

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890211

研究課題名（和文）

骨粗鬆症の原因としてのニトロ化ストレス機構とそれへの女性ホルモン様物質の作用

研究課題名（英文）

Influences of Endocrine Disrupting Chemicals to Endogenous Nitritative Stress as a Cause of Osteoporosis

研究代表者

池田 啓一（IKEDA KEIICHI）

順天堂大学・スポーツ健康科学部・助教

研究者番号：90453597

研究成果の概要：骨粗鬆症は、老化および閉経後に起こることが知られている。閉経に伴う骨粗鬆症においては、女性ホルモンであるエストロゲンの劇的な減少によって、骨形成－骨吸収ともに亢進されるが、そのバランスが破綻し、骨吸収優位の方向へ導かれる。閉経モデルマウスにおける骨組織でのニトロ化の亢進や炎症が関与する骨粗鬆症に NO が関与しているなどの報告から、骨粗鬆症にタンパク質ニトロ化による酸化傷害が関与し、それをエストロゲンが制御していると考えた。本研究では、イソフラボンやトリブチル錫などの女性ホルモン様物質の骨形成への影響について注目し、それらの骨芽細胞におけるニトロ化ストレスの制御について検討した。①女性ホルモン様物質のうち、トリブチル錫（TBT）に焦点を当て、骨芽細胞への作用について解析したところ、TBT は、骨芽細胞分化を促進し、それに p38 MAP kinase 経路が関与していることがわかった。②内因性活性窒素種による 6-ニトロトリプトファンの形成について、LPS/IFN- $\gamma$  刺激 RAW 細胞中に検出した。また、LC-MS/MS による解析で、いくつかのニトロ化タンパク質を同定した。③TNF- $\alpha$  刺激による内因性活性窒素種により、骨芽細胞におけるニトロ化が確認された。また、女性ホルモン様物質のうち、ダイゼイン、ゲニステインにこの系におけるニトロ化抑制作用が見られた。TBT にはニトロ化抑制作用が見られなかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：(1)骨芽細胞 (2)骨形成 (3)女性ホルモン様物質 (4)ニトロ化ストレス

(5)内因性活性窒素種 (6)骨粗鬆症

## 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、老化や閉経に伴い、骨形成-骨吸収という骨代謝のバランスが崩れることにより起こることが知られている。特に、閉経に伴う骨粗鬆症においては、女性ホルモンであるエストロゲンの劇的な減少によって、骨形成・骨吸収ともに亢進されるが、そのバランスが破綻し、骨吸収優位の方向へ導かれる。つまり、破骨細胞による骨吸収が、骨芽細胞による骨形成を上回ることにより生じると考えられている（文献1）。

閉経モデルである卵巣摘出マウスにおいても、骨粗鬆症の症状が観察される。最近の報告では、このマウスで、炎症時に生じる誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）の発現亢進により一酸化窒素（NO）産生量が増加し、骨組織でのタンパク質ニトロ化による酸化傷害が起こり、また、iNOSを欠損した場合には、卵巣摘出による骨粗鬆症および骨組織のニトロ化が見られないことがわかっている（文献2）。また、炎症が引き起こす骨粗鬆症にNOが関与するという報告もある（文献3）。これらのことから、骨粗鬆症にタンパク質ニトロ化による酸化傷害が関与し、それをエストロゲンが制御していると考えられる。

ニトロ化は、炎症や虚血-再還流の際に発生するNOとスーパーオキシド（ $O_2^{\cdot -}$ ）に由来するパーオキシナイトライト（ONOO $^{\cdot}$ ）やNO $_2$ といった活性窒素種が、タンパク質、脂質、ヌクレオチドに対し引き起こす反応であり、過剰な発生は、各組織にニトロ化による酸化傷害を起こす。タンパク質中のニトロチロシンは、炎症性疾患、脳神経系疾患、がんなどの疾患部位において、抗体などで検出されている。一方、我々は、活性窒素種による新規ニトロ化アミノ酸残基として、6-ニトロトリプトファンを見いだした（文献6-9）。さらに、6-ニトロトリプトファンの抗体を開発し、プロテオーム解析でトリプトファンニトロ化タンパク質の同定を行い、ニトロ化におけるトリプトファンのチロシンと異なる独自の機能変化を追求した（文献6）。

最近、植物エストロゲン様物質や内分泌かく乱物質の、生殖系以外への作用および影響が注目されている。モデル培養細胞を用いたこれら女性ホルモン様物質の骨代謝への影響に関する報告は、骨吸収のものが多く、イソフラボン（文献4）や有機スズ類（文献5）が前駆細胞からの破骨細胞への分化を抑えたとされている。本研究では、イソフラボンやトリブチルスズの骨形成への影響に注目し、微小の環境変化での影響を受けやすいタンパク質の翻訳後修飾を指標にし、そのメカニズムの解明を目指した。

<参考文献>

①乾匡範、森優、高井俊行、*生化学*, 78: 250-256, 2006 / ②S. Cuzzocrea et al. *Endocrinology*. 144: 1098-1107, 2003 / ③K.J. Armour et al. *J. Bone Miner. Res.* 14: 2137-2142, 1999 / ④ V.G. Palacios et al. *J. Biol. Chem.* 280: 13720-13727, 2005 / ⑤T. Yonezawa et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355: 10-15, 2007 / ⑥K. Ikeda et al. *Nitric Oxide*. 16, 18-28, 2007 / ⑦ F. Yamakura, K. Ikeda. *Nitric Oxide*. 14, 152-161, 2006 / ⑧ F. Yamakura et al. *J. Biochem.* 38 (1), 57-69, 2005 / ⑨池田啓一ら、*健康創造研究会誌*, 3 (1), 56-64, 2004

## 2. 研究の目的

本研究では、イソフラボンやトリブチル錫などの女性ホルモン様物質の骨形成への影響について注目し、それらの骨芽細胞におけるニトロ化ストレスの制御について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 女性ホルモン様物質の骨形成について

TBTによる骨芽細胞への作用について以下のように検討した。FBSを含む $\alpha$ -MEM培地中のMC3T3-E1細胞に対し、トリブチル錫を添加し、1-4日培養し、タンパク質を抽出後、骨型アルカリホスファターゼの比活性を測定した。また、ウェスタンブロット法により、MAP kinaseのリン酸化について解析した。

### (2) 内因性活性窒素種により生じる6-ニトロトリプトファンの検出について

内因性活性窒素種による6-ニトロトリプトファンの形成について、以下のように検討した。RAW264.7マクロファージ様細胞に、LPS/IFN- $\gamma$ を作用させ活性化させた。12時間後、タンパク質を抽出し、抗6-ニトロトリプトファン抗体を用いたWestern Blot法を行い、含有タンパク質の検出を行った。また、顕著に増加したバンドを切り出し、トリプシン消化後にLC-MS/MSにより分析し、含有タンパク質の同定およびそのニトロ化部位の検出を試みた。

### (3) TNF- $\alpha$ 刺激モデル骨芽細胞におけるタンパク質ニトロ化の女性ホルモン様物質による抑制について

MC3T3-E1細胞に対し、ダイゼイン、ゲニステインおよびTBTの存在下においてTNF- $\alpha$ を作用させた。細胞中のタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法により、ニトロチロシンの検出の差異について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 女性ホルモン様物質の骨形成について

女性ホルモン様物質のうち、トリブチル錫に焦点を当て、骨芽細胞への作用について解析し、p38 MAP kinase のリン酸化減少の抑制による骨形成促進を見だした。

(2) 内因性活性窒素種により生じる 6-ニトロトリプトファンの検出について

内因性活性窒素種による 6-ニトロトリプトファンの検出法の検討を行った。活性化マクロファージ様細胞の 6-ニトロトリプトファン含有たんぱく質は活性化していない対照群と比べて、内因性活性窒素種によるニトロ化が亢進していた。特に、33kDa, 37kDa, 55-60kDa のタンパク質のニトロ化の亢進が顕著であった。さらに、SDS-PAGE のゲルより、これらのバンドを切り出し、LC-MS/MS を用いてタンパク質の解析を行ったところ、いくつかのタンパク質が同定された。しかし、トリプトファンニトロ化部位の検出には至らなかった。現在、検出感度を上げる方法について検討中である。

(3) TNF- $\alpha$  刺激モデル骨芽細胞におけるタンパク質ニトロ化の女性ホルモン様物質による抑制について

TNF- $\alpha$  刺激により多くのバンドでタンパク質中のニトロチロシン量が増えていることがわかった。それに対し、植物エストロゲンであるダイゼインおよびゲニステインを加えると、刺激によるニトロチロシン量の増加が見られなかったことから、ダイゼイン、ゲニステインには、この系におけるニトロ化ストレス抑制の機能があることがわかった。また、TBT によるニトロ化抑制は見られなかった。

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 Yuko Amamiya, Naoki Shida, Keiichi Ikeda, Shigeru Nakajima, Hideaki Iwai Effect of footbathing and laughter on blood pressure or salivary amylase activity in Japanese adults *Journal of Physical Fitness, Nutrition and Immunology*, 17(3), 230-239, 2007 (査読有)

② Yuko Amamiya, Shigeru Nakajima, Keiichi Ikeda, Naoki Shida, Fumiyuki Yamakura, Sachio Kawai, Yuji Nakazato, Shizuo Katamoto, Isamu Kabe, Takahide Tsuchiya, Hideaki Iwai Negative correlations between free histidine content in plasma and BMI or areas of visceral fat *Journal of Physical Fitness, Nutrition and Immunology*, 18 (2) 87-91, 2008 (査読有)

③ Osamu Hosomi, Akira Takeya, Yoshinori

Misawa, Keiichi Ikeda, Yoshiharu Matahira Binding specificities of novel synthesized oligosaccharides to galectin (C-16) and anti- $\alpha$ Gal IgG antibody *Chitin and Chitosan Research*, 14 (3) 263-268, 2008 (査読有)

④ 高血圧発症後の持久的運動トレーニングが自然発症高血圧ラット心臓のニトロ化ストレスに及ぼす影響、古川覚、木村博子、向田正博、山倉文幸、神野宏司、池田啓一、順天堂医学, 54, 308-317, 2008 (査読有)

⑤ 松本孝、若林ゆう、池田啓一、山倉文幸 種々の生体物質のペルオキシナイトライト消去能 *学苑-生活科学紀要-*, 818, 35-39, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

① 池田啓一、神野宏司、内藤久士、古川覚、高森建二、小川秀興、山倉文幸 敗血症モデルラットにおける 6-ニトロトリプトファン含有タンパク質の解析 第7回日本NO学会学術集会プログラム抄録集, p. 85 2007/5/17, 18 ピアザ淡海 (滋賀)

② 韓浩先、嶋田武、池田啓一、小川秀興、高森建二、山倉文幸 HPLC-多チャンネル電気化学検出器による6-ニトロトリプトファンの定量とヒト血清への応用 第7回日本NO学会学術集会プログラム抄録集, p. 84 2007/5/17, 18 ピアザ淡海 (滋賀)

③ 池田啓一、神野宏司、内藤久士、古川覚、松本孝、岩井秀明、高森建二、小川秀興、山倉文幸 LPS投与ラット臓器中の6-ニトロトリプトファン含有タンパク質の特異的抗体を用いた解析 第29回日本フリーラジカル学会学術集会・日本過酸化脂質フリーラジカル学会第31回大会合同学会-プログラム・抄録集, p. 69 2007/6/9, 10 名古屋国際会議場 (愛知)

④ 池田啓一、神野宏司、古川覚、峯木礼子、高ひかり、岩井秀明、内藤久士、高森建二、山倉文幸 6-ニトロトリプトファン特異的抗体を用いた機能プロテオミクス 日本プロテオーム機構第5回大会要旨集, p.135 2007/7/30-31、日本科学未来館、東京

⑤ 山倉文幸、小林一雄、池田啓一 間違って Feが入ったヒトMnSODはミトコンドリアに酸化傷害を引き起こす?—in vitro study, *BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会) 講演要旨集*, Abstract No. 4P-0550 2007/12/11-15、パシフィコ横浜 (神奈川)

⑥ 池田啓一、岩井秀明、峯木礼子、高ひかり、松本孝、高森建二、小川秀興、山倉文幸 内因性活性窒素種によるマクロファージ様培養細胞(RAW264.7)の修飾で生じた 6-ニトロトリプトファン残基を含むタンパク質の検出 日本トリプトファン研究会第29回学術集会プログラム, p. 37 2007/12/8,9、昭和女子大学 (東京)

⑦ 古川寛、木村博子、向田政博、山倉文幸、神野宏司、**池田啓一**、内藤久士、柿木亮、宮下愛未 高血圧発症後の運動トレーニングが自然発症高血圧ラットの酸化・ニトロ化ストレスに及ぼす効果 第43回高血圧関連疾患モデル学会学術総会抄録集、p.68-69、2007/9/7-9、梅田スカイビル・スペース36(大阪)

⑧ 雨宮有子、**池田啓一**、中島滋、加部勇、信太直己、花輪朋樹、七田祐匡、山倉文幸、河合祥雄、形本静夫、岩井秀明 中年における身体活動レベルと動脈硬化指標との相関—MDA-LDL、ウエスト周囲径、HDL-choを中心としての検討— 第78回日本衛生学会総会講演集、*日本衛生学雑誌*、63(2)、512、2008 2008/3/28-31 熊本市市民会館(熊本)

⑨ **池田啓一**、信太直己、雨宮有子、清水智哉、中島滋、山倉文幸、岩井秀明

骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)に対するトリプトファン作用機構 第78回日本衛生学会総会講演集、*日本衛生学雑誌*、63(2)、545、2008 2008/3/28-31 熊本市市民会館(熊本)

⑩ 山倉文幸、**池田啓一** 新しいタンパク質ニトロ化修飾の指標としての6-ニトロトリプトファン 第8回日本NO学会学術集会プログラム抄録集、p.36(シンポジウム)、2008/5/9-10、仙台国際センター(宮城)

⑪ 雨宮有子、**池田啓一**、中島滋、山倉文幸、河合祥雄、形本静夫、中里祐二、加部勇、信太直己、岩井秀明 肥満者・動脈硬化症患者における酸化傷害の亢進と血清中銅・亜鉛濃度との関連、第19回日本微量元素学会大会プログラム・抄録集、2008/7/3-4、学士会館(東京) p.192

⑫ 川崎広明、松本孝、**池田啓一**、安田従生、山倉文幸各種生体物質のperoxynitriteとの反応性—トリプトファンとの反応性を中心として— 日本トリプトファン研究会第30回学術集会講演要旨集 2008/12/6-7

⑬ **池田啓一**、信太直己、雨宮有子、岩井秀明 エストロゲン様物質の骨芽細胞(MC3T3-E1)シグナル伝達への影響、環境ホルモン学会第11回研究発表会講演要旨集 2008/12/13-14 星陵会館、東京ビッグサイト(東京)

⑭ S. Nakajima, H. Iwai, S. Nakamura, S. Kasaoka, **K. Ikeda**, Y. Amamiya, F. Yamakura, S. Kawai, S. Katamoto Suppressive effect of blood free histidine on obesity. (Symposium) 237th American Chemical Society National Meeting & Exposition, Salt Lake City, UT, USA, (Abstract: March 23, 2009, TECH-4) March 22-26, 2009

⑮ **池田啓一**、雨宮有子、信太直己、高子真吾、山倉文幸、加部勇、河合祥雄、形本静夫、岩井秀明 動脈硬化症早期診断項目としての血中マーカー探索 第79回日本衛生学会総会講演集、*日本衛生学雑誌*、64(2)、569、2009、

平成21年3月29日～4月1日、北里大学薬学部(東京)

⑯ 雨宮有子、**池田啓一**、信太直己、高子真吾、中里祐二、中島滋、山倉文幸、河合祥雄、形本静夫、岩井秀明 動脈硬化症患者における血中骨代謝指標および亜鉛濃度 第79回日本衛生学会総会講演集、*日本衛生学雑誌*、64(2)、570、2009、平成21年3月29日～4月1日、北里大学薬学部(東京)

⑰ 信太直己、**池田啓一**、雨宮有子、高田和子、中島滋、加納達二、中里祐二、加部勇、町田和彦、岩井秀明 動脈硬化症患者と健常者の栄養充足率及び血清中微量金属濃度の比較 第79回日本衛生学会総会講演集、*日本衛生学雑誌*、64(2)、601、2009、北里大学薬学部(東京)、平成21年3月29日～4月1日

[図書](計2件)

① **Keiichi Ikeda**, Hideaki Iwai, Takashi Matsumoto, Reiko Mineki, Hikari Taka, Kenji Takamori, Hideoki Ogawa and Fumiyuki Yamakura Proteomic analysis of 6-nitrotryptophan-containing proteins in peroxynitrite-treated PC12 cells, in: The Interdisciplinary Conference on Tryptophan and Related Substances: Chemistry, Biology, and Medicine (Ed. Katsuji Takai), International Congress Series, Elsevier, 2007, 1304, 33-40

② Fumiyuki Yamakura, Takashi Matsumoto, **Keiichi Ikeda**, Hikari Taka, and Naoko Kaga, Formation of 6-nitrotryptophan in purified proteins by reactive nitrogen species: a possible new biomarker, in: The Interdisciplinary Conference on Tryptophan and Related Substances: Chemistry, Biology, and Medicine (Ed. Katsuji Takai), International Congress Series, Elsevier, 2007, 1304, 22-32

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

6. 研究組織  
(1)研究代表者

池田 啓一 (IKEDA KEIICHI)  
順天堂大学・スポーツ健康科学部・助教  
研究者番号: 90453597

(2)研究分担者

(3)連携研究者