

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890014

研究課題名（和文）

メカニカルストレス応答性骨代謝におけるストレス応答シグナル経路の役割

研究課題名（英文）

Role of stress-activated signaling pathway in mechanical stress-induced bone remodeling

研究代表者

松井 裕之 (MATSUI Hiroyuki)

東北大学・加齢医学研究所・教育研究支援者

研究者番号：10547277

研究成果の概要（和文）：骨へのメカニカルストレスはリモデリングサイクルの維持に重要である。骨形成を担う骨芽細胞が間葉由来であるのに対し、骨吸収を行う破骨細胞は免疫担当細胞と同じく造血幹細胞に由来していることから、両者の相互作用の理解には骨免疫学研究の展開が求められている。本研究は、骨芽細胞へのメカニカルストレス負荷により MAPKKK のひとつ TAK1 が活性化される機構を解明し、さらにその下流において破骨細胞分化因子である IL-6 の産生に寄与するシグナル伝達の詳細を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Mechanical stress to bone is important for the maintenance of bone homeostasis. Osteoblast, which performs bone formation derived from mesenchymal cells, osteoclast which is responsible for bone resorption is hematopoietic stem cell origin like as other immune cells. Thus, osteoimmunological study is increasingly needed for the interpretation of osteoblast-osteoclast interaction. This study has unveiled that TAK1 MAPKKK was activated by mechanical stretch loading in osteoblast, and induced the expression of IL-6, an osteoclastogenic factor, via its downstream signaling pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：骨免疫学 メカノバイオロジー MAP キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨のリモデリングは破骨細胞による骨吸収を骨芽細胞による骨形成で埋め戻すさいくるによって成り立っている。これらの細胞の局所動員や活性はホルモンや神経、免疫学的因子およびメカニカルストレスによって制御されている。メカニカルストレスは骨形成を促進することがこれまでの航空宇宙領域の研究から明らかになっているものの、

通常の地上生活において大理石骨病が発症することは無い。このことから、力学的負荷下においても何らかの機構によって破骨細胞とのカップリングが維持されていることが推察されるが、その詳細は明らかになっていなかった。

(2) JNK・p38 はストレス応答 MAP キナーゼファミリーの一員であり、病原関連分子パ

ターンやサイトカインの他、熱ショックや浸透圧など物理化学的的刺激によって活性化される。さらにその下流においては炎症反応やアポトーシスなど、細胞へ適切なストレス応答反応をもたらすことが知られているが、骨メカノバイオロジーにおける役割は不明である。また、JNK・p38 経路を活性化する上流のMAPKKKおよびその活性化機構も不明であった。

2. 研究の目的

骨芽細胞伸展刺激の実験系を用いて、以下の項目の解明を目指した。

(1) 細胞伸展刺激による JNK・p38 上流の MAPKKK の同定およびその作動機構の解明

(2) 上で同定した経路によって制御されている骨代謝・骨免疫イベントの解析

3. 研究の方法

理研細胞バンクより入手した MC3T3-E1 骨芽細胞を適法に則り培養した。メカニカルストレスを細胞に負荷する系として、Strex 社製 ST-140 を用いた反復伸展刺激 (12% 伸展, 10 回/分) を採用した。シリコンゴム製チャンバーを I 型コラーゲンにてコーティングした後、80~90%コンフルエントの状態となるよう細胞を播種した。

(1) TAK1 およびその下流分子活性化はウェスタンブロットによって検出した。細胞は Lysis Buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 1% (v/v) Triton-X, 250 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM DTT, 1 mM PMSF, and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin) により溶解後、遠心にてデブリスを除いたのち、SDS-PAGE に供した。検出に使用した抗体は以下の通りである。リン酸化 (phosphorylation, 以下 P と省略) TAK1 (Thr-187), P-JNK (Thr183/Tyr185), P-p38 (Thr180/Tyr182), P-p65 (Ser-536), JNK, p38, p65, I κ B, および β -actin に対する各抗体は Cell signaling technology より入手した。TAK1 抗体(C-9)は Santa Cruz Biotechnologies より、IL-6 抗体は R&D よりそれぞれ購入した。SP600125 (JNK 阻害剤), SB203580 (p38 阻害剤), BMS-345541, (I κ B 阻害剤), KN-93 および KN-62 (CaMKII 阻害剤) は Calbiochem より入手した。A23187 は Sigma-Aldrich から、TAK1 に対する RNA 干渉実験に用いた siRNA (Stealth Select RNAi, #1-MSS218538 and #2-MSS218539) は Invitrogen からそれぞれ購入した。細胞には siRNA negative control または TAK1 (#1 or #2, 30 pmol/chamber) を Lipofectamine RNAiMAX

(5 $\mu\text{L}/\text{chamber}$) を用いてトランスフェクションし、72 時間後に反復伸展刺激を行った。

(2) TAK1 により制御される骨代謝・骨免疫学的イベントの解析にはリアルタイム PCR 法を用いた。RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO) により cDNA を合成した。リアルタイム PCR は 100 ng の cDNA を鋳型とし、10 μM PCR プライマー、2 \times THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) および Thermal Cycler Dice Real-Time system (TAKARA) を用いて行った。プライマーとして用いたセンス鎖およびアンチセンス鎖の配列は以下の通りである。IL-6 :

5'-CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA-3',
5'-GCAAGTGCATCATCGTTGTTCATAC-3'
GAPDH :

5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3',
5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'
IL-6 の相対的発現量は GAPDH mRNA の発現量によって補正した。

4. 研究成果

(1) TAK1 の活性化には Activation loop 内に存在する 187 番目のスレオニン残基のリン酸化が必須であり、これをモニターする抗リン酸化ペプチド抗体が市販されている。JNK, p38, NF- κ B に関しても同様の抗体が入手可能であったことから、これらを用いて細胞伸展時の TAK1 シグナルの活性化動態についての検討を行った。この結果、TAK1, および JNK, p38 はいずれも活性化されており、

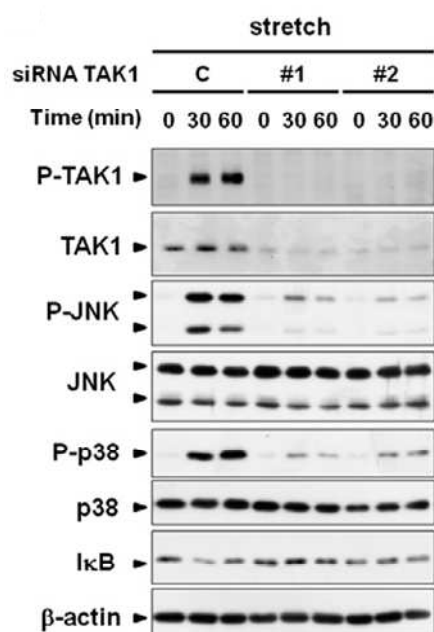


図1 細胞伸展によりTAK1がJNK・p38およびNF- κ B経路を活性化する

NF- κ B 経路の活性化の指標となる p65 のリン酸化および I κ B の分解を観察した。さらに、これらはいずれも TAK1 に対する RNAi によってキャンセルされたことから、細胞伸展刺激は TAK1 を介して JNK, p38 および NF- κ B 経路を活性化することが明らかとなった (図 1)。

(2) 次に、細胞伸展による TAK1 の活性化機構に関する検討を行った。細胞外 Ca²⁺キレーターである EGTA の添加により TAK1 および下流因子の活性化は阻害されることがわかった (図 2A)。さらに、Ca²⁺/calmodulin kinase II (CaMKII) の阻害剤 KN-62 および KN-93 の添加も TAK1 (図 2B) および下流因子 (data not shown) の活性化を阻害した。以上の知見から、伸展刺激は細胞外からの Ca²⁺流入から CaMKII の活性化を介して TAK1 経路を活性化することが明らかとなった。

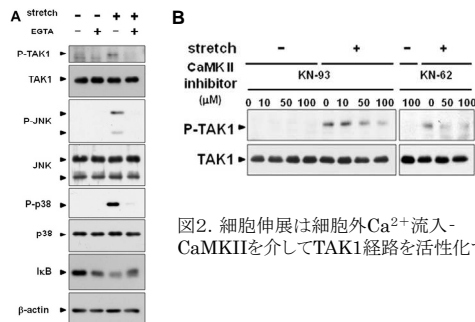
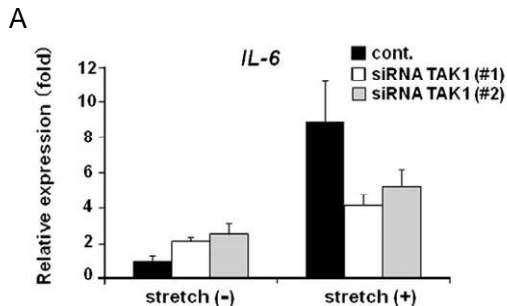
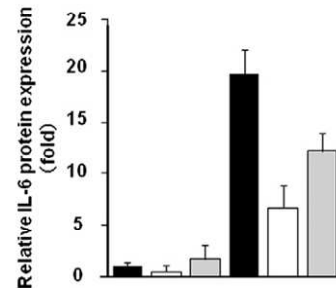
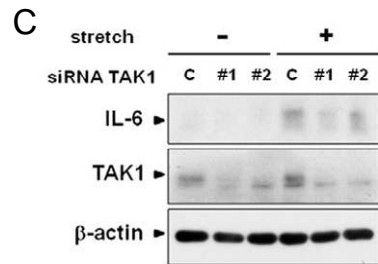
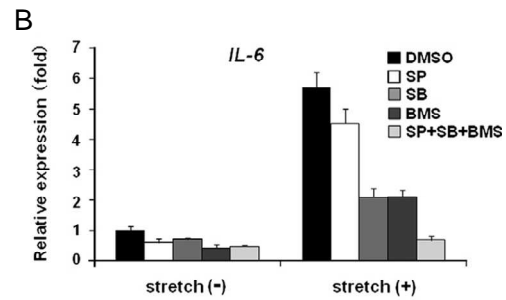


図2. 細胞伸展は細胞外Ca²⁺流入-CaMKIIを介してTAK1経路を活性化する

(3) メカニカルストレスによって活性化される TAK1 経路によって制御されている骨代謝・骨免疫関連イベントを探索するために、刺激開始から 6 時間後の遺伝子発現変動をリアルタイム PCR によって解析したところ、破骨細胞形成因子のひとつであり、骨粗鬆症増悪因子のひとつである IL-6 の mRNA の発現レベルが TAK1 を介して上昇することがわかった (図 3A)。下流の因子についても阻害剤を用いた検討を行ったところ、JNK は弱く、



そして p38 および NF- κ B 経路によってより強く制御されていることが明らかとなった (図 3B)。さらに、培養上清中の IL-6 タンパクを試みたところ、刺激開始から 12 時間



後の IL-6 タンパク量は TAK1 に対する RNAi により抑制されることがわかった (図 3C)。

リコンビナント IL-6 は可溶性型 IL-6 受容体の存在下においてのみ MC3T3-E1 に破骨細胞分化の必須因子である RANKL の発現誘導を行うことを確認している (data not

図3 メカニカルストレスによって活性化される TAK1 経路による IL-6 産生

shown)。これらの知見から、骨芽細胞の TAK1 経路はメカニカルストレス負荷により活性化され、JNK・p38 および NF- κ B 経路を介した IL-6 の産生を行うことにより、破骨細胞とのカップリングを維持する機能を持つことが明らかとなった。

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 4 件)

- Naoto Fukuno*, Hiroyuki Matsui*, Yoshiaki Kanda, Osamu Suzuki, Kunihiro Matsumoto, Keiichi Sasaki, Takayasu Kobayashi, Shinri Tamura. TGF- β -activated kinase 1 mediates

mechanical stress-induced IL-6 expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011, in press. (査読有)

*These authors contributed equally to this work.

- ② Yoshihiro Hagiwara, Akira Ando, Yoshito Onda, Hiroyuki Matsui, Eiichi Chimoto, Hideaki Suda, Eiji Itoi. Expression patterns of collagen types I and III in the capsule of a rat knee contracture model. *J.Orthop Res.* 28(3):315-21, 2010 (査読有)
- ③ 松井裕之, 福野直人, 神田佳明, 鈴木治, 佐々木啓一, 小林孝安, 田村眞理 骨芽細胞におけるメカニカルストレスセンサー分子, 第10回(社)計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会論文集, 1663-1664, 2009 (査読無)
- ④ Naoto Fukuno, Hiroyuki Matsui, Yoshiaki Kanda, Osamu Suzuki, Kunihiro Matsumoto, Keiichi Sasaki, Takayasu Kobayashi, Shinri Tamura. Mechanical stress induces the activation of TAK1 and its downstream pathways in pre-osteoblastic cells. *Proc.MHS*, 383-384, 2009 (査読有)

[学会発表] (計3件)

- ① 松井裕之, 福野直人, 神田佳明, 鈴木治, 武田 弘資, 一條秀憲, 佐々木啓一, 小林孝安, 田村眞理 骨芽細胞の JNK および p38 は骨メカノバイオロジーにおいて破骨細胞とのサイトカインクロストークに寄与する 第33回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, 12月7日(ポスター), 12月8日(口頭), 2010
- ② Hiroyuki Matsui, Naoto Fukuno, Kohsuke Takeda, Hidenori Ichijo, Osamu Suzuki, Takayasu Kobayashi, Shinri Tamura, Keiichi Sasaki. Mechanical stress modulates bone remodeling signals, TOHOKU-FORSYTH Symposium, at Forsyth Institute, Boston, 11-12 March, 2009 (招待講演)
- ③ Hiroyuki Matsui, Naoto Fukuno, Kohsuke Takeda, Hidenori Ichijo, Osamu Suzuki, Takayasu Kobayashi, Shinri Tamura, Keiichi Sasaki. Mechanical stress modulates bone remodeling signals, US-Japan Symposium, at Convention Center

Niigata, 12-13 February, 2009 (招待講演)

[図書] (計1件)

- ① Hiroyuki Matsui, Naoto Fukuno, Kohsuke Takeda, Hidenori Ichijo, Osamu Suzuki, Takayasu Kobayashi, Shinri Tamura, Keiichi Sasaki. Mechanical stress modulates bone remodeling signals, *Interface Oral Health Science*, 129-132, Springer, 2009 (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 裕之 (MATSUI Hiroyuki)

東北大学・加齢医学研究所・教育研究支援者

研究者番号: 10547277