

令和元年6月5日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09224

研究課題名(和文) 薬毒物が骨リモデリングに与える影響 骨形成と骨吸収の両側面からの検討

研究課題名(英文) Effect of toxic substances on bone remodeling -bone forming and bone resorption-

研究代表者

菅野 さな枝 (Kanno, Sanae)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50391090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において薬毒物の骨リモデリングへの影響を調べた。最初に、薬毒物の骨形成に与える影響について、分化に伴い石灰化を誘導するマウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞を用いて実験を行った。法医学で重要な薬毒物として依存性により慢性的な使用が問題となっている覚せい剤のメタンフェタミンとコカインについて調べた。各々の薬物の分化への影響と細胞への蓄積を調べた。その結果、どちらもリモデリングが崩れることがわかった。この結果、これらの長期的使用により、骨形成が悪影響を受ける可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、依存性薬物の使用による骨リモデリングのアンバランスを引き起こす可能性があることを示した。慢性的な使用により依存性薬物が骨に蓄積する可能性も示唆された。これらの結果は、慢性的な使用による生体への悪影響の懸念を高めるものあり、大きな社会問題となっている依存性薬物の使用に警鐘を鳴らす、貴重なデータが得られたと考えられる。しかし、本研究ではまだ依存性薬物として広く使用されている2薬物だけである上に、分化条件下、未分化条件下での細胞への薬物蓄積には両薬物間で一貫性が認められなかった。今後、さらに多くの薬物を対象とした詳細な研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that the chronic exposure to cocaine can lead to an adverse effect on skeletal development and caused to accumulation of cocaine in bone in rat experiment. However, the accumulation mechanisms of abused drugs, such as methamphetamine (MAP) or cocaine, in the bone have not been well documented. MC3T3-E1 cells, a mouse osteoblast-like cell line, can induce osteoblastic differentiation and mineralization. In this study, we investigated the effect of cocaine or methamphetamine (MAP) on cellular proliferation, osteoblastic differentiation and mineralization using MC3T3-E1 cells. These results indicate that chronic exposure to cocaine or MAP might have an adverse effect on bone development. Furthermore, to examine whether cellular accumulations of MAP and its main metabolite, amphetamine (AP), and cocaine and benzoylecgonine (BE), and are changed by mineralization, we compared their concentrations in the cells between with and without mineralization by LC-MS/MS.

研究分野：細胞毒性

キーワード：骨芽細胞 依存性薬物 骨リモデリング 分化 細胞内蓄積

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

法医学において中毒の原因となる薬毒物には、依存性を持つものが多い。近年、依存性薬物の乱用も大きな社会問題となっている。依存性薬物の中枢神経系や心臓に及ぼす影響についての報告は多く見られる。しかし、薬毒物の使用、特に長期の薬物乱用により、骨リモデリングのアンバランスを引き起こすことが懸念されるが、骨リモデリングへの影響はほとんど調べられていない。最近の報告で、動物にコカインを7日間暴露したマウスの骨中濃度分析の結果、骨にコカインが蓄積し、血中濃度と高い相関性を持つことが報告された。薬毒物の慢性暴露においては、骨が薬毒物の貯蔵庫となっている可能性がある。腐敗や白骨化のため体液や組織が採取できない場合は、すでに分析試料として使用されている硬組織である爪、毛髪などと同様に骨も分析試料となる可能性があるが、骨への蓄積については不明な点が多く、今後の研究が必要である。

2. 研究の目的

薬毒物、特に依存性を持つ薬物の長期連用により身体への様々な悪影響が知られている。最近、依存性薬物の長期連用者や長期投与ラットの骨密度減少の報告がされた。骨は常に新しく形成されていることから、長期間の乱用により骨リモデリング(骨代謝)への悪影響が懸念されるものの、実験的にそれらの影響やメカニズムについて調べた研究はきわめて少ない。また薬毒物によっては骨形成に伴い骨に蓄積し、破骨細胞による骨吸収により持続的に低濃度で血中に再度分散することが予想される。本研究では、薬毒物による骨リモデリングへの影響を調べるため、第一段階として骨芽細胞による骨形成への影響から調べた。また、骨芽細胞分化に伴う骨形成時の薬物の蓄積についても調べ、鑑定時の分析試料になるか基礎データを構築する。

3. 研究の方法

依存性が大きな社会問題である覚せい剤の一つメタンフェタミン(MAP)とコカインを実験対象とし、以下に示す方法で実験を行った。本研究では、分化に伴い骨形成をすることが知られている、骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞を使用した。

(1) メタンフェタミンが骨形成に与える影響

MC3T3-E1細胞にMAPを2日間暴露し、細胞増殖能をAlamarBlue®にて調べた。この結果より、MAP暴露による細胞生存率実験を行い、生存率に影響を与えない濃度である20及び100µMを実験に用いた。培養液は、alpha-MEM(10%牛胎児血清含有)に10mM beta-glycerophosphate(beta-GP)、50µg/mL ascorbic acid及び10⁻⁶M beta-estradiolを添加し、分化促進培養液とした。MC3T3-E1細胞を分化又は未分化条件下、MAP暴露下で20日間培養した。分化の指標としてアルカリフォスファターゼ(ALP)の活性測定、及びALPと骨芽細胞分化に関わる転写因子であるRunx2(RUNX2)のmRNA発現量をRT-PCR法により解析した。細胞へのMAP及びその主代謝物であるアンフェタミン(AP)の蓄積は、LC-MS/MSを用いて測定した。

(2) コカインが骨形成に与える影響

MC3T3-E1細胞にコカイン0.1mMを3日間暴露し、細胞増殖能をAlamarBlue®にて調べた。分化への影響を調べるために、分化促進剤として10mM beta-GP及び50µg/mL ascorbic acid存在下、又は非存在(未分化群)下で、コカイン20-100µMを暴露し、21日間培養を行った。ALPの活性測定、カルシウムの沈着(Von Kossa staining)、石灰化骨様結節数計測、及びオステオカルシン(OCN)と骨芽細胞分化に関わる転写因子であるRUNX2のmRNA発現量をRT-PCR法により解析した。細胞への蓄積は、コカイン暴露12日間後の細胞を溶解させ、コカイン及びその主代謝物であるベンゾイルエクゴニン(BE)をLC-MS/MSを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) メタンフェタミンが骨形成に及ぼす影響
MAP 曝露による細胞生存率実験を行い、生存率に影響を与えない濃度である 20 及び 100 μM を実験に用いた (Fig. 1)。分化条件下の培養では、未分化細胞に比べ ALP の活性が増加し、MAP によりその活性は抑制された。一方、分化に伴い ALP と RUNX2 の mRNA 発現量は増加したが、MAP 曝露による大きな変化は見られなかった。細胞内 MAP 及び代謝物で

ある AP 濃度は MAP の曝露濃度依存的に増加が見られた (Fig. 2)。MAP の骨への蓄積が報告されているため、分化による石灰化に伴い細胞内 MAP 濃度の増加が推定されたが、予測に反し、分化細胞は未分化細胞に比べ、MAP 及び AP 濃度共に減少した。

(2) コカインが骨形成に及ぼす影響
コカイン曝露により細胞増殖が促進された (Fig. 3)。500 μM のコカイン曝露では、コントロールに比べ約 1.4 倍に増加した。分化促進条件下では、未分化群に比較し、培養期間依存的に ALP 活性が増加した。分化条件下での 21 日間培養により増加した ALP 活性は、20, 100 μM コカイン曝露によりさらに増加し、20 μM では約 1.4 倍に増加した。石灰化結節数は分化条件下で 20 mM コカイン曝露で増加した (Fig. 4, 5)。石灰化結節数へのコカインの影響は、培養初期で顕著であったことよりコカインが分化初期段階に関わっている可能性が示唆された。Ca の沈着は未分化群では検出されなかったが、分化条件では検出され、その沈着量は 20 μM のコカイン曝露で促進された。また、RT-PCR の結果、20, 100 μM コカインで OCN の発現量は増加傾向

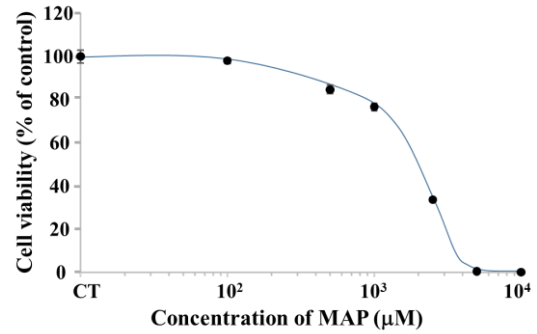


Fig.1 Cytotoxicity of methamphetamine in MC3T3-E1 cells. Cells were cultured in a 96-well plate overnight. The cells were further cultured with methamphetamine (MAP, 0- 10^4 μM) for 48 hrs. The cell viability was evaluated with Alamar Blue®. Data are presented as means \pm SD (N=4).

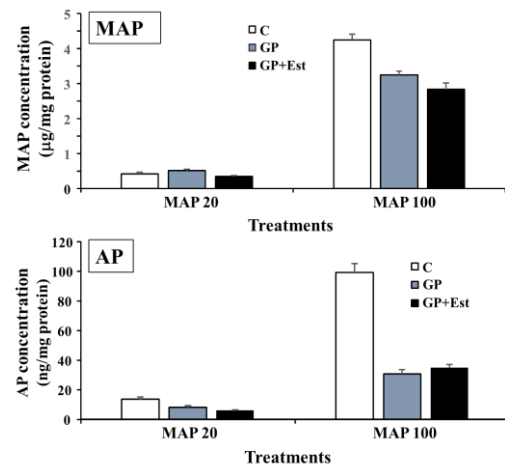


Fig. 2 Effects of osteoblastic differentiation on methamphetamine (MAP) and amphetamine (AP) accumulation in MC3T3-E1 cells.

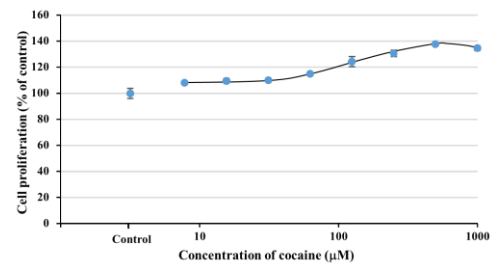


Fig. 3 Effect of cocaine on osteoblast proliferation. MC3T3-E1 cells were pre-cultured in a 96-well plate overnight. The cells were exposed to cocaine for 72 h. Cell viability was evaluated with Alamar Blue®. Data are presented as means \pm SD (N=4).

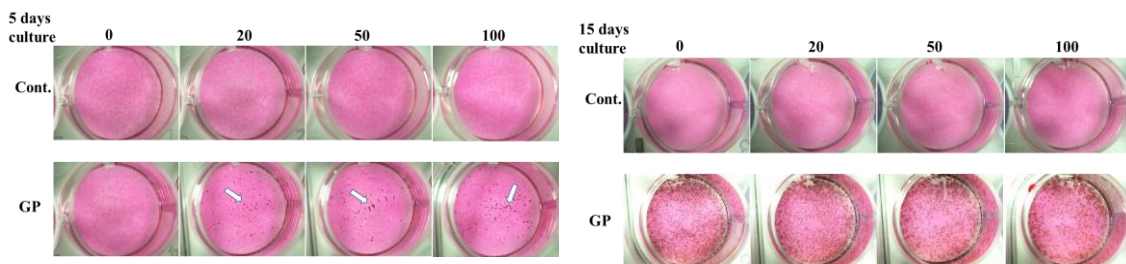


Fig. 4 MC3T3-E1 cells were incubated with or without β -GP in the presence of 0-100 μM cocaine. After the culture of 5 days or 15 days, Ca deposition was determined by von Kossa staining. Black areas indicated by white arrows show Ca deposition.

を示したが、RUNX2 は変化が見られなかった。一方、未分化条件下では、コカインは ALP の活性及び石灰化に影響を与えなかった。細胞への蓄積は、LC-MS/MS を用いて測定した。その結果、細胞プレート一穴当たりのコカイン及び代謝物である BE 濃度は、曝露したコカイン濃度依存的な増加が認められた (Fig. 6)。コカインは分化条件下で培養した群の方が未分化群に比較し高濃度を示した。しかし、主代謝物

BE の蓄積は、分化条件、未分化条件間で差が認められなかった。以上の結果より、コカインの蓄積量の差は細胞内への蓄積でなく、細胞の表面への接着の可能性も考えられる。

本研究の結果より、骨芽細胞への MAP やコカインなどの依存性薬物の曝露により、骨リモデリングのバ

ランスが崩れる可能性が示唆された。今まで骨への影響を調べた研究は少ないため、本研究は今後の骨への影響の基礎データとなり得る。また、骨芽細胞に蓄積していくことより、薬物の骨への蓄積も推定され、法医学解剖における貴重な体内試料となり得ることも示唆された。今回の実験では破骨細胞の結果を出すことができなかった。今後、破骨細胞の分化への影響を調べることにより、より詳細な意義のある研究成果となるものと思われる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

- ① Sanae Kanno, Jun Otaki, Hodeaki Kato, Mamiko Fukuta, Yoshimi Nakamura, Tetsuya Horita, Yasuhiro Aoki. Cellular accumulation of cocaine following osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. March 11-14, 2019. The 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, Baltimore, MD, USA
- ② 菅野さな枝：コカインが骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の分化に及ぼす影響 平成 30 年 7 月 6-7 日 第 37 年次日本法中毒学会 東京
- ③ 菅野さな枝：骨芽細胞分化に伴うメタンフェタミンの細胞内蓄積と分化指標への影響 平成 29 年 6 月 8-9 日 第 101 年次日本法医学会 岐阜

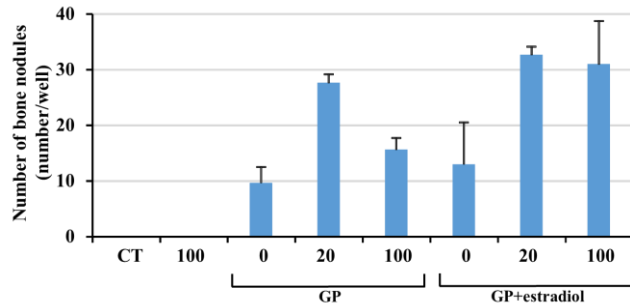


Fig. 5 Effects of cocaine on number of bone nodules. Cells were plated 24-well plate. After 3 days culture, cells were cultured with cocaine (20 or 100 μ M) in the absence or presence of both 10 mM β -GP and 10 μ M β -estradiol for 5 days. The number of bone nodules were measured under microscopic observation.

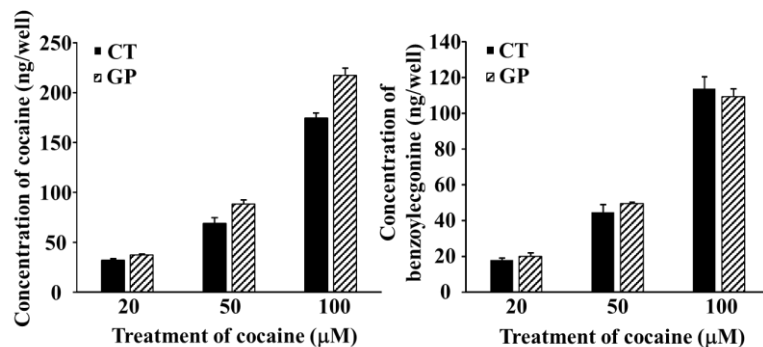


Fig. 6 Effect of differentiation on accumulation of cocaine and benzoylecgonine in MC3T3-E1 cells. Cells were plated 24-well plate. After 3 days culture, cells were cultured with cocaine (20-100 μ M) in the absence or presence of both 10 mM β -GP for 12 days. Concentrations of Cocaine and Benzoylecgonine were analyzed by LC-MS/MS.