

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24年 6月 6日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791800

研究課題名（和文）非ステロイド性抗炎症薬による破骨細胞分化・活性化抑制機構の解明

研究課題名（英文）The mechanism of non-steroidal anti-inflammatory drugs on osteoclast differentiation and activation.

研究代表者

唐川 亜希子 (Karakawa Akiko)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：70552280

研究成果の概要（和文）：

消炎鎮痛薬である非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）は、破骨細胞の分化・骨吸収活性を調節する。本研究では破骨細胞の分化過程における シクロオキシゲナーゼ（cyclooxygenase:COX）の動向を解明し、NSAIDs の骨代謝への作用機序を検討した。

研究期間内に我々は、①破骨細胞分化前期から細胞内に COX 発現が認められること、②骨吸収時および炎症起因物質添加時の、成熟破骨細胞の COX-2 発現が増加すること、③細胞内の COX 活性上昇時に転写因子 ERK が影響を受けることを確認した。現在、NF kappa B, I kappa B 等の核内転写因子の関連性について、継続して解析中である。

研究成果の概要（英文）：

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have regulatory effect on bone remodeling. The efficacy of NSAIDs on bone remodeling is controversial. In clinics, NSAIDs progress bone repair as their inhibitory effect of inflammatory factors; in contrast, NSAIDs delay bone fracture healing in animal models. The aim of this study was to elucidate the mechanism of NSAIDs on osteoclast differentiation and bone resorptive activity.

Cyclooxygenase (COX) -1 and -2 transcripts were appeared in early stage of osteoclast differentiation (day3). COX-2 increased on mature osteoclasts and lipopolysaccharide stimulated inflammatory mature osteoclasts. Level of COX-2 transcript has efficacy on extracellular signal-regulated kinase appearance. These results showed that COX-1 and -2 involved in osteoclasts have regulatory effect on osteoclasts differentiation and bone resorptive activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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

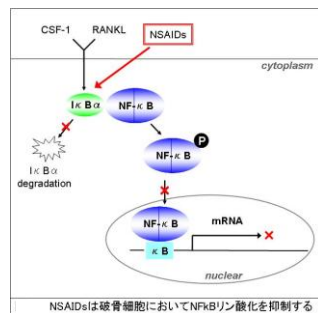
キーワード：歯科薬理学・破骨細胞・NSAIDs・COX

1. 研究開始当初の背景

(1)非ステロイド性抗炎症薬(Non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)は骨代謝に関与する。NSAIDsは骨折モデルにおいて骨代謝を低回転化させる[Ho ML et al. *Clin Orthop*. 58:983-990, 1999; Beck A et al. *Arch Orthop Trauma Surg*. 123: 327-332, 2003]. また NSAIDs による歯槽骨吸収の抑制も報告されている[Paquette DW et al. *J Clin Periodontol*. 27:558-566, 2000].

(2)NSAIDsの破骨細胞における作用は controversial である。種々の in vitro 破骨細胞実験系において、NSAIDsは破骨細胞分化・活性に促進/抑制の双方の作用を示す[Kellinsalmi M et al. *Eur J Pharmacol*. 572: 102-110, 2007; Sawai H et al. 日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集 24: 222, 2006].

(3)NSAIDsの破骨細胞における作用機序は不明である。我々は NSAIDs が破骨細胞の骨吸収活性において cyclooxygenase (COX) 選択性を示すこと、COX 非選択的 NSAIDs である Diclofenac が破骨細胞における NF kappa B リン酸化を抑制することを報告した[Karakawa A et al. *J Dent Res*. 88:1042-1047, 2009. Karakawa A et al. *Dent Med Res*. 29: 46-50, 2009]. 破骨細胞制御因子である他の上流因子 p38MAPK, TRAF6, ERK 等についても、詳細な検討が必要と考えられる。



2. 研究の目的

破骨細胞の分化過程における COX の動向を解明し、NSAIDs の作用機序について詳細に検討する。

3. 研究の方法

(1)破骨細胞分化過程における COX 活性の解析

全骨髄細胞をカラムにて精製し、破骨細胞分化能を持つ造血幹細胞を破骨細胞分化誘導因子 (Colony-stimulating factor-1;

CSF-1, Receptor activator of NF kappa B ligand; RANKL) 存在下で培養する、破骨細胞単独培養系を用いる [Ly IA and Mishell RI. *J Immunol Methods*. 5: 239-247, 1974]. 分化誘導した細胞から mRNA・タンパクを調整し、COX 発現の経時的変化を転写レベル (RT-PCR 法, リアルタイム PCR 法), 翻訳レベル (Western Blot 法) で解析する。

(2)骨吸収活性に関連する炎症性物質の解明
成熟破骨細胞を象牙切片上に播種し、非炎症状態での骨吸収活性発現時に産生される COX および炎症性物質を検索する。前述のように転写・翻訳レベルでの解析を行う他、培養上清中の炎症性物質を ELISA 法にて測定する。また炎症起因物質により炎症を誘発時、破骨細胞の分化・活性化への影響を解析する。炎症誘発時には特に COX-2 活性が上昇することが予測されることから、COX-2 により産生される PGE₂, PGI₂ を中心に解析する。

(3)COX 活性上昇に伴う核内転写因子の動向の解析

COX-2 発現を調整する上流の転写因子として、p38MAPK, TRAF6, ERK 等が報告されている [Tsatsanis et al. *Int J Biochem Cell Biol*. 38:1654-1661, 2006]. しかし COX-2 発現後の細胞内シグナリングについては不明である。既に我々は NF kappa B 活性が NSAIDs により抑制されることを報告しており、炎症時にも同様のメカニズムが働くことが推測される。炎症起因物質により COX-2 産生を誘発し、I kappa B, NF kappa B, リン酸化 NF kappa B 等について RT-PCR 法, Western Blot 法, フローサイトメトリー等で解析する。

(4)NSAIDs 添加時の破骨細胞内における COX 動向の解析と NSAIDs の作用機序の検討

(1)-(3)の結果を参考に、NSAIDs による破骨細胞分化・活性化抑制を検討する。COX と核内転写因子に関連性が認められるならば、COX-1, COX-2 選択的 NSAIDs においても NF kappa B 古典経路に作用するかを調べる。

4. 研究成果

(1)破骨細胞分化過程における COX 活性の解析

破骨細胞の分化・活性過程における COX 阻害剤としての NSAIDs の作用へ注目が集まる一方で、破骨細胞内における COX 活性についてはほとんど報告されていない。我々は単独培養系にて破骨細胞の分化を誘導し、造血幹細胞から多核巨細胞である破骨細胞

への分化過程における細胞内 COX-1, 2 の動向を経時的に検索した。造血幹細胞においては、COX 発現はほとんど認められなかったが、分化因子を加えた誘導系では、形成前期である培養 3 日目から COX-1, 2 とともに継続して発現を認めた。

(2)骨吸収活性に関連する炎症性物質の解明

7-9 日間の培養で得た成熟破骨細胞を象牙切片上に播種し、骨吸収を誘導した。破骨細胞内の COX-2 は転写レベルで増加を示した。炎症起因物質 LPS を添加した破骨細胞分化誘導系において、細胞内および培養上清中の COX-2 ・ prostaglandin E2 が増加する傾向が認められた。

(3)COX 活性上昇に伴う核内転写因子の動向の解析

COX-2 産生を誘発した炎症下の破骨細胞において、ERK が発現することを確認した。また核内転写因子 NF kappa B は抑制傾向を示した。I kappa B, リン酸化 NF kappa B について現在も確認中である。

4)NSAIDs 添加時の破骨細胞内における COX 動向の解析と NSAIDs の作用機序の検討

破骨細胞分化は、使用する NSAIDs により異なる反応を示した。複数の COX-2 選択的阻害薬を用いた実験系において、NS-398, celecoxib では分化が抑制されたが、SC-58125 においては分化抑制は認められるものの、骨吸収活性抑制においては有意差を認めなかった。

骨代謝における NSAIDs の作用については、実験動物の生体内での COX-2 選択的阻害薬を中心とした解析が行われることが多い。我々が研究期間内に明らかにした炎症下での破骨細胞核内因子の動向は、その作用機序の一端を明確にし、基礎的知見を充実させるものである。COX-2 選択的阻害薬について、現在も網羅的な解析を継続中である。

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 2 件)

Morohashi T, Karakawa A, Sakai N, Yamada S. Calcium flux during growth in sham-operated and ovariectomized rats. *Dent Med Res*. 査読有. 31:1-6, 2011.

Nagaoka E, Morohashi T, Kinoshita J, Karakawa A, Sakai N, Yamada S, Inoue M. Effects of tetracycline hydrochloride on measurements with the laser fluorescence device DIAGNOdent: in vitro and in vivo

studies. *Lasers Med Sci*. 査読有. 27:365-70, 2011.

[学会発表] (計 5 件)

Yano A, Suzuki K, Morohashi T, Arimoto T, Karakawa A, Igarashi T, Shinoda H, Yamamoto M, Yamada S. Pam3CSK4, a TLR2 agonist, induces in vitro osteoclastogenesis RANKL-independently and resorbs alveolar bone in rats. *ASBMR 2011 Annual Meeting*. 2011 年 9 月 16 日-20 日. アメリカ合衆国.

矢野亜希子, 鈴木恵子, 諸橋富夫, 唐川亜希子, 山本松男, 山田庄司. TLR2 アゴニストである Pam3CSK4 による破骨細胞形成とラット上顎口蓋骨骨吸収作用について. *第 29 回日本骨代謝学会*. 2011 年 7 月 27 日. 大阪.

Yano A, Suzuki K, Morohashi T, Arimoto T, Karakawa A, Sakai N, Igarashi T, Yamamoto M, Yamada S. Pam3CSK4, a TLR2 Agonist, Induces in vitro Osteoclastogenesis RANKL Independently and Resorbs Alveolar Bone in Rats. *第 31 回昭和歯学会総会*. 2011 年 7 月 2 日. 昭和大学

Nagaoka E, Morohashi T, Kinoshita J, Karakawa A, Sakai N, Yamada S, Inoue M. Effects of tetracycline hydrochloride on measurements with the laser fluorescence device DIAGNOdent: in vitro and in vivo studies. *第 30 回昭和歯学会例会*. 2010 年 12 月 4 日. 昭和大学.

Karakawa A, Amano H, Suzuki K, and Yamada S. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs Inhibit Osteoclast Activation by Inhibiting Nuclear Translocation of NF kappa B. *ASBMR 2010 Annual Meeting*. 2010 年 10 月 7 日. カナダ.

[その他]

ホームページ

昭和大学研究成果データベース
<https://rdb.showa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

唐川 亜希子 (KARAKAWA AKIKO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：70552280

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：