

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790655

研究課題名 (和文) ジーンターゲティングを用いた骨代謝における骨細胞の機能解析

研究課題名 (英文) Function analysis of osteocyte in bone metabolism using gene targeting

研究代表者

石井 清朗 (ISHII KIYOAKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：80419150

研究成果の概要：

骨細胞特異的なCreマウス (DMP1-Cre) および、骨細胞特異的にグルココルチコイド受容体 (GR) を無くしたマウスを作製することができた。また野生型マウスにGRアゴニストを投与すると、骨形成速度が低下し、骨細胞マーカーの発現も減少することが分かった。この結果はGRを介して骨代謝回転を低下させるという考えを指示するもので、骨細胞特異的GR-KOマウスを解析することで、ステロイド骨粗鬆症がどのようにGRを介して起こっているかを、骨細胞を中心としたメカニズムで解明することができると期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学、骨代謝

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の成因や治療において、副腎からステロイドホルモンの重要性が近年再認識され、“交感神経系の亢進は、肥満、糖尿病、高血圧、メタボリックシンドロームの生活習慣病共通の分子基盤である”とする考えが定着しつつある。申請者は、副腎髄質にお

けるカテコールアミン (アドレナリン) の役割という切り口で生活習慣病を捉えようと研究を行い、副腎髄質における慢性的なAT₂ (2型Angiotensin II受容体) 刺激は、カテコールアミン合成を低下させる一方、分泌は促進し、副腎髄質のカテコールアミンを枯渇させて、結果的に交感神経を抑制することを明らかにした。また副腎髄質にもレプチ

ン抵抗性が存在すること示し、肥満をさらに助長することを提唱した。すなわち、肥満における高レプチン血症が、副腎髄質レプチン受容体の脱感作down-regulationを起こすか、もしくはレプチン受容体以降の障害を惹起することにより、副腎髄質からのカテコールアミン分泌不全をおこし、ひいてはカテコールアミン作用不足から肥満を形成すると考えている。

一方、副腎皮質から分泌されるステロイドホルモン、特に糖代謝に必要なホルモンであるグルココルチコイドも心血管、神経、腎臓や筋肉などの機能維持に重要であると共に、抗炎症剤、免疫抑制剤、抗腫瘍薬として必須の薬剤である。しかしグルココルチコイドによる治療は重篤な副作用があり、代表的な症状として骨粗鬆症による骨折がある。我が国でもようやく最近ガイドラインが定められたばかりであるが、病因は不明で骨への副作用のない合成コルチコイドもまだ開発されていない。グルココルチコイドによる骨粗鬆症は、少量でも服用すれば例外なく必発で、骨折は1年以内と早期に起こりうる。一般の骨粗鬆症は、骨密度が若年成人の70%以下に低下することが診断基準であるが、グルココルチコイドによる骨粗鬆症の場合には、骨密度が80%以上でも骨折が起こることが知られ、骨密度以上に骨代謝の異常による骨の“質”が低下することが特徴である。

骨リモデリングは、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスにより、骨の量と質を保つ重要な機構である。我が国で1000万人以上患者が存在すると言われている骨粗鬆症も、破骨細胞の働きがと骨芽細胞の働きを上回るために起こる、代謝性骨疾患と位置づけられている。骨細胞は、骨に最も多く存在する細胞であるが、その機能はほとんど解明されていない。骨細胞は骨芽細胞が最終分化した細胞で、自ら分泌した細胞外基質に囲まれ、骨小腔という骨組織の穴の中に一個ずつquiescentの状態が存在する。骨細胞は、骨小腔から無数の突起を出しており、この突起を介して骨細胞間、あるいは破骨細胞や骨芽細胞ともシグナル伝達のネットワークを形成している。我々は、骨細胞ネットワークが、寝たきり、運動、微小重力などの

力学的負荷の変化やホルモンバランスといった生理的变化を感知して、骨表面の破骨細胞や骨芽細胞の機能を調節しているのではないかと考えている。しかし*in vivo*において、骨細胞上のどのような分子が力学的、生理的变化を感知し、どのように骨細胞間のネットワークを統合制御しているのかについては、現在何も分かっていない。

加えて近年、骨細胞に特異的に発現するDMP1 (dentin matrix protein 1)がFGF23を抑制することで2a型ナトリウムリン共輸送体や1,25-水酸化ビタミンDの発現の低下を妨げ、低リン血症を防いでいることが示され、骨代謝に対する骨細胞の役割が注目されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ステロイド骨疾患が骨細胞の機能不全によって起こるという仮説を証明し、これに基づいた新しい治療法開発の基盤を構築することである。具体的には、骨細胞でのみステロイドが働かなくしたマウスを作成し、これにステロイドを投与しても骨粗鬆症が起こらないことを証明し、ステロイド骨粗鬆症における骨細胞の役割を明確にする。

3. 研究の方法

本研究では、グルココルチコイド受容体(GR)-floxマウスとDMP1-Creマウスを交配させ、骨細胞におけるグルココルチコイド作用の重要性を、受容体を骨細胞でのみ欠失させたマウスにおいて検証し、骨細胞におけるグルココルチコイドの作用を遺伝学的に精査することによってステロイド骨粗鬆症の治療に応用できるか否かを検証する。

DMP1プロモータは、比較的長いイントロン1を付けると骨細胞のみにターゲットできることを使ってDMP1-Creマウスを作製する。

作出したトランスジェニックマウスに、合成グルココルチコイドであるPrednisoloneを投与したのち、骨形態計測、マイクロCTによる3次元の骨微細構造を解析する。骨代謝マーカーを用いた生化学的解析、定量的PCRによる遺伝子発現解析も行う。

4. 研究成果

骨細胞特異的な Cre マウスを作るため、申請者の研究室で骨細胞特異的として明らかになった、DMP-1 プロモータに Cre recombinase を連結したコンストラクトを作製した (図 1)。

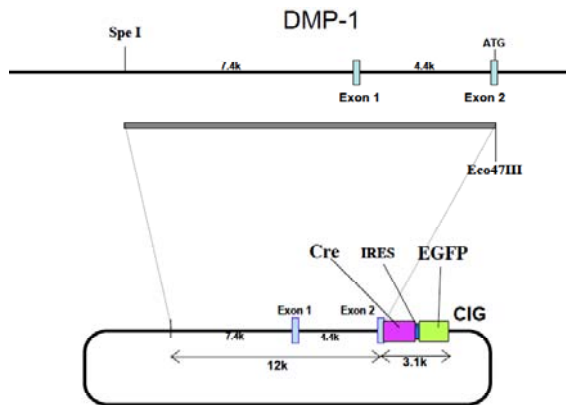


図.1 DMP1-Creマウスのターゲティングベクター

このベクターを導入して DMP1-Cre マウスを作製した。次にこのトランスジェニックマウスの Cre が骨細胞に発現しているのかを確認するため、テスターマウスである CAG-CAT-Z マウス (大阪大学宮崎純一教授より供与を受けた) と交配させ、骨切片を X-Gal 染色することにより確かめた (図 2)。

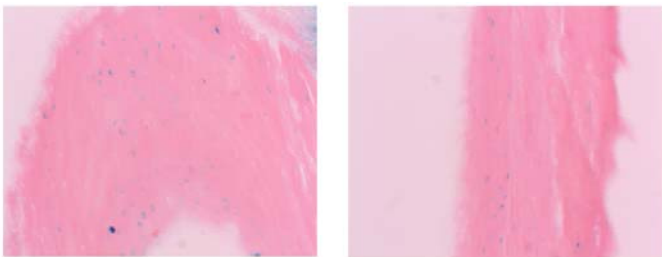


図.2 DMP1-Cre x CAG-CAT-Zマウスの骨切片におけるX-Gal染色

さらに、このDMP1-Creマウスとグルココルチコイド受容体-floxマウス (ドイツの Guenther Schutz教授より供与を受けた) を交配させ、骨細胞においてのみグルココルチコイド受容体を無くしたマウスを得ることができた。

グルココルチコイドの骨作用を調べるために、6ヶ月齢のC57BL/6J野生型マウスに合成グルココルチコイドであるPrednisoloneの

ペレットを背中に埋め込み、2カ月後の状態を観察した。Prednisolone投与群のマウスの骨ではコントロール群に比べて骨形成速度が低下していることが分かった。しかし破骨細胞および骨芽細胞の数に大きな変化はなかった (図3)

	BV/TV	Tb.N	Tb.Th.	Tb.Sp	Oc.S	MS/BS (%)	MAR (µm)	BSR/BS (µm ² /µm ² /day)
control	0.092 ± 0.037	3.1 ± 0.8	49 ± 6	0.34 ± 0.08	167 ± 84	25.9 ± 8.5	1.03 ± 0.12	0.10 ± 0.04
Prednisolone	0.110 ± 0.026	4.0 ± 0.4*	45 ± 6	0.25 ± 0.02*	178 ± 56	10.4 ± 7.7*	0.53 ± 0.11*	0.02 ± 0.02*

	Ob.S/BS 骨芽細胞面(骨面)	Oc.S/BS 破骨細胞面(骨面)
Control	25.7 ± 8.9	3.0 ± 1.3
Prednisolone	28.6 ± 7.4	2.8 ± 0.6

6 M ♂ c57B6/J mice
Prednisolone 5.0 mg/kg/day
60 days

図.3 骨に対するPrednisoloneの影響

この結果はPrednisoloneがこれら細胞の数ではなく機能に影響しているものと考えられる。このため血清中の骨の吸収マーカーであるデオキシピリジノリン (DPD) および形成マーカーであるオステオカルシン (OCN) を測定すると共に低下傾向が見られた (図4)。

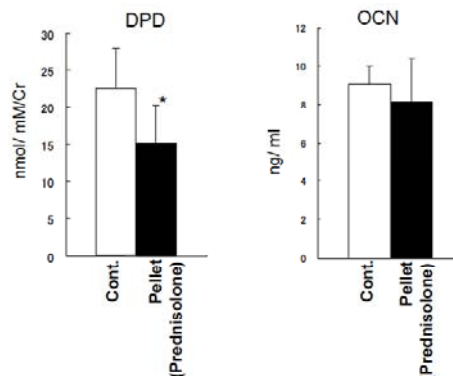


図.4 Prednisoloneの骨代謝マーカーへの影響

mRNA レベルでは IGF-binding protein 1 (IGFBP1) や melanin-concentrating hormone receptor (Mchr1) といったグルココルチコイド受容体のターゲットとなる遺伝子の発現が骨で低下し、podoplanin (Pdpn, GP38)、matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)、phosphate-regulation gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome (Phex)、Sclerostin (Sost) といった骨細胞マーカーの発現も減少していた。

したがって、これらの結果はグルココルチコイドが受容体を介して骨代謝活性の低下を起こすという考えを指示するものである。加えて、この骨代謝の低下は骨細胞数の低下と共に起きている。このことから今回作製した骨細胞特異的にグルココルチコイド受容体を無くしたマウスを解析することで、ステロイド骨粗鬆症の病態がグルココルチコイド受容体を介してどのようなメカニズムで起こっているかを、骨細胞を中心としたメカニズムで解明することができ、治療への指針も得ることができると期待される。

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 3 件)

1. Ishii KA, Fumoto T, Iwai K, Takeshita S, Ito M, Shimohata N, Aburatani H, Taketani S, Lelliott CJ, Vidal-Puig A, Ikeda K.

Coordination of PGC-1beta and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation.

Nat Med. 2009 Mar;15(3):259-66.

査読有り

2. Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S, Ikeda K.

Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction.

Cell Metab. 2007 Jun;5(6):464-75.

査読有り

3. Fukuda T, Ishii K, Nanmoku T, Isobe K, Kawakami Y, Takekoshi K.

5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside stimulates tyrosine hydroxylase activity and catecholamine secretion by activation of AMP-activated protein kinase in PC12 cells.

J Neuroendocrinol. 2007 Aug;19(8):621-31.

査読有り

[学会発表] (計 6 件)

1. 石井清朗

肝臓での CREB-H 発現時における Fasting/Refeeding 時との分子シグナルネット

ワーク関連解析

第 2 回 生活習慣病の転写・シグナルネットワーク研究会

2009 年 3 月 28 日

鎌倉プリンスホテル

2. 石井清朗

PGC-1 β と鉄代謝の協調作用による破骨細胞分化と機能の調節

第 3 回 Bone Research Seminar

2009 年 2 月 28 日

丸ビルホール (東京)

3. Ishii K, Iwai K, Takeshita S, Ito M, Shimohata N, Taketani S, Aburatani H, C. J. Lelliott, A. Vidal-Puig, Ikeda K: PGC-1 β and iron uptake in the mitochondrial activation of osteoclasts. The 30th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 2008 年 9 月 15 日 Montreal, Canada

4. 石井清朗, 伊東昌子, 竹下 淳, 下畑宣行, 油谷浩幸, Christopher Lelliott, Antonio Vidal-Puig, 竹谷茂, 岩井一宏, 池田恭治: PGC-1 β と鉄取り込みの協調作用による破骨細胞分化と機能の調節、第 26 回日本骨代謝学会、2008 年 10 月 30 日 (大阪)

5. 石井清朗

鉄とミトコンドリア 破骨細胞制御の新しいターゲット

第 117 回 日本薬理学会関東部会

2007 年 10 月 6 日

東京大学医学部教育研究棟 (東京)

6. Ishii K

Iron uptake through transferrin receptor 1 promotes osteoclast differentiation and function. The 29th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research.

September 17, 2007

Hawaii Convention Center

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 破骨細胞制御剤とそのスクリーニング方法

発明者: 池田恭治、石井清朗、岩井一宏、伊東昌子

権利者: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団および国立大学法人長崎大学

種類: 公開特許

番号: P2008-303168A

取得年月日：2008年12月18日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nils.go.jp/department/bjd/bjd/index.htm>

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/endocrinology/research/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 清朗 (ISHII KIYOAKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：80419150

