

平成22年 6月 1日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20791434
 研究課題名（和文）：骨芽細胞の分化およびメカニカルストレス応答性におけるAMPKの機能的役割

研究課題名（英文）：Roles of AMPK in Osteogenic Differentiation

研究代表者

葛西 貴行 (KASAI TAKAYUKI)
 鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員
 研究者番号：30457650

研究成果の概要（和文）：

メカニカルストレスに応答性を示した AMP-activated protein kinase(AMPK)は、骨芽細胞分化過程においてリン酸化の低下が見られた。AMPK 持続的リン酸化効果をもつ metformin 刺激および活性化型 AMPK 発現誘導により、骨芽細胞による基質石灰化は抑制された。Metformin 刺激は Runx2 遺伝子発現および骨芽細胞分化マーカー発現を抑制した。これらより、AMPK の Runx2 を介した骨芽細胞分化シグナル伝達経路への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：AMP-activated protein kinase(AMPK) is a kinase responds to mechanical stress. Phosphorylation of AMPK α was significantly decreased during osteoblastic differentiation in both primary osteoblasts and MC3T3-E1, a mouse osteoblastic cell line. Conversely, the terminal differentiation of primary osteoblasts and MC3T3-E1 cells, represented by matrix mineralization, was significantly inhibited by stimulation with metformin, an activator of AMPK. Matrix mineralization of MC3T3-E1 cells was also inhibited by the forced expression of a constitutively active form of AMPK α . Metformin significantly inhibited gene expression of Runx2 along with osteoblast differentiation markers including *osteocalcin (Ocn)*, *bone sialo protein (Bsp)*, and *osteopontin (Opn)*. Thus, our present data indicate that differentiation of osteoblasts is functionally associated with decreased AMPK activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度			
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：AMPK、骨芽細胞、メカニカルストレス、シグナル伝達、エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

メカニカルストレス (MS) を負荷すると骨量が増加することは良く知られているが、これには骨芽細胞の分化および活性化を伴う。

MS の一つである低周波超音波 (Low intensity pulsed ultrasound: LIPUS) 刺激は、骨折の治癒を促進させることが知られており、臨床で広く利用されている。LIPUS 刺激受容から骨形成に至るまでのメカニズムについては不明な点が多いが、マウス骨芽細胞株を使った予備実験において、AMP-activated kinase (AMPK) β サブユニットの遺伝子発現量が LIPUS 刺激により著明に増加する所見が得られた。

AMPK は、ほとんどの細胞腫に $\alpha \beta \gamma$ のヘテロ 3 量体として存在するキナーゼであり、細胞がエネルギー不足に陥った際にリン酸化を受けることにより活性化され、糖および脂質代謝を促進し、エネルギー産生を高める働きを持つことが知られている。しかし、AMPK の骨代謝における機能についてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

MS 負荷による骨芽細胞の応答性を明らかにするために、in vitro における MS による AMPK 遺伝子の誘導が骨芽細胞の機能に及ぼす影響を解析することである。特に AMPK と骨芽細胞分化との関係に注目し、AMPK 活性化剤などによって骨細胞への分化過程を調節できる可能性についても検討を加える。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞における MS 応答性遺伝子の新規同定

MS 応答性を有するマウス骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞から mRNA を精製し、DNA チップを利用した解析で、MS 反応性に発現が増加もしくは減少する遺伝子群を網羅的に同定した。

(2) 骨芽細胞における MS 応答性遺伝子; AMPK の機能・意義検索

① 骨芽細胞分化過程における AMPK 発現およびリン酸化の解析

MC3T3-E1 細胞およびマウス頭頂骨由来の初代培養骨芽細胞 (以下初代骨芽細胞) をアスコルビン酸含有分化培地で 1~4 週間培養し、骨細胞様細胞へ分化させた後タンパクを回収し、AMPK 各サブユニットタンパクの発現レベル、および AMPK リン酸化レベルの変化をウェスタンブロッティング法により確認した。

② AMPK 特異的活性化剤 metformin が骨芽細胞分化に及ぼす影響の解析

MC3T3-E1 細胞および初代培養骨芽細胞に、AMPK の特異的活性化剤 metformin (0, 0.1, 0.5, 2 mM) を作用させ、基質石灰化レベルをアリザリンレッド染色にて、骨分化マーカー (オステオカルシン, 骨シアロタンパク, オステオポンチン) および Runx2 遺伝子発現をノーザンブロッティング法にて解析した。さらにアルカリフォスファターゼ活性の解析も行った。

③ 恒常的活性型 AMPK 発現誘導が骨芽細胞分化に及ぼす影響

マウス AMPK α の第 183 塩基配列であるスレオニンをアスパラギン酸に変異させた AMPK は、恒常的に活性型である。この恒常的活性型 AMPK をドキシサイクリン添加により発現誘導する Tet-on inducible system を用い、基質石灰化に及ぼす影響をアリザリンレッド染色にて解析した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞における MS 応答性遺伝子の新規同定

MC3T3-E1 細胞において、LIPUS 刺激反応性に発現レベルが 2 倍以上増加した遺伝子群を同定した。これらの内、骨代謝との関わりが分かっていない遺伝子の一つである AMPK を選択した。

(2) 骨芽細胞分化過程における AMPK 発現およびリン酸化の変化

初代骨芽細胞, MC3T3-E1 細胞いずれの分化過程においても、AMPK α サブユニットの発現レベルに変化はなかったが、AMPK リン酸化レベルには低下が見られた。(図 1. MC3T3-E1 細胞)

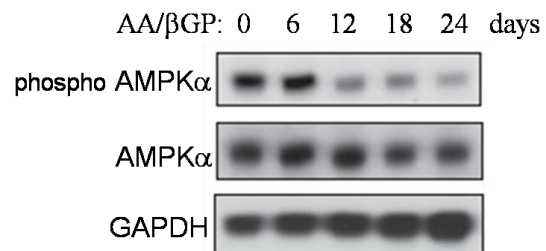


図 1. MC3T3-E1 細胞における AMPK α 発現およびリン酸化レベルの変化

(3) AMPK 活性化剤 metformin の骨芽細胞分化へ及ぼす影響

①MC3T3-E1 細胞および初代培養骨芽細胞において、metformin(0, 0.1, 0.5, 2 mM)を添加培養した際の AMPK リン酸化レベルをウェスタンブロッティング法により確認したところ、2mM metformin 添加においてのみ持続的な AMPK リン酸化効果が見られた。(データ省略) 基質石灰化レベルをアリザリンレッド染色にて確認した結果、持続的 AMPK リン酸化効果のあった 2mM metformin 添加培養において著大な基質石灰化の抑制が見られた。(図 2)

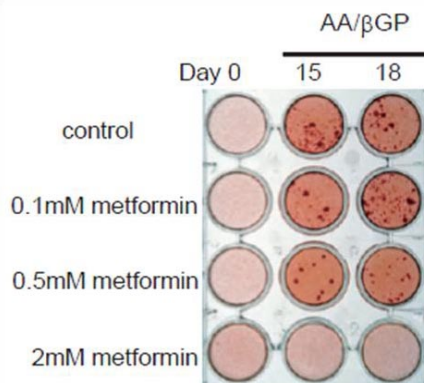


図 2. Metformin による基質石灰化への影響 (MC3T3-E1 細胞)

②2mM metformin 添加培養により、オステオカルシンや骨シアロタンパク、オステオポンチン等の骨分化マーカー発現レベルは低下し、さらに、これら骨分化マーカーの発現を調節する転写因子である Runx2 遺伝子の発現レベルも有意に抑制した。(図 3)

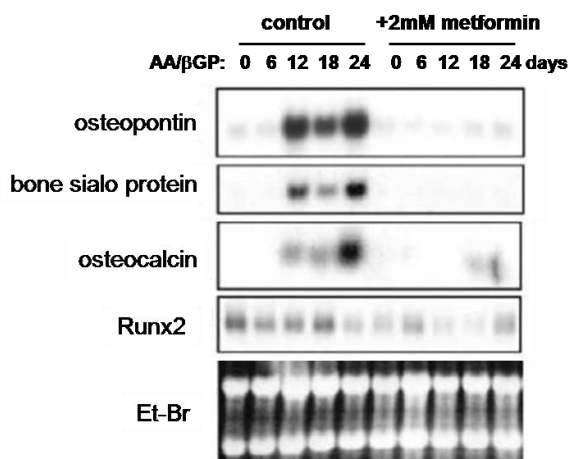


図 3. Metformin による骨分化マーカーおよび Runx2 発現への影響 (MC3T3-E1 細胞)

③2mM metformin 添加培養により、アルカリフォスファターゼ活性は抑制した。(図 4)

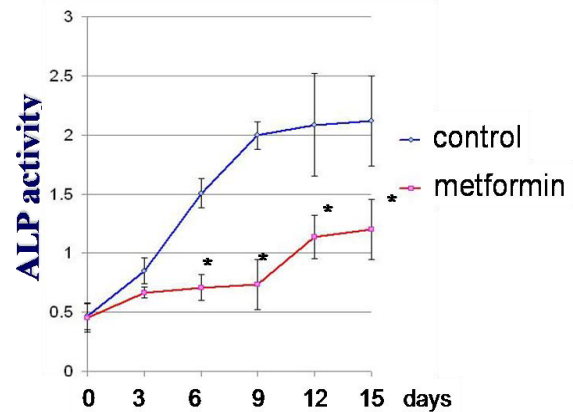


図 4. Metformin によるアルカリフォスファターゼ活性への影響 (MC3T3-E1 細胞)

(3) Tet-on inducible system を使い、ドキシサイクリンにより恒常的活性型 AMPK 発現誘導を行ったところ、骨芽細胞による基質石灰化は有意に抑制された。(図 5)

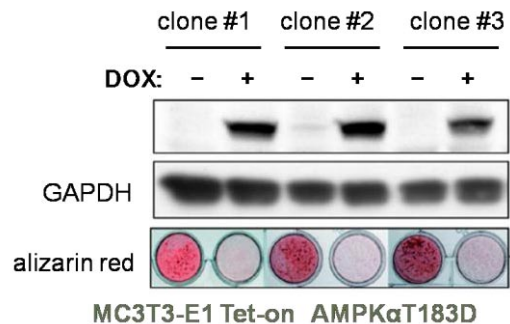


図 5. 恒常的活性型 AMPK 発現誘導が基質石灰化へ及ぼす影響 (MC3T3-E1 細胞)

骨芽細胞における AMPK の機能についての報告は少なく、不明な点が多い。今回、LIPUS 刺激に対する骨芽細胞の応答性の研究を行うにあたり、LIPUS 刺激により遺伝子発現レベルに変化のみられた AMPK に着目し、初段階として骨芽細胞分化における AMPK の役割について解析した。

図 1～図 5 の結果より、in vitro における骨芽細胞分化過程において AMPK のリン酸化レベルで示す活性は低下するが、活性レベルを持続させると Runx2 の発現レベルが低下し、骨芽細胞の分化に抑制的に働く所見が得ら

れた。

これらより、生理的な AMPK 活性の低下は骨芽細胞の分化を誘導する一つの要因であり、そのシグナルには Runx2 の発現誘導が関わりを持つ可能性が考えられた。

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 1 件)

Kasai T, Bandow K, Suzuki H, Chiba N, Kakimoto K, Ohnishi T, Kawamoto S, Nagaoka E, Matsuguchi T

Osteoblast differentiation is functionally associated with decreased AMP kinase activity
Journal of Cellular Physiology, 2009
Dec;221(3):740-749. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

- ① 「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」 2009. 9. 9-11 新潟 第 51 回歯科基礎医学会
- ② 「Roles of AMPK in Osteogenic Differentiation」 2008. 11. 29-30 名古屋 56th JADR
- ③ 「骨芽細胞における細胞内エネルギーセンサーAMPKの機能的役割」 2008. 9. 25 鹿児島 第 10 回鹿児島骨代謝研究会

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛西 貴行 (KASAI TAKAYUKI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員
研究者番号：30457650