

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26713048

研究課題名(和文)骨細胞におけるレニン・アンジオテンシン系の機能解明と新規骨形成薬の開発

研究課題名(英文)Elucidation of renin-angiotensin system roles in osteocyte and development of novel osteogenic medication.

研究代表者

越智 広樹(Ochi, Hiroki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：30582283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：本検討では、骨細胞におけるレニン・アンジオテンシン系の機能を解明するために、骨細胞特異的にRAS構成遺伝子を欠損するマウスを作成し、解析した。骨細胞特異的RAS構成遺伝子欠損マウス(CKO)では、皮質骨量の有意な増加が認められた。骨形態計測により、骨芽細胞の活性が亢進していることが明らかとなった。本検討の結果から、骨細胞におけるRAS構成遺伝子は、骨芽細胞の活性を負に制御することで骨代謝を調節している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the significance of the renin angiotensin system in osteocytes by using osteocyte-specific RAS related gene deficient mice. These conditional knockout mice showed excessive bone mass in cortical bone. Osteoblast activities in cortical bone were significantly increased by bone morphological analysis. These findings suggest that RAS related gene in osteocyte regulates osteoblast function negatively and then maintains bone remodeling.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨細胞 レニンアンジオテンシン系

### 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、人間のかかる疾患のうち、もっとも頻度が高く、今後、社会の高齢化に伴い、さらなる増加が見込まれているが、骨粗鬆症の発症機序については未だ不明な点が多い。近年の分子生物学の進歩は、骨芽細胞及び破骨細胞に関する研究を飛躍的に進展させ、骨粗鬆症治療の進歩に多大な貢献をもたらした。しかしながら、現在の骨粗鬆症に対する治療薬は、骨吸収阻害をターゲットにしたものがほとんどであり、骨形成を目的とした骨粗鬆症薬の開発は喫緊の課題である。これらの課題克服のためには、新たな視点からのアプローチが必要であると考えられる。これまでに申請者らは、「神経と骨のクロストーク」や「マイクロ RNA による骨芽細胞分化機構」など、新しい骨代謝調節機構を世界に先駆けて報告してきた (Nature 2013, Nat Med 2012, Proc Natl Acad Sci U S A. 2009)。

成長後の骨の代謝は、主に骨形成を担う骨芽細胞、骨吸収を担う破骨細胞そして骨芽細胞に由来する骨細胞によって調節されている。骨細胞は骨芽細胞から分化し、骨組織の中で最も数が多いことが知られているものの、その生理的機能ならびに分化調節機構に関しては多くが謎に包まれている。骨細胞の機能不全は骨粗鬆症を生じることが知られていることから、骨細胞は骨粗鬆症の病態解明ならびに新規治療方法の開発において新たな標的となると考えられる。レニン-アンジオテンシン系 (RAS) は血圧調節において重要な役割を果たしている。近年、RAS に関わる ACE2 が腸内環境の正常化に重要であり腸炎発生の予防に重要であることが明らかとなった (Penninger JM. Nature 2012)。このことは、これまで血圧調節のみと考えられていた RAS が、全身の臓器で、その生理的機能の維持や病態発生に重要な役割を担っていることを示唆している。骨代謝分野においても、高血圧患者では骨量が減少していることから、RAS は骨局所において重要な役割を担っている可能性が推測されるが、その詳細に関しては不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、RAS 構成遺伝子に着目し、骨組織における RAS 系の生理的意義を解明する。

(1) 骨細胞における RAS 構成遺伝子の生理的意義の解明

(2) 骨細胞における RAS 構成遺伝子の標的遺伝子の同定と生理的意義の解明

(3) 骨細胞における RAS をターゲットとした骨粗鬆症治療薬の開発

### 3. 研究の方法

(1) 骨細胞特異的 RAS 構成遺伝子欠損マウスの解析

(2) 網羅的遺伝子解析による RAS 構成遺伝

子の標的遺伝子の同定

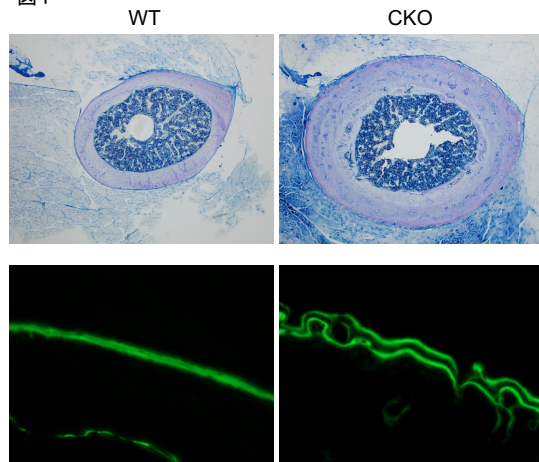
(3) RAS 構成遺伝子による骨細胞制御機構の解明

### 4. 研究成果

(1) 骨細胞特異的 RAS 構成遺伝子欠損 (CKO) マウスの解析

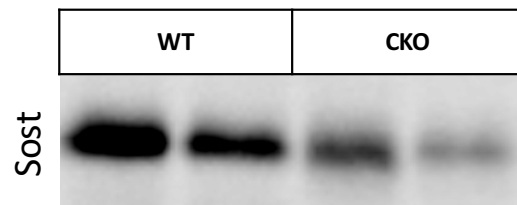
まずマイクロ CT を用いて海綿骨ならびに皮質骨の骨量解析を行った。その結果、皮質骨量の著明な増加が認められた。一方で海綿骨量には差が認められなかった。次いで非脱灰組織を用いた骨形態計測を行った結果、皮質骨において骨形成の有意な増加が認められた (図 1)。これらの結果から、骨細胞における RAS 構成遺伝子は、骨芽細胞の機能を抑制していることが明らかとなった。

図 1



野生型マウスおよび CKO マウスの骨から RNA を抽出し、骨芽細胞、破骨細胞そして骨細胞に関連する遺伝子の発現を確認した。その結果、CKO マウスでは、骨芽細胞マーカーの有意な上昇が認められ、さらに Sost の有意な発現低下が認められた (図 2)。

図 2



(2) 骨細胞における RAS 構成遺伝子の標的遺伝子の同定

4 週齢の野生型マウスおよび CKO マウスの骨組織を採取し、RNA を抽出後、次世代シーケンズによる網羅的発現解析をおこなった。得られた結果をもとに発現解析ならびに wPGSA による Pathway 解析を実施した。

これらの結果を基に、RAS 構成遺伝子の標的

遺伝子を同定した。

### (3) 骨細胞における RAS 構成遺伝子の機能解析

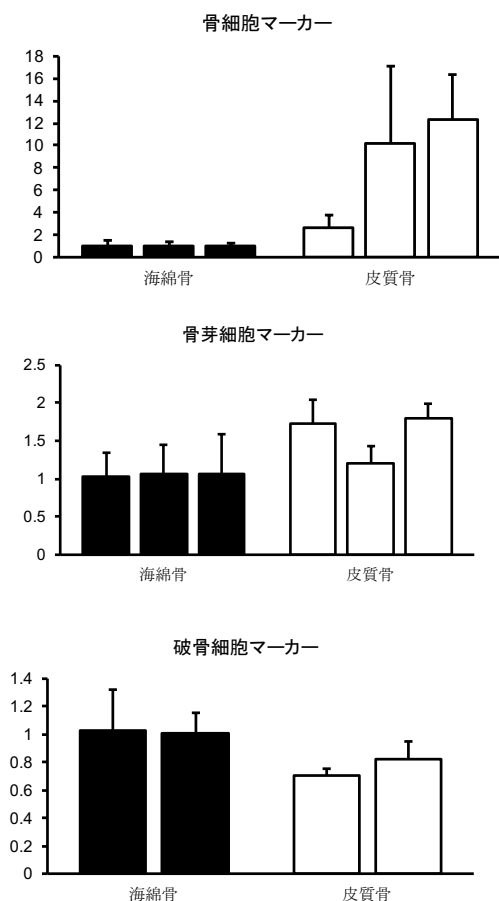
in vitro において、RAS 構成遺伝子を恒常的にノックダウンした骨細胞株を樹立した。この細胞株を用いて、骨細胞分化に及ぼす影響を検討した結果、分化に差は認められなかった。

また、これらの恒常的ノックダウン株と骨芽細胞とを共存培養し、液性因子の影響を想定し、骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した。その結果、骨芽細胞分化には影響は認められず、液性因子を介した作用ではないことが示された。

### (4) 骨組織における皮質骨および海綿骨の比較

CKO マウスでは海綿骨と皮質骨の表現型に解離を示した。そこで、まず、野生型マウスにおいて海綿骨と皮質骨の違いを mRNA レベルで確認した。海綿骨および皮質骨をそれぞれ分離し、RNA を抽出後、骨芽細胞、破骨細胞ならびに骨細胞マーカーの発現を比較検討した。

皮質骨では、海綿骨と比較して骨芽細胞ならびに骨細胞マーカーが有意増加したのに対し、海綿骨では破骨細胞マーカーの上昇が認められた。このことから、皮質骨と海綿骨では、骨代謝様式が異なることが明らかとなった。



以上のことから、骨細胞における RAS 構成遺伝子は、骨芽細胞系を調節し、骨の恒常性を維持している可能性が示唆された。今後これらの標的遺伝子をターゲットとした創薬開発に結びつけたい。

### 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 10 件)

- ① Circadian Clock Regulates Bone Resorption in Mice. Xu C, Ochi H, Fukuda T, Sato S, Sunamura S, Takarada T, Hinoi E, Okawa A, Takeda S., **J Bone Miner Res.** 2016 31(7):1344-55. 査読有り
- ② A Comparison of the Process of Remodeling of Hydroxyapatite/Poly-D/L-Lactide and Beta-Tricalcium Phosphate in a Loading Site. Akagi H, Ochi H, Soeta S, Kanno N, Yoshihara M, Okazaki K, Yogo T, Harada Y, Amasaki H, Hara Y., **Biomed Res Int.** 2015(2015):730105. doi:10.1155/2015/730105. 査読有り
- ③ MicroRNA-145 regulates osteoblastic differentiation by targeting the transcription factor Cbfb. Fukuda T, Ochi H, Sunamura S, Haiden A, Bando W, Inose H, Okawa A, Asou Y, Takeda S. **FEBS Lett.** 2015 Oct 24;589(21):3302-8. 査読有り
- ④ Bone morphogenetic protein 4 and bone morphogenetic protein receptor expression in the pituitary gland of adult dogs in healthy condition and with ACTH-secreting pituitary adenoma. Sato A, Ochi H (**Corresponding author**), Harada Y, Yogo T, Kanno N, Hara Y., **Domest Anim Endocrinol.** 2015 doi:pii: S0739-7240(15)00102-2. 査読有り
- ⑤ The Two Sides of Vitamin E Supplementation. Ochi H, Takeda S., **Gerontology.** 2015;61(4):319-26. 査読有り
- ⑥ Genetic determination of the cellular basis of the ghrelin-dependent bone remodeling. Ma C, Fukuda T, Ochi H, Sunamura S, Xu C, Xu R, Okawa A, Takeda S., **Mol Metab.** 2015 4(3):175-85. 査読有り
- ⑦ Enhancement of Runx2 expression is potentially linked to  $\beta$ -catenin accumulation in canine intervertebral disc degeneration. Iwata M, Aikawa T, Hakozaki T, Arai K, Ochi H, Haro H, Tagawa M, Asou Y, Hara Y., **J Cell Physiol.** 2015 230(1):180-90. 査読有り
- ⑧ Antimicrobial susceptibility of enterococcal

species isolated from antibiotic-treated dogs and cats. Kataoka Y, Umino Y, **Ochi H**, Harada K, Sawada T., **J Vet Med Sci.** 2014 76(10):1399-402. 査読有り

- ⑨ Tibial displacement with stifle joint flexion and cranial cruciate ligament transection in the dog. An ex vivo study using a robotic simulator. Kanno N, Hara Y, Fukano S, Fujie H, **Ochi H**, Fujita Y, Yasuji H, Nezu Y, Yogo T, Tagawa M., **Vet Comp Orthop Traumatol.** 2014;27(4):277-84. 査読有り
- ⑩ Hydroxyapatite/poly-L-lactide acid screws have better biocompatibility and femoral burr hole closure than does poly-L-lactide acid alone. Akagi H, Iwata M, Ichinohe T, Amimoto H, Hayashi Y, Kannno N, **Ochi H**, Fujita Y, Harada Y, Tagawa M, Hara Y., **J Biomater Appl.** 2014 28(6):954-62. 査読有り

[学会発表] (計 0 件)

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

越智 広樹 (OCHI Hiroki)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30582283

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )