

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月22日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592069

研究課題名（和文）鉄を介した破骨細胞分化調節機構の分子メカニズムを解明する

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms of osteoclastogenesis by iron

研究代表者：

坂井 詠子 (SAKAI EIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10176612

研究成果の概要（和文）：ヘム分解酵素であるヘムオキシゲナーゼ1 (HO-1) の発現低下がカスパーゼ3の活性化と HMGB1 の遊離を促進し破骨細胞分化を促進することを明らかにした。また HO-1 の発現誘導作用のある Kahweol や Fisetin などのポリフェノールや tBHQ が破骨細胞分化を抑制することを明らかにした。HO-1 の発現は転写因子 Nrf2 により調節されていることから、Nrf2 ノックアウトマウスの骨髄細胞を用いて破骨細胞を形成させたところ、野生型マウスに比べ顕著な破骨細胞形成促進が見られた。

研究成果の概要（英文）：We reported that RANKL-induced suppression of heme oxygenase-1 (HO-1), a heme-degrading enzyme, promoted caspase3 activation and HMGB1 release during osteoclastogenesis. Induction of HO-1 by tBHQ or polyphenol such as kahweol and fisetin inhibited osteoclastogenesis respectively. Since transcriptional induction of HO-1 is up-regulated by Nrf2, we studied the effect of Nrf2 on osteoclastogenesis. Studies with Nrf2 KO mice bone marrow macrophages showed enhanced formation of osteoclasts compared with wild type mice bone marrow macrophages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
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・機能系基礎歯科学

キーワード：骨代謝・破骨細胞・酸化ストレス・ポリフェノール

1. 研究開始当初の背景

閉経後の女性や卵巣摘出ラットの骨で高いレベルの遊離鉄が検出されることや、遺伝性ヘモクロマトーシス（鉄過剰症）に骨粗鬆症が多くみられることは臨床研究やケースレポートに多数報告されていた。これらの報

告は鉄過剰が骨粗鬆症のリスクを高める可能性を十分示唆するものの、これを示した基礎研究は殆どなされていなかった。我々は鉄キレート剤である desferrioxamine が破骨細胞分化を抑制することを見出していた。同様の結果を Ishii K. らも報告しており (*Nature*

Med. 2009)、鉄が破骨細胞分化にとって重要な役割を持つと考えられた。我々はさらに破骨細胞分化誘導因子である RANKL が分化初期段階に、2 価鉄を細胞外に放出するフェロポルチンとヘムオキシゲナーゼ (HO)-1 の発現を抑制することを見出した。このことは細胞内鉄レベルが高まる可能性を示唆しており、鉄過剰状態になった細胞において活性酸素種 (ROS) の産生が促進される可能性も示唆している。これまでに ROS が破骨細胞分化を促進することが報告されていることから、鉄代謝機構による細胞内 ROS レベルの増減が骨代謝に及ぼす影響は大きいと考えられた。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、破骨細胞分化初期段階において RANKL 依存的な鉄代謝蛋白の発現減少と細胞内酸化ストレスの上昇が破骨細胞分化を促進する可能性があることを示す実験結果を得ている。これらの結果から、生体内で鉄過剰状態が生じた場合、ミトコンドリアストレスが誘発され、破骨細胞分化がさらに亢進し、骨粗鬆症の発症を促進するのではないかと我々は考えている。この仮説を検証するため、本申請研究では鉄を介した破骨細胞分化調節機構のメカニズムを解明することを目指している。

3. 研究の方法

(1) 鉄代謝酵素である HO-1 が破骨細胞分化にどのように関わっているか解析を行った。

- ① マウス HO-1 遺伝子発現ベクターを構築し RAWD 細胞で一過性に発現誘導させて破骨細胞形成を TRAP 染色でみた
- ② RAWD 細胞において siRNA で HO-1 の発現を抑制した場合の破骨細胞形成を TRAP 染色で、カスパーゼ 3 の活性化と細胞外 HMGB1 の遊離をウェスタンブロッティン

グで調べた

- ③ 活性酸素消去剤である N-acetylcystein (NAC) を添加した場合の破骨細胞形成を TRAP 染色で、カスパーゼ 3 の活性化と細胞外 HMGB1 の遊離をウェスタンブロッティンで調べた
- (2) HO-1 の発現を誘導する数種の化合物を用いて破骨細胞形成と細胞内酸化ストレスレベルを調べた

4. 研究成果

(1) 破骨細胞分化に対する HO-1 の関与

- ① マウス HO-1 遺伝子領域を pcDNA-DEST47 と pcDNA-DEST53 に組み換えた発現ベクターを構築した。マクロファージ系細胞株 RAWD へ一過性に発現誘導するとカスパーゼ 3 の活性化は抑えられ HMGB1 の細胞外遊離や破骨細胞形成が阻害された。
- ② HO-1 誘導作用をもつ生薬クルクミンが破骨細胞で HO-1 の発現を誘導し破骨細胞分化を抑制、細胞外への HMGB1 の遊離を抑制することを明らかにした。逆にクルクミンで HO-1 の発現を上昇させた時に siRNA で HO-1 の発現を抑制すると細胞外への HMGB1 の遊離が促進し、破骨細胞分化も促進することを明らかにした。
- ③ NAC はカスパーゼ 3 の活性化を抑え、HMGB1 の細胞外への遊離と破骨細胞分化を抑制した。

以上の結果をまとめて Sakai E. *Journal of Cellular Biochemistry* 113(2), 486-498 (2012) に発表した。

(2) HO-1 の発現を誘導する化合物の破骨細胞分化に対する効果

- ① コーヒーに含まれるジテルペン化合物である Kahweol は RANKL による Erk の活性化を強く抑制し NFATc1、Src、Cathepsin K の発現と細胞外への HMGB1

の遊離を抑制し、破骨細胞形成と骨吸収を抑制した。Fumimoto R. J Pharmacol Sci., 2012, 118(4), 479-486 に発表。

- ② 殺虫剤に含まれる Deltamethrin は Erk の活性化と NFATc1 の発現を抑制し、破骨細胞形成と骨吸収を抑制した。Sakamoto H. Toxicology in Vitro, 2012, 26, 817-822 に発表。
- ③ 脂質の抗酸化作用をもつ食品添加物である tBHQ は HO-1 の発現を誘導する一方で、NFATc1 の発現は抑制した。細胞外への HMGB1 の遊離を抑制し破骨細胞形成と骨吸収は抑制された。Yamaguchi Y. J Appl Toxicol., 2013. in press. Doi: 10.1002/jat.2827 に発表。
- ④ いちごポリフェノールであるフィセチンは HO-1 の発現を促進し、細胞内 ROS 産生を抑え、NFATc1 の産生も抑えて破骨細胞形成と骨吸収を抑制した。Sakai E. J. Pharmacol. Sci., 2013. in press. Doi: 10.1254/jphs.12243FP に発表

以上の結果は、HO-1 の発現を誘導する化合物が非常に効果的に破骨細胞形成と骨吸収を抑制することを示している。また細胞内シグナルのうちでも Erk の活性化抑制が顕著に見受けられ、破骨細胞分化に重要な転写因子である NFATc1 の発現抑制が認められた。細胞内 ROS の発生が抑えられ、細胞外への HMGB1 の遊離が抑えられた。

本研究によって鉄代謝酵素である HO-1 の発現レベルが破骨細胞の分化を調節できることを示す多くの知見を得ることができ、鉄代謝と骨代謝との密接な関係を明らかにすることができた。

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 14 件)

1. Sakai E, Shimada-Sugawara M, Yamaguchi Y, Sakamoto H, Fumimoto R, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, and Tsukuba T.: Fisetin inhibits osteoclastogenesis through prevention of RANKL-induced ROS production by Nrf2-mediated up-regulation of phase II antioxidant enzymes. J. Pharmacol. Sci., 査読有, 2013. in press. Doi: 10.1254/jphs.12243FP
2. Nishishita K, Sakai E, Okamoto K, Tsukuba T.: Structural and phylogenetic comparison of napsin genes: The duplication, loss of function and human-specific pseudogenization of napsin B. Gene, 査読有, 2013;517(2):147-57.
3. Yamaguchi Y, Sakai E, Sakamoto H, Fumimoto R, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T.: Inhibitory effects of tert-butylhydroquinone on osteoclast differentiation via up-regulation of heme oxygenase-1 and down-regulation of HMGB1 release and NFATc1 expression. J Appl Toxicol., 査読有, 2013. in press. Doi: 10.1002/jat.2827
4. Sakamoto H, Sakai E, Fumimoto R, Yamaguchi Y, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Deltamethrin inhibits osteoclast differentiation via regulation of heme oxygenase-1 and NFATc1. Toxicol. in Vitro, 査読有, 2012, 26, 817-822, 201
5. Fumimoto R, Sakai E, Yamaguchi Y, Sakamoto H, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: The Coffee Diterpene Kahweol Prevents Osteoclastogenesis via Impairment of NFATc1 Expression and Blocking of Erk Phosphorylation. J Pharmacol Sci., 査読有, 2012, 118(4), 479-486
6. Narahara S, Matsushima H, Sakai E, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Genetic backgrounds and redox conditions influence morphological characteristics and cell differentiation of osteoclasts in mice. Cell Tissue Res., 査読有, 2012, 348, 81-94
7. Okamoto K, Okamoto Y, Kawakubo T, Iwata J, Yasuda Y, Tsukuba T, Yamamoto K.: Role of the transcription factor Sp1 in regulating the expression of the murine cathepsin E gene. J Biochem., 査読有, 2012, 151, 263-272
8. Sakai E, Shimada-Sugawara M, Nishishita K, Fukuma Y, Naito M, Okamoto K, Nakayama K, Tsukuba T.:

Suppression of RANKL-dependent heme oxygenase-1 is required for high mobility group box 1 release and osteoclastogenesis. *J Cell Biochem.*, 査読有, 2012, 113, 486-498

9. Tsukuba T., Okamoto K., and Yamamoto K.: Cathepsin E is critical for proper trafficking of cell surface proteins *J Oral Biosci.*, 2012, 54, 48-53
10. Yamamoto K, Kawakubo T, Yasukochi A, Tsukuba T.: Emerging roles of cathepsin E in host defense mechanisms. *Biochim Biophys Acta.*, 査読有, 2012, 1824, 105-112
11. Ikeda H, Sumita Y, Ikeda M, Ikeda H, Okumura T, Sakai E., Nishimura M, Asahina I: Engineering bone formation from human dental pulp- and periodontal ligament-derived cells. *Ann Biomed Eng.*, 査読有, 2011, 39(1): 26-34
12. Yukitake H, Naito M, Sato K, Shoji M, Ohara N, Yoshimura M, Sakai E., Nakayama K: Effects of non-iron metalloporphyrins on growth and gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Immunol.*, 査読有, 2011, Mar; 55(3): 141-153
13. Kawakubo T, Yasukochi A, Okamoto K., Okamoto Y, Nakamura S, Yamamoto K: The role of cathepsin E in terminal differentiation of keratinocytes. *Biol. Chem.*, , 2011, 392(6): 571-585
14. Sato T, Nishishita K., Okada Y, Toda K: The receptor potential of frog taste cells in response to cold and warm stimuli. *Chem Senses.*, 査読有, 2010, Jul; 35(6): 491-499

[学会発表] (計 28 件)

1. Fukuma Yutaka, Sakai Eiko., Sugawara Megumi, Erika Yoneshima, Nishishita Kazuhisa., Okamoto Kuniaki., and Tsukuba Takayuki.: Cafestol prevents osteoclastogenesis via impairment of NFATc1 expression and blocking of Erk phosphorylation 第 86 回日本薬理学会, 2013 年 3 月, 福岡
2. Erika Yoneshima, Kuniaki Okamoto., Eiko Sakai., Noriaki Yoshida, and Takayuki Tsukuba.: Up-regulation

mechanisms of endosomal/lysosomal proteins during osteoblast differentiation 第 86 回日本薬理学会, 2013 年 3 月, 福岡

3. 岡元邦彰., 岩田淳一, 坂井詠子., 西下一久., 山本健二, 筑波隆幸.: p53 はカテプシン E 遺伝子の発現を制御する, 第 85 回日本生化学会大会合同大会, 2012 年 12 月, 福岡
4. 坂井詠子., 菅原めぐみ, 福岡 裕, 西下一久., 岩竹真弓, 米嶋枝里香, 岡元邦彰., 筑波隆幸.: フィセチンは RANKL を介した ROS の産生と NFATc1 の発現を抑制することで破骨細胞分化を阻害する, 第 85 回日本生化学会大会合同大会, 2012 年 12 月, 福岡
5. 福岡 裕, 坂井詠子., 菅原めぐみ, 西下一久., 岡元邦彰., 筑波隆幸.: Cafestol の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響, 第 54 回歯科基礎医学会学術大会, 2012 年 9 月, 福島
6. 坂井詠子., 菅原めぐみ, 福岡 裕, 西下一久., 岡元邦彰., 筑波隆幸.: Fisetin の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響, 第 54 回歯科基礎医学会学術大会, 2012 年 9 月, 福島
7. Megumi Sugawara, Eiko Sakai., Kazuhisa Nishishita., Yutaka Fukuma, Kuniaki Okamoto., Noriaki Yoshida and Takayuki Tsukuba: Fisetin prevents osteoclastogenesis via impairment of NFATc1 expression and blocking of Erk phosphorylation 第 85 回日本薬理学会, 2012 年 3 月, 京都
8. Eiko Sakai., Megumi Sugawara, Kazuhisa Nishishita., Yutaka Fukuma., Kuniaki Okamoto. and Takayuki Tsukuba.: Suppression of RANKL-dependent heme

- oxygenase-1 is required for Receptor activator of NF κ B ligand dependent suppression is required for high mobility group box 1 and osteoclastogenesis. 第 85 回日本薬理学会, 2012 年 3 月, 京都
9. Takayuki Tsukuba, Tomoko Kadowaki, Kuniaki Okamoto, Kenji Yamamoto: Accumulation of NADPH oxidase (NOX2) and increased oxidative stress in cathepsin E-deficient macrophages. 第 85 回日本薬理学会, 2012 年 3 月, 京都
10. Kuniaki Okamoto, Yoshiko Okamoto, Eiko Sakai, Kazuhisa Nishishita, Kenji Yamamoto, and Takayuki Tsukuba: Identification of two transcripts and in vivo promoter analysis for cathepsin E. 第 85 回日本薬理学会, 2012 年 3 月, 京都
11. Kenji Yamamoto, Tomoyo Kawakubo, Atsushi Yasukouchi, and Takayuki Tsukuba: Cathepsin E-induced growth arrest and apoptosis of cancer cells and the related signaling. 第 85 回日本薬理学会, 2012 年 3 月 (シンポジウム), 京都
12. 菅原めぐみ, 坂井詠子, 西下一久, 福間裕, 岡元邦彰, 吉田教明, 筑波隆幸: フィセチンによる破骨細胞分化抑制作用, 第 64 回日本薬理学会西南部会, 2011 年 11 月, 福岡
13. 坂井詠子, 菅原めぐみ, 西下一久, 福間裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞分化における RANKL 依存的な HO-1 発現抑制の役割, 第 64 回日本薬理学会西南部会, 2011 年 11 月, 福岡
14. 西下一久, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: アスパラギン酸プロテアーゼナプシン A およびナプシン B の生化学的解析 (Biochemical analyses of napsin A and napsin B), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 2011 年 9-10 月, 岐阜
15. 坂井詠子, 菅原めぐみ, 西下一久, 福間裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: RANKL 依存的な HO-1 発現抑制は HMGB1 の遊離に必要である (Suppression of RANKL-dependent HO-1 is required for HMGB1 release.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 2011 年 9-10 月, 岐阜
16. 坂元裕, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Deltamethrin の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響 (Effects of deltamethrin on osteoclast formation and bone resorption.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 2011 年 9-10 月, 岐阜
17. 山口優, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: *tert*-Butylhydroquinone の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響 (Effects of *tert*-Butylhydroquinone on osteoclast formation and bone resorption.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 2011 年 9-10 月, 岐阜
18. 文元玲子, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Kahweol の破骨細胞形成と骨吸収活性への影響 (Effects of Kahweol on osteoclast formation and bone resorption.), 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 2011 年 9-10 月, 岐阜
19. Reiko Fumimoto, Hiroshi Sakamoto, Yu Yamaguchi, Eiko Sakai, Kuniaki Okamoto and Takayuki Tsukuba: Nrf2 activators inhibit osteoclastogenesis induced by receptor activator of NF- κ B ligand. 第 84 回日本薬理学会, 2011 年 3 月, 横浜

20. Eiko Sakai, Megumi Shimada, Kazuhisa Nishishita, Yutaka Fukuma, Kuniaki Okamoto and Takayuki Tsukuba: Receptor activator of NF- κ B ligand dependent heme oxygenase-1 suppression is required for high mobility group box 1 release, caspase-3 activation, and subsequent osteoclastogenesis. 第 84 回日本薬理学会, 2011 年 3 月, 横浜
21. 坂井詠子, 西下一久, 福間 裕, 岡元邦彰, 筑波隆幸: HO-1 の発現誘導は RANKL を介した HMGB1 の細胞外遊離と破骨細胞分化を阻害する, 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月, 神戸
22. 岡元邦彰, 坂井詠子, 西下一久, 福間 裕, 坂元 裕, 文元玲子, 山口 優, 山本健二, 筑波隆幸: カテプシン E 欠損における破骨細胞分化への影響, 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月, 神戸
23. 榎原 峻, 松島春菜, 坂井詠子, 筑波隆幸: RANKL 誘導性破骨細胞分化における遺伝子型の影響, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010 年 12 月, 神戸
24. 坂井詠子, 嶋田めぐみ, 西下一久, 福間 裕, 岡元邦彰, 中山浩次, 筑波隆幸: HO-1 は HMGB1 の遊離を抑制し破骨細胞形成を阻害する, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010 年 9 月, 松戸
25. 西下一久, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: アスパラギン酸プロテアーゼナプシンの比較遺伝学的分析と生化学的解析, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010 年 9 月, 松戸
26. 筑波隆幸, 岡元邦彰: カテプシン群

によるメンブレントラフィックへの影響, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, シンポジウム 2010 年 9 月, 松戸

27. Kuniaki Okamoto, Yoshiko Okamoto, Tomoyo Kawakubo, Kenji Yamamoto, Takayuki Tsukuba: Transcription factor Spl regulates the expression of the murine cathepsin E gene in gastric adenocarcinoma cells, 第 83 回日本薬理学会年会, 2010 年 3 月, 大阪

28. Takayuki Tsukuba, Michiyo Yanagawa, Tomoko Kadowaki, Yoshiko Okamoto, Kuniaki Okamoto, Kenji Yamamoto: Autophagy impairment associated with increased aberrant mitochondria and oxidative stress in cathepsin E-deficient macrophage 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 2010 年 3 月, 大阪

[図書] (計 1 件)
筑波隆幸 (14、25 章 執筆)、岡元邦彰 (16 章、20 章 執筆)、(加藤有三、篠田壽 監修、大谷啓一、鈴木邦明、戸苅彰史編)、医歯薬出版、現代歯科薬理学 第 5 版、2012 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂井 詠子 (SAKAI EIKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 10176612

(2) 研究分担者

筑波 隆幸 (TSUKUBA TAKAYUKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 30264055

岡元 邦彰 (OKAMOTO KUNIAKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 10311846

西下 一久 (NISHISHITA KAZUHISA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 20237697