

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592513

研究課題名（和文） 顎骨再生に向けた PTH と COX-2 の骨形成相互の解明

研究課題名（英文） The elucidation of the between PTH and COX-2 in bone reconstruction

研究代表者

近津 大地（CHIKAZU DAICHI）

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：30343122

研究成果の概要（和文）：PTH の骨形成促進作用メカニズムを明らかとする目的で、PTH の骨形成促進作用が認められる骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞および MC-4 細胞培養系を用いて PTH シグナルの下流にある転写因子 COX-2 の解析を行った。具体的には、MC3T3-E1 細胞および MC-4 細胞培養系に COX-2 のプロモーター領域の様々な binding site COX-2 DNA mutation を強制発現させ、PTH によるルシフェラーゼ活性を測定することにより、PTH による COX-2 誘導に必須の potential cis-acting site を検索した。また、mRNA、タンパクレベルでの解析を Real-time (Quantitative) PCR および Western blot で検討した。更に、PTH 刺激を加えた MC3T3-E1 細胞および MC-4 細胞培養系から核タンパクを抽出してゲルシフトアッセイを行い、PTH による COX-2 誘導の potential cis-acting site を検討した。その結果、骨芽細胞様細胞株において PTH による COX-2 の発現誘導には、calcium-calcineurin-NFAT signaling pathway が重要であることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Murine MC3T3-E1 and MC-4 cells were stably transfected with -371/+70 bp of the murine cyclooxygenase-2 (COX-2) promoter fused to a luciferase reporter (Pluc371) or with Pluc371 carrying site-directed mutations. Mutations were made in (1) the cAMP response element (CRE) at -57/-52 bp, (2) the activating protein-1 (AP-1)-binding site at -69/-63 bp, (3) the nuclear factor of activated T-cells (NFAT)-binding site at -77/-73 bp, and (4) both the AP-1 and NFAT sites, which comprise a composite consensus sequence for NFAT/AP-1. Single mutation of CRE, AP-1, or NFAT sites decreased parathyroid hormone (PTH)-stimulated COX-2 promoter activity 40% to 60%, whereas joint mutation of NFAT and AP-1 abrogated the induction. On electrophoretic mobility shift analysis, PTH stimulated binding of phosphorylated CREB to an oligonucleotide spanning the CRE and binding of NFATc1, c-Fos, and c-Jun to an oligonucleotide spanning the NFAT/AP-1 composite site. Mutation of the NFAT site was less effective than mutation of the AP-1 site in competing binding to the composite element, suggesting that cooperative interactions of NFATc1 and AP-1 are more dependent on NFAT than on AP-1. Both PTH and forskolin, an activator of adenylyl cyclase, stimulated NFATc1 nuclear translocation. PTH- and forskolin-stimulated COX-2 promoter activity was inhibited 56% to 80% by calcium chelation or calcineurin inhibitors and 60% to 98% by protein kinase A (PKA) inhibitors. These results indicate an important role for the calcium-calcineurin-NFAT signaling pathway in the PTH induction of COX-2 and suggest that cross-talk between the cAMP/PKA pathway and the calcium-calcineurin-NFAT pathway may play a role in other functions of PTH in osteoblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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・外科系歯学

キーワード：PTH、COX-2

1. 研究開始当初の背景

近年、PTH には強力な骨形成促進作用があることが明らかとなり、米国ではヒト組み換え PTH(1-34)が初めての骨形成促進剤としてFDAの承認を得て、既に臨床の現場で用いられている。また、その全身投与が骨折治癒促進効果を持つことが動物実験で複数の施設から報告されている。しかしながら、このPTHの薬理効果の分子メカニズムは、現状では殆ど解明されていない。そのため、米国では重症な骨粗鬆症の患者に対して2年間の投与に限るという条件付きで使用が認められてはいるものの、日本ではまだ臨床応用には至っていない。そうした状況を鑑みると、PTHの日本での臨床応用を可能にするためには、その詳細な作用メカニズムの解明が必要である。その一方、骨代謝において重要な mediator であるプロスタグランジン (prostaglandin; PG) は、constitutive enzyme のシクロオキシゲナーゼ1(cyclooxygenase-1; COX-1)と cytokine や hormone などの刺激により誘導される inducible enzyme の COX-2 が存在する。COX-2 ノックアウトマウスを用いた in vitro および in vivo の実験系で、PTH 刺激による破骨細胞形成は、ノックアウトマウス骨髄培養において野生型マウスよりも70%低下し、この破骨細胞形成の低下はPGE2投与によって消失すること、PTHの頭蓋骨への3日間投与により野生型マウスでは高Ca血症をきたしたが、ノックアウトマウスでは血清Ca上昇が認められなかったことなどから、PTH投与による骨代謝回転がCOX-2を介していることが示唆されて

いる (Okada *et al.* J UOEH, 2003)。また、骨折治癒やインプラント埋入後のオッセオインテグレーションといった骨形成において、COX-2が不可欠であることが報告されている (Simon *et al.* JBMR, 2002; Chikazu *et al.* IJOMS, 2007)。PTHの骨組織に対する多彩な作用は、COX-2を介するシグナルによって調節されている可能性が高い。しかしながら、COX-2を介したシグナルによる骨形成作用は十分検討されていない。

2. 研究の目的

骨系細胞におけるPTHとCOX-2シグナルの検討

3. 研究の方法

PTHの骨形成促進作用メカニズムを明らかにする目的で、PTHの骨形成促進作用が認められる骨髄由来間葉系細胞や骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1、ST2、MC-4 など) 培養系を用いてPTHシグナルの下流にある転写因子COX-2の解析を行う。具体的には、骨髄由来間葉系細胞や骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1、ST2、MC-4 など) にCOX-2のプロモーター領域 (-371/+70 bp) の様々な binding site (NFAT: -77/-73 bp、AP-1: -68/-63 bp、CRE: -57/-52 bp 等) のCOX-2 DNA mutationを強制発現させ、PTHによるルシフェラーゼ活性を測定することにより、PTHによるCOX-2誘導に必須の potential cis-acting siteを検索する。また、mRNA、タンパクレベルで、その骨芽細胞分化、および破骨細胞形成支持能に差が現れるかをReal time PCR、Western blotで検討する。更に、PTH刺激を加えた骨

その結果、骨芽細胞様細胞株において PTH による COX-2 の発現誘導には、calcium-calcineurin-NFAT signaling pathway が重要であることが分かった。

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 12 件)

1. Hechang Huang, Daichi Chikazu, Olga S. Voznesensky, Harvey R. Herschman, Barbara E. Kream, Hicham Drissi, and Carol C. Pilbeam. Parathyroid hormone induction of cyclooxygenase-2 in murine osteoblasts: Role of the calcium-calcineurin-NFAT pathway. J Bone Miner Res. 25:819-829, 2009.
2. Mitsuyoshi Iino, Masayuki Fukuda, Hirokazu Nagai, Yoshiki Hamada, Hiroyuki Yamada, Kazutoshi Nakaoka, Yoshiyuki Mori, Daichi Chikazu, Hideto Saijo, Ichiro Seto, Kazumi Ohkubo, and Tsuyoshi Takato. Evaluation of 15 mandibular reconstructions with Dumbach Titan Mesh-System and particulate cancellous bone and marrow harvested from bilateral posterior ilia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 107:e1-8, 2009.
3. Yoshiyuki Mori, Takafumi Susami, Daichi Chikazu, Hideto Saijo, Miyuki Sakiyama, Masako Matsuzaki, Masako Abe, Mamiko Wada, Mitsuyoshi Iino, and Tsuyoshi Takato. Unilateral expansion of a narrow mandibular dental arch combined with bimaxillary osteotomies in a patient with hypoglossia. Int J Oral Maxillofac Surg. 38:689-693, 2009.
4. Toru Ogasawara, Shinsuke Ohba, Yuko Fujihara, Tsuguharu Takahashi, Guangyao Liu, Daichi Chikazu, Hideyuki Suenaga,

- Ung-il Chung, Tetsuya Yoda, Yoshiyuki Mori, Takafumi Susami, Tsuyoshi Takato, and Kazuto Hoshi. Transforming growth factor- β 1 in combination with fibroblast growth factor-2 and insulin-like growth factor-I for chondrocyte proliferation culture and cartilage regenerative medicine. Asian J Oral Maxillofac Surg. 21:18-26, 2009.
5. Hideto Saijo, Kazuyo Igawa, Yuki Kanno, Yoshiyuki Mori, Kayoko Kondo, Koutaro Shimizu, Shigeki Suzuki, Daichi Chikazu, Mitsuyoshi Iino, Masahiro Anzai, Nobuo Sakai, Ung-il Chung, and Tsuyoshi Takato. Maxillofacial reconstruction using custom-made artificial bones fabricated by inkjet printing technology. J Artif Organs. 12:200-205, 2009.
6. Daichi Chikazu, Tetsushi Taguchi, Hiroyuki Koyama, Hisako Hikiji, Hisako Fujihara, Hideyuki Suenaga, Hideto Saijo, Yoshiyuki Mori, Ichiro Seto, Mitsuyoshi Iino, and Tsuyoshi Takato. Improvement in wound healing by a novel synthetic collagen-gel dressing in genetically diabetic mice. Asian J Oral Maxillofac Surg. 2010 Aug;22(2):61-67.
7. Hideto Saijo, Yoshiyuki Mori, Hisako Fujihara, Yuki Kanno, Daichi Chikazu, Kazumi Ohkubo, Hisako Hikiji, Mitsuyoshi Iino, Yoshiyuki Yonehara, and Tsuyoshi Takato. Evaluation and analysis of formation of bone at the palate in patients with cleft lip and palate after palatoplasty based on computed tomograms and three-dimensional data. J Plast Surg Hand Surg. 2010 Feb;44(1):21-25.
8. Hideto Saijo, Yuki Kanno, Yoshiyuki

Mori, Daichi Chikazu, Mitsuyoshi Iino, and Tsuyoshi Takato. A bone harvesting method involving a surgical template prepared using a three-dimensional model. Asian J Oral Maxillofac Surg. 2010 July;22(1):20-22.

9. Yoshiyuki Mori, Toru Ogasawara, Toru Motoi, Yuichiro Shimizu, Daichi Chikazu, Kazumi Tamura, Seiji Fukumoto, and Tsuyoshi Takato. Tumor-induced osteomalacia associated with a maxillofacial tumor producing fibroblast growth factor 23: report of a case and review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Mar;109(3):e57-63.

10. Daichi Chikazu, Yumiko Fujikawa, Hisako Fujihara, Hideyuki Suenaga, Hideto Saijo, Kazumi Ohkubo, Toru Ogasawara, Yoshiyuki Mori, Mitsuyoshi Iino, and Tsuyoshi Takato. Cyclooxygenase-2 activity is important in craniofacial fracture repair. Int J Oral Maxillofac Surg. 2011 Mar;40(3):322-326.

11. Hideto Saijo, Yuki Kanno, Yoshiyuki Mori, Shigeki Suzuki, Kazumi Ohkubo, Daichi Chikazu, Yoshiyuki Yonehara, Ung-il Chung, and Tsuyoshi Takato. A novel method for designing and fabricating custom-made artificial bones. Int J Oral Maxillofac Surg. 2011 Sep;40(9):955-960.

4. 近津大地: 咬合機能の回復-インプラント治療と骨造成について-. 東京医科大学雑誌 69(4): 450-455, 2011.

[学会発表] (計 6 件)

1. Cyclooxygenase-2 Activity is important for Membrane Bone Fracture Healing: Daichi Chikazu, Yumiko Fujikawa, Naoshi Ogata,

Fumiko Yano, Toru Ogasawara, Hideto Saijo, Yoshiyuki Mori, Mitsuyoshi Iino, and Tsuyoshi Takato; 31th ASBMR Annual Meeting; September 11-15, 2009.

2. Regulator of G Protein Signaling (RGS)-2 Enhances Bone Anabolic Action of PTH through Inhibition of Gαq/PKC Pathway in Osteoblasts: Naoshi Ogata, Fumiko Yano, Daichi Chikazu, Ung-il Chung, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi; 31th ASBMR Annual Meeting; September 11-15, 2009.

3. Cyclooxygenase-2 は膜性骨の骨折治癒における key factor である: 近津大地、藤川由美子、末永英之、杉山 円、古賀陽子、阿部雅修、西條英人、森 良之、飯野光喜、高戸 毅; 第 54 回日本口腔外科学会総会; 平成 21 年 10 月 9-11 日

4. 斎藤忠仁、小笠原徹、森 良之、近津大地、阿部雅修、末永英之、白土博司、高戸 毅、米原啓之: 間葉系細胞において Nanog は BMP シグナルを増強する; 第 64 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2010 年 6 月 24-25 日、札幌プリンスホテル国際館パミール、札幌

5. Akira Matsuo, Hayato Hamada, Eriko Tsuji, Ayako Okamoto, Daichi Chikazu, Hiroshi Kaise, and Norio Kohno: Are implants a risk factor for osteonecrosis in intravenous bisphosphonate?: 20th Annual Scientific Meeting European Association for Osseointegration (EAO). 2011. 10. 13-15 (Megaron Congress Center, Athens).

6. 近津大地: 咬合機能の回復-インプラント治療と骨造成について-; 第 167 回医学会総会特別講演; 2011 年 6 月 4 日、東京医科大学、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：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近津大地 (CHIKAZU DAIUCHI)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：30343122

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：