

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10487

研究課題名(和文)骨代謝における低分子量ストレス蛋白質の分子標的の解析

研究課題名(英文)The molecular target of heat shock protein in bone metabolism

研究代表者

大塚 隆信(Otsuka, Takanobu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10185316

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)：ストレス蛋白質(heat shock protein; HSP)は熱刺激で誘導される一群の蛋白質の総称であり、分子シャペロンとして機能すると考えられている。本研究は骨芽細胞の増殖、分化、運動能等の細胞機能におけるHSPB(HSP27及びHSP22)の役割を検討した。その結果HSP27はPDGF-BBによる骨芽細胞のmigrationを抑制し、リン酸化型HSP27はその抑制効果をさらに増強することを明らかとした。一方、HSP22はTGF- $\beta$ による骨芽細胞のmigrationをSmad経路を介して抑制すること、及びTNF- $\alpha$ によるIL-6産生をmTORとの相互作用を介し促進することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Heat shock proteins (HSPs) are induced by a variety of physiological and environmental stresses, such as heat. As molecular chaperones, HSPs facilitate the refolding of unfolded proteins. However, the details behind the HSP-mediated effects on osteoblasts remain to be clarified. In the present study, in order to investigate the exact mechanism of HSPs in osteoblasts, we explored the molecular targets of HSP27 and HSP22 using osteoblast-like MC3T3-E1 cells. Our results strongly suggest that HSP27 functions as a negative regulator in the PDGF-BB-stimulated migration of osteoblasts, and the suppressive effect is amplified by the phosphorylation state of HSP27. HSP22 functions as a negative regulator in the TGF- $\beta$ -stimulated migration of osteoblasts via suppression of the Smad-dependent pathway. In addition, HSP22 interacts with mTOR and regulates TNF- $\alpha$ -induced IL-6 synthesis in osteoblasts.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨芽細胞 Heat shock protein HSP27 HSP22 骨代謝 骨粗鬆症

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では骨粗鬆症患者は年々増加の一途をたどっているが、その病態、治療法は解決すべき事項が多い。適切な治療がなされないと日常生活活動(ADL)や生活の質(QOL)が悪化し高齢化を迎えている我が国では社会的損失が大きい。細胞生物学的観点からは、骨代謝は、種々の外的刺激に対して骨吸収と骨形成とが活発に繰り返され(骨リモデリング)、骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞によって、巧緻に制御されている。通常は骨吸収と骨形成が絶えず活発に行われながらも平衡状態を保ち、正常な骨量が維持されているが、ひとたびそのバランスが破綻すると骨粗鬆症に代表される代謝性骨疾患が生じる。近年、骨吸収因子の受容体が、骨芽細胞に存在することが明らかとなり、骨芽細胞はその細胞膜上の receptor activation of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) 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、骨代謝の中心的な役割を担っていることが明らかとなったが、骨代謝の調節機構の詳細は未だ解明されていない。従って、骨粗鬆症疾患をあらゆる側面から研究し、その克服が我が国の重要な医学的・社会的課題である。

我々は骨代謝制御の中心的役割を担う骨芽細胞の増殖・分化の制御機構を検討し、骨代謝調節因子の細胞内情報伝達機序の詳細を明らかとしてきた。骨代謝における生体制御機構の解析という構想のなかで、特に heat shock protein (HSP) と称される一連のタンパク質に着目し、骨代謝におけるその役割について解析を進めてきた。HSP は近年では熱刺激のみならず様々な外的ストレスに反応して発現されることが明らかとなり、現在ではストレスタンパク質と総称されている。HSP は、変性した蛋白質の三次元的構造の乱れを還元する (refolding) 分子シャペロンとしての機能を有し、生体防御機構において中心的な役割を担うタンパク質であるが、骨代謝におけるその役割の詳細は未だ明らかとされていない。また、HSP はその分子量によって高分子量 HSP 及び低分子量 HSP (分子量 10-30kDa) との二つの群に大別されている。高分子量 HSP の分子シャペロンとしての機能はよく知られているが、低分子量 HSP の分子シャペロンとしての詳細は未だ明らかとされていない。

我々はこれまでに低分子量 HSP の 1 種である HSP27 (HSPB1) に注目し、骨代謝及び骨折治癒に重要な骨代謝調節因子である fibroblast growth factor-2 (FGF-2)、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 及び sphingosine 1-phosphate などが、特異的に HSP27 の発現を誘導することを明らかとしている。また、この HSP27 の誘導には mitogen-activated protein (MAP) kinase が関与し、レチノイドが相乗的に作用することを明らかにしている。加えて、非リン酸化型の HSP27 が石灰化を抑制することも報告し

ている。

一方、HSP22 (HSPB8) が骨芽細胞において恒常的に発現していることを見出している。以上から、低分子量 HSP が骨代謝を制御する骨芽細胞や破骨細胞の分化や細胞機能を調整している可能性は非常に高く、本研究では骨芽細胞の増殖、分化、運動能等の細胞機能における HSPB の役割を検討し、さらにその分子標的を同定することを目的とした。骨代謝における HSPB の機能が解明されれば、骨代謝異常を制御しうる可能性があり、新たな治療薬開発の可能性が高いと考えられる。本研究が、現在までの骨粗鬆症疾患の治療体系に大きな変化をもたらす可能性があり、整形外科の発展に大いに資する重要な研究であると考えている。

## 2. 研究の目的

- (1) HSP27 が platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) 刺激による骨芽細胞の運動能 (migration) にどのような役割を果たしているのかを詳細に検討する。
- (2) HSP22 が TGF- $\beta$  刺激による骨芽細胞の migration にどのような役割を果たしているのかを詳細に検討する。
- (3) 骨芽細胞において、HSP22 が tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の interleukin-6 (IL-6) 産生過程にどのような役割を果たしているのかを詳細に検討する。

以上を検討し HSP27 及び HSP22 による骨代謝の制御機構の詳細を検討し、骨代謝異常の代表的疾患である骨粗鬆症の新たな治療法確立へ向けた基礎的研究を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞に HSP27 の発現ベクターを導入し、HSP27 の発現の有無によって、PDGF-BB 刺激による骨芽細胞の migration がどのように影響を受けるかを Boyden chamber 法を用いて明らかとする。HSP27 のセリン-15、セリン-78、セリン-82 の 3 箇所をアスパラギン酸に変異させた恒常的リン酸化型 HSP27 発現細胞株、上記 3 箇所をアラニンに変異させた恒常的非リン酸化型 HSP27 発現細胞株のベクターを作成し、MC3T3-E1 細胞への導入を行い、PDGF-BB による migration について比較検討する。PDGF-BB による migration が MAP kinase 経路を介しているかどうかを阻害剤 (SB203580、PD98059、SP600125) を用いて検討する。HSP27 の発現の有無によって、MAP kinase のリン酸化にどのように影響するのかを Western Blot 法を用いて検討する。

- (2) 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞に HSP22 の siRNA を導入し、HSP22 をノックダウンした細胞を用いて、HSP22 が TGF- $\beta$  刺激による骨芽細胞の migration にどのように影響するかを Boyden chamber 法を用いて明らかと

する。HSP22 の骨芽細胞の migration に対する作用が MAP kinase もしくは Smad 経路を介しているかどうかを検討するために、阻害剤 (SB203580、PD98059、SP600125、SIS3) を使用して TGF- $\beta$  刺激による migration がどのように影響を受けるかを検討する。HSP22 をノックダウンした細胞を用いて、HSP22 が Smad2 のリン酸化及び TGF- $\beta$  受容体 (RI 及び RII) の発現にどのように影響するのかを Western Blot 法及び qRT-PCR 法を用いて検討する。

(3) HSP22 をノックダウンした細胞を用いて、HSP22 が TNF- $\alpha$  による IL-6 産生の変化にどのように影響するかを ELISA 法を用いて明らかにする。HSP22 をノックダウンした細胞を用いて、HSP22 が TNF- $\alpha$  による p70 S6 kinase 及び p44/p42 MAP kinase のリン酸化にどのように影響するのかを Western Blot 法を用いて詳細に検討する。HSP22 をノックダウンした細胞を用いて、HSP22 が mTOR 及び p70 S6 kinase へ相互作用を示すかどうかを免疫沈降法を用いて詳細に検討する。

#### 4. 研究成果

(1) PDGF-BB は骨芽細胞における HSP27 のリン酸化を促進した。HSP27 を高発現した細胞において PDGF-BB による骨芽細胞の migration は抑制されることを示した。恒常的に HSP27 をリン酸化した細胞において PDGF-BB による migration はさらに抑制された。p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase 及び stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) の各阻害剤 (SB203580、PD98059、SP600125) は PDGF-BB による migration を抑制した。しかし、HSP27 を高発現した細胞において PDGF-BB による p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase 及び SAPK/JNK のリン酸化は何ら影響されなかった。以上のことから、HSP27 は PDGF-BB による骨芽細胞の migration を抑制的に制御し、リン酸化 HSP27 はその抑制効果をさらに増強することを明らかとした。さらに PDGF-BB は p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase 及び SAPK/JNK の活性化を介して骨芽細胞の migration を促進すること、また HSP27 はこれらの経路の下流もしくはその他の経路でその migration を抑制していることを明らかとした。

(2) HSP22 をノックダウンした細胞において TGF- $\beta$  による骨芽細胞の migration は促進されることを示した。HSP22 をノックダウンした細胞において TGF- $\beta$  による Smad2 のリン酸化は増強された。また、同細胞で TGF- $\beta$  受容体である RII のタンパク発現レベルは促進したが、mRNA 発現は変化しなかった。SIS3 (Smad3 阻害剤) は HSP22 をノックダウンした細胞において TGF- $\beta$  による migration を抑制した。以上のことから、

HSP22 は TGF- $\beta$  による骨芽細胞の migration を抑制的に制御すること、またその抑制経路は TGF- $\beta$  受容体の degradation を促進し Smad 経路を介していることを明らかとした。

(3) HSP22 をノックダウンした細胞において TNF- $\alpha$  による IL-6 産生は阻害されることを示した。また HSP22 をノックダウンした細胞において TNF- $\alpha$  による p70 S6 kinase のリン酸化は増強された。一方、p44/p42 MAP kinase のリン酸化は抑制された。さらに HSP22 は p70 S6 kinase ではなく mTOR と結合を示した。また HSP22 をノックダウンした細胞において mTOR のリン酸化は増強された。以上のことから、骨芽細胞において HSP22 は mTOR と相互作用し、TNF- $\alpha$  による IL-6 産生を促進的に制御していることを明らかとした。

今後も、骨芽細胞においてさらなる HSPB の役割を検討すべく研究を続けていく所存である。

#### 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 24 件)

(1) Sakai G, Tokuda H, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Fujita K, Kawabata T, Kozawa O, Otsuka T. Association of HSP22 with mTOR in osteoblasts: regulation of TNF- $\alpha$ -stimulated IL-6 synthesis. FEBS Lett. 査読有 592 巻, 2018, 1202-1210. doi: 10.1002/1873-3468.13028.

(2) Sakai G, Tokuda H, Fujita K, Kainuma S, Kawabata T, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T. Heat shock protein 70 negatively regulates TGF- $\beta$ -stimulated VEGF Synthesis via p38 MAP kinase in osteoblasts. Cell Physiol Biochem. 査読有 44 巻, 2017, 1133-1145. doi: 10.1159/000485418.

(3) Kawabata T, Otsuka T, Fujita K, Kainuma S, Yamamoto N, Kuroyanagi G, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Suppression by HSP90 inhibitors of BMP-4-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts: Attenuation of p70 S6 kinase. Mol Med Rep. 査読有 16 巻, 2017, 8507-8512. doi: 10.3892/mmr.2017.7639.

(4) Kawabata T, Tokuda H, Fujita K, Kainuma S, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T.

Resveratrol inhibits the epidermal growth factor-induced migration of osteoblasts: the suppression of SAPK/JNK and Akt. *Cell Physiol Biochem*. 査読有 43 卷, 2017, 1025-1036.

doi: 10.1159/000481700.

(5) Kainuma S, Tokuda H, Yamamoto N, Kuroyanagi G, Fujita K, Kawabata T, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T.

Heat shock protein 27 (HSPB1) suppresses the PDGF-BB-induced migration of osteoblasts.

*Int J Mol Med*. 査読有 40 卷, 2017, 1057-1066.

doi: 10.3892/ijmm.2017.3119.

(6) Sakai G, Otsuka T, Fujita K, Kainuma S, Kuroyanagi G, Kawabata T, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H.

Amplification by (-)-epigallocatechin gallate of prostaglandin F<sub>2</sub>α-stimulated synthesis of osteoprotegerin in osteoblasts.

*Mol Med Rep*. 査読有 16 卷, 2017, 6376-6381.

doi: 10.3892/mmr.2017.7354.

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

Resveratrol suppresses thyroid hormone-induced osteocalcin synthesis in osteoblasts.

*Mol Med Rep*. 査読有 16 卷, 2017, 2881-2886.

doi: 10.3892/mmr.2017.6872.

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

(-)-Epigallocatechin gallate but not chlorogenic acid upregulates osteoprotegerin synthesis through regulation of bone morphogenetic protein-4 in osteoblasts.

*Exp Ther Med*. 査読有 14 卷, 2017, 417-423.

doi: 10.3892/etm.2017.4491.

(9) Fujita K, Tokuda H, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Kainuma S, Kawabata T, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T.

HSP90 inhibitors potentiate PGF<sub>2</sub> -induced IL-6 synthesis via p38 MAP kinase in osteoblasts.

*PLoS One*. 査読有 12 卷, 2017, e0177878.

doi: 10.1371/journal.pone.0177878.

(10) Kuroyanagi G, Tokuda H, Yamamoto N, Kainuma S, Fujita K, Ohguchi R, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T.

Attenuation of prostaglandin E<sub>1</sub>-induced osteoprotegerin synthesis in osteoblasts by normoxic HIF inducers.

*Mol Med Rep*. 査読有 15 卷, 2017, 1847-1852.

doi: 10.3892/mmr.2017.6177.

(11) Fujita K, Tokuda H, Yamamoto N, Kainuma S, Kawabata T, Sakai G, Kuroyanagi G, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O, 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 卷, 2017, 1053-1060.

doi: 10.3892/ijmm.2017.2892.

(12) Kuroyanagi G, Tokuda H, Yamamoto N, Kainuma S, Fujita K, Ohguchi R, Kawabata T, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O, Otsuka T.

(-)-Epigallocatechin gallate synergistically potentiates prostaglandin E<sub>2</sub>-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts.

*Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 査読有 128-129 卷, 2017, 27-33.

doi:

10.1016/j.prostaglandins.2017.02.001.

(13) Kainuma S, Tokuda H, Fujita K, Kawabata T, Sakai G, Matsushima-Nishiwaki R, Harada A, Kozawa O, Otsuka T.

Attenuation by incretins of thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts.

*Biomed Rep*. 査読有 5 卷, 2016, 771-775.

doi: 10.3892/br.2016.798.

(14) Yamamoto N, Tokuda H, Kuroyanagi G, Kainuma S, Matsushima-Nishiwaki R, Fujita K, Kozawa O, Otsuka T.

Heat shock protein 22 (HSPB8) limits TGF- $\beta$ -stimulated migration of osteoblasts.

*Mol Cell Endocrinol*. 査読有 436 卷, 2016, 1-9.

doi: 10.1016/j.mce.2016.07.011.

(15) Kainuma S, Otsuka T, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H.

Possible involvement of AMP-activated protein kinase in PGE<sub>1</sub>-induced synthesis of osteoprotegerin in osteoblasts.

Exp Ther Med. 査読有 11 巻, 2016, 2042-2048.

(16) Kainuma S, Otsuka T, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Regulation by AMP-activated protein kinase of PGE2-induced osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. Mol Med Rep. 査読有 13 巻, 2016, 3363-3369. doi: 10.3892/mmr.2016.4900.

(17) Kuroyanagi G, Otsuka T, Yamamoto N, Kainuma S, Ohguchi R, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Mimosine suppresses the PGF2 $\alpha$ -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.

(18) Yamamoto N, Tokuda H, Kuroyanagi G, Kainuma S, Ohguchi R, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, 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.

(19) Kainuma S, Tokuda H, Kuroyanagi G, Yamamoto N, Ohguchi R, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Otsuka T. PGD2 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.

(20) Kuroyanagi G, Tokuda H, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, 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.

(21) Kuroyanagi G, Otsuka T, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Resveratrol suppresses TGF $\beta$ -induced

VEGF synthesis in osteoblasts: Inhibition of the p44/p42 MAPKs and SAPK/JNK pathways. Exp Ther Med. 査読有 9 巻, 2015, 2303-2310.

(22) Kuroyanagi G, Tokuda H, Yamamoto N, Matsushima-Nishiwaki R, Mizutani J, Kozawa O, 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.

(23) Yamamoto N, Otsuka T, Kuroyanagi G, Kondo A, Kainuma S, Nakakami A, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Resveratrol reduces prostaglandin E1-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts: suppression of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 査読有 116-117 巻, 2015, 57-63. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2015.01.003.

(24) Yamamoto N, Otsuka T, Kondo A, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Kozawa O, 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.

〔学会発表〕(計 3 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 PGF2 $\alpha$ 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 長崎ブリックホール(長崎県、長崎市)

(2) 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- $\beta$ による VEGF 産生への役割の検討  
第 1 回日本骨免疫学会ウインターセミナー  
2016 年 1 月 28 日 ホテル マロウド軽井沢(長野県、軽井沢)

(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

骨芽細胞において Rac は TGF- $\beta$  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 富山国際会議場(富山県、富山市)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大塚 隆信 (OTSUKA TAKANOBU)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：10185316

### (2) 研究分担者

水谷 潤 (MIZUTANI JUN)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：70326156

### (2) 研究分担者

鈴木 伸幸 (SUZUKI NOBUYUKI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：50551230

### (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