

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791048
 研究課題名（和文）BMP シグナル伝達系へのカテコラミンの促進効果（運動による骨形成促進メカニズム）
 研究課題名（英文）Catecholamines accelerate BMP signaling; the exercise enhance bone formation
 研究代表者 橋本 祐介 (Hashimoto Yusuke)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：10382178

研究成果の概要（和文）：

運動によって分泌亢進するカテコラミンと骨形成蛋白（Bone morphogenetic protein; BMP）の関係を *in vivo*, *in vitro* で検索した。マウスの異所性骨誘導実験では、BMP 単独含有群と比較してカテコラミンを BMP と含有した群すべてにおいて異所性骨の骨量増大を認めた。また、骨髄由来間葉系細胞（ST2）では、BMP 単独投与群と比較して BMP にエピネフリンを共投与することで有意に骨芽細胞分化マーカーが上昇した。カテコラミンは BMP の骨誘導作用を増強し、生体内カテコラミン分泌と BMP による骨形成反応との相互作用の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Topical effects of a catecholamine on bone morphogenetic protein (BMP)-induced ectopic bone formation were investigated in both *in vivo* and *in vitro* experimental systems. The mass of ossicles ectopically induced by BMP-2 was increased by the addition of catecholamine into a biodegradable BMP-2 carrier, in a dose-dependent manner. The expression level of alkaline phosphatase (ALP) in ST2 cells was consistently elevated by BMP-2 and was further elevated by the addition of catecholamine. Catecholamines might play a part in the regulation of bone metabolism in exercise and sports activities through elevation of the plasma level of catecholamine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研ひの分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨形成蛋白 (Bone morphogenetic protein; BMP)、運動、カテコラミン

1. 研究開始当初の背景

運動が骨量と骨の強度の維持に重要であることは広く認められている。その作用メカニズムについては、力学的負荷による骨細胞ネットワークの歪みや骨細胞周囲の組織液の流れによる物理的刺激として感知され、骨芽細胞の機能亢進となって骨形成が亢進すると仮想されている。特に運動による骨量増加効果は学童期、思春期で明確であるとされる。しかし現時点ではその機序は明らかではない。

一方、運動後の身体的変化として、血中乳酸値の上昇とともに、カテコラミン値(エピネフリン、ノルエピネフリン)上昇が報告されている。この運動後のカテコラミン上昇は思春期に顕著で、瞬発力を求められる競技者で顕著であるとの報告が多い。しかし、この運動後の内分泌的变化による骨形成促進への効果については報告が少ない。

骨芽細胞にはアドレナリン受容体 (α 受容体、 β 受容体) のうち、特に β 受容体が発現している。 β 受容体にリガンド (エピネフリン、ノルエピネフリン) が結合すると Gs 蛋白を介して adenylylate cyclase が活性化され cyclic AMP の合成、さらには protein kinase A(PKA)が活性化され、CREB(cAMP response element binding protein)のリン酸化により標的遺伝子上の CRE(cAMP response element)に結合して遺伝子発現を調節するとされている。ここで、われわれは R-Smads(Smad 1,5,8)と Co-Smad (Smad4)

による BMP の細胞内シグナル伝達系で BMP の初期応答遺伝子 (*Id1*, BMP-6) の promotor 領域の Smads 複合体結合部位 (BMP responsive element, BRE) 近くに CRE 配列が存在し、cAMP/PKA/CREB/CRE 配列を介した BMP 転写活性の増幅に作用していることを明らかにした。

この事実から、運動によって分泌亢進したカテコラミンがアドレナリン受容体を介して BMP のシグナル伝達を促進することで骨形成を促進し、結果として運動による骨形成を高めている可能性がある。最近、血中に BMP およびその拮抗物質である noggin が一定濃度で存在していることが明らかとなっている。しかし、それら活性蛋白の骨代謝における意義については不明である。カテコラミンやそれらの活性蛋白の全身の骨形成制御への関与を運動との関連で明らかにすることができれば、その意義の一端を明らかにできると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、運動によって分泌亢進したカテコラミンと BMP の関係を検索し、BMP 骨誘導作用に対するカテコラミンの増強効果の有無について、*in vitro*、*in vitro* で明らかにすることである。

3. 研究の方法

In vivo では、マウス異所性骨誘導実験モ

デルを用いて、担体としての徐放性ポリマー; 30mg(PLA-DX-PEG polymer: polylactic acid-polyethylene block co-polymer)に各種カテコラミン (エピネフリン、ノルエピネフリン、ドパミン) ; 10,20,40 μ g と rh-BMP2; 5 μ g を混合含有させ、マウスの背筋筋膜下に埋植した。3週間後に産生される異所性骨の X 線撮影、骨量測定を行い、コントロール群 (rh-BMP2 のみ 5 μ g 含有群) と比較検討を行った。

In vitro では、骨髄由来間葉系細胞(ST2)を用いてエピネフリン; 10⁻⁸M を rh-BMP2; 50ng/ml と共投与し、骨芽細胞分化マーカーを測定した。骨芽細胞分化マーカーとしては、ALP 活性 (投与 3 日後) を、及び real time RT-PCR によって、ALP (投与 3 日後)、Osteocalcin (投与 6 日後)、Osterix (投与 3 日後) の mRNA 発現量を評価した。転写調節については BMP 応答領域及び cAMP 応答領域を含んだ Id-1 gene promoter を用いた Reporter Assay (投与 24 時間後) で評価した。

4. 研究成果

マウスの背筋筋膜下に新生した異所性骨の Bone mineral content (BMC) は、各々のカテコラミンを BMP と含有した群すべてにおいて、コントロール群 (rh-BMP2 単独 5 μ g 含有群) と比較して用量依存性に有意な増大が認められた (図 1)。エピネフリンでは最大 3.5 倍、ノルエピネフリンでは最大 2.5 倍、ドパミンでは最大 3 倍に BMC の増大が認められた。

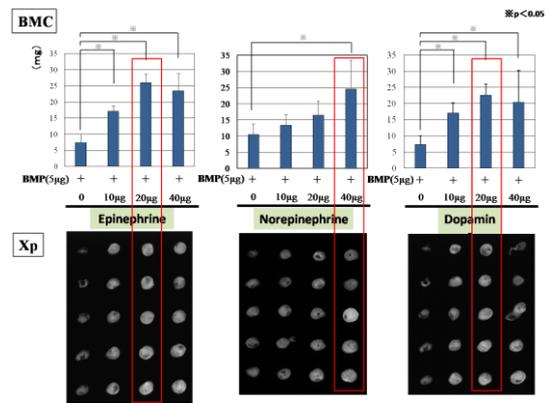


図 1

また異所性骨の軟 X 線撮影結果でも同様に、各々のカテコラミンを BMP と複合した群すべてにおいて、コントロール群と比較して容量依存性に異所性骨のサイズの増大を認めた。*In vivo* において、カテコラミンは BMP による骨形成促進作用を増強した。

ST2 細胞を用いた *In vitro* では、BMP にエピネフリンを共投与することによって、コントロール群 (BMP 単独投与群) と比較して有意に ALP 活性が上昇した (図 2)。

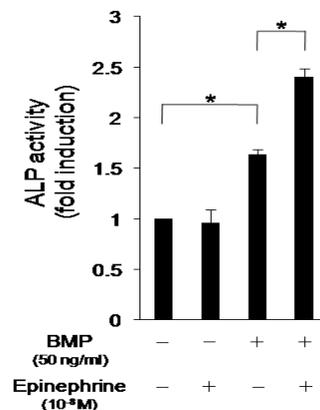


図 2

Real time RT-PCR の結果、コントロール群で発現が増強された ALP (投与 3 日後)、Osteocalcin (投与 6 日後)、Osterix (投与 3 日後) の mRNA 発現は、BMP にエピネフリンを共投与した群において、すべて有意に発現亢進を認めた (図 3)。

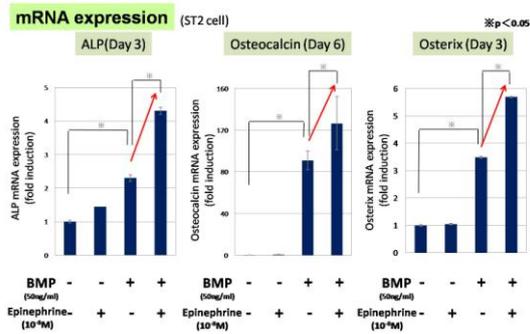


図 3

Id-1 reporter assay では、BMP にエピネフリンを共投与した群において、コントロール群と比較して有意に増強効果を認めた (図 4)。

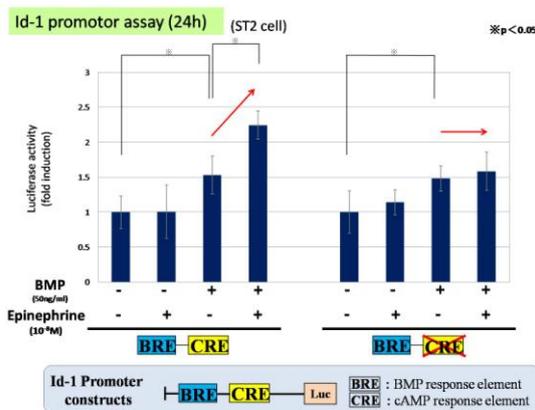


図 4

In vitro において、エピネフリンは、BMP の骨芽細胞分化促進作用を増強し、その増強作用は、PKA/cAMP 系を介していることが分かった。

骨形成において、生体内のカテコラミン分泌・体内循環動態と、BMP による骨形成反応との相互作用の存在が示唆された。

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 9 件)

1. Eguchi Y, Wakitani S, Imai Y, Naka Y, Hashimoto Y, Nakamura H, Takaoka K. J Bone Miner Metab. 2010;28(2):157-64.

Antitumor necrotic factor agent promotes BMP-2-induced ectopic bone formation. 査読有

2. Wakitani S, Okabe T, Kawaguchi A, Nawata M, Hashimoto Y. Rheumatology (Oxford). 2010;49(1):57-62. Highly sensitive ELISA for determining serum keratan sulphate levels in the diagnosis of OA. 査読有

3. Iwakiri K, Minoda Y, Kobayashi A, Sugama R, Iwaki H, Inori F, Hashimoto Y, Ohashi H, Ohta Y, Fukunaga K, Takaoka K. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009

27;91B(2):799-804. In vivo comparison of wear particles between highly crosslinked polyethylene and conventional polyethylene in the same design of total knee arthroplasties. 査読有

4. Fukunaga K, Kobayashi A, Minoda Y, Iwaki Y, Hashimoto Y, Takaoka K. J Bone Joint Surg Br2009; 91-B: 463-8. The incidence of the patellar clunk syndrome in a recently designed mobile-bearing posteriorly stabilised total knee replacement. 査読有

5. Takayama K, Suzuki A, Manaka T, Taguchi S, Hashimoto Y, Imai Y, Wakitani S, Takaoka K. J Bone Miner Metab.2009;27(4):402-11.

RNA interference for noggin enhances the biological activity of bone morphogenetic proteins in vivo and in vitro. 査読有

6. Hoshino M, Egi T, Terai H, Namikawa T, Kato M, Hashimoto Y, Takaoka K. J Biomed

Mater Res A. 2009;90(2):514-21. Repair of long intercalated rib defects in dogs using recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and beta-tricalcium phosphate. 査読有

7. Uemura T, Kazuki K, Hashimoto Y, Takaoka K. Clin J Sport Med. 2008

18(3):292-4 Skiing-induced rupture of the extensor pollicis longus tendon: a report of three cases. 査読有

8. Nomura-Furuwatari C, Wakitani S, Hashimoto Y, Imai Y, Ohta Y, Nakagawa K, Nakao Y, Takayama K, Manaka T, Takaoka K. J Bone Miner Metab 2008 26:152-158.

Expression profiles of phosphodiesterase 4D splicing variants in osteoblastic cells. 査読有

9. Hashimoto Y, Yoshida G, Tomihara T, Matsuura T, Satake S, Kaneda K, Shimada N. Arch Orthop Trauma Surg. 2008

128(11):1265-8. Bilateral osteochondritis dissecans of the lateral femoral condyle following bilateral total removal of lateral discoid meniscus: a case report. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Hashimoto Y, Tomihara H, Yamazaki S, Takigami J, Nishikino S, Takaoka K. 7th biennial ISAKOS congress Anatomical and Computed Tomographic analysis of Femoral Attachment of Anterior Cruciate Ligament. 2009 年 4 月 5 日

2. Nishikino S, Hashimoto Y, Hara Y, Minoda Y, Iwaki H, Nakamura H. The 55th ORS Anatomical and Computed Tomographic analysis of the Femoral Attachment of the Posterior Cruciate Ligament. 2009 年 2 月 22 日

3. Naka Y, Hashimoto Y, Takaoka K. The 55th ORS 2009 Meniscus reconstruction by a tendon autograft with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a rabbit model. 2009 年 2 月 22 日

4. Hashimoto Y, Naka Y, Fukunaga K, Takaoka K. The 55th ORS 2009 Generation of

Bone-Tendon-Bone graft using rhBMP and application to the ACL Reconstruction. 2009 年 2 月 22 日

5. Hashimoto Y, Tomihara T, Yano K, Iwaki H, Takaoka K. The 54th ORS 2008 Anatomical and Computed Tomographic analysis of Femoral Attachment of Anterior Cruciate Ligament. 2008 年 3 月 2 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 祐介 (Hashimoto Yusuke)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：10382178

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

大田 陽一 (Ohta Yoichi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・前期
研究医

上村 卓也 (Uemura Takuya)

大阪市立大学・大学院医学研究科・大学
院生