

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5月29日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791792

研究課題名（和文） 破骨細胞における細胞極性の制御機構解明

研究課題名（英文） Analysis of the cell polarity in osteoclasts

研究代表者

増原 正明(MASUHARA MASAOKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：70372901

研究成果の概要（和文）：

細胞極性に関与する多くの Rab ファミリーGTPase および KIF ファミリーモーター分子が破骨細胞の分化時期に関係なく発現していることを見いだした。極性を示す分子の GFP 融合タンパク質発現系を用いてタンパク分子局在の解析系を作製し、Rab ファミリー分子のノックダウン時の影響を解析したが、大きな影響は見られずリダンダンシーが大きいものと考えられた。また、フラボノイドの1種であるケルセチンが膜型エストロゲン受容体 GPR30 を介して破骨細胞の分化抑制を行っていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

1, Many of Rab-family GTPase and KIF-family motor proteins were expressed in osteoclast regardless of its differentiation stage. We analyzed the changes of localization of some molecules that are thought to have polarity using GFP fusion system and siRNA-knockdown system. All of the molecules we analyzed have no effects, and these results seem to show the redundancy of Rab-family proteins.

2, Quercetin, one of major flavonoids found in many fruits, inhibited the differentiation of osteoclast. The assay using specific agonist and antagonist showed that the effects of quercetin were principally via GPR30, GPCR-type estrogen receptor, and Akt phosphorylation pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、極性、ケルセチン、エストロゲン受容体

1. 研究開始当初の背景

骨組織は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が均衡を取ることによって維持されており、このバランスが崩れると骨粗鬆症などの疾病が引き起こされる。骨吸収を担う破骨細胞はマクロファージ系の細胞から分化する多核の細胞であり、非常に特徴的な形態を有している。これまでの多くの研究により破骨細胞の分化については多くの事柄が解明されてきたが、成熟破骨細胞については未知の部分が多く残されている。

成熟破骨細胞は、骨接着面に波状縁やシーリングゾーン、骨髄側には $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換チャネルなどが局在しているなど、極性が非常に発達している細胞である。破骨細胞が骨吸収を行うにあたって、これらの正確な局在は欠かせないものであるが、どのような制御によって維持されているのか、さらには破骨細胞が休止状態から骨吸収状態へ移行する時にはどのような制御がかかっているのか、についてはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では膜分子の輸送を担うモーター分子および輸送の方向性・特異性に大きく関与していると言われている Rab ファミリー GTPase について、分化時期による発現特異性の解析、siRNA 導入によるノックダウン時に指標となる分子の局在がどのように影響されるかの解析、などを通じて、破骨細胞の細胞極性獲得・維持のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

また、フラボノイドの 1 種であるケルセチンが破骨細胞の分化に影響することを見いだしており、このメカニズム解明についても解析を行う。

3. 研究の方法

破骨細胞の形成は骨髄細胞からの *in vitro* 培養系を用いて行った。つまり、C57BL/6 雄マウスから大腿骨・脛骨を取り、これらから骨髄細胞を回収した。マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 存在下で 3 日間培養を行い、接着している細胞を破骨細胞前駆細胞とした。これをさらに M-CSF および RANKL 存在下で 3 日間培養し、TRAP 陽性・多核の破骨細胞を得た。

破骨細胞分化の各段階で RNA とタンパク質を回収し、RT-PCR や Western Blotting など

により解析を行った。ノックダウン実験は破骨細胞前駆細胞に NEPA21 エレクトロポレーターを用いて siRNA 導入を行った。

これらの実験は鹿児島大学遺伝子組換え実験安全管理規則、鹿児島大学における動物実験に関する規則に則って遂行した。

4. 研究成果

(1)

経時的にサンプリングした RNA からの RT-PCR により、破骨細胞の分化時期に関係なく、細胞極性に関与する多くの Rab ファミリー GTPase および KIF ファミリーモーター分子が発現していることを見いだした。分化によって発現誘導もしくは抑制される分子は見つかっていない。

極性を示すことが知られている分子のいくつかについて、GFP 融合タンパク質発現ベクターを作製し、破骨細胞内の局在を解析する系を作製した。この系を用いて Rab ファミリー分子のノックダウン時の影響を解析したが、現在まで大きな影響を与える分子は見つかっていない。破骨細胞内で発現している Rab ファミリー分子の数が多いこともあわせて考えると、Rab ファミリーのリダンダンシーが大きい可能性が考えられる。

(2)

フラボノイドの 1 種であるケルセチンは濃度依存的に破骨細胞の分化を抑制し、 $10 \mu\text{M}$ でほぼ完全に抑制した。

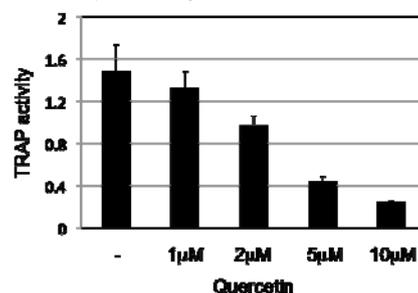


図 1 破骨細胞分化へのケルセチンの影響

ケルセチンにエストロゲン活性がある、と報告されているので、エストロゲン受容体 $\text{ER} \alpha$ 、 $\text{ER} \beta$ の関与を調べたところ、部分的なものであった。そこでエストロゲンの G タンパク質共役型受容体 GPR30 の関与を解析した結果、破骨細胞の分化のすべての時期で GPR30 が発現していること、ケルセチンの破骨細胞

分化抑制には GPR30 が大きく関与していることが明らかになった。

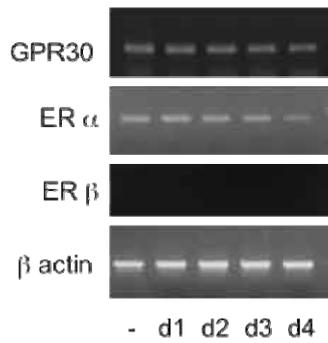


図2 破骨細胞分化時の各種エストロゲン受容体発現

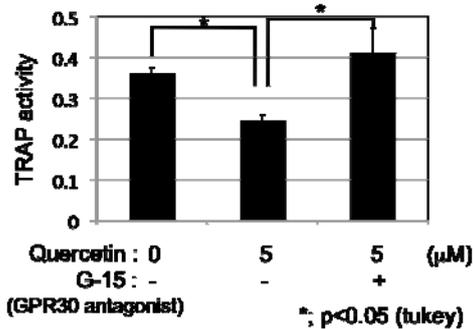


図3 ケルセチンおよび GPR30 アンタゴニストの破骨細胞分化への影響

ケルセチンの破骨細胞分化抑制に関わるシグナル解析を行った結果、ケルセチン存在時には M-CSF と RANKL による Akt のリン酸化が非常に抑制されていることを見いだした。

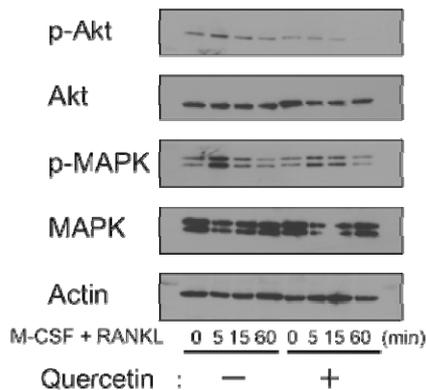


図4 サイトカインによるシグナル分子活性化へのケルセチンの影響

Akt リン酸化抑制は GPR30 agonist によっても引き起こされ、また、GPR30 antagonist 添加によりケルセチンによるリン酸化抑制からの回復が見られた。

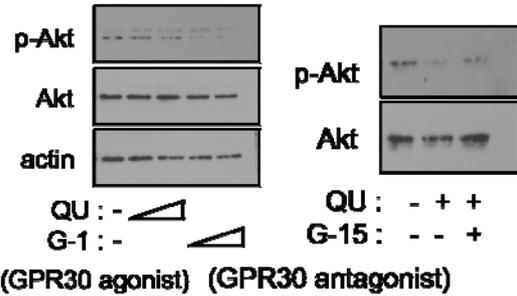


図5 Akt リン酸化における GPR30 アゴニストおよびアンタゴニストの影響

さらに GPR30 のノックダウン時にはケルセチンによる破骨細胞分化抑制が回復していることを見いだした。

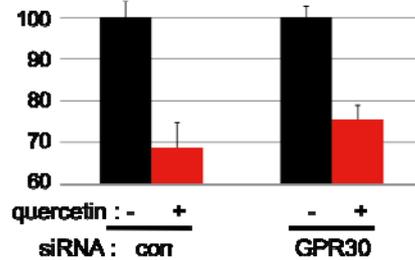


図6 GPR30 ノックダウン時の破骨細胞分化へのケルセチンの影響

これらのことからケルセチンは主に G タンパク質共役型受容体 GPR30 から Akt のリン酸化抑制を介して破骨細胞分化を抑制しているものと考えられた。

ケルセチンは骨芽細胞分化には影響を及ぼさなかったため、骨粗鬆症の予防に有用であることが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- Okayasu M, Nakayachi M, Hayashida C, Ito J, Kaneda T, Masuhara M, Suda N, Sato T, Hakeda Y; Low-density Lipoprotein Receptor Deficiency Causes Impaired Osteoclastogenesis and Increased Bone Mass in Mice Due to a Defect in Osteoclastic Cell-Cell Fusion *J. Biol. Chem.*, 2012, 287(23), 19229-41, 査読有, DOI: 10.1074/jbc.M111.323600

② Hada N, Okayasu M, Ito J, Nakayachi M, Hayashida C, Kaneda T, Uchida N, Muramatsu T, Koike C, Masuhara M, Sato T, Hakeda Y;
Receptor activator of NF- κ B ligand-dependent expression of caveolin-1 in osteoclast precursors, and high dependency of osteoclastogenesis on exogenous lipoprotein
Bone, 2012, 50(1), 226-236, 査読有,
DOI: 10.1016/j.bone.2011.10.028

③ 増原正明
サイトカインと破骨細胞分化におけるシグナル伝達
鹿児島大学歯学部紀要 2010, Vol. 30 45-53,
査読無, <http://hdl.handle.net/10232/17031>

[学会発表] (計8件)

① 増原正明、佐藤友昭
ケルセチンの膜型エストロゲン受容体 GPR30 を介する破骨細胞分化抑制機構の解析
日本薬理学会
2013年3月23日 福岡

② 塚原飛央、増原正明、菌村貴弘、植村正憲、佐藤友昭
反復ストレスと卵巣摘出による GABA 神経機構の機能異常を介したマウスの情動行動変化
日本薬理学会
2013年3月23日 福岡

③ 増原正明、塚原飛央、佐藤友昭
ケルセチンは膜型エストロゲン受容体 GPR30 を介して破骨細胞の分化を抑制する
日本薬理学会西南部会
2012年11月23日 熊本

④ 塚原飛央、増原正明、菌村貴弘、永山知宏、植村正憲、佐藤友昭
ストレスが閉経マウスモデルの情動および GABA 機能に与える影響
歯科基礎医学会
2012年9月15日 福島

⑤ 塚原飛央、永山知宏、増原正明、佐藤友昭
繰り返し強制経口投与による慢性ストレスが卵巣摘出マウスの各種行動実験の成績に及ぼす影響の検討
日本薬理学会

2012年3月15日 京都

⑥ 増原正明、佐藤友昭
ケルセチンによる破骨細胞分化抑制および膜型エストロゲン受容体の関与
日本薬理学会
2012年3月14日 京都

⑦ 増原正明、佐藤友昭
破骨細胞分化におけるケルセチンの影響
歯科基礎医学会
2011年10月2日 岐阜

⑧ 増原正明、永山知宏、佐藤友昭
破骨細胞分化におけるケルセチンの影響-エストロゲン様作用と非エストロゲン様作用-
日本薬理学会
2011年3月24日 横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ：
<http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/Yakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
増原 正明 (MASUHARA MASA AKI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号： 70372901

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし