

令和元年5月29日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18256

研究課題名(和文) 骨芽細胞における骨粗鬆症発症を規定する斬新的な性差因子探索と発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Exploring the novel sex-dependent factors in osteoblastic cells to clarify the mechanisms on developing the osteoporosis.

研究代表者

石田 昌義 (ISHIDA, Masayoshi)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：50643251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症の病態には明らかな性差があり、性ホルモン以外の要因も骨代謝の性差に関与する可能性が示唆されてきた。マウス初代培養骨芽細胞表現型における性差を検討したところ、分化や石灰化は、雄と比較して雌において著明に低かった。このような骨芽細胞の性差を決定する因子の探索を行ったところ、最も雌に発現量が優位に高い遺伝子として、Serpina3nを同定した。雌の骨芽細胞に優位に発現するSerpina3nは、分化した骨芽細胞における表現型を抑制する作用を有し、マウスの骨芽細胞表現型や骨粗鬆症病態の性差を部分的に説明する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症は男性よりも女性に多くみられ、とくに閉経後骨粗鬆症は予後が悪く寝たきりの原因にもなり、医療費を圧迫している。そこで、我々は、雌由来骨芽細胞自身に性差を決める因子が存在するのではないかと考え、骨粗鬆症病態に重要な新しい性差に関連した因子としてSerpina3nを見出した。解析の結果、Serpina3nは骨芽細胞に対して、石灰化や骨芽細胞分化を負に作用する因子であることが明らかとなった。このSerpina3nが骨粗鬆症の病態形成に関与する可能性を示唆している。本研究成果により、Serpina3nをターゲットにした骨粗鬆症の新しい診断マーカーや治療薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that factors other than sex hormones may also be involved in sex differences in osteoporosis and bone metabolism. In primary mouse osteoblasts, the differentiation and calcification were significantly lower in females than males. We performed the comprehensive gene expression analyses and Serpina3n was identified as a gene whose expression level is predominantly higher in females than males. While the reduced endogenous Serpina3n significantly enhanced osteoblast differentiation, enhanced Serpina3n significantly suppressed osteoblast differentiation in a mouse osteoblast cell line. In addition, Serpina3n did not affect the differentiation of mouse mesenchymal stem cell line into osteoblasts, but significantly suppressed calcification. From the above results, Serpina3n, which is predominantly expressed in female osteoblasts, suppresses the phenotype in differentiated osteoblasts. It would be partially able to explain sex differences in osteoblast phenotypes.

研究分野：骨代謝

キーワード：閉経後骨粗鬆症 骨芽細胞 骨代謝 性差

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 臨床における骨粗鬆症発症頻度と女性ホルモン補充治療の現状

臨床において、骨密度低下および骨折リスクの増加が閉経後女性において顕著に認められることから、骨粗鬆症の病態形成に性差があることが示唆される。さらに糖尿病性骨粗鬆症やステロイド性骨粗鬆症の病態や頻度においても性差がある。これまで、多くの遺伝子改変マウスを用いた研究や臨床知見より、女性ホルモンの骨代謝における重要性および骨代謝におけるエストロゲンやアンドロゲンの作用機構が明らかにされてきた。一方、骨粗鬆症へのエストロゲン補充療法は治療の選択肢の一つではあるが、その骨密度や骨折への効果はビスホスホネートなどと比較して限定的である。これらのことから、性ホルモン以外の因子が骨粗鬆症病態に強く関与している可能性が考えられるが、骨粗鬆症発症機序における性ホルモン以外の性差を説明する因子は未だ不明である。

2) 骨粗鬆症における性差研究

また、申請者が所属する教室において、雌マウスにおいて糖尿病による骨粗鬆症にセリンプロテアーゼで悪玉アディポカインでもあるプラスミノゲン活性化抑制因子 (PAI-1) が関与すること、逆に雄マウスでは、糖尿病による骨粗鬆症に PAI-1 の関与は認められないことを明らかにした。この研究で、活性型 PAI-1 による骨芽細胞や破骨細胞への影響は、雌マウスでのみ認められた。さらに、興味深いことに PAI-1 の作用に血中エストロゲン濃度やエストロゲン受容体シグナルの関与は認められなかったため、この性差は、エストロゲンでは説明がつかないことが示唆された (Tamura et al. *Diabetes* 2013)。

2. 研究の目的

骨粗鬆症の病態には顕著な性差がみられるが、性ホルモンの骨粗鬆症への治療効果が限定的であることと糖尿病モデルマウスにおける骨粗鬆症発症には顕著な性差所見を認め、骨芽細胞や破骨細胞自身の何らかの特異的な因子やシグナル系に性差が存在することが示唆された。

そこで、本研究の目的は、①雄・雌マウス由来骨芽細胞の網羅的遺伝子発現解析により骨芽細胞の性差を規定する因子の同定と②雌・雄マウス由来の骨芽細胞にそれに対する反応に性差のあるプラスミノゲン活性化抑制因子 (PAI-1) を添加することにより網羅的分子解析を行う。それをもとにその分子の機能解析を行い、骨粗鬆症病態の性差を規定する重要な因子・シグナル分子を見出すことである。性差を規定する新しい機構の解明により、新規の骨粗鬆症治療標的因子の同定をめざす。

3. 研究の方法

① 性差を規定する因子の探索

雌雄のマウス新生仔頭蓋骨より骨芽細胞を分離し初代培養を行った (雌雄は PCR で雄特異的 SRY 遺伝子を確認することで性差を決定する)。雌雄マウスそれぞれ由来の初代培養骨芽細胞を A) 雄 PAI-1 刺激なし、B) 雌 PAI-1 刺激なし、C) 雄 PAI-1 刺激あり、D) 雌 PAI-1 刺激あり、の 4 群に分ける。各群より mRNA を抽出・精製し、蛍光ラベルを行って網羅的 DNA マイクロアレイ解析により各群で有意に発現に差を有する遺伝子を同定する。発現遺伝子の同定は、活性型 PAI-1 に応答して雌で発現が変動した因子、さらに PAI-1 投与に関わらず雌と雄で有意な発現差を有する遺伝子を同定した。

候補となった遺伝子は、データベース探索によって、骨代謝と関連する因子、既知のシグナルと関連する因子、性ホルモンシグナルに関連する因子などに分類して、系統的に候補遺伝子を絞った。

②培養細胞レベルで抽出した因子の機能評価。

(A) 活性型 PAI-1 に対する応答性を規定する因子の機能解析

雌雄別の骨芽細胞に活性型 PAI-1 を添加し、24 時間後に細胞から mRNA を抽出する。網羅的遺伝子発現解析によって同定された候補遺伝子の発現レベルを確認するとともに、その遺伝子 (cDNA) を哺乳細胞用発現ベクターに組み込む。一過性にマウスの初代培養骨芽細胞、骨芽細胞株 (MC3T3-E1)、間葉系細胞株 (ST2)、骨髓細胞からの破骨細胞分化培養系へ遺伝子強制発現させたときに活性型 PAI-1 を添加して骨芽細胞分化における応答性を Runx2, Osterix, ALP, オステオカルシン、石灰化を指標に評価した。さらに、内因性 PAI-1 の影響も検討するために、私共の教室で維持している PAI-1 欠損マウス由来骨芽細胞において同定した遺伝子がどのような作用を示すのかを明らかにする。また、PAI-1 欠損マウス由来骨芽細胞に活性型 PAI-1 を外因性に添加したときに同定した遺伝子が骨芽細胞の表現型に影響をおよぼすかどうかを検討した。

このようにして PAI-1 が雌由来骨芽細胞に果たすシグナル経路を明らかにした。

(B) 骨芽細胞における性差を規定する因子の機能解析

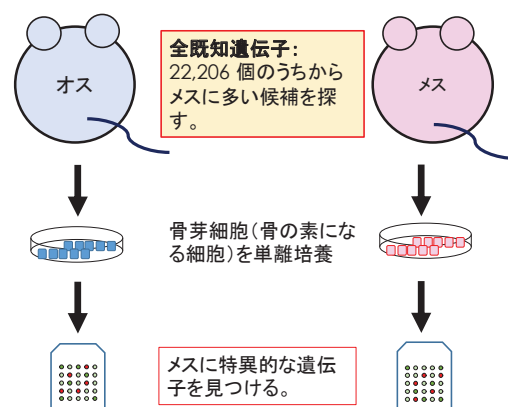
骨粗鬆症の病態に骨芽細胞や破骨細胞自身の性差が寄与するという仮説のもとで骨芽細胞の雄と雌における発現の差異を根拠に抽出した候補遺伝子についての機能解析をマウス初代培養骨芽細胞、骨芽細胞株 (MC3T3-E1)、間葉系細胞株 (ST2)、単球系細胞株 (Raw264.7) からの破骨細胞分化培養系を用いて、

- (1) 候補遺伝子の cDNA を過剰発現ベクターにクローニングし、それぞれの細胞に導入する。さらに分化過程でこの遺伝子を過剰発現させると骨形成にどのような影響を与えるかを解析した。さらには、軟骨芽細胞株 (ATDC5) を用いて軟骨分化に与える影響と脂肪前駆細胞株 (3T3-L1) を用いて脂肪分化に与える影響を検討した。
- (2) 候補遺伝子の発現を抑制すること (siRNA) により骨芽細胞分化マーカーの発現変化を指標に特定遺伝子の機能を明らかにする。
- (3) 破骨細胞のモデルとしてマウス単球系細胞株 (Raw264.7) に RANKL 刺激により破骨細胞へ分化誘導を行い、候補遺伝子の過剰発現系と siRNA による遺伝子発現抑制系を用いて破骨細胞分化に与える影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞の性差を決める因子の同定

骨粗鬆症には性差が存在することはよく知られておりエストロゲンやアンドロゲンは骨代謝に類似した作用を及ぼすため、性ホルモンが関与することが考えられている。閉経後骨粗鬆症での女性ホルモン補充療法の治療効果は、ビスホスホネートと比較すると限定的であることからステロイドや糖尿病に関連した骨粗鬆症の重症度にも性差が報告されており、骨代謝における性差には、性ホルモンのみでは、説明できないこ



メスの骨芽細胞に骨を作りにくくする遺伝子を発見!

とから、細胞レベルで雌雄差が存在する可能性に着目し雌雄由来骨芽細胞の DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行って、骨芽細胞における性差を規定する遺伝子探索を行った。

網羅的遺伝子発現解析によって、雌で雄より発現量が一番高い遺伝子として *Serpina3n* (28.9倍) を見出した。マウスでは *Serpina3n* は性染色体上にはなく 12番染色体上に存在し、Serine protease inhibitor family に属す新しいセリンプロテアーゼインヒビターでありヒトとマウスで77%の相同性をもつ。Granzyme B などのプロテアーゼを阻害し、抗炎症作用や皮膚損傷モデルで修復に関与することや筋肉分解の予防的に作用することが報告されているが、骨組織における生理作用や機能は未知のままである。

まず、マウス初代骨芽細胞に siRNA にて内因性 *Serpina3n* 発現を抑制してみたところ雄、雌でも骨芽細胞マーカー

(Runx2, Osterix, ALP, オステオカルシン) の発現は上昇した。骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞に *Serpina3n* を過剰発現させると、骨芽細胞マーカー (Runx2, Osterix, ALP, オステオカルシン) の発現は減少した。

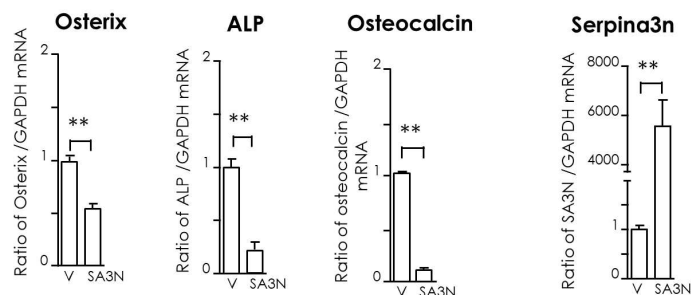


図1: 骨芽細胞における *Serpina3n* の過剰発現は骨芽細胞分化を抑制させた。

さらに骨芽細胞分化に与える *Serpina3n* の影響を検討するため、間葉系幹細胞株 ST2 細胞に *Serpina3n* を過剰発現させ、BMP2 存在下で骨芽細胞分化を誘導したところ、骨芽細胞マーカー (Runx2, Osterix, ALP, オステオカルシン) の発現は減少し、さらに石灰化まで誘導を行うと石灰化に必須な遺伝子 (ANK, ENPP-1, DMP-1) と骨細胞マーカーの一つであるスクレオスチン (SOST) の発現は *Serpina3n* により減少させ、石灰化も抑制した (図2)。

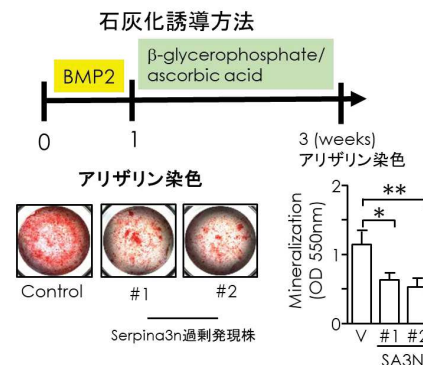


図2: *Serpina3n* 過剰発現は、石灰化を抑制させた。

軟骨分化における *Serpina3n* 発現の影響を検討するため、軟骨芽細胞株 ATDC5 細胞に *Serpina3n* 安定発現株を樹立し、軟骨分化誘導培地により軟骨細胞分化を誘導させたが、軟骨細胞分化には *Serpina3n* は影響を与えないことが示唆された。脂肪分化における *Serpina3n* 発現の影響を検討するため、脂肪前駆細胞株 3T3-L1 細胞と間葉系幹細胞株 ST2 細胞に *Serpina3n* を一過性発現させ脂肪分化を誘導させたが *Serpina3n* 発現は脂肪分化には影響を与えないことが示唆された。

さらに破骨細胞分化における *Serpina3n* 発現の影響を検討するため、単球系細胞株 Raw264.7 細胞に *Serpina3n* 安定発現細胞株を樹立し RANKL 刺激による破骨細胞分化に与える影響を検討したところ、破骨細胞分化には *Serpina3n* は影響しないことが示唆された。初代マウス骨芽細胞においては雌雄ともに siRNA で内因性 *Serpina3n* 発現抑制は RANKL、オステオプロテグリン (OPG) とともに発現が上昇させたが、破骨細胞分化の指標である RANKL/OPG 比はともに有意差はなかった。

以上より、雌骨芽細胞では **Serpina3n** 発現が雄骨芽細胞よりも発現量が高く、骨芽細胞において骨芽細胞分化と成熟を抑制している可能性が示唆され、**Serpina3n** を例えば中和抗体や siRNA など抑制させれば女性における骨粗鬆症発症予防につながる成果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

1. **Masayoshi Ishida**, Naoyuki Kawao, Kiyotaka Okada, Kohei Tatsumi, Kazuko Sakai, Kazuto Nishio, Hiroshi Kaji, *Serpina3n*, Dominantly Expressed in Female Osteoblasts, Suppresses the Phenotypes of Differentiated Osteoblasts in Mice, *Endocrinology*, Volume 159, Issue 11, November 2018, Pages 3775–3790 **査読有**
DOI: 10.1210/en.2018-00639

〔学会発表〕 (計 2 件)

1. **Masayoshi Ishida**, Naoyuki Kawao, Kiyotaka Okada, Kohei Tatsumi, Kazuko Sakai, Kazuto Nishio, Hiroshi Kaji. Dominantly expressed *Serpina3n* suppresses the phenotypes of osteoblasts of female mice. 第 9 回アジア・オセアニア生理学会連合 2019 年大会・2019 年 3 月・兵庫県神戸市
2. **石田昌義**、岡田清孝、峯 嘉宏、河尾直之、辰巳公平、高藤義正、坂井和子、西尾和人、梶博史
骨芽細胞の性差に関与する遺伝子の網羅的解析と *Serpina3n* の役割
第 36 回日本骨代謝学会・2018 年 7 月・長崎県長崎市

〔その他〕

日本経済新聞朝刊 2018 年 11 月 5 日 9 ページ

ホームページ等

近畿大学病院広報誌きづな 21 号

<https://www.med.kindai.ac.jp/files/about/kizuna/kizunavol21.pdf>

マウス雌骨芽細胞で優位に発現する *Serpina3n* は分化した骨芽細胞の表現型を抑制する

http://www.jsbmr.jp/1st_author/361_mishida.html

6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：梶 博史

ローマ字氏名：(KAJI, Hiroshi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。