

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670673

研究課題名(和文) 硫化水素による骨代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Effect of hydrogen sulfide on calcium homeostasis.

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

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in 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に加えてカルシウム代謝異常が観察された。以上の結果から、硫化水素は正常なカルシウム恒常性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 disturbance of calcium metabolism. These results suggest that hydrogen sulfide is essential for calcium homeostasis.

研究分野：骨・カルシウム代謝

キーワード：ガスメディエーター ビタミンD 硫化水素

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。一方、含硫アミノ酸・ホモシスチンの代謝酵素である 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ことから、申請者は含硫アミノ酸代謝の副産物として産生される硫化水素によって、骨・カルシウム代謝が制御されている可能性を考え、CBS ノックアウトマウスの表現型解析とそのメカニズムの解明を試みることにした。また、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、CBS 欠損に起因したメチオニン代謝不全により、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、硫化水素による骨・カルシウム代謝機構の解明を試みる。

2. 研究の目的

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ニ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、メチオニ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 はガス状情報伝達物質として近年注目を浴びている硫化水素を産生する酵素である事から、CBS-硫化水素系による骨・カルシウム代謝制御システムの存在が考えられた。そこで本研究では CBS ノックアウトマウスの骨組織表現型の詳細な解析を行うことで、硫化水素による新たな生理機能の発見とその原因の特定を試みる。

3. 研究の方法

全身性 CBS ノックアウトマウスの骨・カルシウム代謝の表現型解析と細胞種特異的 CBS ノックアウトマウス作製の為の、floxed CBS マウス系統の樹立を試みる。

(1)全身性 CBS ノックアウトマウスの解析

全身性 CBS ノックアウト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、K0 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ほか、CBS ノックアウトマウスにおける骨代謝制御因子に対する応答性について調べる。

(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

時期組織特異的な遺伝子破壊を行なうため、floxed CBS マウス系統の樹立を行なう。これまでも樹立を試みてきたが、相同組換え体 ES クローンの取得に至らなかったため、標的ベクターの改変を行い、相同組換え体 ES クローンの取得を目指す。相同組換え体クローンが取得出来次第、アグリゲーション法によるキメラマウスの作出を行い、サザンブロット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、細胞種特異的な CBS KO マウスの作出を試みる。

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った。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 と骨カルシウム代謝の関連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。これまでも floxed CBS マウスの樹立を試みてきたが、完全な相同組換え体 ES 細胞クローンが取得できていなかったため、相同領域や標的領域の変更を行った複数の新たなターゲットベクターを新たに構築し、エレクトロポレーション法による ES 細胞への遺伝子導入とサザンブロットングによるスクリーニングを行なった。その結果、複数の相同組換え体クローンが取得に成功したため、現在アグリゲーション法によるキメラマウス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。その結果、CBS 欠損マウスにおいて骨代謝異常が起こる原因を突き止める

ことに成功し、現在派その詳細な分子メカニズムの解析を進めているところである。これは硫化水素による新たな骨カルシウム代謝制御という新たな概念をもたらす発見であり、インパクトのある研究成果であると考えられる。

今後は作出中の floxed CBS マウスを用いた組織特異的 CBS ノックアウトマウスを作製し、生体レベルでのより詳細な解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Makoto Suematsu, Takashi Nakamura, Yasuhito Tokumoto, Takehiro Yamamoto, Mayumi Kajimura, Yasuaki Kabe
CO-CBS-H2S Axis: From Vascular Mediator to Cancer Regulator
Microcirculation
査読あり
23(3), 2016 183-190
DOI: 10.1111/micc.12253

2. Keizo Nishikawa, Yoriko Iwamoto, Yasuhiro Kobayashi, Fumiki Katsuoka, Shin-ichi Kawaguchi, Tadayuki Tsujita, Takashi Nakamura, Shigeaki Kato, Masayuki Yamamoto, Hiroshi Takayanagi, Masaru Ishii
DNA methyltransferase 3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosylmethionine-producing metabolic pathway
Nature Medicine
査読あり
21(3), 2015, 281-287
DOI:10.1038/nm.3774

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 齋藤 暁子、大木 章生、中村 貴、小野寺 晶子、篠 宏美、長谷川 大悟、小崎 健次郎、柴原 孝彦、末石 研二、東 俊文
鎖骨頭蓋異形成症患者由来細胞を用いた疾患特異的 iPS 細胞の樹立と機能解析
BMB2015
2015 年 12 月 1 日～4 日
神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

2. 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 シグナルの下流で骨吸収機能を調節する PKN3
第 33 回日本骨代謝学会学術集会
2015 年 7 月 23～25 日
京王プラザホテル(東京都新宿区)

3. 齋藤 暁子、中村 貴、小野寺 晶子、篠 宏美、大木 章生、長谷川 大悟、渡邊 章、小崎 健次郎、柴原 孝彦、末石 研二、東 俊文

鎖骨頭蓋異形成症患者由来細胞を用いた疾患特異的 iPS 細胞の樹立と機能解析

第 33 回日本骨代謝学会学術集会

2015 年 7 月 23～25 日

京王プラザホテル(東京都新宿区)

4. 中村 貴、本田 紗綾子、松尾 光一、末松 誠

T2A 配列を用いた骨細胞特異的 Cre 発現ノックインマウス作出の試み

第 32 回日本骨代謝学会学術集会

2014 年 7 月 24 日～26 日

大阪国際会議場(大阪府大阪市)

5. 中村 貴、本田紗綾子、末松 誠

シスタチオニン 合成酵素は硫化水素産生を介してビタミン D レセプターの転写活性を制御する

第 32 回日本骨代謝学会学術集会

2014 年 7 月 24 日～26 日

大阪国際会議場(大阪府大阪市)

6. 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(大阪府大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

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

(3)連携研究者
なし