

機関番号：32665

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21792132

研究課題名 (和文) ニコチン刺激後の破骨細胞のシグナル伝達の解明

研究課題名 (英文) Effects of nicotine on the signal transduction in osteoclast precursors

研究代表者

田中 秀樹 (TANAKA HIDEKI)

日本大学・歯学部・専修研究員

研究者番号：90434076

研究成果の概要 (和文)：

破骨細胞前駆細胞はニコチンで刺激により、分化の過程で成熟破骨細胞が骨無機質を溶解する際に必要な酸産生酵素(CA II)の発現を増加させた。また、各種サイトカインおよび PGE₂ の産生を増加した。PGE₂ 産生に不可欠な COX 阻害剤およびニコチンの存在下では酸産生酵素の発現は有意に抑制された。このことからニコチン存在下での無機質溶解性の向上には PGE₂ のオートクリン作用が関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Nicotine induces the expression of CA II, inflammatory cytokines and PGE₂ in osteoclast precursors. In the presence of COX-2 inhibitor, nicotine did not induce CA II expression. These results suggest that PGE₂ play a role in the induction of CA II expression by autocrine manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000 円	270,000 円	1,170,000 円
2010 年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000 円	600,000 円	2,600,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病、ニコチン、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

喫煙は、歯周病における環境面からみた最大のリスクファクターであり、歯周病の発症や進行および治療効果の低下に大きく関与することが指摘されている。しかし、骨代謝の視点から歯周病と喫煙との関連性を

細胞および分子生物学的に詳細に調べた報告はきわめて少なく、とくに骨形成と骨吸収に及ぼすニコチンの影響については不明な点が多い。研究代表者らは、タバコの成分の中で最も含有量の高いニコチンの刺激を受けた骨芽細胞は、自らの骨形成

能を低下させるとともに、破骨細胞形成促進因子の産生を増加させる一方、形成抑制因子の産生を低下させ、歯槽骨代謝のバランスを骨吸収に傾けるのではないかと考え、まず石灰化 nodule 形成と細胞外マトリックスタンパクの発現が、ニコチン刺激により低下することを明らかにした (Tanaka *et al.*, *Life Sci* 77, 2005)。また、ニコチンと LPS が、骨芽細胞による M-CSF と PGE₂ の産生の増加および OPG の産生低下を介して破骨細胞様細胞の形成を促進することを明らかにし、喫煙者の歯槽骨吸収が非喫煙者よりも起こりやすいこと、しかもこの傾向は口腔清掃状態の不良によってさらに高くなることを報告した (Tanaka *et al.*, *Life Sci* 78, 2006)。さらに、ニコチンが骨芽細胞のマトリックス金属プロテアーゼ (MMP)-1, -2, -3, -13 および組織型プラスミノゲンアクチベーター産生を増加させることによって骨基質タンパク代謝を分解系に傾けることを報告した (Katono *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin* 38, 874-882, 2006)。しかし、骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞との細胞間相互作用後の成熟破骨細胞の機能発現に及ぼすニコチンの影響を調べた報告は見当たらない。

2. 研究の目的

RAW264.7 細胞を用いて成熟破骨細胞が骨無機質を溶解する際に必要な酸 (H⁺) 産生酵素、明帯で囲まれた低 pH の閉鎖環境下で骨有機質を分解する際に必要なタンパク分解酵素の発現に及ぼすニコチンの影響を調べた。その結果、酸産生酵素の発現は大きく増加する結果が得られた。しかし、この現象がニコチンの直接作用によって起こるのか、ニコチン刺激によって破骨細胞前駆細胞が産生する炎症性サイトカインや

PGE₂ を介する間接作用が関与しているのかについては不明である。さらに、シグナル伝達の視点から、どのような経路によってこの現象が起きているかを検討するために、本研究を企図した。

3. 研究の方法

RAW264.7 細胞を刺激する際のニコチン濃度は(0, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 5×10⁻⁴または 10⁻³ M)とし、破骨細胞分化に必須である RANKL の濃度は 50ng/ml とする。本実験では RANKL 無刺激、ニコチン単独刺激、RANKL 単独刺激およびニコチン・RANKL 同時刺激の条件で細胞を刺激し、それらの影響を調べる。ニコチン刺激後、破骨細胞前駆細胞が多核の破骨細胞に至る 7 日間の過程で経日的に RNA を抽出し、IL-1β, IL-6, IL-8, IL-11, TNF-α とそれらの受容体および PGE₂ 受容体の遺伝子発現を real-time PCR 法で調べた。また、PGE₂ 産生は ELISA 法で、タンパク発現は Western blot 法または ELISA 法で調べる。サイトカインおよび PGE₂ 発現の増加がニコチン刺激によるものであることの確認は、ニコチンのアンタゴニストを用いて調べた。ニコチン刺激で産生されたサイトカインおよび PGE₂ のオートクリン作用の有無は、細胞内シグナル伝達物質の遺伝子発現あるいはリン酸化を調べることによって明らかにした。

4. 研究成果

破骨細胞前駆細胞として、RAW264.7 細胞を種々の濃度 (0, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 5×10⁻⁴または 10⁻³ M) のニコチンで刺激後、ニコチン受容体の遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。その結果、α7 ニコチン受容体の発現は、10⁻⁴ M, 5×10⁻⁴ M および 10⁻³ M ニコチン刺激で有意に増加した。一方、α1, α2, α3, α4, α5, α9 および α10 ニコチン受容体の発現にはニコチン刺激の影響は認められず、α6 および α8 ニコチン受容体は検出されなかつ

た。次に、RAW264.7 細胞を上記の濃度のニコチンで刺激後、CA II, カテプシン K およびマトリックス金属プロテアーゼ-9 (MMP-9) の遺伝子およびタンパク発現に及ぼす影響を検討した。その結果、破骨細胞様細胞の形成が認められる培養 5 日目以降、CA II 発現は 10^{-5} M, 10^{-4} M および 10^{-3} M ニコチン刺激によって有意に増加した。一方、カテプシン K および MMP-9 発現は 10^{-4} M および 10^{-3} M ニコチン刺激によって有意に低下した。ERK のリン酸化は、RAW264.7 細胞を 10^{-3} M ニコチンあるいは 50 ng/ml RANKL で 60 分間刺激後、Western blot 法で調べた。また、ERK 阻害剤 (PD98059) の影響は、RAW264.7 細胞を 10^{-3} M ニコチンあるいは 10^{-3} M ニコチンと 10 nM PD98059 を含む D-MEM で 7 日間培養後、CAII の遺伝子発現を real-time PCR 法で調べた。ERK のリン酸化は、ニコチンおよび RANKL の単独刺激によって増加した。この影響は、ニコチン単独刺激の方が顕著であった。一方、ニコチン添加によって有意に増加した CAII 発現は、PD98059 の同時添加によって有意に低下した。更に CA II の発現の分子機構に着目して、以下の実験を行った。

1) ニコチンが RAW264.7 細胞の各種炎症性サイトカイン発現および PGE₂ 産生に与える影響の検討

RAW264.7 細胞を種々の濃度 (0, 10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} または 10^{-3} M) のニコチンで刺激後、IL-1 β , IL-8 および TNF- α の遺伝子発現を調べた。その結果、これらのサイトカイン発現は、 5×10^{-4} M または 10^{-3} M ニコチン刺激によって有意に増加した。また、ニコチン刺激で増加したこれらのサイトカイン発現は、ニコチン受容体アンタゴニストの同時添加によって、コントロールレベ

ルまで低下した。RAW264.7 細胞を種々の濃度 (0, 10^{-5} M, 10^{-4} M または 10^{-3} M) のニコチンで刺激後、PGE₂ 産生に不可欠な COX-1 および COX-2 の遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。その結果、COX-1 発現にはニコチン刺激の影響は認められなかったが、COX-2 発現は培養 5 日目までの早い時期にニコチン刺激によって有意に増加した。また、ニコチン刺激によって増加した COX-2 発現は COX-2 阻害剤 (NS398) の同時添加によって、コントロールレベルまで低下した。PGE₂ のオートクリン機構を想定して RAW264.7 細胞を種々の濃度 (0, 10^{-5} M, 10^{-4} M または 10^{-3} M) のニコチンで刺激後、PG 受容体の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、EP2 および EP4 発現にはニコチン刺激の影響は認められず、EP1 および EP3 発現は検出されなかった。

2) ニコチンが破骨細胞の CA II 発現に及ぼす分子機構の解明

ニコチン刺激によって増加した CA II 発現、ニコチン刺激によって低下したカテプシン K および MMP-9 発現は、ニコチンとニコチン受容体アンタゴニストの同時添加によって、それぞれコントロールレベルまで低下あるいは増加した。次に、ニコチン刺激によって培養上清中に放出された TNF- α 量を ELISA 法により調べた。その結果、ニコチン 10^{-3} M 刺激時に約 15ng/ml の TNF- α が測定された。抗 TNF- α 中和抗体の存在下で 10^{-3} M ニコチンによる刺激後に CA II 遺伝子発現を調べ、その発現をニコチン単独刺激時およびコントロールと比較したところその発現はニコチン単独刺激時と変化が認められなかった。

次に、ニコチン刺激によって培養上清中に放出された PGE₂ 量を ELISA 法により調べた。その結果、ニコチン 10^{-3} M 刺激時に約

100pg/ml の PGE₂ が測定された。更に RAW264.7 細胞に PGE₂ を種々の濃度 (0, 1, 10, または 100 pg/ml) で刺激後、CA II の遺伝子発現を調べたところ濃度依存的に有意に増加した。また、ニコチン刺激によって増加した CA II 発現は、NS398 の同時添加によって、コントロールレベルに対して約 35% 低下した。これらの結果から、ニコチン刺激によって増加した CA II 発現には PGE₂ によるオートクリン機構が関与している可能性が示唆された。

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 2 件)

- ① Kitami S, Tanaka H, Kawato T, Tanabe N, Katono-Tani T, Zhang F, Suzuki N, Yonehara Y, Maeno M (2010) IL-17A suppresses the expression of bone resorption-related proteinases and osteoclast differentiation via IL-17RA or IL-17RC receptors in RAW264.7 cells. *Biochimie* 92, 398-404 査読有
- ② Zhang F, Tanaka H, Kawato T, Kitami S, Nakai K, Motohashi M, Suzuki N, Wang C, Ochiai K, Isokawa K, Maeno M (2010) Interleukin-17A induces cathepsin K and MMP-9 expression in osteoclasts via celecoxib-blocked prostaglandin E₂ in osteoblasts. *Biochimie* ;93:296-305 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 飯田隆文, 田中秀樹, 上遠野(谷)朋子, 桑原亜貴子, 川戸貴行, 田邊奈津子, 前野正夫, 川口隆彦 (2010) 酪酸は骨芽細胞の COX-1 および COX-2 発現増加を介して PGE₂ 産生を促進する. プログラム: 30, 日本歯科保存学会 2010 年度春季学術大会 (第 132 回), 崇城大学市民ホール, 熊本県
- ② Iida T, Kawato T, Tanaka H, Katono-Tani T, Kuwabara A, Tanabe N, Kawaguchi T, Maeno M (2010) Butyric acid induces Coxs and PGE₂ production in ROS17/2.8 cells. 1725, 88th General Session & Exhibition of IADR, Barcelona, Spain
- ③ Kitami S, Tanaka H, Kawato T, Tanabe N, Motohashi M, Maeno M (2010) IL-17A suppresses proteinase expression and osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. 4754, 88th General Session & Exhibition of IADR, Barcelona, Spain
- ④ 飯田隆文, 田中秀樹, 川戸貴行, 田邊奈津子, 神尾宣昌, 北見 聡, 桑原亜貴子, 中井久美子, 前野正夫 (2010) 酪酸は骨芽細胞の分化を抑制し PGE₂ 産生を促進する. 口腔衛生会誌 60(4): 417, 第 59 回日本口腔衛生学会・総会, 朱鷺メッセ, 新潟県

[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◇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

田中 秀樹 (TANAKA HIDEKI)
日本大学・歯学部・専修研究員
研究者番号：90434076

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：