

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592176

研究課題名（和文）骨代謝に対する組織レニン - アンジオテンシン系の影響

研究課題名（英文）Effect of Renin-Angiotensin System in the bone metabolism

研究代表者

坂東 健二郎 (BANDOW KENJIRO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50347093

研究成果の概要（和文）：Renin-Angiotensin 系（RA 系）は血液量と血圧を正常に保つシステムであるが、一部の器官では局所で ACE (Angiotensin converting enzyme) が AII (Angiotensin II) を産生し、近傍の AT1 (Angiotensin II type 1) 受容体に働く組織 RA 系が存在している。我々は、骨芽細胞で組織 RA 系に必要な機能的 AT1 受容体、AT2 受容体と ACE の発現を確認した。骨芽細胞や軟骨芽細胞を AII で刺激すると骨分化への影響は認められなかったものの、ERK、AMPK、Syk などの細胞内シグナル分子が影響を受け、ケモカインの発現が促進された。骨組織中で AII の局所濃度が高まれば、骨組織 RA 系が働くと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The classical renin-angiotensin system (RAS) is a hormone system that maintains fluid balance and blood pressure. In addition to this classical RAS, many recent reports to suggested the existence of local RAS in several tissues. In our present study, we detected angiotensin II type 1 (AT1), AT2 receptor and angiotensin converting enzyme (ACE), which were the essential elements of local RAS, in osteoblasts. Angiotensin II (AII) stimulated some cellular signal molecules, such as ERK, AMPK and Syk, and promoted the expression of some chemokines in osteoblasts, whereas AII did not directly influence differentiation of osteoblast or chondrocyte. These results suggest that local RAS is functional in bone tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 機能系基礎歯科学

キーワード：骨代謝、骨免疫学、組織 RAS、AT1 受容体、AMPK、Myd88、Cot/Tpl2

## 1. 研究開始当初の背景

昇圧ホルモンである Angiotensin は前駆体である Angiotensinogen として分泌され、腎臓からの Renin により切断され、Angiotensin I (AI)

となる。不活性型である AI は、肺や血管内皮細胞などに切断される事により、活性型である Angiotensin II (AII) となる。このように血中で活性化された AI は血管内皮細胞の収縮

と、副腎からアルドステロン分泌を誘導し、直接的、間接的に血圧を上昇させる。このような血中の Renin-Angiotensin (RA) 系とは別に、心臓や腎臓等の組織内にも Angiotensin Converting Enzyme (ACE) と Angiotensin I type 1 (AT1) 受容体が存在し、局所的に産生された AII が、近傍の AT1 受容体に作用する事が知られている。このような系は全身の RA 系と区別して、組織 RA 系と呼ばれ、心肥大や動脈硬化、腎間質線維化などに関与している事が報告されている。

研究代表者はこれまで、骨芽細胞に対するメカニカルストレスの影響を研究しており、メカニカルストレス受容体の分子を特定していく過程で、AT1 受容体が大きな役割を果たしている事を見出した。AT1 受容体の発現は骨芽細胞の分化に伴って亢進していき、AT1 受容体を介したストレスは Receptor activator of NF $\kappa$ B ligand (RANKL) と、Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) や Macrophage inflammatory protein-1  $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ) などのケモカイン遺伝子発現を促進する。このシグナルは AII 非依存的であるが、ヒトにおける Angiotensinogen の血中濃度が 600 ng/ml という事から、骨芽細胞に発現する AT1 受容体の AII 依存的なシグナルも存在するのではないかと考えた。そこで、予備実験を行ったところ、骨芽細胞で AII の産生に必要な ACE の発現を PCR 法で確認した。また、1.5 ng/ml の組換え体 AII をマウス骨芽細胞の培地に添加すると、Extra-cellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化が確認された。これらの予備実験から、骨組織で組織 RA 系に必要な ACE と機能的 AT1 受容体の発現が確認できた事になる。まだ仮説ではあるが、骨組織の局所で骨芽細胞の ACE が AII を産生すれば、近傍の AT1 受容体に働く可能性があり、骨組織中の血流変化や骨芽細胞機能への直接の影響を及ぼす可能性がある。これらの事を踏まえ、骨組織内の局所的な RA 系が骨代謝に与える影響を検討する研究を計画するに至った。

## 2. 研究の目的

RA 系は血液量と血圧を正常に保つシステムであるが、一部の器官では局所で ACE が AII を産生し、近傍の AT1 受容体に働く組織 RA 系が存在し、動脈硬化や心肥大などの生活習慣病に関与している事が報告されている。申請者は予備実験により、骨芽細胞で組織 RA 系に必要な機能的 AT1 受容体と ACE の発現を確認した。まだ仮説ではあるが、骨組織 RA 系が活性化されれば、骨組織中の血流変化や骨代謝への直接の影響を及ぼす可能性がある。これらの事を踏まえ、骨組織内の局所的な AII の濃度変化が骨代謝に与える

影響を検討する事を目的としている。

また、内臓脂肪の増加や高濃度インスリンが Angiotensinogen の血中濃度を上昇させる事が知られており、肥満、高血圧、高脂血症、糖尿病などの生活習慣病と(組織) RA 系の関係が研究されてきている。そして、高血圧症は骨塩量を減少させる事が知られており、生活習慣病と骨粗鬆症を併発する事も多い。しかし、組織 RA 系と骨代謝の関係については内外でほとんど研究されていない。本研究により、骨での組織 RA 系の調節機構、組織 RA 系の骨代謝への影響が解明されれば、生活習慣病に併発する骨代謝異常や自己免疫疾患による関節炎の発症機序解明が進む事が予想される。また、高血圧症の様々な治療薬の骨代謝への影響も考慮されるようになり、新たな骨疾患予防薬の開発も進む可能性がある。

## 3. 研究の方法

### 【動物】

C57BL/6 マウスは九動(佐賀県鳥栖市)より購入した。*cot/tpl2* ノックアウトマウスは C57BL/6 マウスがバックグラウンドのマウスで、我々が維持している。*myd88* ノックアウトマウスは大阪大学の審良静雄先生の厚意により使わせていただいた。

### 【細胞培養】

マウス培養骨芽細胞株 MC3T3-E1 およびマウス培養軟骨芽細胞前駆細胞株 ATDC5 は理化学研究所バイオリソースセンター(茨城県つくば市)より購入した。その他に、初代培養骨芽細胞はマウス新生仔の頭蓋冠を摘出し、0.125% Collagenase type I, 0.25% Trypsin で処理して、回収した。また、初代培養軟骨芽細胞はマウス新生仔の大腿骨遠心部と脛骨近心部の骨端より軟骨を摘出し、0.05% Collagenase type I で処理して、回収した。骨分化培地として、 $\alpha$ -MEM に 10% ウシ胎仔血清、28 mM アスコルビン酸、5 mM  $\beta$ -グリセロリン酸を添加し、0-3 週間、培養を行った。ATDC5 については、Ham's F-12/DMEM に 5% ウシ胎仔血清、10  $\mu$ g/ml インスリン、10  $\mu$ g/ml トランスフェリン、30 nM 亜セレン酸ナトリウムを添加して、0-4 週間、培養を行った。

### 【細胞染色】

数週間、培養した細胞は 3.7%ホルムアルデヒド PBS 溶液で固定後、染色した。石灰化を見る目的で、アリザリンレッド S 染色と Von Kossa 染色を行った。アリザリンレッド S 染色は固定後の細胞を 5%アリザリンレッド S 水溶液で 5 分間染色したのち、水洗した。Von Kossa 染色は固定した細胞を 5%硝酸銀水溶液で処理し、800 mJ/cm<sup>2</sup> の紫外線を照射

して染色し、5%チオ硫酸ナトリウム水溶液で反応を停止した。また、軟骨基質を染色する目的で、アルシアンブルー染色を行った。固定した軟骨芽細胞を0.5%アルシアンブルー8GX、0.1 M 塩酸水溶液で12時間、染色したのち、水洗した。

#### 【リアルタイム PCR 法】

様々な処理を行った細胞から Trizol 試薬 (インビトロジェン社) を用いて total RNA を抽出し、oligo dT プライマーを用いて cDNA に逆転写した。20000 倍希釈した SYBR Green I (CAMBREX 社) を加えて PCR 反応を行い、反応中の蛍光を Step One Plus (ABI 社) で読み取り、発現していた mRNA の量を解析した。

#### 【ウェスタンブロット法】

実験に用いた細胞は RIPA buffer で溶解し、10%ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行った。泳動後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜にトランスファーし、5%スキムミルク TBST でブロッキングを行った。1 次抗体と反応させた後、ペルオキシダーゼ (POD) 標識 2 次抗体と反応させた。その後、ルミノール試薬で化学発光させ、X 線フィルムに焼付け、現像を行った。

## 4. 研究成果

#### 【受容体の確認】

骨芽細胞が分化していく過程で、RA 系が働く前提となる受容体の発現を確認した。具体的に、マウス新生仔頭蓋冠より骨芽細胞を採取し、アスコルビン酸含有分化培地で 0~3 週間、分化させ、AT1 および AT2 受容体の発現をウェスタンブロット法で確認したところ、いずれの受容体も分化が進むに連れて発現が高くなったが、AT2 受容体でより顕著であった。これらの結果は、骨芽細胞は分化が進むにつれ、AII の影響を受けやすくなる事を示唆している。

#### 【AII の骨分化への影響】

骨芽細胞の分化への AII の長期的な影響を見るため、マウス初代培養骨芽細胞の分化培地に AII を添加し、0~3 週間培養した。Arizarin Red S 染色、von Kossa 染色法で、石灰化への影響を確認したが、AII 刺激による影響は確認できなかった。また、オステオカルシン (OCN)、オステオポンチン (OPN)、アルカリホスファターゼ (ALP) などの骨分化マーカーの mRNA の発現をリアルタイム PCR 法で確認し、コントロール群と比較したが、顕著な差は認められなかった。AII は骨芽細胞の石灰化や分化には影響を与えない事を示唆している。

メカニカルストレスにより AT1 受容体を

刺激すると、MCP-1、MIP-1 $\beta$ などのケモカインの発現が促進されたので、AII 刺激でも効果がみられるかを見た。すると、CCL2、3、7、9、CXCL9、10、11 の mRNA の発現の上昇がリアルタイム PCR 法により確認された。

#### 【AII 刺激による細胞内シグナル】

AII 刺激の骨芽細胞における細胞内シグナルを確認した。AII 刺激により、短時間で Mitogen-activated protein kinase (MAPK) の 1 種である Extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化が認められた。しかし、骨芽細胞をアスコルビン酸含有培地で 2 週間培養してから AII で刺激すると、ERK のリン酸化は未分化な時よりも弱くなる。また、AT1 受容体を選択的に刺激する低出力超音波は分化していても ERK のリン酸化は弱くならなかった。前述のように、骨分化が進むと AT2 の発現が優位になる事が影響を与えているかもしれない。

もうひとつ、我々が注目したシグナル分子が、AMP activated protein kinase (AMPK) である。AMPK は細胞内のエネルギーとなる ATP が枯渇すると活性化され、細胞内に ATP を補充するように働く。骨芽細胞を AII 刺激すると、AMPK $\alpha$  は短時間で脱リン酸化した。また、骨芽細胞は分化するに従い、AMPK $\alpha$  のリン酸化が減弱していった。そこで、AMPK の骨分化への影響を確認する事にした。骨芽細胞に AMPK の阻害剤である Compound C と促進剤である Metformin を添加して分化させた。Compound C は細胞がアポトーシスを起こしてしまい、長期の培養ができなかったため、骨分化への影響は確認できなかったが、Metformin は骨芽細胞の石灰化を抑制し、OCN、OPN、骨シアロタンパク (BSP)、Runx2 などの骨分化マーカーの発現を抑制した。この事は、AMPK が骨分化を抑制しているが、AII は AMPK を短時間、抑制する事で、骨分化を調節しているのかもしれない。

#### 【AII の軟骨分化への影響】

次に、マウス新生仔膝関節より採取した軟骨芽細胞を AII で刺激したところ、骨芽細胞と同様に AMPK の脱リン酸化が認められた。そこで、AMPK シグナルが軟骨分化にどのような影響を与えるのか調べるため、マウス初代培養軟骨芽細胞の培地に Metformin を添加し、軟骨分化マーカーの mRNA の発現をコントロール群と比較した。すると、ALP と collagen type X a1 (colXa1) の発現が Metformin 添加により抑制された。また、マウス軟骨芽細胞前駆細胞株 ATDC5 細胞の培地に Metformin を添加したところ、sex determining region Y box 5 (Sox5)、Sox9、collagen type 2 a1 (col2a1) などの発現が抑制された。Metformin は軟骨基質の生成を抑制

する事をアルシアンブルー染色、石灰化を抑制する事をアリザリンレッド染色などで確認した。これらは、AMPK シグナルが軟骨分化に抑制的に働く事を示唆している。

#### 【アンジオテンシン受容体の発現に影響を与える刺激の検討】

骨芽細胞のアンジオテンシン受容体の発現に影響を与える刺激についても検討した。まず、骨芽細胞を AII で刺激したところ、AT1 受容体は刺激後 6 時間で mRNA の発現が 2 倍になった。しかし、さらに刺激を続けると、5 日で対象群と発現量に差が認められなくなった。また、AT2 受容体については、AII 刺激による影響は認められなかった。このことから、AII は骨芽細胞に対して持続的に効果を表すのではなく、短期的にあるいは局所的に働くのではないかと考えられる。他にも様々な刺激を骨芽細胞に与えたが、グラム陰性菌の内毒素である Lipopolysaccharide (LPS) がアンジオテンシン受容体の発現に影響を与えた。刺激後 5 日以内には AT1 受容体、AT2 受容体ともに影響を受けなかったが、2 週間刺激を続けたところ、無刺激群に比べ、AT1 および AT2 受容体の発現が抑制された。また、LPS は OCN、I 型コラーゲン、ALP などの骨分化マーカーの発現も抑制した。そこで、LPS の受容体である Toll-like receptor 4 (TLR4) の下流のシグナル分子である Myd88 と Cot/Tpl2 の KO マウスから採取した骨芽細胞を用いて、同様の実験を行ったところ、Myd88 KO マウスでの骨芽細胞で LPS による骨分化抑制作用が認められず、Cot/Tpl2 KO マウスでは骨分化の後期が LPS により抑制された。今後、これらの分子の相互作用を解析していければ、骨関節炎と生活習慣病の関係などが解明できるのではないかと考えている。

#### 【骨組織 RA 系の Syk シグナルの検討】

すでに、骨芽細胞のメカニカルストレスの受容に、AT1 受容体が関わっている事を示唆する結果を得ていたので、培養骨芽細胞系 MC3T3-E1 に低出力超音波や伸展などのメカニカルストレスを負荷した。すると、数分で ERK1/2 のリン酸化が認められ、30 分遅れて Spleen tyrosine kinase (Syk) のリン酸化が認められた。さらに、骨や軟骨、脂肪、筋などの分化マーカー遺伝子について検討したところ、メカニカルストレスにより脂肪細胞の分化マーカー遺伝子である Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$ 1 の発現が抑制された。骨細胞へのメカニカルストレスは脂肪細胞への分化を抑制する作用がある事が示唆された。ここで、AT1 受容体の Antagonist である Candesartan で前処理をしてメカニカルストレスを負荷したところ、ERK と Syk のリン酸化は抑制され、

PPAR $\gamma$ 1 の発現は抑制されなかった。次に、AT2 受容体の Antagonist である PD123319 で前処理して同様の実験を行ったところ、Candesartan と同様に、PPAR $\gamma$ 1 の発現は抑制されなかった。これらの結果は骨芽細胞のメカニカルストレスの受容に AT1 受容体ばかりでなく、AT2 受容体も関わっている事を示唆している。また、ERK の阻害剤である U0126 でも同様の結果が得られた。さらに面白い事に、骨芽細胞を AII とメカニカルストレスで同時に刺激したところ、ERK と Syk のリン酸化は認められるものの、PPAR $\gamma$ 1 の発現に影響がなかった。AT2 受容体シグナルは ERK を活性化しない事が知られていることから、AII、AT1 受容体、AT2 受容体、ERK、Syk の間には複雑なクロストークがある事が考えられる。今後、siRNA などで AT1 受容体、AT2 受容体の発現を抑制するなど、より深い解析が必要であると考えている。

また、ATDC5 細胞に Constitutive active な Syk を強制発現させると、Sox9、col2a1 などの軟骨分化マーカーの発現が対象群よりも促進された。軟骨分化においても、AII シグナルと Syk に何らかのクロストークがあるかもしれない。

#### 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 2 件)

①Molecular mechanisms of the inhibitory effect of lipopolysaccharide (LPS) on osteoblast differentiation.

Bandow K, Maeda A, Kakimoto K, Kusuyama J, Shamoto M, Ohnishi T, Matsuguchi T.  
Biochem Biophys Res Commun. 2010, 402: 755-761. 査読有

②Osteoblast differentiation is functionally associated with decreased AMP kinase activity.

Kasai T, Bandow K, Suzuki H, Chiba N, Kakimoto K, Ohnishi T, Kawamoto S, Nagaoka E, Matsuguchi T.  
J Cell Physiol. 2009, 22: 740-749. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

①「Syk を介した骨芽細胞の LIPUS 受容機構」  
楠山讓二、坂東健二郎、社本光央、大西智和、松口徹也  
第 14 回超音波骨折治療研究会 2011 年 1 月 22 日(東京都).

②「骨分化における LPS 刺激の細胞内シグナル解析」  
Kenjiro Bandow, Aya Maeda, Kyoko Kakimoto, Tomokazu Ohnishi, Tetsuya Matsuguchi

平成 22 年度日本生化学会九州支部例会,  
2010 年 5 月 16 日(鹿児島県).

③「2 型糖尿病によるマウス骨芽細胞のメカニカルストレス反応性の減弱」

大西智和、坂東健二郎、松口徹也

第 13 回超音波骨折治療研究会 2010 年 1 月  
23 日(東京都).

④「骨分化への Lipopolysaccharide (LPS) の影響」

坂東健二郎、柿元協子、大西智和、松口徹也

第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9  
日～12 日 (神奈川県)

⑤「骨芽細胞分化における細胞内エネルギーセンサーキナーゼ (AMPK) の役割」

葛西貴行、坂東健二郎、柿元協子、大西智和、

川本真一郎、長岡英一、松口徹也

第 51 回歯科基礎医学会学術大会 2009 年 9  
月 9 日～11 日 (新潟県)

⑥「高グルコース培養が骨芽細胞のメカニカルストレス反応性に及ぼす影響」

大西智和、坂東健二郎、柿元協子、千葉紀香、

松口徹也

第 12 回超音波骨折治療研究会 2009 年 1 月 17  
日 (東京都).

⑦「軟骨細胞の分化における AMP-activated protein kinase (AMPK) の機能的役割」

坂東健二郎、柿元協子、大西智和、千葉紀香、

松口徹也 第 31 回日本分子生物学会年会第

81 回日本生化学会大会合同学会(BMB2008),  
2008 年 12 月 9 日～12 日(兵庫県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂東 健二郎 (BANDOW KENJIRO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50347093

### (2) 研究分担者

松口 徹也 (MATSUGUCHI TETSUYA)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10303629

大西 智和 (OHNISHI TOMOKAZU)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：30244247

(2008 年度～2009 年度)

柿元 協子 (KAKIMOTO KYOKO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40274049