨細胞とエストロゲンの関係について、進展が見込まれるが、上述のことから、骨粗鬆症の治療において、直接的な関係に行き着くには、さらなる進展が必要とされる。

鳥類には、哺乳動物に比べて飛躍的にエストロゲンに高い反応性を示す骨髄骨が存在している。この骨髄骨は、卵殻形成のためのカルシウムの供給源として骨髄中に形成され、産卵周期の血中エストロゲン値の増減に応じて迅速なリモデリングが行なわれている。また、実験的エストロゲン投与により、骨髄骨は容易に形成され、その後速やかに吸収される。このように、鳥類の骨髄骨はエストロゲンの強い支配を受け、リモデリングが行なわれている。このリモデリングにおいて、血中エストロゲン値の高い骨形成期に、破骨細胞は骨吸収を停止した休止状態で骨髄骨表面に存在し、エストロゲン値が低くなる骨吸収期に再び活発に骨吸収を行なう。さらに、エストロゲンは破骨細胞のアポトーシス誘導に影響を与えることなく、骨吸収を制御している可能性が示唆された。これは哺乳動物の破骨細胞とは異なることから、骨髄骨、特に破骨細胞におけるエストロゲンの作用を追求することは、骨粗鬆症のようなエストロゲン欠乏による骨吸収亢進型の疾病に対して、選択的エストロゲン調節薬やビスホスフォネートとは作用機序の異なる、副作用の無い、より安全な治療薬の開発につながると期待される。

2. 研究の目的

骨粗鬆症は性別に関係なく起こる骨疾患であるが、女性では、閉経によるエストロゲ

ン欠乏が骨吸収を急激に亢進させ、全身の骨だけでなく、顎骨および頭頸部の骨の非薄化を招き、咀嚼機能の低下および骨折を誘発している。それゆえ、骨量の維持および増加のみならず、副作用の無い治療薬による正常な骨質の改善は、可及的速やかに解決される必要がある。本研究は、まずエストロゲンに高い反応性を持ち、哺乳動物の破骨細胞と異なるエストロゲンの反応を示す鳥類骨髄骨の破骨細胞を用いて、エストロゲンとその応答遺伝子を見出し、その機構を解明する。次に、哺乳類の破骨細胞、さらには骨代謝におけるこれらの応答遺伝子の役割を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

骨代謝、特に破骨細胞におけるエストロゲンとエストロゲン応答遺伝子の同定およびその機能を解明するために、まず、エストロゲンに高い反応性を持つ鳥類骨髄骨を用いて、*in vitro* および *in vivo* の実験を行なう。これらの実験の中で、破骨細胞の分化、生死および機能制御に関わるエストロゲン応答遺伝子を同定し、その役割を検討する。

(1) エストロゲン投与した雄ウズラの骨形成期および骨吸収期の骨髄細胞をそれぞれエストロゲン存在下で培養し、破骨細胞に分化させる。これらのエストロゲンに感作された破骨細胞を用いて、DNA マイクロアレイ解析によりエストロゲン応答遺伝子を同定する。

(2) エストロゲン応答遺伝子として得られる遺伝子の候補は多数存在すると考えられるため、NCBI などの遺伝子バンクの情報を利用し、得られた遺伝子の塩基配列をもとに破骨細胞の機能およびアポトーシスに関連する遺伝子を検索する。さらに、該当したエストロゲン応答遺伝子の機能の解明のため、同様に骨髄細胞から破骨細胞を分化させる際に、それらの遺伝子に対し RNAi 法による発現抑制、あるいは翻訳されるタンパク質の中和抗体や阻害剤を用いて発現を阻害し、破骨細胞の分化、機能およびアポトーシスへの影響を検討する。

(3) 骨髄骨の破骨細胞はエストロゲン受容体 のみが優位に発現しており(未発表)、骨髄骨リモデリングに関与している可能性が非常に高いことから、Chip assay などによりエストロゲン応答遺伝子が受容体 を介して作用しているか検討する。

(4) 骨髄骨リモデリングにおけるエストロゲン応答遺伝子の役割を明らかにするために、応答遺伝子およびそのタンパク質の発現および局在を *in situ* Hybridization 法および免疫組織学により検出する。また、それらの発現量を RT-PCR 法および ELISA などでも明らかにする。さらに、RNAi 法による発現抑制、または中和抗体や阻害剤を投与し、これらの応答遺伝子およびタンパク質の発現を抑制することによる形態学および分子生物学

的变化を調べ、骨髄骨リモデリングへの影響を検討する。

(5) 哺乳動物におけるエストロゲンとエストロゲン応答遺伝子の役割を解明するために、骨髄骨の実験で得られたエストロゲン応答遺伝子の塩基配列を参考に哺乳動物(マウス)において遺伝子バンクで検索する。さらに、これらの遺伝子あるいはタンパク質が発現しているか、マウス骨髄細胞あるいは細胞株(RAW264.7)から分化させた破骨細胞を用いて、RT-PCR法やウェスタンブロット法などにより検討する。

(6) マウスにおけるエストロゲン応答遺伝子の機能を解明するために、マウス骨髄細胞あるいはRAW264.7を用いて、RNAi法によりこれらの遺伝子の発現を抑制し、破骨細胞形成またはアポトーシス、ならびに骨吸収能への影響を検討する。また、同様に、中和抗体や阻害剤を用いて、タンパク質の機能を阻害し影響を検討する。

(7) 骨リモデリングにおけるエストロゲン応答遺伝子の機能を解明するために、成熟マウスおよび卵巣摘除マウス(骨粗鬆症モデルマウス)に、応答遺伝子の発現をRNAi投与により、タンパク質の発現を中和抗体あるいは阻害剤投与によりそれぞれ抑制する。大腿骨および下顎骨における骨量や形態変化を骨形態計測などにより測定しつつ、破骨細胞の機能および形態的变化、さらには骨芽細胞など関連する細胞の動態についても形態学的、免疫組織学的に調べ、エストロゲン応答遺伝子の役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) エストロゲン投与3日後の雄ウズラの骨髄細胞を採取し、RANKL/M-CSFにより破骨細胞の分化を誘導するとともに、17 β -エストラジオール(17 β -E)を添加した。この17 β -E添加により、破骨細胞はアポトーシスを起こさず、17 β -Eの濃度依存的に骨吸収を抑制した。アポトーシス関連遺伝子(Fas、Caspase 3, 8, 9, Bcl-2)の発現をリアルタイム RT-PCR法にて検討したところ、いずれも高濃度の17 β -Eでのみ、増加していた。これらの細胞を用いて、骨吸収に関連するV-ATPaseの発現を免疫組織学的に検討した結果、17 β -Eにより免疫反応の減少が認められた。以上のことから、アポトーシス関連遺伝子の発現はエストロゲンにより増加するが、骨髄骨破骨細胞にはアポトーシスを抑制する機構が備わっていて、エストロゲンにより機能が抑制されると示唆された。

(2) (1)の実験と同様に、骨髄細胞から破骨細胞を分化させるとともに、17 β -Eを添加した。これらの細胞からTotal RNAを回収し、DNAマイクロアレイにより解析を行なった。その結果、17 β -E無添加の細胞を対照群とし、17 β -Eを添加した細胞と比較したところ、発現量が著しく変動した遺伝子(4倍以上)が

多数見出された(増加した遺伝子は108個、減少した遺伝子は42個)。このことから、骨髄骨の破骨細胞はエストロゲンにตอบสนองして、さまざまな遺伝子の発現を変動させることが明らかになった。

(3) 著しく変動を示した遺伝子をカテゴリー別に分類し、これらのカテゴリーから哺乳動物の破骨細胞の分化、機能およびアポトーシスなどに関連する既知の遺伝子を抽出した結果、増加した遺伝子群から13個の遺伝子、減少した遺伝子群からは3個の遺伝子が認められた。このことから、骨髄骨の破骨細胞において、哺乳動物の破骨細胞で発現している遺伝子と同類の遺伝子がエストロゲンにより変動していることが示唆された。

(4) 増加を示した遺伝子群の中から、2個の遺伝子(遺伝子AおよびB)について、siRNAによる発現抑制を行なった。これまでと同様に、エストロゲン投与3日後の雄ウズラの骨髄細胞をRANKL/M-CSFにより破骨細胞に分化させるとともに、17 β -Eを添加し、培養を行なった。多核細胞が現れる培養後期に、遺伝子AおよびBに対するsiRNAを添加した結果、どちらの遺伝子も発現が抑制された。また、17 β -Eの有無に関わらず、多核細胞の形成が濃度依存的に抑制された。このことから、遺伝子AおよびBのいずれも、成熟破骨細胞の形成を抑制するだけでなく、アポトーシスの誘導に関与している可能性が示唆された。

(5) エストロゲンの破骨細胞の機能に対する影響について、その詳細を調べるために、エストロゲン投与5日後の雄ウズラ(波状縁を形成した破骨細胞が骨髄骨表面に多数存在する)にエストロゲンを再投与した。この再投与により、血中エストロゲン値は再度上昇し、その後、減少を示した。この過程において、形態学的観察を行なったところ、骨髄骨は骨髄腔中心に向かって、さらに形成が進行した。また、骨髄骨表面に存在している破骨細胞は扁平化し、小さくなった。しかしながら、これらの細胞にアポトーシスは認められなかった。骨吸収に関連するV-ATPaseの発現を免疫組織学的に検討した結果、その免疫反応は細胞の形態変化とともに減少した。このことから、培養細胞と同様に骨髄骨の破骨細胞はエストロゲンによりアポトーシスは誘導されないが、機能が抑制されることが推察された。また、その機能の抑制には、V-ATPaseの発現の減少が関与していることが示唆された。

以上の結果から、骨髄骨の破骨細胞は、多数のエストロゲン応答遺伝子と推察される遺伝子が存在し、それらの中にはアポトーシスの抑制に関与する遺伝子が複数存在することが推察された。これらのエストロゲン応答遺伝子には、直接または間接的にアポトーシスの抑制ならびに骨吸収の抑制に関与する遺伝子が含まれると強く推察されるため、これらの遺伝子の作用について調べるこ

は骨代謝へのエストロゲンの役割を明らかにする上で非常に有用であると考えられる。また、エストロゲンにより起こる骨吸収の抑制には、V-ATPase の発現の減少が関与していることが示唆されたことから、V-ATPase の発現に直接的あるいは間接的にエストロゲンあるいはその応答遺伝子が関与していることも予想される。

研究期間において哺乳動物へのアプローチに至らなかったものの、これらの遺伝子には哺乳動物で既知の遺伝子も多数含まれており、さらに未知の遺伝子も含まれていることから、今後、同様にこれらの遺伝子について検討を続けることは、骨粗鬆症などエストロゲン欠乏による骨疾患のみならず、骨代謝全体において非常に有用な知見が得られると示唆される。

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 2件)

1. Shinji Hiyama, Yumiko Kadoyama, Mineo Watanabe, Takashi Uchida. Gene Expression Profiling of Avian Osteoclasts Treated with Estrogen for Exploring Unidentified Action(s) of Estrogen in Bone. Journal of Bone and Mineral Research, 28, S327, 2013. 査読有り

2. Shinji Hiyama, Yumiko Kadoyama, Takashi Uchida. Estrogen is involved in osteoclast activity but neither in osteoclastogenesis nor in osteoclast apoptosis in avian medullary bone. IBMS (International Bone and Mineral Society) BoneKEY. 10, S47, 2013. 査読有り

[学会発表](計 3件)

1. Shinji Hiyama, Yumiko Kadoyama, Mineo Watanabe, Takashi Uchida. Gene Expression Profiling of Avian Osteoclasts Treated with Estrogen for Exploring Unidentified Action(s) of Estrogen in Bone. American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting 2013. 2013. 10.4~10.7. Baltimore, USA.

2. Shinji Hiyama, Yumiko Kadoyama, Takashi Uchida. Estrogen is involved in osteoclast activity but neither in osteoclastogenesis nor in osteoclast apoptosis in avian medullary bone. IBMS (International Bone and Mineral Society). 2013. 5.28~6.1. Kobe, Japan.

3. Shinji Hiyama, Yumiko Kadoyama, Takashi Uchida. The regulation of osteoclastogenesis by the alteration of bone marrow cells in avian medullary bone. Comparative Endocrinology of Calcium Regulation Workshop. 2013.5.28. Kobe,

Japan.

6. 研究組織

(1)研究代表者

樋山 伸二 (HIYAMA SHINJI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・

助教

研究者番号：60314754