

## 老化関連酸化コレステロールによる 破骨細胞分化の亢進機構の解明

### [1] 組織

代表者：大塚まりな

(山口大学大学院医学系研究科)

対応者：伊藤甲雄

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

朝霧成挙 (山口大学大学院医学系研究科)

本田健 (山口大学大学院医学系研究科)

瀬戸哲也 (山口大学大学院医学系研究科)

研究費：物件費 13万円

### [2] 研究経過

加齢は骨粗鬆症の危険因子であるが、その原因は性ホルモンの低下のみならず、生活習慣に根ざした要因も大きく寄与する。骨密度低下の主要な原因の一つに破骨細胞の異常な活性化があり、それを誘導する様々なストレス因子が報告されている。正常な骨代謝において、破骨細胞は、マクロファージが分化誘導因子 RANKL の刺激を受けることで、細胞融合を経て形成される。破骨細胞の分化は様々な因子によって制御されることが多くの研究から示されている。関節リウマチなどの炎症病変部においては、破骨細胞の異常な増加によって骨破壊をきたすことがしばしば認められるが、炎症性サイトカインの働きが破骨細胞の活性化に深く関わっている。また、活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) が破骨細胞の分化に重要な役割を担うことが知られている。炎症部位における破骨細胞の不活性化を目的として、抗酸化物質の効果を検証する報告は多い。酸化ストレス因子には ROS のほか、酸化コレステロールがあり、様々な病態の形成に関与することが知られている。酸化コレステロールは炎症反応を促進し、活性酸素種を生成することで、新たなコレステロールの酸化を引き起こす。持続的に酸化ストレスの惹起から慢性炎症を誘発することから、酸化コレステロールは動脈硬化やアルツハイマー病、炎症性腸疾患の原因の一つと考えられている。さらに、酸化コレステロールは生体内での代謝が困難であり、加齢とともに蓄積することが指摘されている。動脈硬化においては、

酸化コレステロールがマクロファージに作用することで泡沫細胞が生じ、これが病変の形成に深く関与することが明らかになっている。一方、マクロファージの破骨細胞への分化において、酸化コレステロールがどのような作用を持つのか、その詳細は明らかにされていない。酸化コレステロールは酵素的あるいは非酵素的な反応の組み合わせにより、さまざまな種が生体内に生じるが (図1)、我々は生体内に最も多量に存在するコレステロール酸化生成物の一つ 7-Ketocholesterol に着目した。7-Ketocholesterol は細胞内 ROS のレベルを上げることや、TNF および IL-1 $\beta$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を誘導することで炎症を促進することが知られている。さらに、生体内における 7-Ketocholesterol レベルは慢性炎症と正の相関が示されており、また高コレステロール食によって骨組織における 7-Ketocholesterol のレベルは上昇することが知られている。

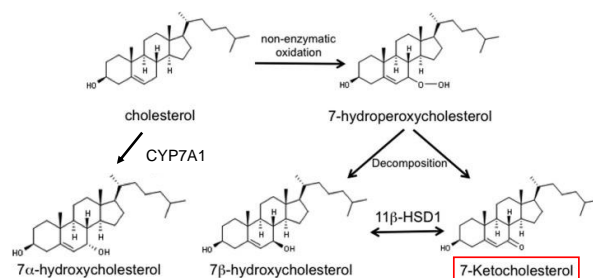


図1. 7-Ketocholesterol の生成過程 [1]

本研究では、RANKL 誘導性破骨細胞の分化に対する 7-Ketocholesterol の効果を検討した。また、炎症性サイトカインによって分化が促進される破骨細胞についても、酸化コレステロールの影響は不明であることから、TNF および IL-6 の共刺激による破骨細胞分化モデルを用いて、それに対する 7-Ketocholesterol の効果も同様に解析した。本研究の実施にあたり、加齢学研究所共同研究者としてご対応頂いた加齢医学研究所・伊藤甲雄先生には、本研究の遂行に関してご助力を賜った。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

マウスの大腿骨より単離した骨髄細胞群を、M-CSFを含む培地で48時間培養してマクロファージを得た。その後、RANKL (RANKL誘導性破骨細胞)あるいはTNFおよびIL-6 (炎症性サイトカイン誘導性破骨細胞)を添加したM-CSF含有培地で破骨細胞分化を誘導した。分化誘導培地に7-Ketocholesterol (図中には7KCと表記)を添加し、2~3日間培養後にパラホルムアルデヒドで固定した後、破骨細胞の特異的染色法であるTRAP染色を実施し、染色された多核の細胞数を破骨細胞の分化度の指標とした。また、分化誘導1日後にMITアッセイを行い、検量線から細胞数を算出し、7-Ketocholesterol作用時の細胞毒性を評価した。

図2は、7-Ketocholesterol未処理の分化条件で形成された破骨細胞数を100%とした時の相対値を縦軸に、添加した7-Ketocholesterolの濃度を横軸に示した図である。RANKLによって形成される破骨細胞の数は、7-Ketocholesterolを添加することで増加することが分かった。さらに、炎症性サイトカイン誘導性は骨細胞形成においても、7-Ketocholesterolは分化促進効果を示し、RANKL誘導性破骨細胞形成よりも、より低濃度で有意な促進効果が認められた。

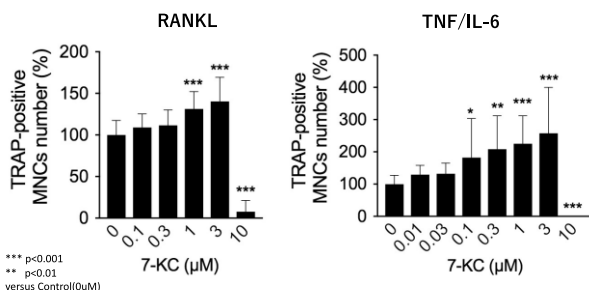


図2. 7-Ketocholesterolの破骨細胞分化促進作用

7-Ketocholesterolは細胞毒性を持つことが報告されているため、本系のマクロファージに対して、RANKL存在下におけるMITアッセイによりCell viabilityを測定した。7-Ketocholesterol濃度が3 μM以下では、細胞数の減少は認められなかったが、10 μMでは3割程度に減少していた (Data not shown)。図2のRANKL誘導性破骨細胞形成において、10 μMの7-Ketocholesterolでは破骨細胞数が減少しているが、これは細胞死によるものであることを確認した。

次に、7-Ketocholesterolの破骨細胞分化促進における機序を調べた。Retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR)はステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する転写因子であり、細胞分化の制御や様々な組織の発生に重要な役割を果たしている。内因性リガンドについては未だ議論の余地があるが、コレステロール類によって活性化される

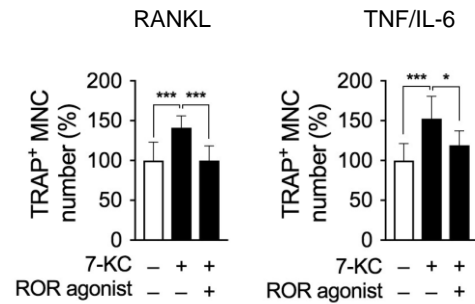


図3. ROR-agonistによる7-Ketocholesterol作用の阻害

こと、リガンド非依存的に活性化していることが報告されている[2]。また、7-KetocholesterolはRORに対してインバーサゴニスト作用を持つ[2]。我々は本研究で用いているRANKL誘導性あるいは炎症性サイトカイン誘導性破骨細胞分化モデルにおいて、RORに対する合成インバーサゴニストがいずれの分化も亢進させることを確認している (data not shown)。これらの結果から、7-KetocholesterolはインバーサゴニストとしてRORシグナルを減弱させることで、破骨細胞分化を亢進させているのではないかと考えた。そこで、7-Ketocholesterolと共にRORアゴニストを添加した系で破骨細胞分化を実施した結果、いずれの破骨細胞分化モデルにおいても、RORアゴニストによって7-Ketocholesterolの分化促進効果が抑制されることが分かった (図3)。以上の結果から、7-Ketocholesterolの破骨細胞分化促進作用には、ROR不活性化の機序が寄与することが示唆された。

[1] Wang et al., J. Biol. Chem., 285, 5013-5025, 2010

[2] Trends Endocrinol. Metab. 23: 619-27, 2012.

#### (3-2) 波及効果と発展性など

生体内における7-Ketocholesterolは、加齢によって蓄積する酸化コレステロールの中でも最も多量に存在し、様々な加齢関連疾患との関連性が指摘されている。骨粗鬆症における破骨細胞の増加や、炎症性骨疾患における骨破壊の原因となる破骨細胞に対して、加齢で増加した7-Ketocholesterolがどのような影響を持つのか、具体的には、破骨細胞分化の促進効果を介して、骨密度低下や骨破壊を増悪させるのかについては、現在のところ不明である。本研究成果は、その可能性を示唆する基礎的な知見であり、生体内における加齢関連酸化コレステロールと破骨細胞分化の関係性が明らかになれば、老化と破骨細胞の制御破綻を結びつける新たな分子病態の解明につながる。

[4] 成果資料  
なし