

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18592070

研究課題名 (和文) 亜鉛製剤の骨吸収抑制作用に関する基礎的研究

研究課題名 (英文) β -alanyl-L-histidinato zinc inhibits bone resorption

研究代表者

鈴木 直人 (SUZUKI NAOTO)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10226532

研究成果の概要：亜鉛製剤(β -alanyl-L-histidinato zinc: AHZ)の骨吸収抑制作用について検討した。骨芽細胞に代表的な炎症性サイトカインである TNF- α を添加したところ、M-CSF および RANKL 発現は上昇したが、AHZ の同時添加によってコントロールレベルまで減少した。また AHZ は、TNF- α による I κ B のリン酸化を抑制した。一方、AHZ 添加によって、TRAP 陽性の成熟破骨細胞数は顕著に減少した。また AHZ は、RANKL 刺激によって上昇した I κ B のリン酸化を抑制した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	630,000	3,930,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：免疫・感染・炎症

1. 研究開始当初の背景

加齢や炎症に伴う骨吸収の亢進は、骨の脆弱化と易骨折化を招くことから、高齢者の QOL は著しく低下する。

骨吸収の主役である破骨細胞の形成は、骨芽細胞の細胞膜に発現する破骨細胞分化因子 (RANKL) と破骨細胞前駆細胞 (単球) の RANKL 受容体 (RANK) との細胞間相互作用 (RANK-RANKL signaling system) によって行われる。骨芽細胞が種々の炎症性サイトカインの刺激を受け、RANKL やマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) を発現、提示あるいは分泌する機構には、Rel/NF- κ B ファミリーと呼ばれる転写因子の関与が知られている。また、RANK と RANKL との細胞間結合

のシグナル伝達には、Rel/NF- κ B ファミリーが関与することも報告されている。このように、Rel/NF- κ B ファミリーは、骨芽細胞と破骨細胞のいずれにおいても、破骨細胞形成に深く関わっている。一方、胃潰瘍治療薬の一つである亜鉛製剤 (β -alanyl-L-histidinato zinc: AHZ) が、胃粘膜細胞の Rel/NF- κ B ファミリーの活性化を抑制することから、抗炎症薬として注目されている。

これらの背景から、申請者らは、AHZ が Rel/NF- κ B ファミリーの活性化抑制を介して破骨細胞の分化を抑制するのではないかと、さらに、失われた骨組織の再生を AHZ が促進するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) 炎症性刺激を受けた骨芽細胞の M-CSF, RANKL あるいはプロスタグランジンや腫瘍壊死因子(TNF- α)などの発現に及ぼす AHZ の影響について検討する。

(2) RANK-RANKL signaling system による破骨細胞の分化に及ぼす AHZ の影響について、破骨細胞分化マーカー発現や I κ B のリン酸化を指標に検討する。

これらのことから、骨リモデリングのバランス、とくに骨吸収に与える AHZ の影響について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞に及ぼす AHZ の影響の検討

① 骨芽細胞の培養

本研究には、骨芽細胞としての細胞特性を保持することが知られているヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞(Saos-2)、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞細胞(MC3T3-E1)あるいはラット骨肉腫由来骨芽細胞様細胞(ROS17/2.8)を用いる。

② 試料の調製

骨芽細胞を培養プレートに播種し、種々の濃度のインターロイキン1(IL)-1やプロスタグランジン E₂(PGE₂)で一定時間刺激し、細胞から mRNA、細胞内タンパク質(核および細胞質成分)を抽出するとともに、培養上清を回収する。また、同条件で種々の濃度の AHZ を添加した試料を作製する。

③ 骨芽細胞の破骨細胞分化因子発現に及ぼす AHZ の影響

a) 遺伝子発現

前述②で回収した mRNA をもとに、real-time PCR法を用いて、RANKL, M-CSF, TNF- α あるいは IL 等の遺伝子発現を定量的に分析する。

b) タンパク発現

前述②で回収した細胞抽出液あるいは培養上清を試料として、RANKL, M-CSF あるいは IL のタンパクレベルでの発現を Western法あるいは ELISA法を用いて調べる。

④ Rel/NF- κ B ファミリーの活性化に及ぼす AHZ の影響

前述②で回収した細胞抽出液を試料とし、AHZ の Rel/NF- κ B ファミリーの活性化への影響を I κ B のリン酸化を指標にして、Western blot 法によって検討する。

(2) 破骨細胞分化に及ぼす AHZ の影響の検討

① 破骨細胞の培養

本研究には、破骨細胞への分化能を有するマウス由来株化単球(RAW264.7)を用いる。なお、破骨細胞への分化には、リコンビナント RANKL および M-CSF を用いる。

② 破骨細胞分化に及ぼす AHZ の影響

単球を①の条件で破骨細胞へと分化させる

際に、種々の濃度の AHZ を添加して培養する。破骨細胞への分化は、1) TRAP 染色, 2) 炭酸脱水素酵素(II型)発現, 3) カテプシン K 発現を指標に調べる。

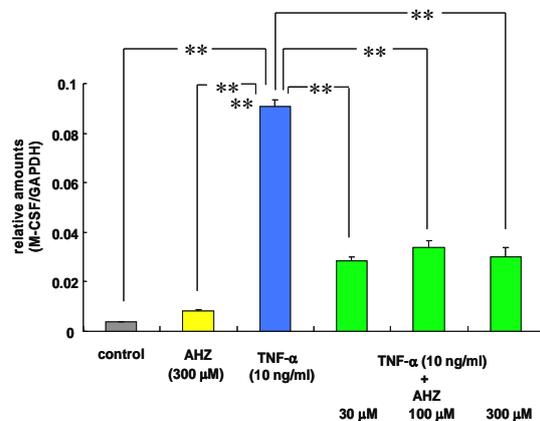
③ Rel/NF- κ B ファミリーの活性化に及ぼす AHZ の影響

前述①および②の条件で培養した細胞から、細胞質成分を抽出し、I κ B のリン酸化を抗 I κ B および抗 phospho-I κ B 抗体を用いた Western blot 法で検討する。

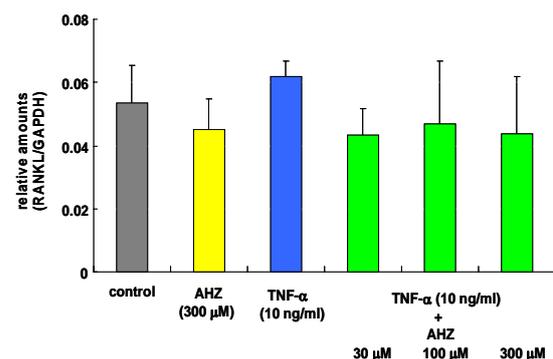
4. 研究成果

(1) 骨芽細胞に及ぼす AHZ の影響の検討

① TNF- α の添加によって M-CSF 遺伝子発現は上昇した(第1図)が、AHZ の同時添加によってその発現量は減少した。一方、RANKL 発現には TNF- α および AHZ 添加の影響はほとんど認められなかった(第2図)。



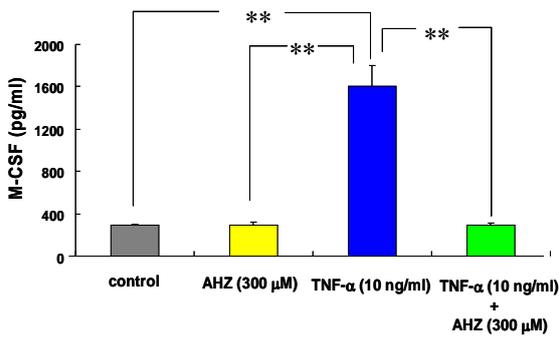
第1図 TNF- α および AHZ の単独あるいは同時添加が M-CSF 遺伝子発現に及ぼす影響, ** $p < 0.01$



第2図 TNF- α および AHZ の単独あるいは同時添加が RANKL 遺伝子発現に及ぼす影響, ** $p < 0.01$

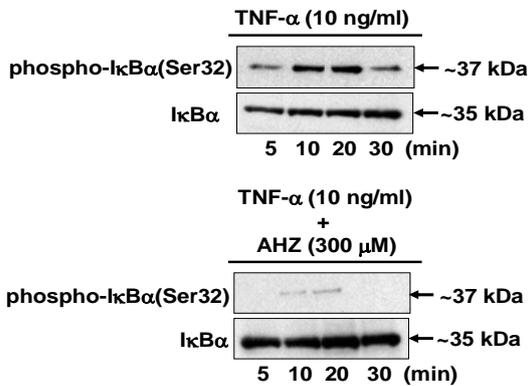
② TNF- α の添加によって M-CSF タンパク発現は上昇したが、AHZ の同時添加によって

その発現量は有意に減少した(第3図)。



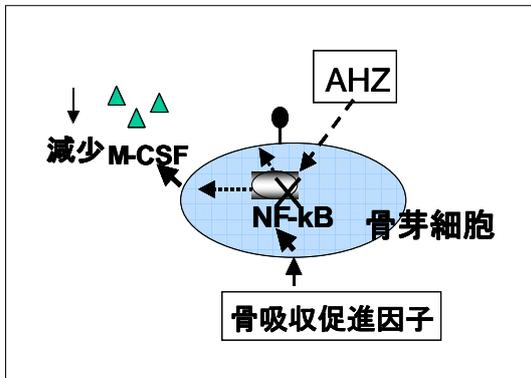
第3図 TNF-α およびAHZの単独あるいは同時添加が M-CSF タンパク発現に及ぼす影響, ** $p < 0.01$

③TNF-α 添加によって増加した IκB のリン酸化は, AHZ の添加によって減少した。



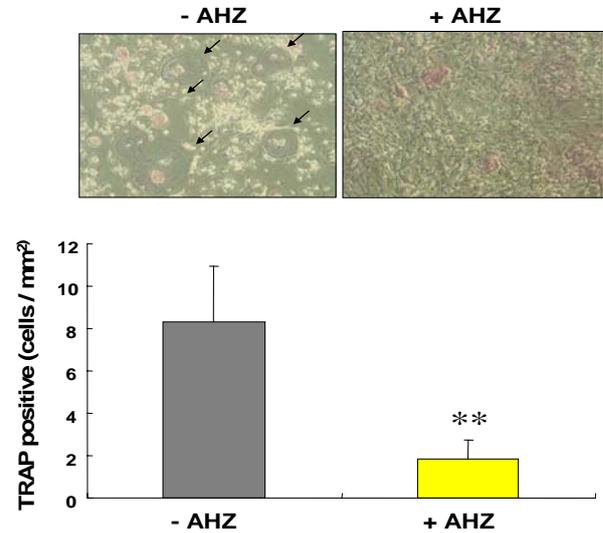
第3図 IκBのリン酸化に及ぼすAHZの影響
上段: TNF-α 単独添加, 下段: TNF-αとAHZの同時添加

骨芽細胞に及ぼすAHZの影響をまとめると, AHZは, 細胞のIκBのリン酸化を抑制することでM-CSF発現を減少させていることが示唆された(第4図)。



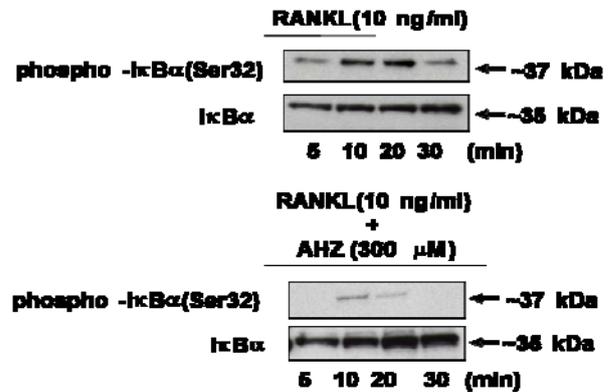
第4図 骨芽細胞に及ぼすAHZの影響のまとめ

(2)破骨細胞分化に及ぼすAHZの影響の検討
①AHZの添加によってTRAP陽性の成熟破骨細胞の形成は減少した(第5図)。



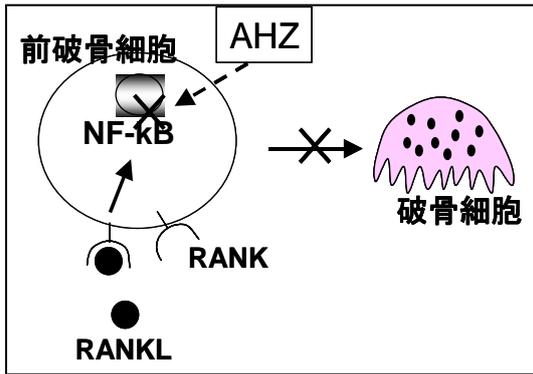
第5図 破骨細胞分化及ぼすAHZの影響
上段: 位相差顕微鏡像, 矢印: 成熟破骨細胞,
下段: TRAP陽性細胞数, ** $p < 0.01$

②RANKL添加によって増加したIκBのリン酸化は, AHZの添加によって減少した(第6図)。



第6図 IκBのリン酸化に及ぼすAHZの影響
上段: RANKL 単独添加, 下段: RANKLとAHZの同時添加

破骨細胞分化に及ぼすAHZの影響をまとめると, AHZは, RANKL刺激によって上昇するIκBのリン酸化を抑制することで, 幼若な破骨細胞前駆細胞からTRAP陽性の成熟破骨細胞への分化を抑制していることが示唆された(第7図)。



第 7 図 破骨細胞分化に及ぼす AHZ の影響のまとめ

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 1 件)

① Fujisaki K, Tanabe N, Suzuki N, Kawato T, Takeichi O, Tsuzukibashi O, Makimura M, Ito K, Maeno M. Receptor activator of NF-κB ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264.7 cells. Life Sciences 80, 1311-1318, 2007, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 鈴木直人: β -alanyl-L-histidinato zinc は骨芽細胞の M-CSF を抑制する. 第 16 回硬組織再生生物学会, 2007 年 9 月 22 日, 松本
 ② 鈴木直人: 骨リモデリングに及ぼす β -alanyl-L-histidinato zinc の影響. 第 49 回歯科基礎医学会, 2007 年 8 月 30 日, 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 直人 (NAOTO SUZUKI)
 日本大学・歯学部・准教授
 研究者番号: 10226532

(2) 研究分担者

前野 正夫 (MAENO MASAO)
 日本大学・歯学部・教授
 研究者番号: 60147618
 田邊 奈津子 (TANABE NATSUKO)
 日本大学・歯学部・助教
 研究者番号: 10409097

(3) 連携研究者

()
 研究者番号: