

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 6 月 15 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592077

研究課題名（和文） β 2 受容体による細胞内情報伝達の組織多様性に関する研究

研究課題名（英文） Different effects of enantiomers of beta2-adrenergic agonist on muscle and bone.

研究代表者

山田庄司（YAMADA SHOJI）

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：00111617

研究成果の概要（和文）：選択的 β 2 アドレナリン受容体作動薬の光学異性体(+)(-)(±)が筋と骨への作用の違いを検討した (+)体 tulobuterol が骨芽細胞の β 2 受容体を介し破骨細胞分化を促進させ、 μ CT による骨量測定では、(-)体は影響がなく(+)体投与により、骨密度低下と骨吸収亢進が明らかになった。一方、筋肥大は (-)体で伸張し、(+)体では認められなかった。血圧測定結果から血管平滑筋作用も同様であった。以上の結果により、 β 2 作動薬は(-)体に精製すれば、骨代謝に影響を及ぼすことなく、安全に気管支喘息治療薬として使用される可能性を明らかになった。

研究成果の概要（英文）：When (-)-(R)- and (+)-(S)-enantiomers of β 2-adrenergic receptor (β 2-AR) agonist tulobuterol (each 10 mg/kg) was subcutaneously injected into female young rats once a day for 4 weeks, the effects of each enantiomer on the muscle and bone were examined. The (-)-(R)-enantiomer, but not (+)-(S)-enantiomer, significantly increased the body weight and decreased fat, compared with vehicle control. Particularly, the (R)-enantiomer not only increased the heart muscle and skeletal muscle but shifted the muscle lactate dehydrogenase (LDH) isoenzyme from the H-type to M-type and also myosin heavy chain (HMC) isoform pattern from slow type to fast type. On the other hand, the (S)-enantiomer decreased the bone mineral density, accompanied with increase in urinary deoxypyridinoline excretion. In vitro, osteoclast-like cell formation were generated in co-culture, mouse bone marrow cells (BMC) and ST2-T cells preparations for 7 days, treated with (S)-enantiomer more than with (R)-enantiomer. Moreover, it was inhibited by selective β 2-AR inhibitor butoxamine and non-selective β -AR inhibitor propranolol. The effects of (R)-enantiomer of β 2-AR agonist should be convenient for athletes and exercisers, but the (S)-enantiomer might influence the bone growth and increase the risk of bone fracture in young users, in particular when used illegal dosage as doping. This study is the first report indicating the different activities of (R)- and (S)-enantiomers of β 2-AR agonist on the muscle and bone. We need to carry out “racemiswitch” to develop drugs consisting useful active enantiomer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：破骨細胞 アドレナリン $\beta 2$ 作動薬

1. 研究開始当初の背景

生体が危機的状態に陥ると、交感神経が刺激されカテコールアミン類が多量に分泌される。その代表であるアドレナリンは、血管収縮作用による血圧上昇効果が誘導されることから、急性循環不全（ショック）や心不全の治療になくなくてはならない薬剤である。歯科臨床でも局所麻酔薬の添加薬として広く用いられている。その中でもアドレナリン $\beta 2$ 作動薬は $\beta 2$ 受容体に選択性を持ち、気管支・子宮・血管などの平滑筋に対して弛緩作用を示すことから、主に喘息治療薬や鎮咳薬として多用されている。また薬物投与による老人の筋力アップによる寝たきりへの防止薬としての期待が高まっている。分担研究者である竹田らは、 $\beta 2$ 受容体 KO マウスの骨量が野生型に比べ増加していた。その原因として、「 $\beta 2$ 受容体を欠損した骨芽細胞は破骨細胞誘導能が低下するために最終的に骨吸収量が減少したと考えられる」という世界から注目される報告を行った。（Nature, 434:514, 2005）

一方、炎症状態ではマクロファージ・単球系細胞がノルアドレナリン合成酵素群を発現亢進させることが報告された。マクロファージと起源を同じくする破骨細胞においても同様の作用を持つと考えられ、交感神経系が骨代謝および炎症性骨吸収機構に重要な役割を持つ可能性が一層強く示唆される。

2. 研究の目的

$\beta 2$ 受容体は GPCR の一種であるので、少なくとも 2 量体になり G 蛋白と共役し細胞内情報伝達をすることが知られている。2 量体になるときに細胞膜に存在するコレステロールを巻き込むことで、結晶構造が変化すること及び、巻き込むコレステロールの違いから組織特異的に $\beta 2$ 受容体の共役する G 蛋白することが Cherezov ら（Science 318 1258, 2007）により判明した。本研究では、リガンドである $\beta 2$ 作動薬の光学異性体 (+)(-)(\pm) を用いて骨芽細胞による破骨細胞誘導能に対する影響を指標に、リガンド結合性・細胞内情報伝達の違いを筋芽細胞・心筋と比較検討する。 $\beta 2$ 受容体の組織特異性の確認をすることで、骨組織においては、自律神経作用が生理的には抑制されていることを明らかにする。

3. 研究の方法

1) 破骨細胞形成系に対する $\beta 2$ 作動薬の影響に関する実験

$\beta 2$ 受容体を発現する骨髄間質細胞株として慶應大の松尾らが樹立した ST2-T 細胞を用い

る。この細胞と造血系細胞との共存培養系に $\beta 2$ 作動薬の各種光学異性体 (+)(-)(\pm) 添加により、造血系細胞が破骨細胞様細胞に分化するか否かを検討する。

培養 4 日目には、ほとんどの細胞が破骨細胞の前駆細胞になるので、この時点より各種の $\beta 2$ 作動薬の光学異性体を 4 8 時間添加し、cAMP 量を測定し、リガンド結合および AC 活性を検討する。6 日間培養終了後、TRAP 染色にて破骨細胞を同定する。また競合的拮抗阻害薬である butoxamine ($\beta 2$ 選択的) と propranolol ($\beta 1 \beta 2$ 非選択的) 添加群でも同様に比較検討する。

2) $\beta 2$ 受容体遺伝子欠損マウスによる検討
リガンドに依存した変化であることを再確認するために $\beta 2$ 受容体遺伝子欠損マウスより骨芽細胞を調整し、野生型の造血幹細胞との共存培養系に $\beta 2$ 作動薬の各種光学異性体 (+)(-)(\pm) 添加により、造血系細胞が破骨細胞様細胞に分化するか否かを検討する。また KO 骨芽細胞の RANKL mRNA 発現を RT-PCR にて検討する。

3) $\beta 2$ 作動薬光学異性体の筋組織・骨組織に対する作用～in vivo 投与との比較検討～
野生型マウスに、3 種類の光学異性体 $\beta 2$ 作動薬を注射投与する。4 週間後にマウスを屠殺し、遅筋繊維の多いヒラメ筋・心筋と、速筋繊維の多い長指伸筋の筋湿重量を比較する。また筋における MHC 同定蛋白の発現の変化を比較検討する。投与された直後に血圧測定し、血管平滑筋に及ぼす影響を検討する。リガンドの違いにおける筋組織に見られる筋肥大作用と骨組織の μ CT による骨量測定を比較検討する。 $\beta 2$ 作動薬に選択的に作用する $\beta 2$ 拮抗薬についても、同様に比較検討を行う。

4. 研究成果

1) 破骨細胞形成系に対する $\beta 2$ 作動薬の影響に関する実験

RT-PCR 法および WB 法により、骨髄間質細胞および骨芽細胞で $\beta 2$ アドレナリン受容体の発現が確認された。ところが、血管平滑筋弛緩作用を持たない (+) 体 tulobuterol が最も強く破骨細胞形成を促進した。また、 $\beta 2$ アドレナリン受容体拮抗薬である butoxamine により、各種 tulobuterol による破骨細胞形成は阻害された。一方、骨髄細胞単独培養系に各 tulobuterol を添加しても、破骨細胞は形成されなかった。さらに (+) tulobuterol 添加により ST2-T 細胞における receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) mRNA の発現亢進および cyclic adenosine 3'

5'-monophosphate (cAMP) が最も強く上昇した。

2) $\beta 2$ 受容体遺伝子欠損マウスによる検討
1) の実験系を用いて、 $\beta 2$ 受容体 KO マウスの骨芽細胞をカルバリアから調整し、野生型の骨髄細胞との共存培養系に(+)(-)(±) $\beta 2$ 作動薬を添加しても破骨細胞形成を誘導できなかった。また cAMP の上昇も確認することが出来なかった。

3) $\beta 2$ 作動薬光学異性体の筋組織・骨組織に対する作用～in vivo 投与との比較検討～マウスに、3 種類の光学異性体 $\beta 2$ 作動薬を注射投与した。4 週間後に屠殺し、遅筋繊維の多いヒラメ筋・心筋と、速筋繊維の多い長指伸筋の筋湿重量を比較した。この場合は MHC 同定蛋白の発現の変化及び筋肥大は(-) 体で伸張し、(+) 体では作用が認められなかった。投与された直後に血圧測定し、血管平滑筋に及ぼす影響臭い手も同様に結果が得られた。一方、骨組織の μ CT による骨量測定を比較検討したところ、逆に(-) 体は影響がなく(+) 体投与群では、骨密度の低下が認められた。また尿中ピリジノリンを測定結果により、(+) 体投与群では、細胞実験同様に生体でも骨吸収が亢進していることが明らかになった。

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) Nishikawa K., Nakashima T., Takeda S., Isogai M., Hamada M., Kimura A., Kodama T., Yamaguchi A., Owen M. J., Takahashi S., and Takayanagi H. Maf promotes osteoblast differentiation in mice by mediating the age-related switch in mesenchymal cell differentiation. *J Clin Invest* 査読有 120, 2010, 3455-3465

(2) Karakawa A., Sano T., Amano H., Yamada S. Inhibitory Mechanism of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs on Osteoclast Differentiation and Activation. *J of Oral Biosciences* 査読有 52, 2010, 119-124

(3) Oka Y, Iwai S, Amano H., Irie Y, Yatomi K, Ryu K, Yamada S., Inagaki K and Oguchi K. Tea polyphenols inhibit rat osteoclast formation and differentiation. *J Pharma Sci* 査読有 118, 2012, 55-64

(4) 山田庄司慢性腎臓病(CKD)患者への歯科薬物療法－薬物動態学的考察－*Dent Med Res.*, 査読有 33, 2013, 43-50

[学会発表] (計 3 件)

(1) Karakawa A., Amano H., Suzuki K., and Yamada S Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Inhibit Osteoclast Activation by Inhibiting

Nuclear Translocation of NF κ B. 2010 年 10 月 17 日 ASBMR 2010 Annual Meeting カナダ(トロント)

(2) 天野均, 府川有紀子, 脇能広, 唐川亜希子, 岡崎雅子, 臼井通彦, 竹田秀, 山本松男, 山田庄司, 宮本謙一 アドレナリン $\beta 2$ 受容体アゴニストの光学異性体による骨吸収作用の違いについて昭和大学大学院歯学研究科・口腔癌包括的研究センター平成 22 年度合同シンポジウム 2011 年 3 月 26 日 東京

(3) 山田庄司 慢性腎臓病 (CKD) 患者への歯科薬物療法 2013 年 3 月 2 日 昭和歯学会・特別例会 (招待講演) 東京

[図書] (計 1 件)

(1) Takeda, S Skeletal Regulation of Energy Metabolism, in Bone and Development in Topic in Bone Biology pp305 Springer. 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

山田庄司 (YAMADA SHOJI)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号 : 00111617

(2) 研究分担者

天野 均 (AMANO HITOSHI)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号 : 90212571

唐川亜希子(KARAKAWA AKIKO)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：70552280

竹田 秀(TAKEDA SHU)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：30376727
(平成 22 年度)

(3) 連携研究者

竹田 秀(TAKEDA SHU)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：30376727
(平成 23、24 年度)