

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861212

研究課題名(和文)骨細胞と骨芽細胞レニン・アンジオテンシン系を標的とした新規骨粗鬆症治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of novel medication for osteoporosis which focuses on the renin angiotensin system in osteoblast and osteocyte

研究代表者

大庭 聖子(Ohba, Seiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：60710118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨芽細胞ならびに骨細胞におけるRAS受容体に関して生理的意義を検討した。骨細胞特異的RAS受容体欠損マウス(CKO)では、皮質骨量の増加が確認された。一方骨芽細胞特異的CKOマウスでは変化は認められなかった。骨細胞特異的CKOマウスの骨からRNAを抽出し網羅的解析を実施することで、標的遺伝子の同定を行った。現在、同定された標的遺伝子の骨細胞における生理的意義を検討中である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the role of RAS receptor in osteoblast and osteocyte. Osteocyte specific RAS receptor knockout mice (CKO) showed increase of cortical bone mass. On the other hand, osteoblast specific knock out mice did not show the bone abnormality. Furthermore, we analyzed the target genes of the RAS receptor in osteocytes by comprehensive gene analysis. We are now trying to examine the physiological function of those target genes in osteocytes.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨細胞 骨芽細胞

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最も頻度が高く、今後、社会の高齢化に伴い、さらに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。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。近年の分子生物学において、骨芽細胞及び破骨細胞に関する研究は飛躍的に進展したが、骨細胞に関する研究は未だ黎明期にある。骨細胞はこれまでに重力のメカノセンサー、石灰化の調節、マイクロダメージの感知・修復などの作用を示すことが示唆されているものの、詳細は不明であり、その生理的機能ならびに調節機構に関しては謎に包まれている。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重要であると考えられるが、骨細胞は骨基質中に埋没した細胞であるため、アクセスが非常に困難である。骨細胞は骨芽細胞から分化するため、骨基質のより表面に存在する骨芽細胞に注目し、この骨芽細胞を上手く操作することで、骨細胞とともに骨芽細胞が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可能性が考えられる。

一方、古くからレニン-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ことが知られていたが、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.ら Nature 2012)。このことは、これまで血圧調節にのみ重要であると考えられていた RAS が、全身の臓器で生理機能の維持や病態形成に重要な役割を担っていることを示唆している。疫学的な検討からも、高血圧患者は骨量の減少と高い骨粗鬆症のリスクを持つことが知られているため、RAS は血圧調節以外に、骨局所において骨代謝調節の重要な役割を担っている可能性が推測されてきたが、その詳細な分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、骨芽細胞ならびに骨細胞における RAS の生理的意義を明らかとするとともに、RAS に注目した新たな骨形成治療薬開発の分子基盤構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞ならびに骨細胞特異的 RAS 受容体欠損マウスの作成と解析

(2) 骨芽細胞ならびに骨細胞における RAS 受容体の機能解析

(3) 骨芽細胞ならびに骨細胞における RAS

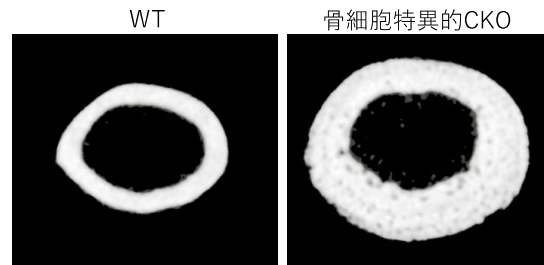
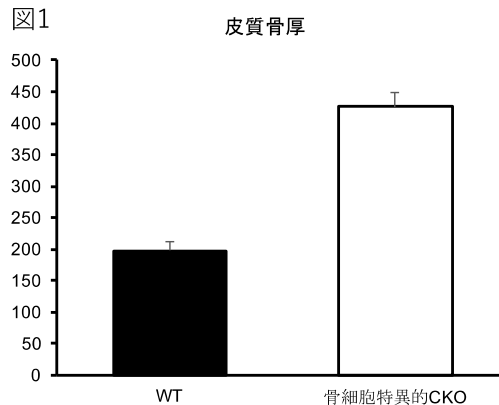
受容体標的遺伝子の同定

4. 研究成果

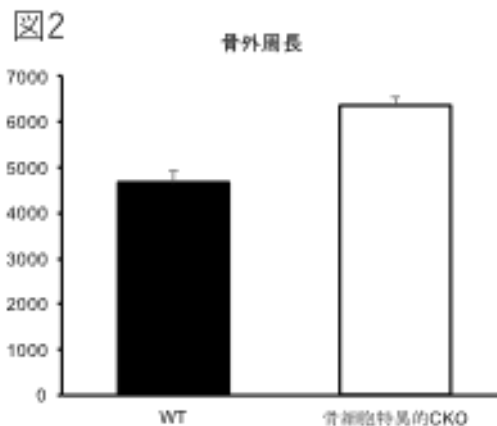
(1) 骨芽細胞特異的ならびに骨細胞特異的 RAS 受容体欠損マウス作成と解析

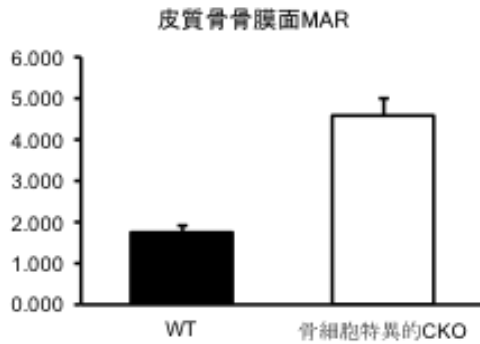
Runx2 Cre マウス (骨芽細胞特異的) ならびに Dmp1 Cre マウス (骨細胞特異的) をもちいて CKO マウスを作成した。

マイクロ CT を用いて、各 CKO マウスの骨解析を実施したところ、骨細胞特異的 CKO マウスにおいて、皮質骨において顕著な骨量増加が認められた (図 1)。

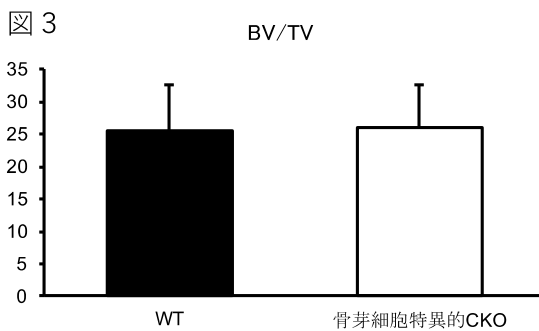


さらに詳細に検討した結果、外骨膜の骨量増加が顕著であり、骨形態計測の結果によると、外骨膜での骨形成が有意に増加していた (図 2)。





一方で、骨芽細胞特異的 CKO マウスでは野生型と比較して骨表現型に差は認められなかった (図 3)。

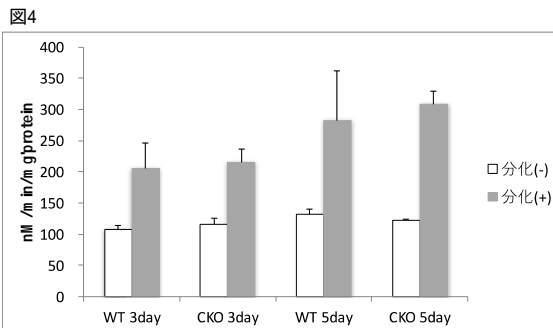


(2) 骨芽細胞ならびに骨細胞における RAS 受容体の機能解析

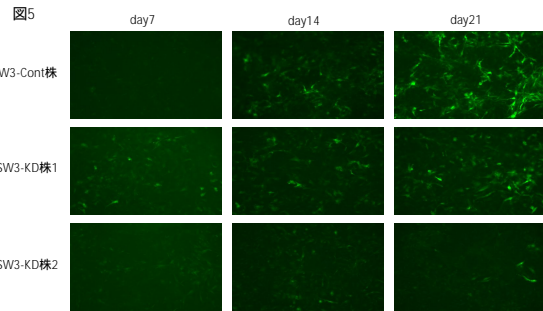
骨芽細胞ならびに骨細胞における RAS 受容体の機能を解析するために、各細胞株で恒常的 KD 株を作成した。

まず骨芽細胞株においてノックダウンが分化におよぼす影響を、ALP 活性を解析し検討した。

その結果、RAS 受容体の KD は骨芽細胞分化には影響しなかった (図 4)。



一方、骨細胞培養株において、ノックダウン株を作成し、骨細胞分化を検討した。骨細胞分化は GFP 陽性細胞数で評価した。その結果、骨細胞において RAS 受容体のノックダウンは、軽度ではあるが、骨細胞の分化を抑制する傾向が認められた (図 5)。



(3) 骨芽細胞ならびに骨細胞における RAS 受容体標的遺伝子の同定

表現型の認められた骨細胞特異的 CKO マウスの長管骨から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて遺伝子の網羅的発現解析を行った。

得られたデータから RAS 受容体遺伝子の標的遺伝子の同定を行った。また、Real Time PCR にて定量解析を実施した。

以上の結果から、骨細胞における RAS 受容体遺伝子は、骨芽細胞分化を負に制御している可能性が示唆された。現在、本研究で同定された標的遺伝子の機能解析を in vivo ならびに in vitro において実施している。

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 0 件)

〔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

大庭 聖子 (Ohba Seiko)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・非常
勤講師

研究者番号：60710118

(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

()