

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890249

研究課題名（和文） 活性酸素による破骨細胞制御の分子機構の解明

研究課題名（英文） To elucidate the mechanisms of reactive oxygen species regulates osteoclastogenesis.

研究代表者

近藤 久貴（KONDO HISATAKA）

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：40469002

研究成果の概要（和文）：アドレナリンβ作動薬は骨芽細胞のβ受容体を刺激し、間接的に破骨細胞分化を促進することが知られているが、β作動薬が直接破骨細胞に働きその分化を制御しているか否か未だ明らかではない。そこで本研究ではβ作動薬が破骨細胞を直接制御しているか検討を行ったところ、交感神経が活性酸素種(Reactive oxygen species：ROS)を誘導し、破骨細胞分化を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The beta-adrenergic agonist stimulate osteoclast differentiation through the beta-adrenergic receptor on osteoblast. We tested whether the beta-adrenergic agonist regulate osteoclast differentiation directly or not. We suggested sympathetic nervous system regulate osteoclast differentiation through reactive oxygen species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,140,000	342,000	1,482,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,340,000	702,000	3,042,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系基礎薬理学

キーワード：シグナル伝達、生体分子、遺伝子、ストレス、（活性酸素種、破骨細胞）

1. 研究開始当初の背景

（1）活性酸素種；ROS(Reactive oxygen species)は癌や生活習慣病、老化、炎症、アレルギー等、様々な病気の原因として注目されているが、近年骨粗鬆症の原因因子としても可能性が示唆された(Koh, et al. Journal of Bone and Mineral Research, 2006)。そして申請者はこれまでに放射線により増加

した ROS が破骨細胞を誘導することにより、骨量を減少させる可能性を示唆している。

（2）ASK1 (Apoptosis-signal regulating kinase 1) は ROS により活性化されアポトーシスシグナルを伝達する分子として一俵らにより報告された (Ichijo, et al. Science, 1997) が、βアドレナリン刺激により誘導さ

れた ROS によっても活性化することが報告されている (Fan, et al. Circulation Research, 2006)。また β アドレナリン作動薬が破骨細胞を活性化することが報告されている (Elefteriou, et al. Nature, 2005) が、ASK1 が破骨細胞制御のシグナル伝達に関与するか否か未だ明らかではない。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、 β アドレナリン作動薬が破骨細胞形成を直接制御するか検討することである。

(2) β アドレナリン作動薬等により誘導された ROS 感受性のシグナル伝達物質である ASK1 が破骨細胞分化を制御するか否かを検討することである。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* での β アドレナリン作動による破骨細胞への影響の検討。

①破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞を 2.5×10^3 cells/cm² の濃度でガラスボトムディッシュに播き、10% FBS, RANKL (50 ng/ml) 含有の α メディウムにて成熟破骨細胞に分化させ、 β 作動薬であるイソプレナリンを投与し、蛍光色素 CM-H2DCFDA を用い細胞内 ROS を測定した。さらに破骨細胞数を (酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase: TRAP)) 染色を行い計測した。さらにリアルタイム PCR にて発現遺伝子の解析を行った。

②野生型マウスおよび ASK1 欠損マウスの骨髓細胞を 1.5×10^5 cells/cm² の濃度でプレートに播き用い、破骨細胞形成実験。

(2) *in vitro* の実験系から得られた結果の *in vivo* での確認。

①C57BL/6J マウスに浸透圧ポンプにて生食もしくは、イソプレナリンを 5, 25, 50, 100 μ g/g/day の濃度で 2 週間、持続投与を行い、3 次元 CT による骨構造解析および、骨組織切片による組織解析を行った。さらに骨における酸化ストレスの指標である過酸化脂質の定量をおこなった。

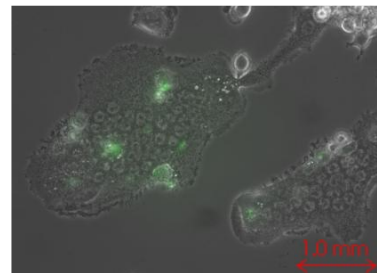
②C57BL/6J マウスに 2 週間の抗酸化剤 α リポ酸の投与、非投与において、 β アドレナリン作動薬投与による骨量の減少にどのような変化が見られるか検討を行った。3 次元 CT による骨構造解析および、骨組織切片による組織解析を行った。

②野生型および ASK1 欠損マウスに 2 週間の β アドレナリン作動薬投与を行った。その後 3 次元 CT による骨構造解析および、骨組織切片による組織解析を行った。

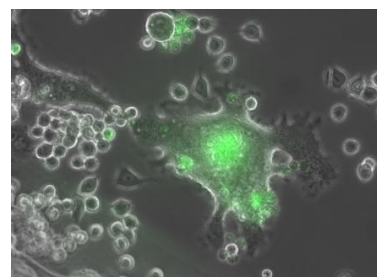
4. 研究成果

① β 作動薬であるイソプレナリン 1μ M を破骨細胞前駆細胞に作用させることにより ROS 産生が増加し (図 1 AB)、 β 拮抗薬であるプロプラノロール処理は ROS の増加を抑制した (図 1C)。イソプレナリン濃度依存的に破骨細胞の分化マーカーである NFATc1 mRNA を有意に増加させ、RANKL (50 ng/ml) により誘導される破骨細胞 (酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase: TRAP) 陽性多核細胞) 形成を促進させた (図 2ABCD)。抗酸化剤である α リポ酸、プロプラノロールは NFATc1 mRNA の発現および破骨細胞形成を抑制した。

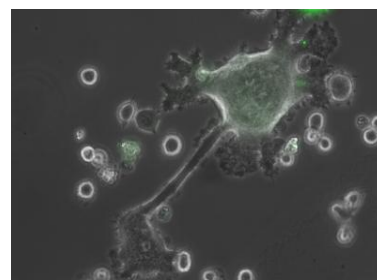
図 1 ABC. イソプレナリンに誘導された ROS 産生の増加がプロプラノロールによりブロックされた。



A. ISO (0 μ M)

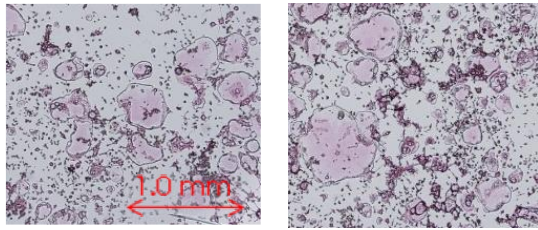


B. ISO (1 μ M)

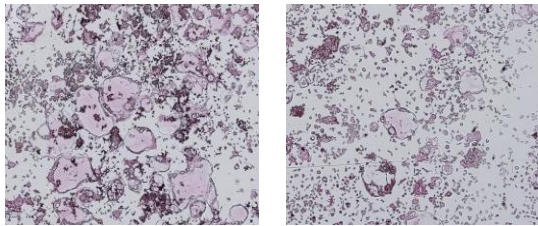


C. ISO (1 μ M) + PRO (10 μ M)

図2 ABCD. イソプレナリンに誘導されたROS産生の増加がプロプラノロールによりブロックされた。



A. ISO (0 μM) B. ISO (1 μM)



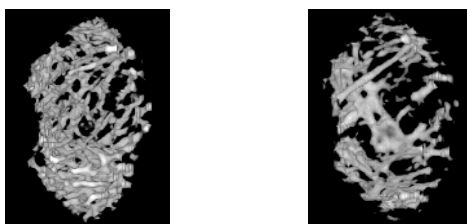
C. ISO (10 μM) D. ISO (1 μM) + PRO (5 μM)

②野生型マウスおよび ASK1 欠損マウスの骨髄細胞はどちらも正常に破骨細胞を形成し、アポトーシスにより減少した。

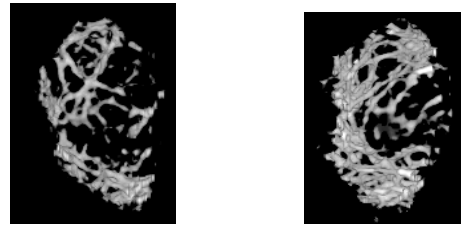
(2) *in vitro*の実験系から得られた結果を *in vivo*で確認した。すなわちβアドレナリン作動薬がROSを介して破骨細胞分化を制御するか否か *in vivo*で検討を行った。

①βアドレナリン作動薬投与 (5, 25, 50, 100 μg/g /day) によりすべての濃度で脛骨海面骨の骨量が低下 (図3 ABCDE) し、さらに組織学的検討により、イソプレナリン投与により破骨細胞数、破骨細胞面積の増加をもたらした (図4 ABCDE)。さらに動的組織形態学的計測ではイソプレナリン投与が骨形成の動的パラメータを減少させることが明らかとなった。さらにイソプレナリン投与は、骨における酸化ストレスの指標である過酸化脂質の量を増加させた

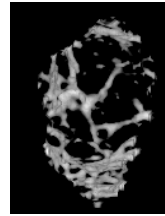
図3 ABCDE. イソプレナリン5, 25, 50, 100 μg/g/dayを2週間腹腔内投与することにより骨量が減少した。



A. Ctrl B. 5 μg/day

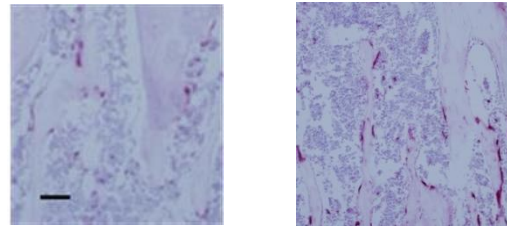


C. 25 μg/day D. 50 μg/day

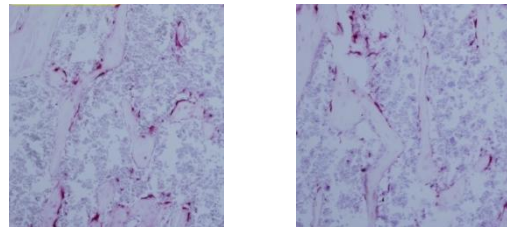


E. 100 μg/day

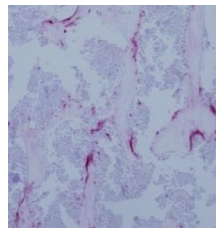
図4 ABCDE. イソプレナリン5, 25, 50, 100 μg/g/dayを2週間腹腔内投与することにより破骨細胞数が増加した。*Barは100 μm



A. Ctrl B. 5 μg/day



C. 25 μg/day D. 50 μg/day



E. 100 μg/day

②抗酸化作用のあるαリポ酸の投与によりイソプロテノール投与による破骨細胞形成の増加が抑制され、イソプロテノール投与による骨量の減少も認められなかった。以上の結果からβ作動薬が破骨細胞でROSの産生を増加させることにより *in vivo*で破骨細胞形成を促進させる可能性が示唆された。

③ASK1欠損動物ではβ作動薬による破骨細胞形成が抑制される傾向が認められた。βアドレナリン作動薬がROSを介して破骨細胞分化を制御する際、ROS感受性のシグナル伝達物質であるASK1が関与する可能性を示唆した。

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3件)

- ① Kondo Hisataka, Searby Nancy, Mojarrab Rose, Phillips Jonathan, Alwood Josh, Yumoto Kenji, Almeida Eduardo, Limoli Charles, Globus Ruth, Total-body irradiation of postpubertal mice with (137)Cs acutely compromises the microarchitecture of cancellous bone and increases osteoclasts, Radiat Res, 171(3), 2009, 283-289、査読有
- ② 近藤久貴 戸苺彰史 交感神経活動は Reactive oxygen species (ROS)を介し破骨細胞分化を促進する、口腔組織培養学会誌 19(1), 2009, 47-48、査読無
- ③ Kondo Hisataka, Yumoto Kenji, Alwood Josh, Mojarrab Rose, Wang Angela, Almeida Eduardo, Searby Nancy, Limoli Charles L, Globus Ruth. Oxidative stress and gamma radiation-induced cancellous bone loss with musculoskeletal disuse, J Appl Physiol. 108(1)、2010、152-161、査読有

[学会発表] (計3件)

- ① Kondo Hisataka、Togari Akifumi、Domaratskaya Elena、Grigoryan Elenora、Globus Ruth、Searby Nancy、Dvorochkin Natalya、Almeida Eduardo、The effects of spaceflight on gamma radiosensitivity of bone and cartilage tissues、Life in space for life on earth、2008年6月15日、Angars (France)
- ② 近藤久貴、戸苺彰史、交感神経は活性酸素種を介し破骨細胞分化を促進する、第27回日本骨代謝学会、2009年7月23日、大阪国際会議場 (大阪)
- ③ 近藤久貴、戸苺彰史、交感神経活動は Reactive oxygen species (ROS)を介し破骨細胞分化を促進する、第46回口腔組織培養学会、2009年12月5日、昭和大学 (東京)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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

近藤 久貴 (KONDO HISATAKA)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：40469002