

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462827

研究課題名(和文) 1-アドレナリン受容体を介した骨形成機構の分子薬理学的研究

研究課題名(英文) Pharmacological study on increased bone formation by alpha1-adrenoceptor signaling in bone metabolism.

研究代表者

戸苅 彰史 (TOGARI, Akifumi)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：80126325

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)：骨代謝における 1-アドレナリン受容体シグナルの生理的意義を検討した。その結果、1-受容体遮断薬プラゾシンが骨形成を抑制して骨量を減少させること、1B-受容体欠損マウスでも骨形成抑制による骨量低下を認めた。また、骨芽細胞において 1-受容体作動薬フェニレフリンが細胞機能調節を担う転写因子CCAAT/enhancer-binding protein (Cebpd) 発現を増大させることも認め、このCebpd発現が骨芽細胞の増殖を制御している可能性を示した。これらの結果から、1B-受容体シグナルが骨形成により骨量を制御し、Cebpd発現を介して骨芽細胞の増殖を制御している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：To obtain a better understanding of bone remodeling by the sympathetic nervous system, we investigated the role of alpha 1B-adrenoceptor signalling. The systemic administration of prazosin, alpha1-adrenoceptor antagonist, decreased the bone formation in mice. In addition, alpha1B-adrenoceptor-deficient mice showed a lower bone mass due to decreased bone formation, without exhibiting any changes in bone-resorbing activity. Furthermore, the treatment of phenylephrine, alpha1-adrenoceptor agonist, with osteoblastic MC3T3-E1 cells increased the expression of the transcriptional factor CCAAT/enhancer-binding protein delta (Cebpd). The over-expression of Cebpd induced cellular proliferation in MC3T3-E1 cells, whereas the silencing of Cebpd suppressed it. These results suggested that alpha1B-adrenoceptor signalling is required for bone formation and regulated cellular proliferation through a mechanism relevant to the up-regulation of Cebpd in osteoblasts.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：交感神経 骨代謝 1B-アドレナリン受容体 骨形成 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

骨代謝機能と α -AR (アドレナリン受容体) の関連についての基礎研究は少ないが、臨床において、 α_1 -AR 阻害薬による骨折リスクの増大が報告されている。起立性低血圧などを原因とした転倒の増加が一因とも考えられるが、 α_1 -AR 阻害薬を服用する高血圧患者においては同時に骨粗鬆症を持つ割合が高いことも報告されており、 α_1 -AR 阻害薬が骨量を負に制御している可能性が考えられる。また、動物モデルにおいては、 α_1 -AR 作動薬が骨折の治癒を促し、 α_1 -AR を介した正の骨量制御が示されている。我々は、骨芽細胞に α_{1B} -AR が恒常的に発現していること、 α_1 -AR の刺激が破骨細胞分化抑制因子である osteoprotegerin (OPG) の発現を増加させること、さらに Gi/o 共役型の α_{1B} -AR が骨芽細胞の細胞増殖活性を亢進させることを報告している。これらの我々の知見は、 α_1 -AR を介した骨芽細胞の増殖促進作用、石灰化に関わる alkaline phosphatase (ALP) 活性の亢進作用、および骨芽細胞の前駆細胞 (骨髄由来間葉系幹細胞) の増殖亢進作用などにより支持されている。これらの細胞レベルでの研究結果は、骨芽細胞の α_1 -AR を介した骨形成促進作用を示唆しており、本研究の計画に至っている。

2. 研究の目的

本研究において、交感神経活動が骨形成を正に制御する可能性を検証するため、骨芽細胞に発現している α_{1B} -AR の骨代謝における役割に注目し、1) α_{1B} -AR 欠損マウスの骨代謝、2) 交感神経活動亢進による α_{1B} -AR 欠損マウスの骨代謝変動、3) α_{1B} -AR 欠損マウス由来の骨芽細胞および破骨細胞の機能を解析する。すなわち、骨形成を促進する新たな機構を解明することにより、骨吸収の抑制ではない骨形成を促進する新規薬物療法の開発を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 動物: 8週齢の雄性 C57BL/6J マウスと α_{1B} -AR ノックアウトマウス ($\alpha_{1B}^{-/-}$ マウス) を用いた。 α_1 -AR 遮断薬であるプラゾシンは生理食塩水で溶解し、8週齢の雄性 C57BL/6J マウスに1、3、10、30 μ g/kg/day の用量で2週間腹腔内に投与した。対照群には生理食塩水を投与した。

(2) μ CT 解析: μ CT (Rigaku, Japan) を使用して大腿骨の三次元 μ CT 画像を撮影し、海綿骨の骨梁構造解析から骨量/組織量 (BV/TV)、骨梁数 (Tb.N)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁間隔 (Tb.Sp) および大腿骨遠位端の成長板より近位端部の二次海綿骨部分を解析した。

(3) 骨形態計測: 骨形態計測のため、マウスにカルセインの二重標識を施し、大腿骨遠位端の成長板より近位端の二次海綿骨部分の骨石灰化面 (MS/BS)、骨石灰化速度 (MAR)、骨形成速度 (BFR) を解析した。また、右脛骨の脱灰標本を作成し、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色した。TRAP 陽性細胞を破骨細胞とし、脛骨近位端の成長板より遠位端部の破骨細胞表面積/骨表面積 (Oc.S/BS) と破骨細胞数/骨表面積 (Oc.N/BS) を評価した。

(4) 細胞培養: MC3T3-E1 細胞を 10% ウシ胎児血清を含む α -MEM 中で 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件下で培養した。細胞がコンフルエントに達した時点で、10 mM β -グリセロリン酸と 10 μ g/ml アスコルビン酸を培養液中に添加した。マウス胚由来細胞株 C3H10T1/2 細胞は 10% ウシ胎児血清を含む DMEM 中で 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件下で培養した。

(5) siRNA 遺伝子導入: 細胞が 70% コンフルエントに達した時点で、低分子二本鎖干渉 RNA (siRNA) の導入を行った。

(6) Cebp δ 安定過剰発現株の作成: 全長 Cebp δ を組み込んだコンストラクトを MC3T3-E1 細胞に導入した。

(7) 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 取り込み試験：細胞増殖活性は Cell Proliferation ELISA kit (Roche Applied Science, Switzerland) を用いて BrdU 取り込み能を評価した。

(8) Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction 解析：Real-Time Polymerase Chain Reaction (real time PCR) は Quantitect SYBER Green PCR kit (Qiagen, Netherlands) を使用し、Step One Software v2.0 (Applied Biosystems, USA) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) プラゾシンは用量依存的にマウス大腿骨遠位部の BV/TV および Tb.Sp を抑制し、30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与で有意な抑制を認めた。また、プラゾシンは骨形成パラメーターである MS/BS、MAR、BFR の有意な減少を示した。さらに、大腿骨遠位部の骨形成関連遺伝子の解析により、*Runx2*、*Osx*、*OC* の mRNA 発現の有意な減少を認めた。これらの結果は、 α_1 -AR シグナルの薬理的遮断が骨形成を抑制することを示している。一方、脛骨の脱灰切片の TRAP 染色実験により、骨吸収パラメーターである Oc.S/BS の有意な減少と Oc.N/BS の減少傾向を認めた。さらに、大腿骨遠位部の破骨細胞関連遺伝子の解析により、*nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic-1 (Nfatc1)* および *cathepsin K (Ctsk)* の mRNA 発現の有意な減少も認めた。この結果は、 α_1 -AR シグナルの薬理的な阻害が、骨形成のみならず骨吸収も抑制することを示している。

(2) α_{1B} -AR ノックアウトマウス ($\alpha_{1B}^{-/-}$ マウス) の骨組織を解析した結果、WT マウスに比し $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスにおける大腿骨遠位部の BV/TV および Tb.N の有意な減少を認めた。また、 $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスにおける骨形成パラメーターの MS/BS、MAR、BFR も、WT マウスに比し有意に減少していた。さらに、大腿骨遠位部の

骨形成関連遺伝子の解析により、 $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスにおける *Runx2*、*Osx*、*OC* の mRNA 発現が有意に減少していた。この結果は、マウスにおける α_{1B} -AR ノックアウトが骨形成を抑制することを示している。一方、脛骨の脱灰切片の TRAP 染色実験により骨吸収パラメーターである Oc.S/BS と Oc.N/BS について、 $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスと WT マウスに差が認められなかった。この結果は、マウスにおける α_{1B} -AR ノックアウトが骨吸収に影響しないことを示している。

(3) α_1 -AR シグナルの標的分子を同定するため、フェニレフリン処理した MC3T3-E1 細胞における遺伝子変動をマイクロアレイ解析し、CCAAT-enhancer binding protein δ (*Cebp δ* 、*Cebpd*) の発現の著しい増加を認めた。フェニレフリン処理 2 時間後をピークとして、MC3T3-E1 細胞に *Cebpd* mRNA の有意な発現増大を認め、この発現増大はプラゾシンにより消失した。さらに、 α_1 -AR シグナルを薬理的に遮断するプラゾシンは大腿骨遠位部における *Cebpd* mRNA の発現を有意に抑制した。さらに、 $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスの *Cebpd* mRNA 発現は、WT マウスに比し有意に減少していた。この結果は、骨芽細胞における α_{1B} -AR シグナルが *Cebpd* の発現制御に重要な役割を果たしている可能性を示した。また、 α_1 -AR シグナルが破骨細胞形成抑制因子の *Tnfrsf11b* 発現を、時計遺伝子を介して、促進していることも見出している。

(4) α_1 -AR シグナルが骨芽細胞の増殖を制御している可能性を踏まえ、*Cebpd* と細胞増殖活性との関わりを検討した。siRNA (siRNA-*Cebpd*) を導入し *Cebpd* をノックダウンした MC3T3-E1 細胞において、BrdU の取り込みにより細胞増殖活性を調べたところ、取り込みの有意な減少が認められた。また、cyclin E1 をコードしている *Ccne1* mRNA

の発現も有意に減少していた。さらに、Cebpd 安定過剰発現株において検討したところ、BrdU 取り込みの有意な増加が認められた。この結果は、Cebpd が骨芽細胞の増殖を促進している可能性を示している。

(5) これらの本研究の結果から、交感神経系による骨代謝制御には β_2 -AR のみならず、 α_{1B} -AR も重要な生理的役割を担っていることを明らかにした。さらに、この α_{1B} -AR シグナルは骨形成の促進を介して骨量を増加させていることを示し、骨形成を促進する骨粗鬆症治療薬の開発に役立つものである。また、この α_1 -AR シグナルが骨芽細胞の Cebpd を正に制御することによりその増殖を促進し、骨形成の促進に関わっている可能性も示唆した。また、実験的歯の移動が α_1 -アドレナリン受容体シグナルにより影響を受けている可能性も得られている。

(6) モノアミンシグナルによる骨代謝制御を検討している途上、同様のアプローチを用いて、5-HT_{2A}R シグナルの骨代謝における生理的役割を明らかにした。5-HT_{2A}R シグナルの薬理的遮断はマウス大腿骨の骨量/組織量 (BV/TV) を有意に減少させ、その減少が骨形成の抑制に基づくことを形態計測により示した。また、骨芽細胞分化に関わる *Runx2*、*Osterix (Osx)*、*Osteocalcin (OC)* 発現の有意な低下も骨組織の遺伝子発現より観察した。さらに、培養細胞の MC3T3-E1 細胞においても、5-HT_{2A}R 遮断薬が骨芽細胞の分化マーカー ALP 活性を濃度依存的に抑制し、5-HT_{2A}R をノックダウンした C3H10T1/2 細胞における *Osx* mRNA の著しい発現低下も認めた。これらの結果は、骨芽細胞における 5-HT_{2A}R シグナルの薬理的な遮断は *Osx* 遺伝子による骨芽細胞の分化を抑制し、骨形成の抑制に基づいた骨量の減少を惹起してことを示している。

(7) 本研究では、 α_{1B} -AR と同様に 5-HT_{2A}R も骨量を正に制御していること、5-HT が骨芽細胞に発現する 5-HT_{2A}R を介して骨芽細胞分化を正に制御すること、および、NA が骨芽細胞に発現する α_{1B} -AR を介して Cebpd 発現を正に制御することで細胞増殖を促進することを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Tanaka K, [Hirai T](#), [Kondo H](#), [Kodama D](#), [Hamamura K](#), [Togari A](#): α_{1B} -adrenergic receptor signaling regulates bone formation through the up-regulation of CCAAT/enhancer-binding protein delta expression in osteoblasts. *British Journal of Pharmacology*, 査読有, 173(6): 1058-1069, 2016. DOI:10.1111/bph.13418

Tanaka K, [Hirai T](#), [Kondo H](#), [Kodama D](#), [Hamamura K](#), [Togari A](#): Pharmacological blockade of 5-HT_{2B} receptor signaling impairs bone formation in mice. *Aichi Gakuin Dental Science*, 査読有, 29: 2016.

[Hirai T](#), Tanaka K, [Togari A](#): α_{1B} -adrenergic receptor signaling controls circadian expression of *Tnfrsf11b* gene by regulating clock genes in osteoblasts. *Biology Open*, 査読有, 4(11): 1400-1409, 2015. DOI:10.1242/bio.012617

Tanaka K, [Hirai T](#), [Ishibashi Y](#), [Izumo N](#), [Togari A](#): Modulation of osteoblast differentiation and bone mass by 5-HT_{2A} receptor signaling in mice. *European Journal of Pharmacology*, 査読有, 762:150-157,

[学会発表] (計 10 件)

林 香里, 近藤 久貴, 宮澤 健, 後藤 滋巳, 戸蒔 彰史: 実験的歯の移動による破骨細胞と歯の移動量におけるアドレナリン α 受容体の関与. 第130回日本薬理学会近畿部会, 2016.11.19, 京都大学百周年時計台記念館(京都市左京区吉田本町).

林 香里, 近藤 久貴, 宮澤 健, 後藤 滋巳, 戸蒔 彰史: アドレナリン α_{1B} 受容体ノックアウトマウスでは破骨細胞誘導抑制により実験的歯の移動が抑制される. 第34回日本骨代謝学会学術集会・第3回アジア太平洋骨代謝学会議, 2016.7.21, 大阪国際会議場(大阪市北区中之島).

平居 貴生, 田中 健二郎, 戸蒔 彰史: α_{1B} -adrenergic receptor signaling controls circadian expression of the osteoprotegerin by regulating clock genes in osteoblasts. 第22回日本時間生物学会学術大会, 2015.11.22, 東京大学本郷キャンパス(東京都文京区本郷).

田中 健二郎, 平居 貴生, 戸蒔 彰史: 交感神経系による骨形成制御には α_{1B} -アドレナリン受容体シグナルが関与する. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015.9.12, 朱鷺メッセ(新潟市中央区代島).

田中 健二郎, 平居 貴生, 戸蒔 彰史: α_{1B} -アドレナリン受容体シグナルは骨形成を制御する. 第35回日本歯科薬物療法学会学術大会, 2015.6.21, 鶴見大学会館(横浜市鶴見区豊岡町).

田中 健二郎, 平居 貴生, 戸蒔 彰史: α_1 -アドレナリン受容体シグナルによる骨代謝制御の可能性. 第88回日本薬

理学会年会, 2015.3.20, 名古屋国際会議場(名古屋市熱田区熱田西町).

田中 健二郎, 平居 貴生, 戸蒔 彰史: α_1 -アドレナリン受容体シグナルによる骨代謝制御. 第51回日本口腔組織培養学会学術大会・総会, 2014.11.15, 九州歯科大学講堂(北九州市小倉北区真鶴).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸蒔 彰史 (TOGARI, Akifumi)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号 80126325

(2) 研究分担者

平居 貴生 (HIRAI, Takao)
愛知学院大学・薬学部・准教授
研究者番号 80389072

友寄 大介 (児玉 大介) (TOMOYOSE, Daisuke)
愛知学院大学・薬学部・講師
研究者番号 40549979

浜村 和紀 (HAMAMURA, Kazunori)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号 00422767

(追加:平成27年5月21日)

近藤 久貴 (KONDO, Hisataka)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号 40469002

(追加:平成27年5月21日)