

論文内容の要旨

Hyperactivation of Nrf2 leads to hypoplasia of bone in vivo

(生体での Nrf2 活性化は骨形成低下を引き起こす)

(吉田瑛紀, 鈴木隆史, 守田匡伸, 田口恵子, 土田恒平, 本橋ほづみ,
土井田稔, 山本雅之)

(Genes to Cells 平成 30 年 3 月電子掲載)

I. 研究目的

Nrf2(Nuclear factor-erythroid 2-related factor2)は, 酸化ストレスや求電子性ストレスに対して細胞防御に働く主要な転写因子である. Nrf2 活性化剤は様々なストレス性疾患の予防や治療へ有効と考えられ, 研究や治験が進められている.

最新の研究で Nrf2 抑制に働く Keap1(Kelch-like ECH-associated protein1)を欠失させ, Nrf2 を全身で活性化させたマウスでは成長障害を引き起こすことが報告された. しかし, Nrf2 がどのようにして成長障害に関与するかは未だ明らかではない.

本研究では Nrf2 を全身で活性化させたマウスを分析して成長障害をきたすメカニズムを明らかにすることを目的とする.

II. 研究対象ならび方法

全身で Keap1 欠失させたマウスは食道過角化のため生後まもなく死亡してしまう. そのため, 扁平上皮組織でのみ Nrf2 を欠失させ, Keap1 欠失マウスの致死性を回避した.

このマウスを NEKO(Nrf2-deficient in esophagus and Keap1-null mouse:Keap1^{-/-}::Nrf2^{Flox/Flox}::Keratin5-Cre)と名付けた. 8-10 週齢および 9-10 ヶ月齢マウスについて解析を行った. 全身 X 線, CT 撮影, 骨形態計測には Latheta LCT-200(日立製作所), 3D 画像再構築には Amira(M@xnet 社)を使用した. さらに, 大腿骨凍結標本を作成し, Alcian blue 染色を行い, 成長軟骨を Image J を用いて定量化した.

また, NEKO マウス同様に腎性尿崩症をきたす腎尿細管特異的 Keap1 欠失マウス(Keap1^{Flox/Flox}::Pax8-rtTA::tetO-Cre)へも同様の解析を行った.

Nishikawa らの方法(J Clin Invest. 2010 120(10):3455-3465)を参考にし, 骨芽細胞, 破骨細胞の初代培養を行った. 骨芽細胞は生後 0-5 日の頭蓋骨をディスペーゼとコラゲナーゼで消化し, 前駆細胞を採取した. 破骨細胞は, 6-8 週マウス大腿骨から骨髓細胞を採取し, M-CSF, RANKL を用いて分化誘導させた.

III. 研究結果

1. NEKO マウスでは大腿骨の骨密度が低下しており，長軸・短軸ともに骨成長が阻害されていることがわかった．骨の外奇形は認めなかった．血中カルシウム濃度の低下と，高齢マウスでも同様の傾向が認められることから Nrf2 活性化により慢性的な骨形成低下が生じることがわかった．(p<0.01)
2. 腎尿細管特異的 Nrf2 活性化マウスでは腎性尿崩症を呈することがわかっているが，このマウスでは骨密度や骨成長に変化は認められなかった．このことから，NEKO マウスで見られる骨形成低下は腎性尿崩症によるものではないことがわかった．
3. 初代培養の結果から Keap1 欠失による Nrf2 活性化は骨芽細胞，破骨細胞いずれにおいても分化を抑制することが明らかになった．このことから，NEKO マウスにおいてみられた骨密度低下は，骨芽細胞の分化障害が原因と考えられた．
4. NEKO マウスの大腿骨遠位成長軟骨では Alcian blue 染色の強度低下を認めた．しかし成長軟骨の厚さに有意な変化は認められなかった．このことから Keap 1 欠失は軟骨形成にも軽度の抑制作用がある可能性が示唆された．

IV. 結 語

本研究により，全身で Nrf2 活性化した NEKO マウスでは骨形成低下を呈することが明らかになった．Nrf2 活性化による骨への影響について動物モデルを検討したのは本研究が初めての報告である．Nrf2 活性化剤は今後様々な疾患を対象にした治療薬として適応拡大が予測されるが，本研究の成果は，その適正な使用を今後検討する上で有用な情報を提供するものである．

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 別府 高明 (高気圧環境医学科)

副査 教授 山内 広平 (内科学講座：呼吸器・アレルギー・膠原病内科分野)

副査 准教授 村上 秀樹 (整形外科学講座)

酸化ストレスや求電子性ストレスに対して細胞防御に働く主要な転写因子である Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor2) は、抗酸化ストレス剤として様々なストレス性疾患の予防や治療へ有効と考えられており、現在注目を集めている。著者らの研究グループは、従来の Nrf2 高活性化マウスモデルの改良型である NEKO (Nrf2-deficient in esophagus and Keap1-null mouse: Keap1^{-/-}:Nrf2^{Flox/Flox}:Keratin5-Cre) マウスを作成・確立しているが、同マウスが低身長・低体重であることに着目し、その原因について検討することを本研究も目的とした。まず、同マウスの低身長の確認のため、全身 X 線、CT 撮影、脂肪量解析を検討した。次に、NEKO マウスは腎尿崩症を来すが、腎尿崩症が低身長の原因でないことを確認するために、NEKO マウス同様に腎性尿崩症をきたす腎尿細管特異的 Keap1 欠失マウス (Keap1^{Flox/Flox}:Pax8-rtTA::tetO-Cre) を用いて上記と同様の骨形態の評価を行った。さらに、Nrf2 高発現が、骨芽細胞、破骨細胞の分化に及ぼす影響について検討すべく、Nishikawa らの方法 (J Clin Invest. 2010 120(10):3455-3465) に準じて、骨芽細胞、破骨細胞の初代培養を行った。骨芽細胞は生後 0-5 日の頭蓋骨をディスパーゼとコラゲナーゼで消化し、前駆細胞を採取した。破骨細胞は、6-8 週マウス大腿骨から骨髓細胞を採取し、M-CSF, RANKL を用いて分化誘導させた。結果として、NEKO マウスでは大腿骨の骨密度が低下しており、長軸・短軸ともに骨成長が阻害されていることがわかった。次に、腎性尿崩症をきたす腎尿細管特異的 Keap1 欠失マウスは腎性尿崩症を呈していたが、骨密度や骨成長に変化は認められなかった。このことから、NEKO マウスで見られる骨形成低下は腎性尿崩症によるものではないことがわかった。初代培養の結果から Keap1 欠失による Nrf2 活性化は骨芽細胞、破骨細胞いずれにおいても分化を抑制することが明らかになった。よって、NEKO マウスにおいてみられた骨密度低下は、骨芽細胞の分化障害が主因であることが判った。最後に、NEKO マウスでは体脂肪量、および筋肉量の減少をきたすことが明らかとなった。本研究により、全身で Nrf2 活性化した NEKO マウスでは骨形成低下、体脂肪および筋肉量の低下を呈することが明らかになった。Nrf2 活性化による骨への影響について動物モデルを検討したのは本研究が初めての報告である。Nrf2 活性化剤は今後様々な疾患を対象にした治療薬として適応拡大が予測されるが、本研究の成果は、その適正な使用を今後検討する上で有用な情報を提供すると考える。

試験・試問の結果の要旨

当該学生に対して数問の試問が執行された。①成長期における骨芽細胞・破骨細胞分化のバランスおよび材料である NEKO マウスにおける分化のアンバランスについて、②癌における IL-6 を含めたメディエーターと Nrf2 の関係、③実際の臨床における Nrf2 の応用について質問した。結果として、各々に対する確かな回答が得られた。以上から、当該学生は学位に値する学識を有していると判断できた。また、作成された学位論文において、剽窃・盗作などの研究不正がないことを確認した。

参考論文

- 1) 寛骨臼蓋部に発生した骨内ガングリオンに対する内視鏡下手術の 1 例 (三又義訓, ほか 5 名と共著)
整形外科 66 巻, 1 号 (2015)
- 2) テリパラチド週 1 回皮下投与製剤 18 ヶ月間の骨代謝と骨密度の動態 (室岡玄洋, ほか 7 名と共著)
岩手医学雑誌 65 巻, 5 号 (2013)