

平成 23 年 5 月 21 日現在

機関番号：33902
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008 年度 ～ 2010 年度
 課題番号：20592193
 研究課題名 (和文) 骨芽細胞における交感神経系を介した時計遺伝子発現に関する分子薬理学的研究
 研究課題名 (英文) Pharmacological study on circadian gene expression induced by sympathetic nervous activity in osteoblastic cells.
 研究代表者
 戸苅 彰史 (TOGARI AKIFUMI)
 愛知学院大学・歯学部・教授
 研究者番号：80126325

研究成果の概要 (和文)：概日リズムの中核である視床下部の視交叉上核から、末梢臓器の末梢時計に中枢情報を伝達する交感神経および副腎系の役割を検討するため、交感神経の活動亢進が骨芽細胞における時計遺伝子の発振や骨芽細胞の活動に与える影響を調査した。その結果、培養ヒト骨芽細胞 SaM-1 において、イソプレナリン、デキサメタゾンが時計遺伝子の発振を誘導すると共に、I 型コラーゲンやアルカリホスファターゼの発振をも誘導する事を見いだした。さらに、12 時間の明暗サイクル維持したマウスにおける骨の時計遺伝子、骨代謝関連遺伝子の解析において、骨代謝の概日リズムを示唆した。本研究結果より、骨代謝における概日リズムの時計情報伝達における交感神経活動の意義を分子レベルで明らかにした。

研究成果の概要 (英文)： Most living organisms exhibit circadian rhythms and these oscillations are generated by endogenous circadian clocks, present in the suprachiasmatic nuclei (SCN). Output signals from SCN are believed to transmit standard circadian time to peripheral tissue through sympathetic nervous system and humoral routes. So, we examined whether sympathetic nervous system and glucocorticoid affect peripheral clock in cultured osteoblast. In the present study, we demonstrated that both sympathetic signal and glucocorticoids are mediators of circadian rhythm from SCN to peripheral tissues. In addition, these sympathetic and glucocorticoids affect expressions of some osteoblast-related genes, which may contribute to circadian rhythms of bone metabolism

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨芽細胞、時計遺伝子、交感神経、アドレナリン、グルココルチコイド

1. 研究開始当初の背景

近年、骨代謝の制御に交感神経系の関わりが注目されている。我々の研究室においても、

ヒト骨芽細胞および破骨細胞に交感神経からの神経伝達物質の受容体や神経軸索を誘導する因子を認め、これら細胞による骨代謝

制御に交感神経系の関与を示唆している。さらに、神経細胞と骨芽細胞の共培養実験系において、神経細胞と骨芽細胞によるアドレナリン受容体を介した機能的な相互作用の存在を示し、交感神経細胞と骨芽細胞の間に直接的かつ機能的な繋がりを認めている。これらの知見は神経-骨形成ネットワークの存在を示唆しているが、我々はさらに交感神経系の活動亢進が、骨芽細胞における破骨細胞形成促進因子の発現促進を介して、骨吸収の促進をもたらしている可能性を *in vivo* および *in vitro* 実験において示している (Togari A et al.: *Expert Opin. Ther. Targets* 9(5): 931-940, 2005)。一方、Karsenty らも、また交感神経系が骨形成を抑制的に制御していることを示しており、交感神経系の活動亢進を介した骨形成抑制作用に注目している。これらの知見は、交感神経系が骨代謝の制御に深く関わっていることを示している (Togari A: *Clinical Calcium* 16(2): 74-79, 2006)。

骨代謝および歯の形成に概日リズムが存在することは組織学的研究により古くから知られていたが、近年、骨代謝に関わる血中ホルモンと骨代謝マーカーが概日リズムを示すことが見出されている。ウサギ長管骨の伸長は、夜（活動期）よりも昼（休息期）に亢進していることが見出された。また、ラット成長板における石灰沈着と ALP 活性が夜に亢進する概日リズムを示すことも、電顕的観察において報告されている。骨組織においても、DNA 合成、コラーゲン合成、石灰化は概日リズムを示し、骨形成マーカーである血中 ALP とオステオカルシンのレベルにおいてもラットでは昼に高く、ヒトでは逆に血清オステオカルシンレベルが夜に上昇している。さらに、ラットの骨吸収においても概日リズムが認められている。しかし、骨代謝における概日リズムと時計遺伝子との関連についての研究は現在までなされていない。

ほ乳類における概日時計の中核は、視床下

部の視交叉上核に存在し、Period、Clock、BMAL 等の時計遺伝子群がその実態を担っている。時計遺伝子は、肝臓などの臓器にも発現しており末梢時計を形成している。中枢時計は時間情報を末梢時計に伝達すると考えられており、その伝達システムの解析が進められている。今までに得られている視交叉上核と肝臓などの末梢臓器の間には多シナプス性自律神経経路が存在していること、日周振動を示すメラトニンの放出が交感神経によって支配されていること、光情報によって肝臓の交感神経が活性化されること等の知見は中枢時計が自律神経を介して時間情報を末梢時計へと伝達している可能性を示している。また、交感神経系の活性化によるカテコールアミンの放出が、中枢時計による末梢時計の支配経路の一つであることを示している (Terazono H et al.: *PNAS* 100: 6795-6800, 2003)。また、近年、視交叉上核の時間情報が、中枢の交感神経系のルートを通り、脊髄中間質外側核から副腎への交感神経を経て副腎皮質の遺伝子転写を変化させ、副腎皮質ステロイドの分泌を増加させることが明らかにされている (Ishida A et al.: *Cell Metab.* 2: 297-307, 2005)。すなわち、光誘導性ステロイド産生に副腎髄質カテコールアミン類がステロイド産生を上昇させる副腎髄質-皮質間の相互作用が関与している可能性が示されている。これらの知見は、視交叉上核からの時間情報が交感神経活動を介したカテコールアミンおよびグルココルチコイドが末梢の時計遺伝子の発現を制御している可能性を示している。

2. 研究の目的

そこで、我々は視交叉上核からの時間情報を伝達する交感神経・副腎系による二系統の経路による培養骨芽細胞の末梢時計発振と概日リズム誘導との関連を調べるため、①アドレナリン受容体およびグルココルチコイド

受容体への薬理的な刺激による時計遺伝子の発振と概日リズムの誘導、②β-アドレナリン作動薬とグルココルチコイドとの相互作用による時計遺伝子の発振と概日リズムの誘導、および③骨芽細胞におけるアドレナリン作動薬およびグルココルチコイドによる時計遺伝子発現機序とその生理機能への関与について検討する。すなわち、時間情報を伝達する交感神経系および副腎系による二系統の生理的意義を培養実験で解析すると共に、正常骨芽細胞および骨肉腫由来の骨芽細胞における結果を比較し、骨芽細胞における時計遺伝子の特徴を明らかにする。

すなわち、交感神経系の骨代謝を担う細胞における時計遺伝子発現への関与およびその発現機構を解析し、骨代謝における交感神経による時計遺伝子の制御と概日リズムとの関連を検討する事を目的とした。

3. 研究の方法

骨芽細胞に存在するアドレナリン受容体 (AR) およびグルココルチコイド受容体を薬理的に刺激した際の時計遺伝子の発現リズムを解析するため、ヒト骨膜由来の正常骨芽細胞 (SaM-1) を用いた。SaM-1 細胞には AR ($\alpha 1B$ -AR, $\alpha 2B$ -AR, $\beta 2$ -AR) および GR (GR α) の恒常的発現が認められている。そこで、この SaM-1 細胞を 5%血清で 24 時間培養した後、アドレナリン作動薬、デキサメタゾンおよび 50%血清 (positive control) で処理した細胞から、経時的に RNA を抽出し、時計遺伝子および骨代謝関連遺伝子の mRNA 量を real-time PCR にて解析した。また、このリズムの刻みのガン化による影響を解析するため、市販されているヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞 (SaOS-2, HOS, MG-63) について、同様の解析を行った。

また、in vivo における時計遺伝子と骨代謝関連遺伝子との関連性を 12 時間の明暗サイクル環境下で飼育したマウスにおいて解

析した。

4. 研究成果

本研究により四つの研究成果を得た。第一に、ヒト骨芽細胞 SaM-1 において 50%血清、イソプレナリン、デキサメタゾンによる薬理的な刺激により時計遺伝子の発振が誘導されること。第二に、50%血清、イソプレナリン、デキサメタゾンによる薬理的な刺激により I 型コラーゲンに時計遺伝子同様の発振が誘導されること、しかもイソプレナリンは初期に発現上昇を示したのに対しデキサメタゾンは発現上昇ではなく、むしろ発現低下を示したこと。第三に、ヒト骨肉腫由来 MG-63 においても時計遺伝子の発現が SaM-1 同様にみられ、腫瘍細胞においても時計遺伝子が正常に制御されていたこと。第四に、in vivo において骨代謝関連遺伝子の概日リズムが明らかとなり、時間薬理的知見の一部が得られたことである。

(1) アドレナリン受容体およびグルココルチコイド受容体への薬理的な刺激による時計遺伝子の発振と概日リズムの誘導

血清 50%、イソプレナリン (1 μ M)、デキサメタゾン (0.1 μ M) を 0 時間、2 時間、4 時間、8 時間、12 時間、16 時間、20 時間、24 時間処理した SaM-1 細胞における時計遺伝子の定量を行い、以下の結果を得た。

① 50%血清は処理 2 時間および 20~24 時間後に時計遺伝子 period1 および period2 の発現ピークを示した。period3 の発現のピークは 28 時間後に認められた。一方、BMAL1 の発現ピークは 12 時間後に認められ、period1 および period2 とは逆の位相を示した。

② イソプレナリンは処理 2 時間および 16 時間後に period1 の発現ピークを示した。period2 および period3 の発現ピークは 24 時間後に認められた。BMAL1 の発現ピークは 8 時間後に認められ、period1 とは逆の位相を

示した。

③ デキサメタゾン処理は処理 4 時間および 20~24 時間後に period1 の発現ピークを示した。period2 および period3 の発現ピークは 24 時間後に認められた。BMAL1 の発現ピークは 16 時間後に認められ、period1 とは逆の位相を示した。

これらの結果から、骨芽細胞に時計遺伝子が存在し、 β -受容体およびグルココルチコイド受容体の刺激により遺伝子発振の誘導を惹起している可能性を示した。この知見は、中枢時計からの時計情報を伝達する 2 経路（交感神経系と副腎系）が末梢骨芽細胞に及んでいる可能性を示し、さらに、イソプレナリンによる初期ピークの位相がデキサメタゾンより 2 時間早かったことから、交感神経系と副腎系で時間情報の伝達速度に差がある可能性も示された。

(2) 骨芽細胞におけるアドレナリン作動薬およびグルココルチコイドによる時計遺伝子発現機序とその生理機能への関与

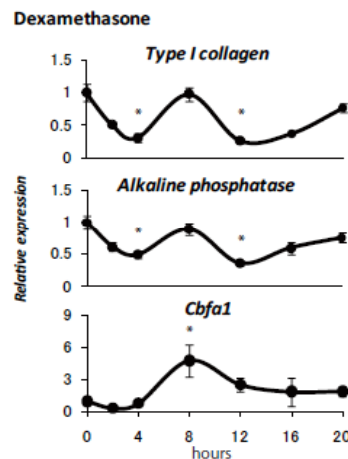
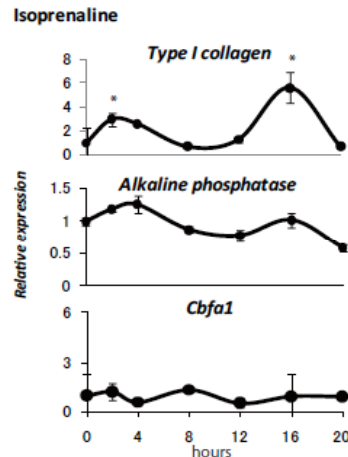
(1) で準備したサンプルから骨代謝関連遺伝子の発現を定量し、以下の結果を得た。

① イソプレナリン処理は SaM-1 細胞の I 型コラーゲンおよび ALP の発現に時計遺伝子と同様の変動を示した。すなわち、両遺伝子は処理後 2~4 時間および 16 時間に発現ピークの上昇を示した。また、I 型コラーゲンの方が、ALP よりも大きな変動を示した。

② デキサメタゾン処理は SaM-1 細胞の I 型コラーゲンおよび ALP の発現に時計遺伝子と同様の変動を示したが、両遺伝子は処理後 4 時間および 12 時間に発現ピークの減少を示した。

これらの結果から、イソプレナリンは処理後 2~4 時間に発現ピークの増加を示し、一方、デキサメタゾンは処理後 4 時間に発現ピークの減少を示した。交感神経系、副腎系の

2 系統の情報伝達は骨芽細胞における時計遺伝子の発現に同様の位相パターンを示したにもかかわらず、I 型コラーゲンは初期の変動では全く逆の位相を示した。骨代謝のサーカディアンリズムと時計遺伝子との関連が示されたが、位相の違いについては明らかにできず、今後に残された検討課題である。



また、骨芽細胞で発現する時計遺伝子の生理的意義を明らかにするため、時計遺伝子 period1 をノックダウンした細胞における骨代謝関連遺伝子の発現について現在検討中である。

(3) 発癌と時計遺伝子の関連

ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞 MG-63 を、イソプレナリン ($1 \mu\text{M}$) あるいはデキサメタゾン ($0.1 \mu\text{M}$) を、0、2、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、および 48 時間処理し、これら培養細胞における時計遺伝子の定量

を行い、以下の結果を得た。

① ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞 MG-63 においても、イソプレナリンは SaM-1 と同様に時計遺伝子の発現変動を示した。

② ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞 MG-63 においても、デキサメタゾンは SaM-1 と同様に時計遺伝子の発現変動を示した。

ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞 MG-63 においても、イソプレナリンおよびデキサメタゾンは SaM-1 とほぼ同様の時計遺伝子の発現変動を示した。すなわち、癌化した骨芽細胞においても時計遺伝子の発現は正常に制御されていた。骨代謝関連遺伝子についての解析は今後の課題として残されている。

(4) In vivo における骨代謝関連遺伝子発現の概日リズム

ICR マウスを 2 週間以上 12 時間の明暗サイクル環境下で飼育した。その後、Zeitgeber Time (ZT: 明暗サイクルの一周期が ZT24、明期開始時刻を ZT0 とする) の ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16, ZT20 における骨組織から RNA を抽出した。その骨代謝関連遺伝子および時計遺伝子を解析し、以下の結果を得た。

① In vivo における骨組織において時計遺伝子 *period1* および *Bmal1* の発現に概日リズムが認められた。*period1* は ZT12 に発現ピークが観られ、*BMAL1* は *period1* と逆位相を示していた。

② 骨組織において、骨代謝関連遺伝子 NFAT、カテプシン K、I 型コラーゲン、Runx-2 の発現に概日リズムが認められ、これらの発現のピークはいずれも ZT12 であった。すなわち、骨吸収マーカーである NFAT とカテプシン K の発現ピーク、および骨形成マーカーである I 型コラーゲンと Runx-2 の発現ピークが共に ZT12 で認められた。

これらの結果は、暗期に入った直後 (ZT12) に骨代謝が最も活性化した状態になる事を示し、さらに *period1* 発現との同調から骨代

謝の概日リズムと時計遺伝子との関連をも示した。

本研究では、実験条件の設定が難しく、当初の目的の一つであった「 β -アドレナリン作動薬とグルココルチコイドとの相互作用による時計遺伝子の発振と概日リズムの誘導」についての評価には至らなかったが、本実験を遂行しながら、破骨細胞が神経とシナプスを形成する可能性、交感神経の亢進した自然発症高血圧ラット (SHR) に観られる骨量減少に対する β -受容体遮断薬による回復、持続的な β -受容体作動薬のインフュージョンによる骨吸収の亢進、およびヒドロコルチゾンによる骨芽細胞の増殖抑制作用に HGF の関与を示すことを見いだしている。現在、これらの知見を活用しながら、さらに骨代謝の概日リズムを分子レベルで明らかにすることを企画している。本研究はこれらの研究をさらに発展させる上での重要な手掛かりを与え、多くの有益なる知見を得る事ができた。これらの成果を基に、更なる研究計画が現在進行中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① Tsunashima Y, Kondo A, Matsuda T, Togari A : Hydrocortisone inhibits cellular proliferation by downregulating hepatocyte growth factor synthesis in human osteoblasts. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 査読有, **34**(5): 700-703, 2011.

② Kondo H, Togari A: Continuous treatment with a low-dose β -agonist reduces bone mass by increasing bone resorption without suppressing bone formation. *Calcified Tissue International*, 査読有, **88**: 23-32, 2011.

③ Sato T, Arai M, Goto S, Togari A: Effects of propranolol on bone metabolism in spontaneously hypertensive rats. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 査読有, **334**(1):99-105, 2010.

④ Suga S, Goto S, Togari A: Demonstration of direct neurite-osteoclastic cell communication in vitro via the adrenergic receptor. Journal of Pharmacological Sciences, 査読有, **112**(2): 184-191, 2010.

⑤ 戸苺彰史: 末梢神経系と骨代謝の関わり. CLINICAL CALCIUM, 査読無, **20**(12):49-56, 2010.

[学会発表] (計7件)

① Goto S, Sato T, Arai M, Togari A: Effects of β -blockers on bone metabolism in spontaneously hypertensive rats. The 43rd Annual Scientific Congress Korean Association of Orthodontists (Incheon, Korea). 2010. 11. 19.

② 佐藤琢麻, 新井通次, 戸苺彰史, 後藤滋巳: 高血圧自然発症ラット(SHR)の骨代謝に及ぼす β -遮断薬の効果. 第69回日本矯正歯科学会大会 第3回日韓ジョイントミーティング(横浜), 2010. 9. 28.

③ 河本新太郎, 近藤久貴, 福田理, 戸苺彰史: ヒト骨芽細胞 SaM-1 細胞における時計遺伝子の役割. 第52回歯科基礎医学会学術大会(東京), 2010. 9. 21, 22.

④ 近藤久貴, 戸苺彰史: 低濃度 β アゴニストの持続投与は骨形成に影響を与えず、骨吸収を促進し骨量を減少させる. 第28回日本骨代謝学会学術集会(東京), 2010. 7. 21.

⑤ 佐藤琢麻, 新井通次, 後藤滋巳, 戸苺彰史: β -遮断薬は高血圧自然発症ラット(SHR)の骨減少を改善する. 第27回日本骨代謝学会学術集会(大阪), 2009. 7. 23.

⑥ Obata K, Suga S, Goto S, Togari A: Direct neurite-osteoclastic cell communication in co-culture system. 56 Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (Nagoya), 2008. 11. 30.

⑦ 須賀智子, 小畑孝二, 後藤滋巳, 戸苺彰史: 共培養系における神経細胞と破骨細胞の相互作用. 第50回歯科基礎医学会(東京) 2008. 9. 23.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸苺 彰史 (TOGARI AKIFUMI)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号: 80126325

(2) 研究分担者

新井 通次 (ARAI MICHITUGU)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号: 20097538

近藤 久貴 (KONDO HISATAKA)
愛知学院大学・歯学部・助教
研究者番号: 40469002

小畑 孝二 (OBATA KOJI)
愛知学院大学・歯学部・助教
研究者番号: 4037229

(2008年度のみ参画)