

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 31 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年～2012 年

課題番号：22791805

研究課題名（和文） 活性酸素種誘導性の破骨細胞活性化シグナルへの ASK1 関与の検討

研究課題名（英文） Examination of the ASK1 involvement in a reactive oxygen species-inducitive osteoclast activation signal.

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）：活性酸素種が破骨細胞分化に関与すること、ASK1 が活性酸素種により活性化されることが報告されているが、破骨細胞分化における ASK1 の役割は未だ不明である。そこで、本研究で破骨細胞分化における ASK1 の役割を検討したところ、活性酸素種による破骨細胞分化に ASK1 が関与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that reactive oxygen species is important for osteoclastogenesis and activation of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1). However, the role of ASK1 on osteoclastogenesis is still unknown. We investigated whether ASK1 is involved in osteoclastogenesis and found that ASK1 involved in reactive oxygen species-inducitive osteoclast activation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、ストレス

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種（Reactive oxygen species: ROS）は老化、炎症などにより増加することが知られており近年、骨粗鬆症にも関与することが示唆されている（*Journal of Biological Chemistry* 282 (2007) 27285-27297）。私たちのグループはこれまでに宇宙放射線が宇宙飛行士の骨量を減少させる可能性があることを報告した（*Radiation Research*. 2009 Mar; 171 (3):283-9.）。この研究では宇宙飛行士が 1 日に受けうる放射線量で、10 日以内に 45%もの骨量減少が起こるこり、そしてこの骨量の減少が、ROS によ

る破骨細胞の活性化であることを示した（*J Appl Physiol*. 2010 Jan;108(1):152-61）。

ASK1 (Apoptosis signal regulating kinase 1) は ROS により活性化しアポトーシスシグナルを誘導する MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) であるが、近年生体防御機構を活性化させるシグナル分子としても注目を浴びている（*Matsuzawa, et al. Nature Immunology*, 2005）。また交感神経 β 受容体作動薬が ROS を介して破骨細胞を活性化することをこれまでに報告している（2009 年骨代謝学会）。

これらの結果は放射線、交感神経活性化シ

グナルによる破骨細胞分化の共通のメカニズムとして、ASK1 シグナルが関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

交感神経活性化シグナルによる破骨細胞分化に ASK1 が関与するか否か検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

細胞培養:野生型マウスおよびASK1 欠損マウスの骨髓細胞を 6cm dish に捲き、12 時間後に浮遊しているものを造血系幹細胞として破骨細胞形成実験に用いた。破骨細胞前駆細胞を macrophage colony stimulating factor 存在下で 12well のプレートに野生型およびASK1 欠損マウス由来の骨髓細胞を 1.0×10^6 cells/cm² で撒き過酸化水素もしくは、 β 作動薬イソプレナリンを加え 4 日間培養を行い、破骨細胞数の計測を行った。

動物:野生型マウスおよびASK1 欠損マウスに β 作動薬 ($5 \mu\text{g/g}$ of body weight/day) を腹腔内投与し実験開始後 2 週間後に大腿骨、脛骨を採取し形態学的、組織学的解析を行った。

4. 研究成果

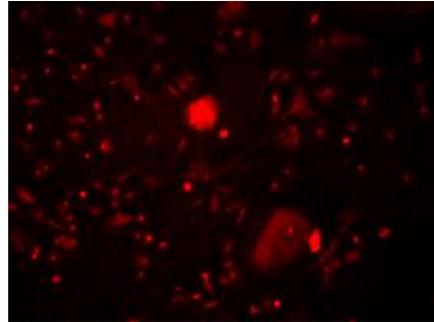
(1) *in vitro* 実験の結果

はじめに破骨細胞に Apoptosis signal regulation kinase 1(ASK1)が存在するか否か検討を行った。酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP)陽性の成熟破骨細胞(A)にASK1 が確認された(BC)。

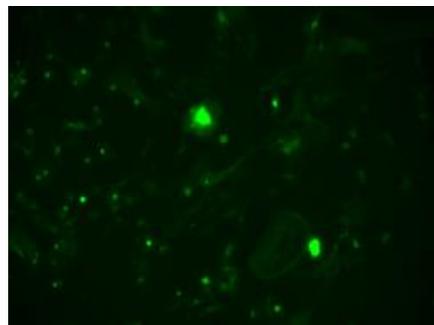
次に活性酸素種による破骨細胞分化に Apoptosis signal regulation kinase 1(ASK1)が関与するか否か検討した。野生型マウスおよびASK1 欠損マウス由来の破骨細胞前駆細胞を過酸化水素 ($0 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$)、イソプレナリン ($0 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$)を加え 4 日間培養を行い、破骨細胞数の計測を行った。結果はASK1 と野生型との間に有意な変化が確認された。また、過酸化水素 ($0 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$)、イソプレナリン ($0 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$)によりASK1が活性化型になることがWestern

blot により確認された。以上の結果から活性酸素種やイソプレナリンによる破骨細胞誘導にASK1 が関与することが示された。

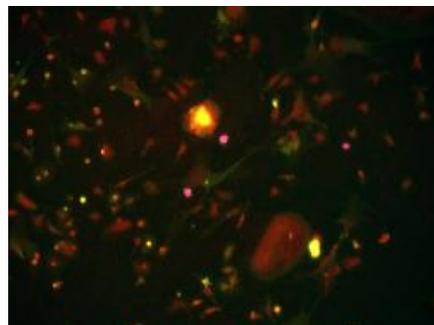
A. TRAP



B. ASK1



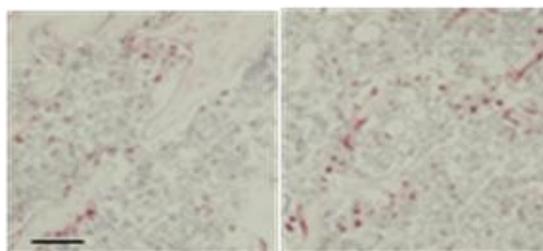
C. Merge



(2) *in vivo* 実験の結果

次に、野生型マウスおよびASK1 欠損マウスに β 作動薬イソプレナリン ($5 \mu\text{g/g}$ body weight/day i. p)を 10 日間投与し、組織学的、形態学的に解析を行った。Dは大腿骨遠位端の脱灰切片である。破骨細胞はTRAP染色に手赤く染色された。野生型マウスではイソプレナリン投与により、破骨細胞数は増加したが、ASK1 欠損型マウスでは野生型でみられたような増加は観察されなかった。

D. 破骨細胞はTRAP 染色により赤く染色された。



WT ctrl

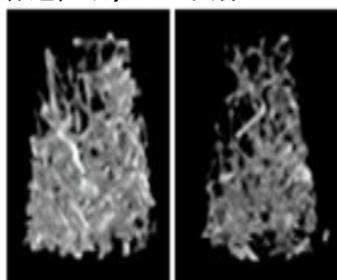
WT ISO



KO ctrl

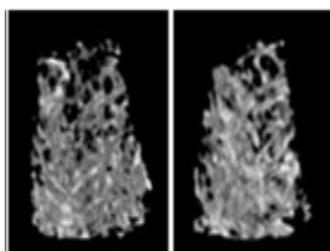
KO ISO

E. 大腿骨遠位端 μ CT画像



WT ctrl

WT ISO



KO ctrl

KO ISO

Eは大腿骨遠位端のCT画像であるが、野生型では β 作動薬の投与により見られた骨量の減少が、やはりASK1欠損動物では観察されなかった。

以上の結果から活性酸素種による破骨細胞分化にASK1が関与することが示唆された。本研究の発展によりからASK1を標的とした骨粗鬆症の新規治療法の確立へ発展することが期待される。

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)

① Togari A, Arai M, Kondo H, Kodama D, Niwa Y. The neuro-osteogenic network: The sympathetic regulation of bone resorption. Japanese Dental Science. 査読有 2012 印刷中.

② Komoto S, Kondo H, Fukuta O, Togari A. Comparison of β -adrenergic and glucocorticoid signaling on clock gene and osteoblast-related gene expressions in human osteoblast. Chronobiol Int. 査読有 2012 Feb;29(1):66-74.

③ Kondo H, Ezura Y, Nakamoto T, Hayata T, Notomi T, Sorimachi H, Takeda S, Noda M. MURF1 deficiency suppresses unloading-induced effects on osteoblasts and osteoclasts to lead to bone loss. J Cell Biochem. 査読有 2011 Dec;112(12):3525-30.

④ Kondo H, Togari A. Continuous treatment with a low-dose β -agonist reduces bone mass by increasing bone resorption without suppressing bone formation. Calcified Tissue International. 査読有 2010 Jan; 88(1):23-32.

〔学会発表〕(計3件)

① 近藤久貴 低濃度 β アゴニストの持続投与は骨形成に影響を与えず、骨吸収を促進し骨量を減少させる。第28回骨代謝学会学術集会 2010.7.21. 東京

② 近藤久貴 交感神経活動はROSを介し破骨細胞分化を促進する。第218回 松本歯科大学大学院セミナー 2010.7.8. 塩尻

③ 近藤久貴 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45回骨Ca代謝研究会 2010.6.4. 名古屋

〔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

近藤 久貴 (KONDO HISATAKA)
愛知学院大学・歯学部・助教
研究者番号：40469002

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：