

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19791351

研究課題名（和文） デキサメサゾンの骨芽細胞分化に対する作用機構の解明

研究課題名（英文） The elucidation of the mechanisms of dexamethasone-regulated osteoblast differentiation

研究代表者

三上 剛和 (MIKAMI YOSHIKAZU)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：80434075

研究成果の概要（和文）：本研究では、合成副腎脂質ホルモンの一つであるデキサメサゾン (Dex) の骨芽細胞分化に対する影響とその分子機構について解析を行った。研究の結果、Dex の骨芽細胞分化に対する作用効果は、作用させる濃度や時間のみならず、作用させる細胞の分化レベルに大きく依存することが明らかになった。また、この作用効果には MAP kinase 経路や Jak-STAT 経路などの細胞内シグナル伝達機構が関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanisms by which dexamethasone (Dex) affects osteoblast differentiation. This study demonstrated that Dex regulated osteoblast differentiation on the cell-differentiation stage dependent manner, and that MAP kinase and Jak-STAT signaling pathway were involved in the mechanisms for the Dex-regulated osteoblast differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	660,000	3,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：デキサメサゾン，骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

合成副腎皮質ホルモンの一つであるデキサメサゾン (Dex) は抗炎症効果をもつことから、関節リウマチなどの非感染性の炎症性疾患あるいは自己免疫疾患などの治療薬として頻繁に使用されている。しかし、Dex の長期投与は骨髄における未分化間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を抑制するとともに

脂肪細胞への分化を促進することから、骨粗鬆症を誘発する可能性が示唆されている。

しかし、その一方で、培養細胞を用いた実験では、Dex は骨芽細胞分化に対して促進的に働くことが報告されている。このような Dex の骨芽細胞分化に対する多面的な作用効果の相違については、作用させる濃度や時間などに依存すると考えられているが、その詳

細なメカニズムについては、不明である。

2. 研究の目的

Dex の骨芽細胞分化に対する作用機構を解明し、Dex の抗炎症薬としての効果的な使用方法、あるいは、骨粗鬆症の治療と予防法の開発に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

これまでの研究から、Dex の骨芽細胞分化に対する作用効果の相違は、作用させる濃度や時間のみならず、作用させる細胞の分化レベルにも依存する可能性が示唆されている。そこで本研究では、Dex の濃度や時間、細胞の分化レベルによる作用効果の違いを検討するため、各分化レベルにある培養細胞に対して Dex を様々なタイミングと濃度で作用させ、骨芽細胞分化に対する影響を検討した。

4. 研究成果

第一に、Dex の骨芽細胞分化に対する作用効果の相違について、作用させる細胞の分化レベルの違いに着目して解析を行った。ラット頭蓋冠由来の未分化間葉系幹細胞 ROB-C26 はサイトカインである BMP-2 を作用させると骨芽細胞へ分化し、石灰化した骨様結節を形成する。そこで、ROB-C26 を BMP-2 を用いて骨芽細胞へ誘導するとともに、様々なタイミングで Dex を作用させ、その後の細胞分化に対する影響を検討した。

実験の結果、Dex を培養の初期（培養 0 日目～6 日目）に作用させた場合には ROB-C26 は脂肪細胞へ分化し、培養後期（培養 9 日目～12 日目）に作用させた場合には、BMP-2 を単独で作用させたときよりも顕著に骨芽細胞の分化が促進された (Fig. 1)。

また、ROB-C26 に BMP-2 を作用させると骨芽細胞分化誘導転写因子である *Ostesix* (OSX) の発現が誘導されるが、培養初期に Dex をさせた ROB-C26 ではこの BMP-2 誘導性の OSX の発現が抑制されていた (Fig. 2)。

一方、培養後期に Dex を作用させた細胞では、このような Dex による OSX の発現抑制は認められなかった (Fig. 2)。そこで、ROB-C26 に OSX を強制発現させ、同様の実験を行ったところ、OSX 強制発現細胞においては、培養初期に Dex を作用させても骨芽細胞分化の指標とされる石灰化物が形成された。以上の結果から、Dex は ROB-C26 に対して、未分化の状態では脂肪細胞への分化を誘導するが、ある程度、骨芽細胞へ分化した状態では、その後の骨芽細胞の最終分化を促進すると考えられる。また、未分化な状態の細胞に対して、BMP-2 誘導性の OSX の発現を抑制してしまうことが、骨芽細胞への分化を抑制し、脂肪細胞へ分化させてしまう要因の一つと考えられる。

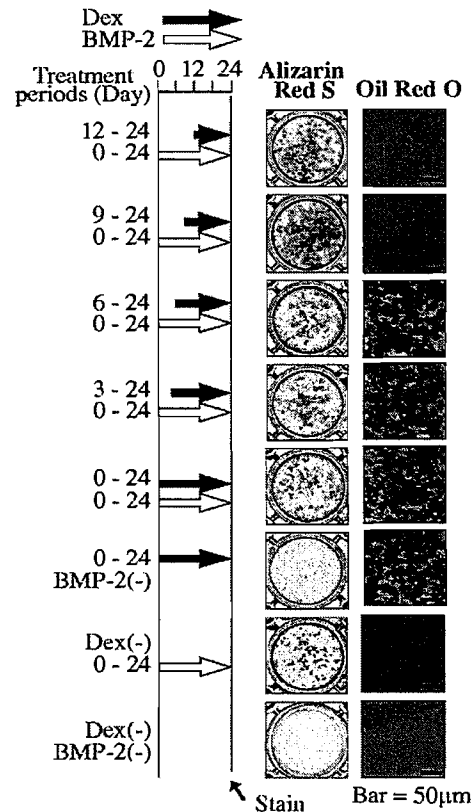


Fig.1. Effect of dexamethasone (Dex) on mineralization and lipid droplet formation. Cells were cultured in the presence or absence of bone morphogenetic protein (BMP)-2 (100 ng/ml) and Dex (10^{-8} M) treatment was commenced on various days, as indicated. After 24 days culture, cells were stained with Alizarin red S and Oil red O.

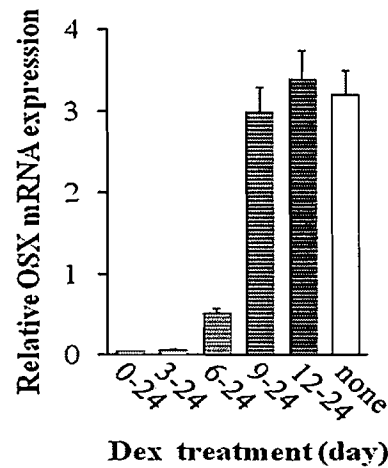


Fig.2. Analysis of OSX mRNA expression. Cells were cultured in the presence of bone morphogenetic protein (BMP)-2 (100 ng/ml) for 24 days, with Dex treatment (10^{-8} M) commencing on different days as indicated. After culture, real-time reverse transcription-polymerase chain reaction was performed. mRNA expression was normalized against that of β -actin, used as an internal control.

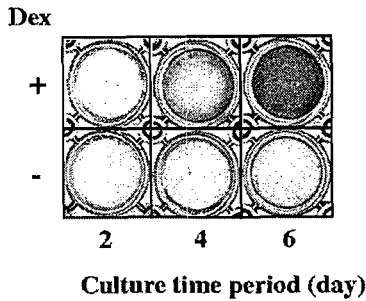


Fig. 3. Time-dependent effect of Dex on the mineralization in ROS17/2.8 cells. Cells were cultured for 2, 4, and 6 days in the presence or absence of 10^{-8} M Dex, and stained with Alizarin red S.

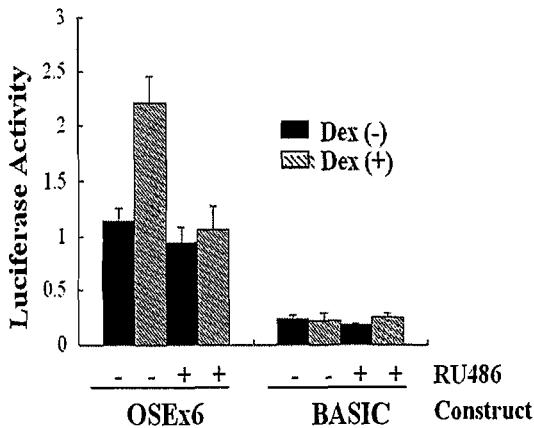


Fig. 4. Transcriptional activity of Runx2. Luciferase assay was performed using the (OSE2)x6-Luc construct which contains six repeats of the Runx2 binding site (OSE2). RU486 was used as a glucocorticoid antagonist. (OSE2)x6-Luc was transfected into cells. After 24 h, cells were treated with vehicle (ethanol), 10^{-8} M Dex, 10^{-6} M RU486, or 10^{-8} M Dex + 10^{-6} M RU486 for an additional 24 h, and then luciferase activity was determined. A vector pGL-Basic (Basic) was used as negative control.

第二に、Dex の骨芽細胞分化促進効果について解析を行った。本研究の結果から、Dex は、ある程度、骨芽細胞へ分化した細胞に対してはその後の最終分化を促進すると考えられることから、ラット成熟骨芽細胞様の培養細胞である ROS17/2.8 に Dex を作用させ、関連遺伝子の発現量および活性レベルを解析した。

解析の結果、Dex は ROS17/2.8 の石灰化を濃度依存的に促進するとともに (Fig. 3)、骨芽細胞分化誘導転写因子と知られる Runx2 の

転写活性を増加させることが明らかになった (Fig. 4)。siRNA を用いて Runx2 の発現を抑制した ROS17/2.8 では、Dex による石灰化の促進効果が抑制されたことから、Dex による ROS17/2.8 の骨芽細胞最終分化に対する促進効果には、Runx2 の転写活性を増加させることが重要な要因の一つであると考えられる。また、Dex を作用させた ROS17/2.8 において、Runx2 の著しい発現量の増加は認められなかったことから、Dex は Runx2 の翻訳後の修飾 (例えばリン酸化など) に関与し、その転写活性に影響を与えることが示唆された。

最後に、Dex と BMP-2 の相互作用について解析を行った。BMP-2 は未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導することが知られている。そこで、BMP-2 と Dex の相互作用について、それぞれを単独で処理した場合と併用した場合について、骨芽細胞分化関連因子の変動について解析した。

前述の実験に用いた ROB-C26 は頭蓋冠由来の幹細胞であることから、他の系統の幹細胞においても同様の結果が得られるかどうかの確認を兼ね、本実験にはマウス由来の未分化幹細胞様培養細胞である C3H10T1/2 細胞を用いた。C3H10T1/2 を BMP-2 (+) Dex (-)、BMP-2 (-) Dex (+)、BMP-2 (+) Dex (+)、および BMP-2 (-) Dex (-) の条件でそれぞれ培養し、骨芽細胞分化の指標であるアルカリフォスファターゼ (ALP) の活性をそれぞれの培養系において測定した。

実験の結果、C3H10T1/2 では ROB-C26 とは異なり、培養初期においても、BMP-2 と Dex を同時に作用させた培養系では、それぞれを単独で作用させた培養系と比較して、顕著に ALP の mRNA の発現量が増加し、活性レベルが上昇した (Fig. 5)。このことから、Dex の骨芽細胞分化に対する作用効果は細胞の分化レベル以外に、細胞の系統 (種類) にも大きく依存すると考えられる。

次に、ルシフェラーゼアッセイを用いて ALP 遺伝子の近位に存在するプロモーター領域の解析を行った。ALP プロモーター領域の各種欠損配列をルシフェラーゼ遺伝子の近位に結合させたコンストラクトを作成し、これを細胞に導入した。その後、それぞれの細胞に BMP-2 および Dex を作用させ、ルシフェラーゼの活性レベルを解析した。

解析の結果、BMP-2 と Dex の ALP 遺伝子発現誘導に対する相乗的な効果には、転写因子 STAT3 の結合配列が必要であることが示唆された (Fig. 6)。そこで、STAT3 に対する抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行ったところ、ALP プロモーター領域に存在する STAT3 結合配列を含むゲノム断片が共沈することが確認できた。さらに、siRNA を用いて STAT3 の発現を抑制した細胞では、BMP-2 と Dex の ALP

遺伝子発現誘導に対する相乗的な効果が抑制された。これらのことから、Dex は STAT3 を介して BMP-2 と相乗的に働き、C3H10T1/2 細胞の骨芽細胞への分化を誘導する可能性が示唆された。

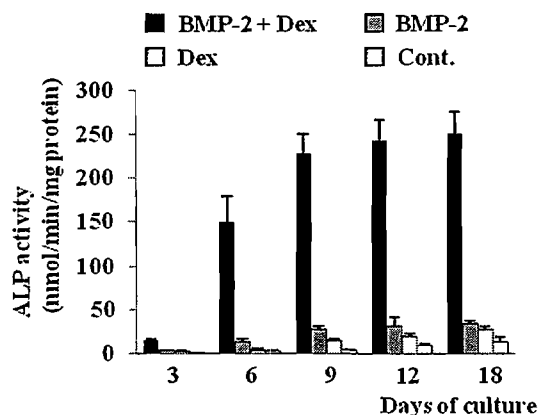


Fig.5. Effects of Dex and BMP-2 on ALP levels in C3H10T1/2 cells. Cells were cultured under the same conditions indicated in A, and ALP activity was measured.

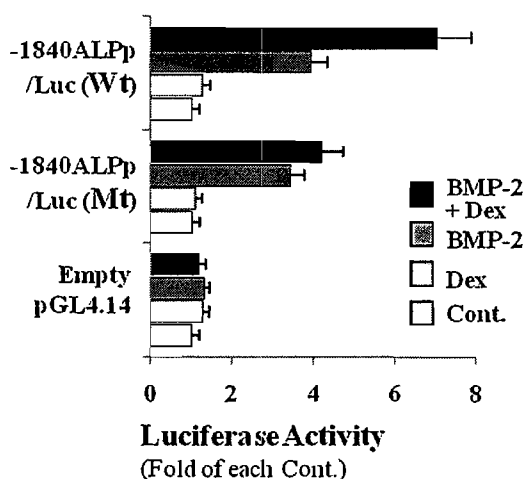


Fig.6. Effects of Dex and BMP-2 on ALP promoter activity in C3H10T1/2 cells. Basal luciferase activity of the wild-type murine ALP promoter construct, -1840ALPp/Luc(Wt), and of the STAT3 response element-truncated promoter constructs, -1840ALPp/Luc(Mt) was determined in C3H10T1/2 cells. Cells stably transfected with each construct were cultured with BMP-2 (100 ng/ml), Dex (10^{-8} M), or a combination of both inducers for 6 days, and then the luciferase activities were determined. An empty vector, Empty pGL4.14, was used as a negative control against ALP promoter constructs. Controls (Cont.) indicate cells cultured without BMP-2 or Dex.

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Mikami Y, Omoteyama Y, Takagi M. Inductive effects of dexamethasone on the mineralization and the osteoblastic gene expressions in mature osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 362, 368-373, 2007. 査読有
- ② Mikami Y, Takahashi T, Takagi M. Dexamethasone promotes DMP-1 mRNA expression by inhibiting negative regulation of Runx2 in multipotential mesenchymal progenitor, ROB-C26. *Cell Biology International*. 32, 239-246. 2008. 査読有
- ③ Mikami Y, Somei M, Takagi M. A new synthetic compound, SST-VED1-1, inhibits osteoblast differentiation by down-regulating Osterix expression. *The Journal of Biochemistry*. 145, 239-247. 2009. 査読有
- ④ Mikami Y, Somei M, Takagi M. A tryptamine derivative, SST-VED1-1, inhibits apoptosis and stimulates mineralization in osteoblasts. *Endocrine Journal*. 56, 665-678, 2009. 査読有
- ⑤ Mikami Y, Asano M, Honda J M, Takagi M. Bone morphogenetic protein 2 and Dexamethasone synergistically increase Alkaline Phosphatase levels through JAK/STAT signaling in C3H10T1/2 cells. *Journal of Cellular Physiology*. 223, 123-133, 2010. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 剛和 (MIKAMI YOSHIKAZU)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：80434075

研究分担者

該当なし