

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007 ~ 2008
 課題番号： 19592280
 研究課題名 (和文) 骨芽細胞・骨芽様細胞を用いた加齢によるメカニカルストレス誘導骨形成・骨代謝の解析
 研究課題名 (英文) Analyses of mechanical stress-induced bone formation and metabolism on aging osteoblasts and osteo-like cells
 研究代表者
 楠美 昭則 (KUSUMI AKINORI)
 弘前大学・大学院医学研究科・客員研究員
 研究者番号： 20332494

研究成果の概要：

申請者は、一軸方向周期的伸展刺激 (以下、伸展刺激) 負荷された正常ヒト骨芽細胞の OPG/RANKL 産生制御について報告 (Kusumi A. et al. JBMM23.373-381.2005) してきたが、他の報告と OPG/RANKL 産生や、活性化する MAPK の経路に違いがあり、この矛盾の解析が急務であった。

そこで、本研究では、購入した正常ヒト骨芽細胞を継代培養してそれぞれの継代細胞に伸展刺激負荷し、第3継代と第5継代の正常ヒト骨芽細胞について比較解析したところ、第3継代では伸展刺激負荷で p38MAPK 経路活性化依存性の OPG 産生亢進、RANKL 産生抑制制御が認められたが、第5継代では伸展刺激負荷で ERK1/2 活性化し、OPG 産生抑制、RANKL mRNA 発現亢進となるが、OPG/RANKL 産生制御は ERK1/2 経路依存性ではなかった。つまり、申請者らの報告と他の報告との違いの重要なポイントは培養継代の影響である事がわかった。更に、骨芽細胞の継代による細胞老化の方向に研究を向けたかったが、老化関連遺伝子発現の変化は認められなかった。

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：歯学・外科系歯学

キーワード：細胞・組織、周期的伸展刺激、細胞老化、MAPK、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

加齢により発症する疾患は多く、骨の疾患である骨粗鬆症やリウマチ性関節炎なども同様である。骨疾患発症には力学的負荷の関

与も知られており、細胞レベルでの病気発症と加齢、力学的負荷との関連の解明が必要であった。研究開始当時から、動物個体の加齢のモデルとして、個体組織から分離した正常細胞を継代培養続けることで、この老化して

いく細胞を加齢・老化のモデルとして現在でも世界的に解析が行われている。

申請者らはこれまで骨再生・骨形成解析で、伸展刺激負荷した正常ヒト骨芽細胞内の、p38MAPK-OPG/RANKL カスケードと OPG/RANKL の拮抗的産生能を報告した (Kusumi A. et al. JBMM23.373-381.2005)。ところが、他の報告では、伸展刺激負荷による MAPK の活性化はほとんどが ERK1/2 活性化で、p38MAPK 活性化の報告は申請者らのみであったため、更に、OPG/RANKL 産生制御についても若干の違いがあり、これらの矛盾に対する解析が急務であった。他の報告では株化された骨芽細胞の解析が多いのに対し、申請者らは正常骨芽細胞を用いていたことから、更に、正常骨芽細胞の継代を繰り返すことで、その細胞の特徴が変化することを見出し、正常ヒト骨芽細胞の継代による特徴の変化と、伸展刺激に対する MAPK や OPG/RANKL 産生制御の反応性について解析を行った。

また、正常ヒト骨芽細胞によく似た、当大学樹立の Maus 骨腫瘍由来細胞株 NHOS を用いて、ヒト骨芽細胞と同様の解析を行う予定であった。

2. 研究の目的

骨疾患と加齢のモデルとして、継代を続けた正常ヒト骨芽細胞を用いた細胞レベルでの特徴の変化と加齢、メカニカルストレスとの関連の解明が必要である。特に本研究では、加齢ヒト骨芽細胞内の ERK1/2 活性化を伴った OPG/RANKL 産生制御が、ERK1/2 経路依存性かどうかの解明が必要であり、更に正常ヒト骨芽細胞と性格がよく似た Maus 骨腫瘍由来細胞株 NHOS を用いて、*in vivo/in vitro* の解析を行うことである。

3. 研究の方法

- (1)細胞は正常ヒト骨芽細胞(三光純薬)を購入して用いた。伸展刺激はシリコンチャンパーに 5×10^4 細胞を付着させ、培養細胞伸展装置 NS-300 (ストレッチス社)を用いて、7%、0.25Hz で1日4時間、3日間行う。
- (2)正常ヒト骨芽細胞の第3第5継代細胞を用いて伸展刺激負荷を行い、OPG/RANKL 産生について解析を ELISA 法と real-time RT-PCR 法 (ライトサイクラー、ロッシュ社)を用いて行う。特に、第5継代骨芽細胞を ERK1/2 活性化による経路等をウエスタンブロッティング法を用いて、重点的に解析する。
- (3)加齢・老化に関与する Ras 遺伝子、RAS タンパクの発現産生についてウエスタンブロッティング法を用いて解析する。

- (4)伸展刺激で関与する遺伝子として、Ras 以外の他の分子 (TNF レセプター family、チュープリン family) についてウエスタンブロッティング法や real-time RT-PCR 法を用いて解析を行う。
- (5)伸展刺激負荷した Maus 骨腫瘍由来細胞株 NHOS の解析を行う。

4. 研究成果

- (1)正常ヒト骨芽細胞を継代(第3、第5、第7継代)ごとに走査顕微鏡(IX70、オリンパス)を用いて形態的に解析すると、継体回数を増やすに従って、骨芽細胞は、細長く、一般的に知られる老化細胞の形態に変化していることがわかった。
- (2)伸展刺激負荷された正常ヒト骨芽細胞は第3代4継代では OPG 産生亢進するが、第5継代以降では OPG 産生抑制しており、第3継代と第5継代で有意差が認められ、拮抗的であった。
- (3)伸展刺激負荷された正常ヒト骨芽細胞は第3継代では OPG 産生(タンパク及び mRNA)亢進、sRANKL 産生と RANKL mRNA 発現の抑制が認められた。しかし第5継代では OPG (タンパク及び mRNA)産生抑制、RANKL mRNA 発現亢進した。sRANKL 産生は、亢進の傾向は見られたが、有意差は得られなかった。
- (4)伸展刺激負荷により、産生、発現が促される OPN (タンパク及び mRNA)産生能、NO 産生能、Cox-2 mRNA 発現能は、継代によって、拮抗的な産生、発現の影響はなかった。
- (5)伸展刺激負荷15分後にウエスタンブロッティング法で MAPK について解析したが、第3継代では p38MAPK 活性化、ERK1/2 不活化だが、第5継代では p38MAPK 不活化 ERK1/2 活性化が誘導された。JNK 活性化については第3、第5継代でも認められなかった。
- (6)伸展刺激負荷により第5継代骨芽細胞では、ERK1/2 が活性化するが、伸展前の前処理で ERK1/2 阻害剤 (PD98059) を用いた解析では OPG/RANKL 産生は、ERK1/2 活性化の依存性はなかった。
- (7)正常ヒト骨芽細胞は凍結した状態で購入するが、この凍結から融解する直後の骨芽細胞は p38MAPK 活性化が誘導されやすい可能性があるが、伸展刺激負荷しても、p38MAPK 活性化のしない第4、5、6継代の骨芽細胞に凍結・融解を行い伸展刺激負荷したが p38MAPK 活性化は認められなかった。
- (8)p38MAPK は第5継代骨芽細胞でも伸展刺激負荷すると最小限ながら活性化はするが、p38MAPK 阻害剤 (SB203580) 前処理によ

る伸展刺激負荷された正常ヒト骨芽細胞からの OPG/RANKL 産生制御には影響はなかった。

- (9) 伸展刺激負荷された正常ヒト骨芽細胞の第3、第5継代の細胞で Ras や活性化 Ras(リン酸化 MKK3, MKK6)の発現をウエスタンブロットリング法で解析したところタンパクレベルで影響なかった。同様に TNF レセプター family、チューブリン family についても、変化は認められなかった。
- (10) Ras 遺伝子発現が細胞継代に影響なかったことから、NHOS の解析はもっと考察があるため進まなかった。更に、研究室及び実験室の引越があり、研究が全く進まない時期があり、マウスの実験はほとんどできなかった。
- (11) 本研究のヒト骨芽細胞の結果は現在 Journal of Bone and Mineral Metabolism に掲載決定した。

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 13 件)

- 1) Nakagawa H, Matsumiya T, Sakaki H, Imaizumi T, Kubota K, Kusumi A, Kobayashi W, Kimura H. Expression of vascular endothelial growth factor by photodynamic therapy with mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 43. 544-550. 2007. 査読有.
- 2) Morohashi S, Kusumi T, Sato F, Odagiri H, Chiba H, Yoshihara S, Hakamada K, Sasaki M, Kijima H. Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. Int J Mol Med 20. 139-143. 2007. 査読有.
- 3) Omi H, Kusumi T, Kijima H, Toh S. Locally administered low-dose alendronate increases bone mineral density during distraction osteogenesis in a rabbit model. J Bone Joint Surg Br. 89. 984-988. 2007. 査読有.
- 4) Sato F, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Imaizumi T, Imanaka T, Kondo J, Koyanagi S, Noshiro M, Yoshida H, Kusumi T, Kato Y, Kijima H. Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates vascular endothelial growth factor expression. Genes Cells 13. 131-144. 2008. 査読有.
- 5) Kusumi T, Koie T, Tanaka M, Matsumoto K, Sato F, Kusumi A, Ohyama C, Kijima H. Immunohistochemical detection of the carcinoma in the specimen obtained radial prostatectomy following hormone therapy. Pathol Int 58. 687-691. 2008. 査読有.
- 6) Nishime C, Ohnishi Y, Suemizu H, Tamaoki N, Kusumi T, Sato F, Yamazaki H, Nakamura M, Ueyama Y, Kijima H. In vivo chemotherapeutic profile of human gallbladder small cell carcinoma. Biomed Res 29. 251-256. 2008. 査読有.
- 7) Kondo J, Sato F, Kusumi T, Liu Y, Motonari O, Sato T, Kijima H. Claudin-1 expression is induced by tumor necrosis factor-alpha in human pancreatic cancer cells. Int J Mol Med 22. 645-649. 2008. 査読有.
- 8) Nishi T, Kusumi T, Tanaka M, Sato F, Sasaki M, Kudo H, Kijima H. Establishment of transplantable murine osteosarcoma cell line with endochondral ossification. Anticancer Res 28. 1627-1631. 2008. 査読有.
- 9) Suzuki T, Sato F, Kondo J, Liu Y, Kusumi T, Fujimoto K, Kato Y, Sato T, Kijima H. Period is involved in the proliferation of human pancreatic MIA-PaCa2 cancer cells by TNF- α . Biomed Res 29. 99-103. 2008. 査読有.
- 10) Kusumi T, Minakawa M, Fukui K, Saito S, Ohashi M, Sato F, Fukuda I, Kijima H. Cardiac tumor comprising two components including typical myxoma and atypical hypercellularity suggesting a malignant change. Cardiovasc Pathol 10. 2008. 査読有.
- 11) Miyamoto K, Kusumi T, Sato F, Kawasaki H, Shibata S, Ohashi M, Hakamada K, Sasaki M, Kijima H. Decreased expression of claudin-1 is correlated with recurrence status in esophageal squamous cell carcinoma. Biomed Res 29. 71-76. 2008. 査読有.
- 12) 楠美智巳、津田英一、石橋恭之、楠美昭則、鬼島宏 関節遊離体の臨床病理：離断性骨軟骨炎を中心に。病理と臨床 27. 275-282. 2009. 査読無.
- 13) Kusumi A, Kusumi T, Miura J, Tateishi T. Passage-affected competitive regulation of osteoprotegerin synthesis and the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand mRNA expression in normal human osteoblasts stimulated by the application of cyclic tensile strain. J Bone Miner Metabolism in press. 査読有.

〔学会発表〕(計2件)

- 1)楠美昭則、他. 周期的伸展刺激負荷されたヒト骨芽細胞の培養継代回数による OPG 産生と sRANKL 発現制御の影響. 第 61 回日本口腔科学会学術集会. 2007.4.19. 神戸市.
- 2)楠美昭則. The influence of culture passages on OPG synthesis and RANKL mRNA expression in normal human osteoblasts stimulated with the application of cyclic tensile strain *in vitro*. 第 37 回日本免疫学会総会学術集会. 2007.11.20. 東京都.

〔図書〕(計1件)

- 1)Nakane A et al eds. Emerging Theories of Host Defense.総ページ 301.
Kusumi A, Sakaki H, Kusumi T, Nakagawa H, Kubota K, Oda M, Satoh H, Kimura H. The influence of serial passage on cyclic tensile strain-induced osteoprotegerin synthesis from normal human osteoblasts *in vitro*. Hirosaki University Press. 2007.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

弘前大学・大学院医学研究科・
客員研究員・楠美 昭則
研究者番号：9 0 3 3 2 4 9 4

(2)研究分担者

弘前大学・大学院医学研究科・
講師・楠美 智巳
研究者番号：9 0 3 2 2 9 3 2

(3)連携研究者

弘前大学・医学部附属病院・
講師・佐藤 寿
研究者番号：9 0 3 1 1 5 3 9

弘前大学・医学部附属病院・
助教・神 宏剛
研究者番号：9 0 3 7 4 8 5 0