

SHRSP/IzmにおけるNox2欠損による骨修復異常

島根大学 医学部 病理学講座 病態病理学 藤川晃一、並河 徹

1) 背景、目的

SHRSP/Izmは高血圧モデルとして広く使用されており、その高血圧の原因の一つとして活性酸素による酸化ストレスの亢進があげられる^(1,2)。我々は、活性酸素を能動的に作り出す酵素であるNADPH Oxidase (Nox) に着目して、研究を行ってきた。NoxファミリーはNox1からNox5までの5種類が存在しており、p22phoxなどと複合体を形成することで機能し、NADPH由来の電子が細胞の内側から表面側に輸送されて、最終的に酸素分子と反応することで活性酸素であるスーパーオキシドアニオンが産生される。Nox1、2および4はユビキタスに、Nox3は内耳などに発現しており、Nox5はげっ歯類には発現していない。Nox1と2はRac、p47phoxなどのコファクターによって活性が調節され、短期的に大量のO₂⁻を産生するのに対し、Nox4は恒常的に活性化しており、比較的少量のH₂O₂を産生している⁽³⁾。Nox2とNox4は心血管系に発現が多く、高血圧に特に重要であると考えられる⁽⁴⁾ことから、Crispr/Cas9システムを使用して、Nox2あるいはNox4を欠損するSHRSP/Izm (Nox2 KO SHRSP、Nox4 KO SHRSP) を作出し、高血圧の進展への影響を評価した。この検討によって、Nox2欠損で血圧の上昇が有意に抑制され、Nox4欠損で血圧の上昇が促進されるという結果が得られた。

一方で、これらのラットを飼育していく中で、Nox2 KO SHRSP 個体において尾骨や下肢骨端が肥大化している個体が散見されたため、この症状の原因を検討した。本稿では、この結果について紹介する。

2) 方法、結果

骨肥大が生じている箇所を詳細に観察するために、レントゲン撮影を行ったところ、下肢骨の骨端や尾骨において、骨の形成が過剰になっている様子が観察された(図1)。骨端や尾骨は通常飼育下で負荷のかかりやすい箇所であり、すべてのNox2 KO SHRSPで骨肥大が起こるわけではないということから、骨組織に損傷を受けた際に骨修復に異常が生じ、骨肥大になるのではないかと考えた。そこで、WKY/Izm、SHRSP/Izm、すべてのNoxを欠損するSHRSP (Nox KO SHRSP)、Nox2 KO SHRSP、Nox4 KO SHRSPの5系統を用いて、骨損傷モデルを作成し詳細に検討した。

2か月齢の時点で、左脛骨に傷を付ける手術を行い、その1か月後および2か月後にレントゲン撮影と左右の脛骨の回収を行った。レントゲン撮影の結果、術後1か月の時点ではWKYやSHRSP、Nox4 KO SHRSPの3系統と比べて、Nox KO SHRSPとNox2 KO SHRSPで骨の肥大化が見られ始めていた(図2)。さらに、術後2か月の時点では、WKYやSHRSP、Nox4 KO SHRSPの骨は少し太くなっているものの修復が進んでいるのが分かるのに対し、Nox KO SHRSPとNox2 KO SHRSPでは骨が異常に肥大化していることが観察された(図2)。

これらの骨組織を脱灰し、パラフィン切片を作成し、HE染色を行うことで骨組織の観察を行った。術後1か月の時点では、5系統すべての骨損傷サンプル(左脛骨)で、活性化した立体的な骨芽細胞や多



図 1. Nox2 KO SHRSP で偶発的に見られる骨肥大

核の破骨細胞が観察された(図3)。コントロールサンプル(右脛骨)では、非活性な扁平な骨芽細胞が観察され、破骨細胞はほとんど見られなかった。術後2か月の時点では、WKY、SHRSP、Nox4 KO SHRSPでは、立体的な活性型の骨芽細胞や破骨細胞がほとんど見られなくなり、骨修復反応が終焉に向かっていることが観察された。一方、Nox KO SHRSP、Nox2 KO SHRSPでは、立体的な活性型の骨芽細胞や破骨細胞が未だ多く残っており、骨修復反応が継続していることが観察された。

3) 考察

本研究結果では、Nox2を欠損するNox KO SHRSPおよびNox2 KO SHRSPで、骨を損傷した際の修復過程において、異常な骨修復が生じた結果、過剰な骨肥大が起こる可能性を示した。その詳細としては、活性型骨芽細胞と破骨細胞の残存が観察されたことから、Nox2欠損によって骨修復過程を終了するシグナルが入らなくなり、骨芽細胞の過剰な増殖と活性化が引き起こされたことに起因すると考えられた。Nox2は骨芽細胞の分化過程においては機械的刺激によって発現上昇し、分化を抑制する方向に働く一方で、破骨細胞の分化過程で発現上昇し、分化を促進すると報告されている^(5,6,7)。この報告からも、Nox2欠損によって骨芽細胞への分化が促進された可能性が支持され、この過剰な骨芽細胞に対応するために破骨細胞も維持されたと考えることができる。

一方で、骨修復過程でのNox2欠損による影響についての報告はなされておらず、Nox2 KOマウスで骨が肥大化したという報告もなされていない。本研究にみられた骨肥大は、高血圧モデルラットSHRSPにおいてのみ見られた現象である可能性があり、SHRSPは老人性骨粗鬆症のモデルとしても知られている⁽⁸⁾ことから、SHRSPでは酸化ストレスをはじめとした様々な要因によって、骨微小環境のバランスにも影響が生じていると推察される。今後、SHRSPを用いた骨環境と高血圧の連関に関する研究が進むことで、高血圧患者における骨病態への影響が示されることを期待する。

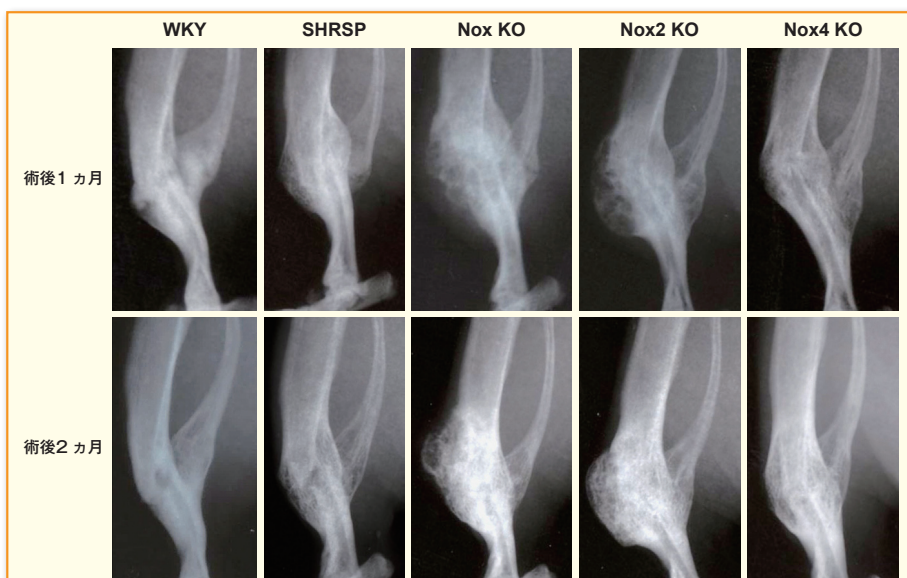


図2. 骨損傷モデルのレントゲン写真

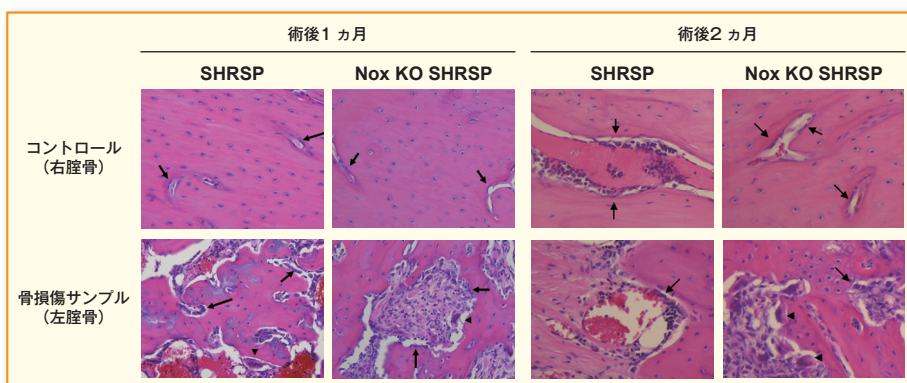


図3. 骨損傷モデルのHE染色画像

参考文献

- 1) Kishi T, et al. *Circulation*. 2004 May 18;109(19):2357-62
- 2) Noguchi K, et al. *Eur J Pharmacol*. 2010 Apr 10;631(1-3):28-35
- 3) Karen Bedard, et al. *Physiol Rev*. 2007; 87(1):245-313
- 4) Ago T, et al. *Circ J*. 2011;75(8):1791-800
- 5) James S Lyons, et al. *Sci Signal*. 2017 Nov 21;10(506)
- 6) Nakanishi A, et al. *Int J Mol Med*. 2013 Apr;31(4):874-80
- 7) Jin-Ran Chen, et al. *J Biol Chem*. 2015 Jun 5;290(23):14692-704
- 8) Yamori Y, et al. *Clin Exp Hypertens A*. 1991;13(5):755-62