

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ~ 2009

課題番号：19791377

研究課題名 (和文) 骨破壊疾患の保護的療法に関する基礎的研究

研究課題名 (英文) Basic research for protective therapy on bone-destructive disease

研究代表者

森田 あや美 (近藤史実) (AYAMI MORITA)

愛知学院大学・薬学部・助教

研究者番号：70301629

研究成果の概要 (和文) : 本研究において、ヒト骨芽細胞において lysophosphatidic acid (LPA) は PLC の活性化, IP₃ 誘導性細胞内カルシウム濃度の上昇を介し IL-6 および IL-8 産生を促進させた。一方、マウスストローマ細胞において mTOR kinase の活性化は osteoprotegerin (OPG) 産生の制御因子として重要であること、さらにマウス骨芽細胞様細胞において NF-κB の核内移行の抑制による NGF 産生を明らかにした。これらの骨代謝制御因子に対しキーとなるシグナルカスケードが明らかにされれば、これらの因子を制御する手段により、骨疾患に対する新たな治療の構築に繋がるものと考えている。

研究成果の概要 (英文) : In the present study, I demonstrated that LPA stimulated the production of IL-6 and IL-8 via the activation of PLC and IP₃ receptor-mediated intracellular calcium release in human osteoblasts. In contrast, the present results underline the importance of mTOR kinase acting as regulator of OPG production in mouse stromal cells. Furthermore, these results underline the cascade leading to NGF production, suggesting that mouse osteoblastic cells secrete NGF through the suppression of NF-κB nuclear translocation. If key signal cascade for these regulators of bone-metabolism can be elucidated, it can open the door for a new therapy for bone-destructive diseases by means of controlling these productions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：lysophosphatidic acid, IL-6, IL-8, osteoblasts, RANKL, OPG

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周疾患等の炎症状態において骨吸収は深刻な問題であり、炎症状態における骨芽細胞および破骨細胞の応答およびそのメカニズムについて解析することは、基礎並びに臨床において重要な知見であると考えられる。人為的に炎症状態を再現した骨芽細胞および破骨細胞に対する prostaglandin (PG)E₂ の作用については数多く報告されているが、アラキドン酸合成経路から同時に産生される lysophosphatidic acid (LPA) の骨芽細胞に対する作用については、ほとんど報告されていない。

(2) 骨粗鬆症治療薬として用いられている vitamin K₂ (VK₂) は、骨肉腫由来骨芽細胞様細胞の細胞増殖を抑制し、オステオカルシン (OSCAL) の Gla 化を促進させることが報告されているが、ヒト正常骨芽細胞における細胞増殖およびその作用機構については解明されていない。さらに、IL-1β により OSCAL の発現が抑制されることが報告されており、VK₂ 存在下において IL-1β が細胞増殖促進作用を示さないという知見も得ているが、細胞増殖と OSCAL との関連については明らかにされていない。

(3) 骨破壊を伴う慢性関節リウマチや歯周関連疾患の病因ならびに病態の進行要因を探るアプローチとして、骨芽細胞由来破骨細胞分化因子 RANKL ならびに破骨細胞分化抑制因子 osteoprotegerin (OPG) の骨芽細胞および破骨細胞に対する分化、増殖、および活性機構について着目されている。また、歯周疾患に伴い病巣で爆発的に産生誘導される炎症性サイトカインの被曝により、骨芽細胞は RANKL 産生ならびにアポトーシス細胞死が惹起されるが、アポトーシスが歯周病の病態進行に関与するか否かは現時点で明らかにされていない。骨芽細胞における RANKL および OPG の産生機序の解明、ならびに骨破壊疾患の病態ならびに進行との関連性を探求することは、新規な治療戦略を探る上で急務であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) ヒト培養骨芽細胞の分化・増殖に対する Lysophosphatidyl acid (LPA) の新規な作用

(2) ヒト培養骨芽細胞の分化・増殖に対する炎症性サイトカイン interleukin (IL)-1β の新規な作用

(3) *in vitro* 病態モデル (炎症性サイトカイン処理マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 および ST-2) により誘導されるアポトーシスシグナルカスケードの分子機構の解明および RANKL/OPG の関与

(4) (1)~(3) の総括的な考察および付加の実験を行う

以上 4 項目に関して詳細な基礎的な検討を行い、新たな骨破壊疾患治療戦略、特に非侵襲的な保護療法の構築をめざすことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) LPA のヒト骨芽細胞に対する作用として、細胞内カルシウム濃度の上昇等が報告されているが、その作用機構およびその他の生理作用は明らかにされていない。そこで骨吸収促進因子である IL-6 および IL-8 の産生に対する作用およびその産生作用機構、特に、LPA 受容体、MAPK 系、細胞内カルシウム濃度の関与等について検討した。受容体、IL-6、および IL-8 の遺伝子発現は RT-PCR 法により確認し、タンパク産生は ELISA 法を用い測定した。また、細胞内カルシウム濃度の測定は、ARGUS 50/CA 蛍光分光光度計により測定し、各種阻害剤およびブロッカーを用いて IL-6 および IL-8 産生機構について検討した。

(2) IL-1β に対するヒト骨芽細胞 (SaM-1, SaOS-2, HOS, および MG-63 細胞) の細胞増殖を BrdU 法を用いて測定し、IL-1R1, IL-1R2, IL-1R antagonist, および OSCAL 等の遺伝子発現は RT-PCR を用いて検討した。また OSCAL および Gla-OSCAL タンパク発現は ELISA 法を用いて定量した。

(3) マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞において、NGF 産生に NF-κB が関与するか否かを検討した。NGF 産生量および NF-κB 核内移行量は ELISA 法を用いて検討し、細胞増殖は BrdU 法を用いて検討した。また、DNA fragmentation は BrdU 法を用い、Cell-cycle は FACS を用いて測定した。

(4) マウスストローマ細胞 ST-2 細胞において OPG 産生に mammalian target of rapamycin (mTOR) が関与しているか否かを検討した。OPG および RANKL タンパク産生は ELISA 法を用いて定量し、mTOR および phospho-mTOR の発現はウェスタンブロット法を用いて検討した。また、細胞増殖および DNA fragmentation は BrdU 法を用いて測定し、Cell-cycle は FACS を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) ① ヒト骨芽細胞 SaM-1 細胞およびヒト骨芽細胞様細胞 SaOS-2, HOS, および MG-63 細胞全てにおいて LPA 受容体である Edg-2 および Edg-4 の遺伝子発現が認められた。しかし、LPA 受容体の Edg-7 は HOS および MG-63 細胞のみで発現が認められた。

- ② SaM-1 細胞において、LPA 刺激により IL-6 および IL-8 の遺伝子発現が 0.5~3 時間をピークに促進された。さらに LPA は濃度および時間依存的に IL-6 および IL-8 のタンパク産生量を促進した。
- ③ さらに SaM-1 細胞において Edg-2 および Edg-7 のブロッカーである Kil6425 は、LPA による IL-6 および IL-8 のタンパク産生促進を濃度依存的に抑制したことから、LPA は Edg-2 受容体を介して IL-6 および IL-8 産生を促進させる事が示唆された。
- ④ 次に SaM-1 細胞において LPA による細胞内カルシウム濃度の変化について検討したところ、LPA は細胞内カルシウム濃度 $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ、この濃度上昇は Kil6425 または IP_3 受容体のブロッカーである 2-APB により抑制された事から、LPA による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には Edg-2 および IP_3 が関与していることが示唆された。また、EGTA による細胞外 Ca^{2+} の除去が、LPA による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に影響を与えない事から、細胞外の Ca^{2+} に依存しない反応である事が示唆された。
- ⑤ LPA 刺激による IL-6 および IL-8 産生促進は、ホスホリパーゼ C (PLC) 阻害剤である U-73122, 2-APB, または Rho-kinase 阻害剤である Y-27632 により抑制された事から、LPA は PLC の活性化、 IP_3 依存性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇、および Rho-kinase を介し IL-6 および IL-8 産生を促進させることが示唆された。

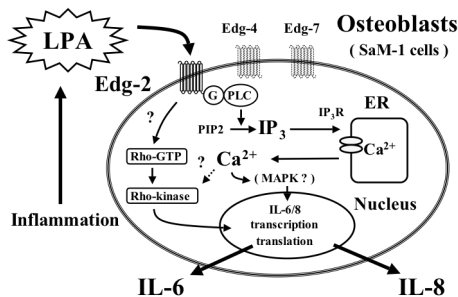


図1 骨芽細胞に対する LPA シグナル伝達機構

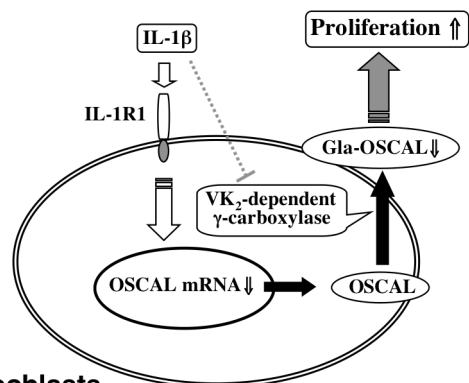
以上の知見をまとめて、Archives of Oral Biology, 53, 2008, 207-213. にて報告した。

- (2) ① SaM-1, SaOS-2 HOS, および MG-63 細胞において、IL-1 β 刺激による細胞増殖への影響について検討したところ、IL-1 β は SaM-1 および MG-63 細胞の細胞増殖を促進したが、SaOS-2 および HOS 細胞の細胞増殖には影響を与えなかった。さらに各種細胞における IL-1 β 受容体の IL-1R1 および IL-1R2, ならびに IL-1 β antagonist の遺伝子発現を調べたところ、SaM-1 および MG-63 細胞において IL-1R1 の遺伝子発現が認められたのみだった。これらの知見はヒト骨芽細胞は IL-1 β に対し応答する細胞としない細胞が存在し、IL-1R1 の遺伝子発現にも違いが

有る事を示唆している。

- ② また、IL-1 β に対する細胞増殖以外の応答を検討するため、骨芽細胞のフェノタイプ の遺伝子発現について調べたところ、osteocalcin (OSCAL) の遺伝子発現は全ての細胞において認められたが、SaM-1 および MG-63 細胞においてのみ IL-1 β 刺激により OSCAL の遺伝子発現は抑制された。ALP または type I collagen の遺伝子発現は、IL-1 β による影響を受けなかった。

- ③ さらに SaM-1 細胞において OSCAL および Gla 化された Gla-OSCAL の添加による細胞増殖への影響を検討したところ、OSCAL または Gla-OSCAL は細胞増殖に影響を与えなかった。一方で、内因性の Gla-OSCAL の産生量の抑制が細胞増殖に関与しているか否かを検討するため、 γ -carboxylase の阻害剤である vitamin K₂ (VK₂) による Gla-OSCAL の産生量および細胞増殖への影響について調べた。IL-1 β は Gla-OSCAL 産生量を抑制したが、VK₂ 存在下では Gla-OSCAL 産生量に影響を及ぼさなかった。同様に、IL-1 β は細胞増殖を促進させるが、VK₂ 存在下では細胞増殖促進作用を示さなかった。以上の知見より IL-1 β によるヒト骨芽細胞の細胞増殖促進には OSCAL の Gla 化の抑制が必要である事が示唆された。以上の結果をまとめて投稿中である。



Osteoblasts

図2 IL-1 β による細胞増殖促進作用機構

- (3) ① マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞において NF- κ B の阻害剤である pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) による NGF 産生への影響を検討したところ、PDTC は 4~16 μ M をピークに NGF 産生を促進させたが、16 μ M 以上の高濃度では NGF 産生を抑制した。また低濃度の 16 μ M PDTC は時間依存的に NGF 産生を促進させたが、同濃度の PDTC は NF- κ B の核内移行を 30%程度抑制した。一方で高濃度の 125 μ M PDTC は完全に NGF 産生および NF- κ B の核内移行を抑制した。

- ② また、低濃度 (4~31 μ M) の PDTC は細胞増殖および DNA fragmentation に影響を及ぼさなかったが、高濃度 (125 μ M) の PDTC

は細胞増殖を抑制し、DNA fragmentation を誘導した。

③ 次にマウス骨芽細胞の分化に対する PDTC の影響について FACS cell-cycle 法を用いて検討したところ、16 μ M PDTC は G0/G1 arrest には影響を及ぼさなかったが、125 μ M PDTC は G0/G1 arrest を誘導した。これらの結果より、125 μ M PDTC はアポトーシス細胞死を誘導することにより、NGF 産生を抑制したことが示唆された。

④ 加えて、NF- κ B の特異的阻害剤である SN50 を用いて同様な検討を行ったところ、低濃度 (20 μ M) の SN50 は NF- κ B の核内移行を 40% 程度抑制し、NGF 産生を促進させたが、高濃度 (100 μ M) の SN50 は NF- κ B の核内移行および NGF 産生の両者を抑制した。以上の知見より、マウス骨芽細胞様細胞において、NF- κ B の適度な核内移行の抑制は、NGF 産生を促進する事が示唆された。以上の結果をまとめて、Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 31, 2010, 92-101. にて報告した。

(4) ① マウスストローマ細胞 ST-2 細胞において、Rapamycin の OPG 産生に対する効果について検討したところ、Rapamycin は濃度依存的 (10~1000 nM) および時間依存的に OPG 産生を促進した。

② ウェスタンブロット法により、Rapamycin の phospho-mTOR の発現に対する影響に付いて調べたところ、100 nM の Rapamycin はコントロールレベルよりも phospho-mTOR の発現を抑制したが、3000 nM の Rapamycin は完全に phospho-mTOR の発現を抑制した。

③ 次に Rapamycin の OPG または RANKL 産生に対する影響に付いて検討したところ、100 nM Rapamycin は OPG 産生を促進させたが、RANKL 産生には影響を及ぼさなかった。

④ また、Rapamycin の細胞増殖および DNA fragmentation に対する影響について検討したところ、3000 nM Rapamycin は細胞増殖を抑制し、DNA fragmentation を誘導したが、30~1000 nM の濃度では細胞増殖および DNA fragmentation には影響を及ぼさなかった。

⑤ さらにアポトーシスに対する影響を調べるため、FACS を用い Cell-cycle について検討した。100 nM Rapamycin は G0/G1 arrest を誘導しなかったが、3000 nM Rapamycin は G0/G1 arrest を誘導した。これらの結果より、100 nM Rapamycin は細胞増殖およびアポトーシスに影響を及ぼす事無く OPG 産生を促進することが明らかとなった。

⑥ 一方、ST-2 細胞において OPG 産生を促進させる事が報告されている BMP-4 を用い、Rapamycin の作用との比較検討を行った

。100 nM Rapamycin と同様に、BMP-4 (10 ng/ml) は OPG 産生を促進させ、phospho-mTOR 発現を抑制した。以上の知見より、ST-2 細胞において mTOR kinase 活性化の抑制は、OPG 産生促進を制御していることが示唆された。これらの結果をまとめて Biochemical Biophysical Research Communications, 384, 2009, 82-86. にて報告した。

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 4 件)

(1) Aki, Y., Kondo, A., et. al. Lysophosphatidic acid-stimulated interleukin-6 and -8 synthesis through LPA1 receptors on human osteoblasts. Archives of Oral Biology, 査読有り, 53, 2008, 207-213.

(2) Mogi, M., Kondo, A. Down-regulation of mTOR leads to up-regulation of osteoprotegerin in bone marrow cells. Biochemical Biophysical Research Communications, 査読有り, 384, 2009, 82-86.

(3) Mogi, M., Kondo, A. Down-regulation of NF- κ B led to up-regulation of NGF production in mouse osteoblasts. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 査読有り, 31, 2010, 92-101.

(4) Mogi, M., Kondo, A. ELISA for RANKL-OPG complex in mouse sera. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 査読有り, 2010, in press.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田あや美 (近藤史実) (AYAMI MORITA)

愛知学院大学・薬学部・助教

研究者番号：70301629

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：