

運動器疾患研究部

(1) 構成員

部長 池田 恭治

室長

関節疾患研究室 竹下 淳

骨機能再建研究室 渡邊 研

特任研究員

麓 敏雄

流動研究員

兼子 佳子

朴 慶愛

印籐 頼子

研究補助員・事務補助員

鈴木 三恵

(2) 平成 22 年度研究活動の概要

骨の代謝回転は、破骨細胞と骨芽細胞によってドライブされ、骨芽細胞が最終分化して骨基質内に埋まった骨細胞は、これら 2 種類の細胞機能を骨内部から調節する役目をもつ。破骨細胞の分化の骨吸収機能の活性化機構、

骨芽細胞から骨細胞への転換の分子メカニズム、これら 3 種類の細胞間のコミュニケーションの詳細、とりわけ破骨細胞由来の骨芽細胞機能制御因子の精製が、研究部が取り組んでいる大きなテーマである。これらの制御ポイントが、老化という衰退過程のなかでどのように破綻していくのか、それらを防止するためにどのような手段が有効なのか

骨格系は、腱を介して筋肉活動と直接連動し、神経・循環系を介して生体のほとんどすべての臓器と機能的連関関係にある。こうした骨と他の臓器を包括した制御機構も重要なテーマである。研究部では、とくに機械的・力学的な環境に対する骨の適応反応、循環動態と骨代謝との関連などについて、生理的および病理的観点から解析を進めている。

麓 敏雄、池田 恭治

ステロイド骨粗鬆症のモデルマウスの作製と病態解析

【研究の背景】ステロイド骨粗鬆症は、グルココルチコイド投与に続発し、骨密度の低下が顕著になる前から、若年者にも投与早期から骨折を起こすことで知られる。グルココルチコイドを投与すると必発することから、わが国でもガイドラインが作成され予防の重要性が提唱されている。

我々は、骨密度の低下がなくても、骨の脆弱性が増し骨折の危険が高まることに着目し、ステロイド骨粗鬆症における骨脆弱性の病理基盤を明らかにすることで、有効な治療法の開発も可能になり、また一般に見られる加齢による骨粗鬆症の骨折防止にもつながると考えた。

【目的】そこで、ステロイド骨粗鬆症の病態を再現するモデルマウスを作製し、分子遺伝学および薬理学の手法を駆使して、骨質劣化の病理基盤の解明をめざした。

【方法】成熟した C57BL/6 マウスの皮下にプレドニゾロンの徐放ペレットを植え込み、2 ヶ月という慢性経過でグルココルチコイドの過剰状態を作

製した。

マイクロ CT による海綿骨および皮質の骨量測定、構造解析、組織形態計測や生化学解析による骨の細胞機能の評価を行った。

【結果】プレドニゾロンの慢性投与により、腰椎の海綿骨の減少と、長管骨の皮質の菲薄化が見られた。組織形態計測や血清の生化学検査の結果から、骨吸収の亢進よりは、主に骨形成の抑制の結果であることが明らかになった。

【結論】分子遺伝学的手法が応用できる C57BL/6 系統において、皮質骨の菲薄化や骨形成の低下など、ヒトのステロイド骨粗鬆症と似た病態の再現に成功した。今後は、骨の細胞特異的に GR を欠如させたモデルマウスとの組み合わせにより、病態の中核となる細胞を特定できる可能性がある。

印籐 頼子、池田 恭治

骨髓脂肪と加齢

【研究の背景】体組成（脂肪・筋肉・骨格）のなかで、白色脂肪はエネルギーの蓄積を、褐色脂肪はエネルギーの放出を介して、代謝の恒常性に寄与するとともに、加齢に伴う肥満やメタボリック症候群の発症にも深く関わっている。

骨髓においても、加齢による造血機能の低下とともに脂肪が増生し、赤色髓が（末梢から躯幹に向かって順に）黄色髓に置換されていくことが知られているが、そのメカニズムは謎である。骨髓の脂肪細胞は骨芽細胞と同じく間葉系の幹細胞に由来すると考えられており、幹細胞から骨芽細胞への分化が加齢に伴って抑制され、逆に脂肪細胞の産生が増加するという分化スイッチの転換が“骨の老化”の原因であるとの説があるが、詳細なメカニズムは未解明で、加齢変化を有効に遅延あるいは阻止する方策も知られていない。

【目的】我々は、脂肪分化を抑制する活性をもつ IL-6 ファミリーのサイトカイン、オンコスタチン M (OSM) に着目して、その *in vivo* における生理作用の解明と、加齢に伴う骨髓脂肪の増生および骨形成機能の低下における OSM シグナルの関与を明らかにする第一歩として、OSM の受容体 (OSM-R) を遺伝的に欠失したマウスの骨および骨髓の解析を行った。

【方法】OSM-R ノックアウトマウス

（東京大学分子細胞生物学的研究所・宮島 篤教授との共同研究）を導入し、マイクロ CT による海綿骨および皮質の骨量測定と構造解析（長崎大学附属病院・伊東昌子准教授との共同研究）、組織形態計測や生化学解析による骨の細胞機能の評価を行った。

【結果と考察】OSM-R ノックアウトマウスの骨髓では、脂肪（とくに単房性）が増加し、OSM の骨髓脂肪に対する抑制的な作用が *in vivo* で確認された。OSM は *in vitro* での破骨細胞形成促進作用が知られているが、KO マウスでは破骨細胞の数や骨吸収には対照群と差が認められなかった。

KO マウスの組織解析では、骨芽細胞の数と骨形成速度が上昇しており、骨芽細胞に対する OSM の抑制的な生理作用が判明した。一方、骨細胞の数は減少し、空の骨小腔面積が増加していたことから、骨芽細胞から骨細胞への終末分化あるいは骨細胞の生存には促進的に働いている可能性が示唆される。以上の結果の総和として、KO マウスでは皮質骨が増加し、海綿骨量も上昇傾向を示した。

【結論】OSM の骨髓脂肪および骨芽細胞に対する生理作用がはじめて明らかになった。OSM-R を介する骨髓内部の細胞分化の振り分けのメカニズムを究明することで、加齢に伴う骨と骨髓の老化を制御する手立てが見つかる可能性がある。

竹下 淳、麓 敏雄、鈴木 三恵

カップリンの機能解明とカップリン転写活性促進化合物のスクリーニング（案）

【研究の背景】骨粗鬆症をターゲットとした創薬のために骨カップリング因子の同定を試みて、活性化破骨細胞が特異的に分泌する遺伝子を見出し、骨形成を促進することから「カップリン」と命名した。骨カップリング因子としての機能を生体内で証明するためにマウスを使った loss-of-function と gain-of-function の実験を行い、カップリンが骨カップリング因子であることを証明すると共に、創薬を目指してカップリンの転写活性を促進する化合物のスクリーニングを行っている。

【目的】カップリンの機能解明と創薬のシーズを創出するための化合物のスクリーニングを行う。

【方法】破骨細胞特異的にカップリンをノックアウトするためにカップリン floxed マウスとカテプシン K-cre マウスを交配し、カップリン欠損マウスを作成した。このマウスに RANKL を投与し、カップリング機能が障害しているかどうかを骨形態計測に

より解析した。また、カップリンプロモーターに分泌型 ALP 遺伝子を連結し、発現ベクターを作成した。このベクターを RAW264.7 細胞にトランスフェクションし、化合物を添加し、培養後の培養上清の ALP 活性を測定することにより、10000 個の化合物ライブラリーをスクリーニングした。

【結果】破骨細胞特異的にカップリンを欠損すると低骨量を発症することが分かった。このマウスに RANKL を投与して破骨細胞を誘導すると骨吸収が促進され、その後に起こる骨形成が野生型に比べ障害されることが分かった。これらのことからカップリンが骨カップリング因子の一つであることが強く示唆された。カップリン遺伝子の転写活性を促進する化合物を 10 個見出した。今後、マウスを用いてこれらの化合物がカップリン遺伝子の発現を上昇し、骨量を上昇させるかどうかを検討する予定である。

朴 慶愛、竹下 淳

破骨細胞が分泌する新規カップリング因子の同定

【研究の背景】骨粗鬆症をカップリングの破綻として捉え、骨カップリング因子の同定とメカニズムの解明により、これまでにない新規骨粗鬆症治療薬の開発を目指している。これまでに活性型破骨細胞が産生し、骨芽細胞に働き骨形成を高める因子カップリンを同定した。我々はカップリン以外にも破骨細胞が産生・分泌し、骨芽細胞に働く骨カップリング因子があると考え、その同定を試みている。

【目的】破骨細胞の培養上清中に骨芽細胞分化を促進する活性を検出したので、その原因因子を同定し、骨粗鬆症をターゲットとする創薬のシードを見出すことを目的とする。

【方法】破骨細胞を大量に培養し、その培養上清を分離・精製し、骨芽細胞の ALP 活性を指標として、新規骨カップリング因子を同定する。

【結果】骨芽細胞を破骨細胞と共存培養することにより、骨芽細胞の ALP 活性を促進する活性が破骨細胞により分泌されることを見出した。そこで、破骨細胞の各分化段階の培養上清を骨

芽細胞に添加したところ、多核成熟破骨細胞の培養上清に骨芽細胞の ALP 活性を促進する因子が多く含まれることが分かった。さらに、成熟破骨細胞の培養上清を限外ろ過により分収したところ、100kDa 以上に強く、30～100kDa に弱い活性があることが分かった。この活性は室温で一昼夜保存しても安定であり、75℃で30分間の処理で失活した。また、pH2 または pH10 で1時間の処理でも失活した。さらに、PDGF、TGF- β 、および VEGF の中和抗体では活性は消失しなかった。現在、イオン交換カラムを用いて分離精製を行っている。

【結論】破骨細胞の培養上清中に骨芽細胞の分化を促進する活性を検出した。それらは PDGF、TGF- β 、および VEGF ではなく、分子量 100kDa 以上であることが分かった。破骨細胞の培養上清中に新たな骨カップリング因子が存在することを突き止めたので、その実態を明らかにすることが期待される。

研究業績（運動器疾患研究部）

I. 論文発表

1. 原著

Yajima A, Inaba M, Tominaga Y, Nishizawa Y, Ikeda K, Ito A: Increased osteocyte death and mineralization inside bone after parathyroidectomy in patients with secondary hyperparathyroidism. J Bone Miner Res 25: 2374-2381, 2010

Akieda-Asai S, Zaima N, Ikegami K, Kahyo T, Yao I, Hatanaka T, Iemura S-i, Sugiyama R, Yokozeki T, Eishi Y, Koike M, Ikeda K, Chiba T, Yamaza H, Shimokawa I, Song Si-Y, Matsuno A, Mizutani A, Sawabe M, Chao MV, Tanaka M, Kanaho Y, Natsume T, Sugimura H, Date Y, McBurney MW, Guarente L, Setou M: SIRT1 Regulates Thyroid-Stimulating Hormone Release by Enhancing PIP5K α Activity through Deacetylation of Specific Lysine Residues in Mammals. PLoS ONE 5(7): e11755. doi:10.1371/journal.pone.0011755

Yano M, Watanabe K, Yamamoto T, Ikeda K, Senokuchi T, Lu M, Kadomatsu T, Tsukano H, Ikawa M, Okabe M, Yamaoka S, Okazaki T, Umehara H, Gotoh T, Song WJ, Node K, Taguchi R, Yamagata K, & Oike Y: Mitochondrial Dysfunction and Increased Reactive Oxygen Species Impair Insulin Secretion in Sphingomyelin Synthase 1 Null Mice. J. Biol. Chem. 286, 3992-4002, 2011.

2. 総説

Watanabe K, Ikeda K: Osteocytes in normal physiology and osteoporosis. Clinic Rev Bone Miner Metab 8: 224-232, 2010

Watanabe K, Ikeda K: Chapter 9. Osteocytes in Mechanosensing: insights from mouse models and human patients. In: "Mechanosensing Biology" (ed. Masaki Noda), p127-139, Springer, 2011

池田恭治: 副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP)、臨床検査ガイド 2011-2012、p399-404 文光堂, 2011

池田恭治: 自然加齢マウス・ラット、CLINICAL CALCIUM 特集“骨・関節疾患の動物モデル” 21: 65-71, 2011

渡辺 研、大上泰弘、池川志郎：変形性関節症 自然発症モデルマウス CLINICAL CALCIUM 特集“骨・関節疾患の動物モデル” 21： 134-141, 2011

池田恭治：骨粗鬆症にかかわるミトコンドリア、別冊・医学のあゆみ“ここまでわかった ミトコンドリア研究の新展開” 医歯薬出版 p115-118, 2011、東京

池田恭治：骨粗鬆症モデル、完全版マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック、p515-532 羊土社, 2010

渡辺 研、池田恭治：骨細胞の分子生物学、THE BONE “運動と骨 II” 24： 57-63, 2010

池田恭治：骨粗鬆症の発症メカニズム、臨床と研究 特集/骨粗鬆症の新しい展開 41： 1-4, 2010

池田恭治：骨のアンチエイジングとリハビリテーション、Medical Rehabilitation 124： 47-50, 2010

3. 著書、Chapters

伊藤明美、池田恭治：図解 わかる骨形態計測～骨のなかをのぞいてみよう～、 医薬ジャーナル社、2010 年、大阪

4. その他

Yamauchi J, Ubara Y, Ikeda K, Takaichi K: Retroperitoneal liposarcoma with lamellar bone inside. Lancet 377: 941, 2011

5. 新聞・報道,等

なし

I.

6.特許申請、取得状況

なし

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

池田恭治：骨粗鬆症の病因と治療をめぐる最近のトピックス、第9回名城倶楽部特別講演、

3月5日、名古屋市

池田恭治：骨折は忘れたところにやってくる、第11回知多北東部整形リハビリ病診連携会
5月22日 大府市

池田恭治：骨の細胞機能と情報伝達網、山形大学大学院講義「遺伝情報科学」、6月29日、山形市

竹下 淳：骨代謝の基礎と最近のトピックス、創薬生命科学特別講義、6月3日、名古屋市立大学

池田恭治：鉄と破骨細胞、シンポジウム“鉄代謝の基礎と臨床” 第34回日本鉄バイオサイエンス学会 9月12日 東京

竹下 淳：Bone-resorbing osteoclasts secrete a factor that stimulates osteoblastic differentiation 第5回 Bone Research Seminar 2月18日 東京

渡辺 研：マウスにおけるスフィンゴミエリン合成酵素遺伝子 Sms1/Sms2 の機能、第5回スフィンゴセラピー研究会、米子、7月16日

2. 国際学会発表

Takeshita S, Fumoto T, Park K-a, Aburatani H, Kato S, Ito M, Ikeda K:: Bone-resorbing osteoclasts secrete a factor that stimulates osteoblastic differentiation. The 32nd Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 10月15、16日 Toronto, Canada

3. 国内学会発表

伊藤明美、杵鞭あゆみ、兼子佳子、池田恭治：アレンドロネート投与による皮質骨と海綿骨の代謝変化、第28回日本骨代謝学会、東京、7月21日

渡辺 研、酒井義人、原田 敦：脊柱管狭窄症黄色靱帯由来靱帯細胞に発現する転写因子 Pax9 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(BMB2010) 12月9日 神戸

Hayashi A, Fujii T, Yakura Y, Matsui T, Okada F, Watanabe K, Kitatani K, Okazaki T, Takeya H: Pathophysiology of thrombocytopenia in mice lacking sphingomyelin synthase

1 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010) 12 月 9 日 神戸

矢野正人、山本格士、渡辺 研、池田和貴、瀬ノ口隆文、門松 毅、東野寛人、後藤知己、岡崎俊朗、田口 良、山縣和也、野出孝一、尾池雄一：スフィンゴミエリン合成酵素 1 ノックアウトマウスにおける ROS 産生増加と致死性・インスリン分泌不全・脂肪萎縮との関連性の解析

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010) 12 月 9 日 神戸

光武 進、横田はづき、座間宏太、山下 匡、岡崎俊朗、渡辺 研、五十嵐靖之：スフィンゴミエリン合成酵素 2 は、食事誘導性脂肪肝形成に関与する

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010) 12 月 9 日 神戸

座間宏太、林 遥、光武 進、渡辺 研、岡崎俊朗、五十嵐靖之：細胞内スフィンゴミエリンの栄養の取り込みに対する影響 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010) 12 月 9 日 神戸

Ⅲ. 公的研究費

1. 文部科学省

池田 恭治（代表） 3,263 万円 （総額 3,263 万円）

新学術領域

造血細胞から破骨細胞への分化転換のメカニズム

池田 恭治（代表） 702 万円 （総額 702 万円）

基盤研究 (B)

骨代謝における RANKL 遺伝子の機能解明

竹下 淳（代表） 195 万円 （総額 195 万円）

基盤研究 (C)

骨吸収特異的転写制御機構の解明

麓 敏雄（代表） 182 万円 （総額 182 万円）

若手 (B)

グルココルチコイドの骨細胞及び骨芽細胞に対する作用メカニズムの解析

渡辺 研（分担） 130万円 （総額1,550万円）

基盤研究(A)

スフィンゴミエリン K0 マウスを用いた自己免疫疾患の発症機序の解明と免疫抑制剤の開発

渡辺 研（代表） 117万円 （総額117万円）

基盤研究(C)

スフィンゴミエリン合成酵素の機能分担に関する研究

2. 財団、その他

池田 恭治（代表） 3,000万円 （総額 3,900万円）

独立行政法人医薬基盤研究所 基礎研究推進事業

骨質を標的とした骨折予知診断および新規治療薬に関する研究

竹下 淳（代表） 300万円 （総額 300万円）

長寿科学振興財団 H22 長寿科学研究者支援事業

骨再生を促進する因子の同定