

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462289

研究課題名(和文)骨代謝におけるAMPキナーゼを介するエネルギー調節機構の役割に関する研究

研究課題名(英文) Roles of AMP-activated protein kinase in bone metabolism

研究代表者

徳田 治彦 (TOKUDA, HARUHIKO)

岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10397325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エネルギー状態の変化は、生体の活動・恒常性維持のみならず組織・細胞機能に多大な影響を及ぼす。エネルギー代謝調節においてAMP-activated protein kinase (AMPK) が中心的な役割を担っていると考えられているが、しかし、骨代謝におけるAMPKの役割の詳細はこれまでほとんど明らかとされていない。本研究では、骨芽細胞においてプロスタグランジンによるオステオプロテジェリン産生におけるAMPKの役割を検討した。その結果、骨芽細胞においてAMPKは、プロスタグランジン(PG) D2、PGE1およびPGE2によるオステオプロテジェリン産生を促進的に制御していることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：AMP-activated protein kinase (AMPK), a key enzyme sensing cellular energy metabolism, is currently known to regulate multiple metabolic pathways. Osteoprotegerin plays a pivotal role in the regulation of bone metabolism by inhibiting osteoclast activation. We have previously reported that the activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase superfamily including p38 MAP kinase, p44/p42 MAP kinase and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) are involved in the synthesis of osteoprotegerin stimulated by prostaglandin D2 (PGD2), PGE1 or PGE2 in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. On the basis of these findings, we herein investigated the implication of AMPK in the osteoprotegerin synthesis induced by PGD2, PGE1 or PGE2 in these cells. Our results strongly suggest that AMPK acts as a positive regulator in the osteoprotegerin synthesis stimulated by PGD2, PGE1 or PGE2 in osteoblasts.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨代謝 エネルギー代謝 骨芽細胞 AMPキナーゼ プロスタグランジン オステオプロテジェリン MA  
Pキナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は世界に類を見ない高齢化社会を迎えた我が国において医学的に、また社会的に大きな問題となっている。骨粗鬆症による脊椎および大腿骨頸部骨折は高齢者の自立機能を障害し、いわゆる“寝たきり”の原因となり、高齢者の生活の質(QOL)を低下させる大きな要因である。しかし、骨粗鬆症は“沈黙の疾患”と云われるように初期では臨床症状がほとんどなく、自覚症状の出現及び骨折が生じたときにはその病態は既に進行した状態にある。したがって、骨粗鬆症をできるだけ早期に診断し、適切な治療を施すことにより脊椎・大腿骨の骨折を予防することが極めて重要である。

骨粗鬆症の治療には現在、ビスフォスフォネート製剤・選択的エストロゲン受容体モジュレーター(SERM)・テリパラチド・デノスマブなど大規模な臨床試験で骨折抑制効果の確かめられた薬剤が使用されているが、治療中に骨折に至る例も数多く見られ、治療効果は限定的である。さらに、骨量減少が軽微にも係わらず骨折に至る骨強度低下の著しい事例や、治療による非生理的な骨代謝制御に起因した非定型的骨折を発症する事例の存在が、臨床的課題となっている。このように、より効果的な治療法の開発のため必要な細胞レベルでの骨代謝および病態制御機構は、未だ十分に解明されたとは言いがたい。以上、骨粗鬆症の成因及び病態の詳細は未だ明らかではなく、その解明は急務といえる。

骨組織は身体の骨格維持、カルシウムの貯蔵および造血の場としての骨髓腔の構成という生体の恒常性・機能維持において極めて重要な役割を果たしている。このため骨のリモデリング(再構成)は絶えず活発に行われており、骨量は骨吸収とそれにカップルして生じる骨形成の平衡の上に維持されている。骨粗鬆症ではそのバランスが崩れ、骨量が減少し骨の脆弱性が増し、骨折が生じやすくなる。骨代謝は、骨を形成する役割を担う骨芽細胞の働きと骨を吸収する役割を担う破骨細胞の二つの機能細胞の働きによって、巧緻に制御されている。そのバランスが保たれることにより、骨量は維持されている。近年、副甲状腺ホルモンや活性化ビタミンDをはじめとする多くの骨吸収因子の受容体が、破骨細胞ではなく骨芽細胞に存在することが見出された。すなわち、骨芽細胞はその細胞膜上のRANKL(receptor activation of NF- $\kappa$ B ligand)を介し、骨吸収を担う破骨細胞の形成・分化をも制御調節し、骨代謝の制御において中心的な役割を担っていることが明らかとなってきた。私共はこれまで一貫して、骨芽細胞の増殖・分化機能の制御機構の検討を進めてきた。とりわけ細胞内情報伝達機構に注目しその詳細を解析し、なかでも骨代謝調節因子による負のフィードバック機構、すなわち自己調節機序の存在の重要性を明らかとしてきた。

エネルギー状態の変化は、生体の活動・恒常性維持のみならず組織・細胞機能に多大な影響を及ぼす。筋・肝臓における糖・脂質代謝は、生体全体のエネルギー代謝に中心的な役割を果たしている。エネルギー代謝の調節は栄養系シグナル、内分泌系ホルモンおよび神経系等のクロストークにより制御されており、近年、栄養系シグナルによる筋・肝臓のエネルギー代謝調節においてAMP-activated protein kinase(AMPキナーゼ)が中心的な役割を担っていることが明らかとされてきた。最近、私共は骨形成のみならず骨吸収においても骨代謝の中核的役割を担う骨芽細胞において、重要な骨形成促進因子の一つである塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)がAMPキナーゼを活性化することを見出した。しかし、骨代謝におけるエネルギー代謝調節およびAMPキナーゼの役割の詳細はこれまでほとんど明らかとされていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、エネルギー代謝調節において中心的役割を担うAMP-activated protein kinase(AMPキナーゼ)が骨代謝においてどのような役割を果たしているか、骨芽細胞の増殖・分化機構および破骨細胞調節機能に対するAMPキナーゼの影響および作用機序を検討し、その分子機序を同定することで新たな骨粗鬆症治療法確立の基礎的検討を行うことである。

## 3. 研究の方法

(1) 新生仔マウス頭蓋冠より分離株化された骨芽細胞様MC3T3-E1細胞を10%FBSを含む $\alpha$ -MEM中で培養した。confluentに達した後、培地を0.3%FBSを含む $\alpha$ -MEMとし48時間後実験に供した。細胞をAMPキナーゼの阻害物質であるcompound Cによる前処置の後、プロスタグランジン(PG) D<sub>2</sub>、PGE<sub>1</sub>およびPGE<sub>2</sub>で刺激した。

(2) PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>1</sub>およびPGE<sub>2</sub>により刺激され活性化されるMAPキナーゼスーパーファミリー(p44/p42 MAPキナーゼ、p38 MAPキナーゼ、SAPK/JNK)、AMPキナーゼおよびacetyl-CoA carboxylaseのリン酸化をWestern blot法で検討した。

(3) PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>1</sub>およびPGE<sub>2</sub>刺激により遊離されるオステオプロテジェリンをELISA法で検討した。

(4) PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>1</sub>およびPGE<sub>2</sub>刺激により誘導されるオステオプロテジェリンのmRNAをRT-PCR法で検討した。

## 4. 研究成果

(1) 私共は既に骨芽細胞において、プロスタグランジンE<sub>2</sub>がp44/p42 MAPキナーゼ、p38 MAPキナーゼおよびSAPK/JNKの活性化を介し、オステオプロテジェリン産生を促進していることを明らかとしている。今回、プロスタグランジンE<sub>2</sub>によるオステオプロテジェリン産生とAMPキナーゼの関連を検討した。その結果、プロスタグランジンE<sub>2</sub>

は骨芽細胞において AMP キナーゼを活性化すること、活性化された AMP キナーゼは SAPK/JNK の上流で機能し、プロスタグランジン E2 によるオステオプロテジェリン産生を制御していることを明らかとした。

(2)私共は既に骨芽細胞において、プロスタグランジン D2 が p44/p42 MAP キナーゼ、p38 MAP キナーゼおよび SAPK/JNK の活性化を介し、オステオプロテジェリン産生を促進していることを明らかとしている。今回、プロスタグランジン D2 によるオステオプロテジェリン産生と AMP キナーゼの関連を検討した。その結果、プロスタグランジン D2 は骨芽細胞において AMP キナーゼを活性化すること、活性化された AMP キナーゼは p44/p42 MAP キナーゼおよび SAPK/JNK の上流で機能し、プロスタグランジン D2 によるオステオプロテジェリン産生を制御していることを明らかとした。

(3) 私共は既に骨芽細胞において、プロスタグランジン E1 が p38 MAP キナーゼおよび SAPK/JNK の活性化を介し、オステオプロテジェリン産生を促進していることを明らかとしている。今回、プロスタグランジン E1 によるオステオプロテジェリン産生と AMP キナーゼの関連を検討した。その結果、プロスタグランジン E1 は骨芽細胞において AMP キナーゼを活性化すること、活性化された AMP キナーゼは p44/p42 MAP キナーゼおよび SAPK/JNK の細胞内情報伝達機構とは別の機序でプロスタグランジン D2 によるオステオプロテジェリン産生を制御していることを明らかとした。

##### 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 23 件)

1.Fujita K, Otsuka T, Yamamoto N, Kainuma S, Ohguchi R, Kawabata T, Sakai G, Kuroyanagi G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O and Tokuda H.

(-)-Epigallocatechin gallate but not chlorogenic acid up-regulates osteoprotegerin synthesis by bone morphogenetic protein-4 in osteoblasts. *Exp. Ther. Med.* in press

2.Fujita K, Tokuda H, Kainuma S, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O and Otsuka T.

Resveratrol suppresses thyroid hormone-induced osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* in press

3.Kuroyanagi G, Tokuda H, Yamamoto N, Kainuma S, Fujita K, , Ohguchi R, Kawabata T, Sakai G, Matsushima-

Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O and Otsuka T.

(-)-Epigallocatechin gallate synergistically potentiates prostaglandin E<sub>2</sub>-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. *Prostag. Oth. Lipid M.* 査読有 128 巻, 2017, 27-33. doi:10.1016/j.prostaglandins.2017.02.001. Epub 2017 Feb 2.

4.Fujita K, Tokuda H, Yamamoto N, Kainuma S, Kawabata T, Sakai G, Kuroyanagi G, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O and Otsuka T. Incretins amplify TNF- $\alpha$ -stimulated IL-6 synthesis in osteoblasts: suppression of the I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B pathway. *Int. J. Mol. Med.* 査読有 39 巻, 2017, 1053-1060. doi:10.3892/ijmm.2017.2892. Epub 2017 Feb 15.

5.Kuroyanagi G, Tokuda H, Yamamoto N, Kainuma S, Fujita K, Ohguchi R, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O and Otsuka T. Attenuation on prostaglandin E<sub>1</sub>-induced osteoprotegerin synthesis in osteoblasts by normoxic HIF inducers. *Mol. Med. Rep.* 査読有 15 巻, 2017, 1847-1852. doi:10.3892/mmr.2017.6177. Epub 2017 Feb 8.

6.Kainuma S, Tokuda H, Fujita K, Kawabata T, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O and Otsuka T. Attenuation by incretins of thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Biomed. Rep.* 査読有 5 巻, 2016, 771-775. doi:10.3892/br.2016.798. Epub 2016 Nov 1.

7.Yamamoto N, Tokuda H, Kuroyanagi G, Kainuma S, Matsushima-Nishiwaki R, Fujita K, Kozawa O and Otsuka T. Heat shock protein 22 (HSPB8) limits TGF- $\beta$ -stimulated migration of osteoblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.* 査読有 436 巻, 2016, 1-9. doi: 10.1016/j.mce.2016.07.011. Epub 2016 Jul 7.

8.Kainuma S, Otsuka T, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O and Tokuda H. Regulation by AMP-activated protein kinase of PGE<sub>2</sub>-induced osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* 査読有 13 巻, 2016, 3363-3369. doi:10.3892/mmr.2016.4900. Epub 2016 Feb

9. Kainuma S, Otsuka T, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O and Tokuda H. Possible involvement of AMP-activated protein kinase of PGE<sub>1</sub>-induced osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. *Exp. Ther. Med.* 査読有 11 巻, 2016, 2042-2048. Epub 2016 Feb 22.
10. Kuroyanagi G, Otsuka T, Yamamoto N, Kainuma S, Ohguchi R, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O and Tokuda H. Mimosine suppresses the PGF<sub>2α</sub>-induced synthesis of osteoprotegerin but not interleukin-6 in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 査読有 37 巻, 2016, 533-541. doi: 10.3892/ijmm.2016.2452. Epub 2016 Jan 7.
11. Yamamoto N, Tokuda H, Kuroyanagi G, Kainuma S, Ohguchi R, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O and Otsuka T. Amplification by (-)-epigallocatechin gallate and chlorogenic acid of TNF- $\alpha$ -stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 査読有 36 巻, 2015, 1707-1712. doi:10.3892/ijmm.2015.2381. Epub 2015 Oct 20.
12. Kainuma S, Tokuda H, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Ohguchi R, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O and Otsuka T. PGD<sub>2</sub> stimulates osteoprotegerin synthesis via AMP-activated protein kinase in osteoblasts: regulation of ERK and SAPK/JNK. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 査読有 101 巻, 2015, 23-29. doi:10.1016/j.plefa.2015.08.003. Epub 2015 Sep 2.
13. Kuroyanagi G, Otsuka T, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O and Tokuda H. Resveratrol suppresses TGF- $\beta$ -induced VEGF synthesis in osteoblasts: inhibition of the p44/p42 MAP kinase and SAPK/JNK pathways. *Exp. Ther. Med.* 査読有 9 巻, 2015, 2303-2310. doi:Epub 2015 Mar 26.
14. Kuroyanagi G, Tokuda H, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O and Otsuka T. Unphosphorylated HSP27 (HSPB1) regulates the translation initiation process via a direct association with eIF4E in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 査読有 36 巻, 2015, 881-889. doi:10.3892/ijmm.2015.2274. Epub 2015 Jul 7.
15. Yamamoto N, Otsuka T, Kondo A, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Kozawa O and Tokuda H. Rac limits TGF- $\beta$ -induced VEGF synthesis in osteoblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.* 査読有 405 巻, 2015, 35-41. doi:10.1016/j.mce.2015.02.002. Epub 2015 Feb 7.
16. Yamamoto N, Otsuka T, Kuroyanagi G, Kondo A, Kainuma S, Nakakami A, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O and Tokuda H. Resveratrol reduces prostaglandin E<sub>1</sub>-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts: suppression of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *Prostag. Oth. Lipid M.* 査読有 116-117 巻, 2015, 57-63. doi:10.1016/j.prostaglandins.2015.01.003. Epub 2015 Feb 9.
17. Kuroyanagi G, Tokuda H, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Mizutani J, Kozawa O and Otsuka T. Resveratrol amplifies BMP-4-stimulated osteoprotegerin synthesis via p38 MAP kinase in osteoblasts. *Mol. Med. Rep.* 査読有 12 巻, 2015, 3849-3854. doi:10.3892/mmr.2015.3877. Epub 2015 Jun 3.
18. Kuroyanagi G, Otsuka T, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Nakakami A, Mizutani J, Kozawa O and Tokuda H. Downregulation by resveratrol of basic fibroblast growth factor-stimulated osteoprotegerin synthesis through suppression of Akt in osteoblasts. *Int. J. Mol. Sci.* 査読有 15 巻, 2014, 17886-17900. doi: 10.3390/ijms151017886.
19. Yamamoto N, Tokuda H, Kuroyanagi G, Mizutani J, Matsushima-Nishiwaki R, Kondo A, Kozawa O and Otsuka T. Regulation by resveratrol of prostaglandin E<sub>2</sub>-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 査読有 34 巻, 2014, 1439-1445. doi:10.3892/ijmm.2014.1934. Epub 2014 Sep 16.
20. Kuroyanagi G, Mizutani J, Kondo A, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Otsuka T, Kozawa O and Tokuda H. Suppression by resveratrol of

prostaglandin D<sub>2</sub>-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 査読有 91 巻, 2014, 73-80. doi:10.1016/j.plefa.2014.04.003. Epub 2014 Apr 24.

21.Kondo A, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Mizutani J, Kozawa O and Otsuka T. Rho-kinase limits BMP-4-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts: regulation of the p38 MAP kinase pathway. Life Sci. 査読有 96 巻, 2014, 18-25. doi:10.1016/j.lfs.2013.12.017. Epub 2013 Dec 22.

22.Kuroyanagi G, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Kondo A, Mizutani J, Kozawa O and Otsuka T. Resveratrol suppresses prostaglandin F<sub>2α</sub>-induced osteoprotegerin synthesis in osteoblasts: inhibition of the MAP kinase signaling. Arch. Biochem. Biophys. 査読有 542 巻, 2014, 39-45. doi:10.1016/j.abb.2013.12.002. Epub 2013 Dec 11.

23.Kondo A, Otsuka T, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Mizutani J, Kozawa O and Tokuda H. Resveratrol inhibits BMP-4-stimulated VEGF synthesis in osteoblasts: suppression of S6 kinase. Int. J. Mol. Med. 査読有 33 巻, 2014, 1013-1018. doi:10.3892/ijmm.2014.1626. Epub 2014 Jan 17.

〔学会発表〕(計6件)

1. 藤田和彦、徳田治彦、黒柳 元、山本尚洋、貝沼慎悟、川端 哲、酒井 剛、西脇理英、大塚隆信、小澤 修  
骨芽細胞において HSP90 阻害剤は p38 MAP kinase を介し PGF<sub>2α</sub> による IL-6 産生を促進する  
第 90 回日本薬理学会年会  
2017 年 3 月 15 日 長崎

2. 徳田治彦、谷川隆久、原田 敦、新飯田俊平、小澤 修  
レスベラトロール(RES)は骨芽細胞におけるプロスタグランジン E<sub>1</sub>(PGE<sub>1</sub>)によるオステオプロテジェリン(OPG)産生を減弱する  
第 58 回日本老年医学会学術集会  
2016 年 6 月 8 日 金沢

3. 黒柳 元、山本尚洋、貝沼慎悟、大口怜央、藤田和彦、徳田治彦、小澤 修、大塚隆信  
骨代謝における Rac の TGF-β による VEGF 産生への役割の検討

第 1 回日本骨免疫学会 ウィンターセミナー  
2016 年 1 月 28 日 軽井沢

4. 黒柳 元、山本尚洋、貝沼慎悟、大口怜央、藤田和彦、徳田治彦、小澤 修、大塚隆信  
骨芽細胞において Rac は TGF-β による VEGF 産生を抑制的に制御している  
第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2015 年 10 月 22 日 富山

5. 貝沼慎悟、黒柳 元、近藤 章、山本尚洋、水谷 潤、徳田治彦、小澤 修、大塚隆信  
骨芽細胞において resveratrol は PGF<sub>2α</sub> による osteoprotegerin 産生を抑制する  
第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2014 年 10 月 9 日 鹿児島

6. 山本尚洋、近藤 章、黒柳 元、貝沼慎悟、水谷 潤、徳田治彦、小澤 修、大塚隆信  
骨芽細胞において Rho-kinase は BMP-4 による osteocalcin 産生を抑制的に制御している  
第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2014 年 10 月 9 日 鹿児島

〔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  
<http://www.med.gifu-u.ac.jp/labo/pharma/index.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
徳田 治彦 (TOKUDA HARUHIKO)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10397325

(2)研究分担者

小澤 修 (KOZAWA OSAMU)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90225417

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし