

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007~2008

課題番号:19591042

研究課題名(和文)骨代謝における生体防御機構の分子基盤の解析:ストレス蛋白質の機能解析

研究課題名(英文)Molecular mechanism of chaperone properties in bone metabolism

研究代表者

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

研究成果の概要: ストレス蛋白質は、熱や化学物質などのストレスにより組織・細胞内に誘導される一群のタンパク質の総称である。低分子量ストレス蛋白質がどのようなメカニズムで、骨代謝を調節しているのかについては不明である。本研究では、骨芽細胞において、低分子量ストレス蛋白質の HSP27 誘導の分子機序の一部を明らかとした。本結果は、骨粗鬆症に対する薬物治療法への応用に極めて重要かつ有用であると考えられる。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・代謝学

キーワード:ストレス蛋白質、マップキナーゼ、骨芽細胞、カテキン、ポリフェノール

## 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は高齢化社会を向か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、また“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。しかし、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

の解明は急務となっている。

## 2. 研究の目的

細胞がストレスに曝露されると、一連のストレス蛋白質(heat shock protein, HSP)が誘導される。HSPはその分子量によって、高分子量HSPと低分子量HSPの2つのグループに分けられている。高分子量HSPは生体防御において分子シャペロンとして中心的役割を果たすことがよく知られている。一方、HSP27は低分子量HSPファミリーの一員であり、種々の組織に存在することが報告されている。しかしHSP27の生理的役割の詳細は未だ明らかとされていない。今回、骨代謝において中心的役割を担う骨芽細胞におい

て、TGF- $\beta$ による誘導される HSP27 に対する緑茶の主要なポリフェノール成分であるカテキンの影響および骨代謝調節因子である sphingosine 1-phosphate (S-1-P)による HSP27 の誘導における Rho キナーゼの役割につき検討した。

### 3. 研究の方法

培養骨芽細胞(MC3T3-E1 細胞)を用い、カテキン及び種々の薬剤で前処置した後、TGF- $\beta$ および sphingosine 1-phosphate で細胞を刺激し誘導された HSP27 のレベルを Western blot 法で検討した。

### 4. 研究成果

- (1)カテキンは HSP70 のレベルには何ら影響しなかったが、用量依存的に TGF- $\beta$ によって誘導される HSP27 のレベルを抑制した。
- (2)TGF- $\beta$ は MAP キナーゼスーパーファミリの 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 HSP27 を誘導した。
- (3)カテキンは TGF- $\beta$ による p44/p42 MAP キナーゼ,および p38 MAP キナーゼの活性化には何ら影響しなかったが、SAPK/JNK の活性化を抑制した。
- (4)sphingosine 1-phosphate (S-1-P)は Rho キナーゼの基質である MYPT-1 のリン酸化を促進した。一方、Rho キナーゼの阻害剤である Y27632 及び fasudil はそのリン酸化を抑制した。
- (5)Y27632 及び fasudil は S-1-P による HSP27 の誘導を抑制した。
- (6)既に私共は S-1-P が p38 MAP キナーゼおよび PI3-キナーゼ/Akt の活性化を介して HSP27 を誘導することを報告している。今回、Y27632 及び fasudil は S-1-P による PI3-キナーゼ/Akt の活性化には何ら影響しなかったが、p38 MAP キナーゼの活性化を抑制した。

以上の結果から、骨芽細胞において、カテキンは SAPK/JNK の阻害を介し、TGF- $\beta$ による誘導される HSP27 を抑制することおよび Rho キナーゼは p38 MAP キナーゼの上流で機能し、S-1-P によって誘導される HSP27 を制御していることが明らかとなった。

### 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 17 件)

- ①Yamauchi J, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Minamitani C, Natsume H, Mizutani J,

Otsuka T, Takeda J, Harada A, Kozawa O and Tokuda H. Tacrolimus but not cyclosporine A enhances FGF-2-induced VEGF release in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2009;23:267-272. 査読 有

- ②Minamitani C, Otsuka T, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Hanai Y, Mizutani J, Tokuda H and Kozawa O. Involvement of Rho-kinase in sphingosine 1-phosphate-stimulated HSP27 induction in osteoblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2009;24:77-82. 査読 有

- ③Kuno M, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Harada A, Adachi S, Kozawa O and Tokuda H. Rho-kinase inhibitors decrease TGF- $\beta$ -stimulated VEGF synthesis through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblasts. *Biochem. Pharmacol.* 2009;77:196-203. 査読 有

- ④Tokuda H, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Adachi S, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T and Kozawa O. Function of Rho-kinase in prostaglandin D<sub>2</sub>-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2008;79:41-46. 査読 有

- ⑤Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Natsume H, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Tokuda H and Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate reduces platelet-derived growth factor-BB-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts: suppression of SAPK/JNK. *Mediators Inflamm.* 2008;2008:291808. 査読 有

- ⑥Minamitani C, Otsuka T, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Hanai Y, Mizutani J, Tokuda H and Kozawa O. Involvement of Rho-kinase in prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -stimulated interleukin-6 synthesis via p38 mitogen-activated protein kinase in osteoblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2008;291:27-32. 査読 有

- ⑦Hayashi K, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Kato K, Tokuda H and Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate reduces

- transforming growth factor  $\beta$ -stimulated HSP27 induction through the suppression of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblasts. *Life Sci.* 2008;82:1012-1017. 査読 有
- ⑧ Takai S, Hanai Y, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Otsuka T, Tokuda H and Kozawa O. p70 S6 kinase negatively regulates FGF-2-stimulated IL-6 synthesis in osteoblasts: function at a point downstream from protein kinase C. *J. Endocrinol.* 2008;197:131-137. 査読 有
- ⑨ Minamitani C, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Otsuka T, Kozawa O and Tokuda H. A case of raloxifene-induced acceleration of platelet aggregation. *Internal Med.* 2008;47:1523-1528. 査読 有
- ⑩ Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Harada A, Hosoi T, Ohta T and Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits basic fibroblast growth factor-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts. *Horm. Metab. Res.* 2008;40:674-678. 査読 有
- ⑪ Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Harada A, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, Ogura S and Kozawa O. Potentiation by platelet-derived growth factor-BB of FGF-2-stimulated VEGF release in osteoblasts. *J. Bone Miner. Metab.* 2008;26:335-341. 査読 有
- ⑫ Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Harada A, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Ohta T and Kozawa O. Platelet-derived growth factor-BB amplifies  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induced VEGF synthesis in osteoblasts: function of phosphatidylinositol 3-kinase. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2007;77:187-193. 査読 有
- ⑬ Yamauchi J, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Doi T, Kato H, Ogura S, Kato K, Tokuda H and Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate inhibits prostaglandin  $\text{D}_2$ -stimulated HSP27 induction via suppression of the p44/p42 MAP kinase pathway in osteoblasts. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2007;77:173-179. 査読 有
- ⑭ Tokuda H, Hanai Y, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Doi T, Harada A, Takai S and Kozawa O. Rho-kinase regulates endothelin-1-stimulated IL-6 synthesis via p38 MAP kinase in osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;362:799-804. 査読 有
- ⑮ Tokuda H, Takai S, Hanai Y, Matsushima-Nishiwaki R, Hosoi T, Harada A, Ohta T and Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate suppresses endothelin-1-induced interleukin-6 synthesis in osteoblasts: inhibition of p44/p42 MAP kinase activation. *FEBS Lett.* 2007;581:1311-1316. 査読 有
- ⑯ Takai S, Tokuda H, Hanai Y, Harada A, Yasuda E, Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, Ogura S, Ohta T and Kozawa O. Negative regulation by p70 S6 kinase of FGF-2-stimulated VEGF release through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 2007;22:337-346. 査読 有
- ⑰ Takai S, Tokuda H, Hanai Y and Kozawa O. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt limits FGF-2-induced VEGF release in osteoblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007;267:46-54. 査読 有
- ⑱ Takai S, Tokuda H, Hanai Y and Kozawa O. Limitation by p70 S6 kinase of PDGF-BB-induced IL-6 synthesis in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Metabolism* 2007;56:476-483. 査読 有
- ⑲ Tokuda H, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Hanai Y, Hosoi T, Harada A, Ohta T and Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate enhances prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$ -induced VEGF synthesis via up-regulating SAPK/JNK activation in osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* 2007;100:1146-1153. 査読 有

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

なし