

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592227

研究課題名(和文) BMPシグナル伝達系へのカテコラミンの促進効果(運動による骨形成促進メカニズム)

研究課題名(英文) Catecholamine accelerates osteoblastic differentiation by enhancing bone -The effects of exercise on bone formation-

研究代表者

鈴木 亨暢 (Suzuki, Akinobu)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00445016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに培養骨芽細胞において、カテコラミンが骨形成蛋白(bone morphogenetic protein以下BMP)のもつ骨芽細胞分化促進作用をさらに増強させることを解明してきた。そこでこのカテコラミンによるBMPの増強作用の詳細なシグナル経路について解明した。マウス全身投与によるエピネフリンの血中濃度上昇が、cAMP/CRE signalingおよびアドレナリン 2受容体・PKA系経路を介して、BMPの骨芽細胞分化促進作用を増強し、骨形成を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Topical effects of a catecholamine on bone morphogenetic protein (BMP)-induced ectopic bone formation were investigated. Epinephrine enhanced bone induction by BMP-2. The mass of ossicles ectopically induced by BMP-2 was increased by the systemic addition of epinephrine. The expression level of alkaline phosphatase (ALP) in cells was consistently elevated by BMP-2 and was further elevated by the addition of epinephrine. The epinephrine-enhanced ALP elevation was specifically abolished by an antagonist to beta 2-adrenergic receptors and by a protein kinase A inhibitor. The luciferase activity of the Id1 gene was elevated by BMP-2 treatment and this activity was further enhanced by the addition of epinephrine. Epinephrine-enhanced luciferase activity was abolished by mutation of the cAMP-response element (CRE) sequence in the Id1 promoter, indicating that CRE-binding transcription proteins induced by epinephrine addition may act as enhancers of Smad-mediated BMP signaling.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨形成蛋白 BMP カテコラミン 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症の有病者率は、本邦ですでに 1000 万人を超えたといわれている。その予防対策として、適度な運動は骨量と骨の強度の維持に重要であることがすでに報告されている。その作用メカニズムについては、力学的負荷による骨細胞ネットワークの歪みや骨細胞周囲の組織液の流れによる物理的刺激として感知され、骨芽細胞の機能亢進となって骨形成が亢進すると仮想されている。特に運動による骨量増加効果は学童期、思春期で明確であるとされる。しかし現時点ではその機序は明らかではない。

一方、運動後の身体的変化として、血中乳酸値の上昇とともにカテコラミン値(アドレナリン; A、ノルアドレナリン; NA)の上昇が報告されている。この運動後のカテコラミン上昇は思春期に顕著で、瞬発力を求められる競技者で顕著であるとの報告が多い。しかし、この運動後の内分泌的变化による骨形成促進への効果については報告が少ない。

骨芽細胞にはアドレナリン受容体(受容体、受容体)のうち、受容体の発現が報告されている。受容体にリガンド(A, NA)が結合するとGs蛋白を介してadenylate cyclaseが活性化されcyclic AMPの合成、さらにはprotein kinase A(PKA)が活性化され、CREB(cAMP response element binding protein)のリン酸化により標的遺伝子上のCRE(cAMP response element)に結合して遺伝子発現を調節するとされている。ここで、従来我々はR-Smads(Smad 1,5,8)とCo-Smad(Smad4)による骨形成蛋白(bone morphogenetic protein 以下BMP)の細胞内シグナル伝達系でBMPの初期応答遺伝子(I_d1, BMP-6)のpromotor領域のSmads複合体結合部位(BMP responsive element, BRE)近くにCRE配列が存在し、cAMP/PKA/CREB/CRE配列を介したBMP転写活性の増幅に作用していることを明らかにした。

この事実から、運動によって分泌亢進したカテコラミンがアドレナリン受容体を介してBMPのシグナル伝達を活性化し、骨形成を促進し多結果、運動による骨形成を高めている可能性がある。

2. 研究の目的

我々はこれまでに培養骨芽細胞において、カテコラミンがBMPのもつ骨芽細胞分化促進作用をさらに増強させることを報告した。そこで本研究ではカテコラミンによるBMPの増強作用の詳細なシグナル経路について転写因子レベルで解明する。*in vivo*では、運動によって上昇する血中カテコラミン濃度とBMPとの相互作用を調べる。運動による新しい骨量維持機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) カテコラミンによるBMPの効果促進のメカニズムの解明 (*In vitro*)

骨髄由来間葉系幹細胞(ST2細胞)に、カテコラミン(エピネフリン、ノルエピネフリン、ドパミン)をリコンビナントヒトBMP2(rhBMP2)と共投与し、骨芽細胞分化についてALPアッセイ(投与3日後)で評価した。アドレナリン受容体の関与、cAMP/PKA系の関与、PKC系の関与、MAPK系の関与を検討するために、各種inhibitorを前投薬した上で、エピネフリンとrhBMP2を共投与し、ALPアッセイを用いてinhibitorによるブロック効果の程度を評価した。

カテコラミンによるBMP転写調節について評価するため、BMPの初期応答遺伝子であるI_d1のプロモーター解析を行った。I_d1 geneのpromoter plasmidからBRE配列(BMP系)とCRE配列(cAMP系)を単独もしくは双方に変異導入した4種のI_d1 promoterを作製し、MC3T3-E1, ST細胞にplasmidをトランスフェクションした。エピネフリンをrhBMP2と共投与し、ルシフェラーゼによるI_d1 promoterレポーターアッセイで評価した。

(2) カテコラミン全身投与によるBMPの骨形成促進作用の増強効果 (*In vivo*)

我々はこれまでにBMPを非常に効率よく徐放させる担体ポリマー(Polylactic acid-polyethylene block co-polymer)を用いて、マウスの筋膜下に新生異所性骨を作製するマウス異所性骨誘導実験モデルを発展させてきた。そこで、rhBMP5 μg含有のポリマーを背筋筋膜下に埋植したマウスに、エピネフリンの全身投与を行い、3週間後の新生異所性骨についてレントゲン評価と骨量を測定した。カテコラミンを全身投与しない群をコントロール群とした。

4. 研究成果

(1) ST2細胞にエピネフリン($10^{-8}M$, $10^{-7}M$)、ノルエピネフリン($10^{-8}M$)、ドパミン($10^{-8}M$)を各々rhBMP2(100ng/ml)と共投与したところ、rhBMP2単独投与群に比べて、共投与群のALP活性はいずれも上昇した(図1)。

アドレナリン 2受容体選択的阻害剤(Butoxamine, $10^{-6}M$)およびPKA inhibitor(H89, $2 \times 10^{-8}M$)を前投薬した上で、エピネフリン($10^{-8}M$)とrhBMP2(50ng/ml)を共投与したところ、エピネフリンに付加によるALP活性の上昇は抑制される結果となった。しかし、アドレナリン 1受容体選択的阻害剤(Prazosin, $10^{-7}M$)やPKC inhibitor(G6976, $10^{-8}M$)・MAPK inhibitor

(SB203580; 10^{-8} M) を前投薬した上で、エピネフリンと rhBMP2 を共投与しても、エピネフリンによる ALP 活性の上昇は抑制されなかった (図 2)。

図 1

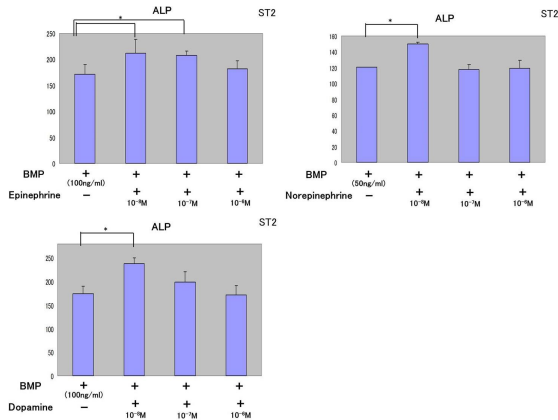
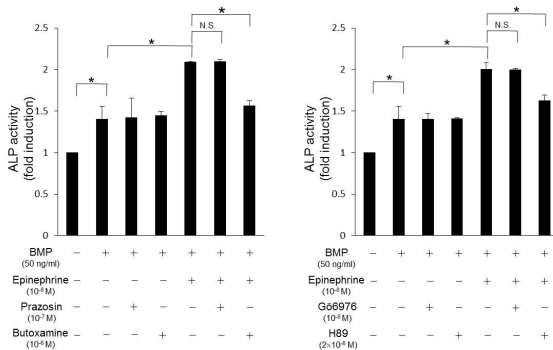


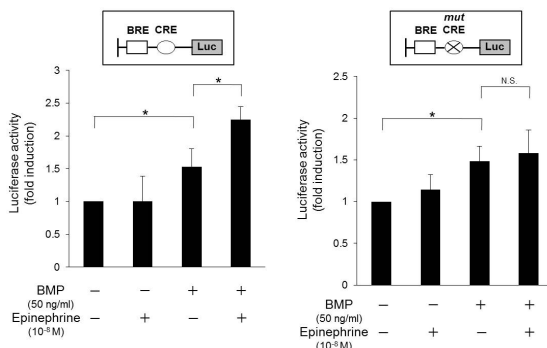
図 2



以上より、エピネフリンによる BMP の骨芽細胞分化促進作用の増強効果は、アドレナリン 2 受容体及び PKA 系経路を介して作用していることが明らかとなった。

次に ID1 レポーターアッセイでは、BMP による ID1 レポーターアッセイの上昇は、エピネフリンの付加によってさらに上昇した。しかし、CRE 配列を変異した ID1 promoter のレポーターアッセイでは、エピネフリンの付加による上昇は認められなかった (図 3)。

図 3

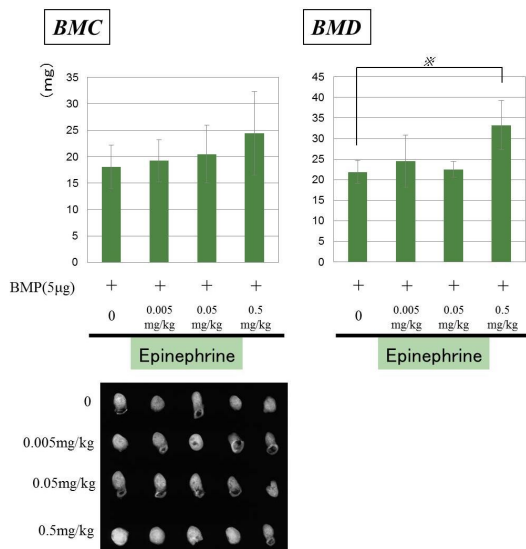


以上より、エピネフリンによる BMP の骨芽細胞分化促進作用の増強効果は、

cAMP/CRE signaling が関与していることが判明した。つまり、エピネフリンによる BMP の骨芽細胞分化促進作用の増強メカニズムは、アドレナリン 2 受容体及び PKA 系経路を介して作用しており、転写因子のレベルでは cAMP/CRE signaling が関与していることが明らかとなった。

(2) マウス異所性骨誘導モデル (背筋筋膜に rhBMP5 μ g を含有したポリマーを埋植) において、エピネフリンを 0.5mg/kg で 3 週間連日皮下注射したところ、3 週間後の新生異所性骨は、コントロール群に比べて Bone mineral density の有意な増加を認め、軟 X 線画像でサイズの増大を認めた (図 4)。

図 4



以上まとめると、全身投与によるエピネフリンの血中濃度上昇が、cAMP/CRE signaling およびアドレナリン 2 受容体・PKA 系経路を介して、BMP の骨芽細胞分化促進作用を増強し、骨形成能を促進することが示唆された。

今後、マウスにカテコラミンを全身投与 (間欠的皮下注射) した場合の血中アドレナリン濃度の変動、および、BMP に対するカテコラミンの全身効果について検討したい。また、マウス異所性骨誘導実験モデルを用いて、マウスに運動負荷を加えた場合の血中アドレナリン濃度の変動を測定し、および BMP に対する運動効果についても検討を重ねたい。

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 12 件)

Suzuki A, Daubs MD, Inoue H, Hayashi T, Aghdasi B, Montgomery SR, Ruangchainikom M, Hu X, Lee CJ, Wang CJ,

Wang BJ, Nakamura H. Prevalence and motion characteristics of degenerative cervical spondylolisthesis in the symptomatic adult. *Spine*. 38(17). E1115-20. 2013. 査読有.

Ibrahim M, Terai H, Yamada K, Suzuki A, Toyoda H, Nakamura H. The role of internal fixation for long bone metastasis prior to impending fracture: an experimental model. *J Orthop Sci*. 18(4). 659-66. 2013. 査読有.

Dohzono S, Matsumura A, Terai H, Toyoda H, Suzuki A, Nakamura H. Radiographic evaluation of postoperative bone regrowth after microscopic bilateral decompression via a unilateral approach for degenerative lumbar spondylolisthesis. *J Neurosurg Spine*. 18(5). 472-8. 2013. 査読有.

Hoshino M, Tsujio T, Terai H, Namikawa T, Kato M, Matsumura A, Suzuki A, Takayama K, Takaoka K, Nakamura H. Impact of initial conservative treatment interventions on the outcomes of patients with osteoporotic vertebral fractures. *Spine*. 38(11). E641-8. 2013. 査読有.

Takahashi S, Suzuki A, Toyoda H, Terai H, Dohzono S, Yamada K, Matsumoto T, Yasuda H, Tsukiyama K, Shinohara Y, Ibrahim M, Nakamura H. Characteristics of diabetes associated with poor improvements in clinical outcomes after lumbar spine surgery. *Spine*. 38(6). 516-22. 2013. 査読有.

Yasuda H, Matsumura A, Terai H, Toyoda H, Suzuki A, Dozono S, Nakamura H. Radiographic evaluation of segmental motion of scoliotic wedging segment in degenerative lumbar scoliosis. *J Spinal Disord Tech*. 26(7). 379-84. 2013. 査読有.

Xiong C, Daubs MD, Montgomery SR, Aghdasi B, Inoue H, Tian H, Suzuki A, Tan Y, Hayashi T, Ruangchainikom M, Chai T, Corey M, Wang JC. BMP-2 Adverse Reactions Treated With Human Dose Equivalent Dexamethasone in a Rodent Model of Soft-Tissue Inflammation. *Spine*. 38(19). 1640-7. 2013. 査読有.

Hara Y, Hashimoto Y, Takigami J, Yamasaki S and Nakamura H. Anterior Opening Wedge Osteotomy of the Proximal Tibia for Genu Recurvatum Caused by Partial Proximal Tibial Epiphyseal Arrest. *Journal of Case Reports in Medicine*. Vol2. ID 235710. 2013. 査読有.

橋本 祐介, 山崎 真哉, 瀧上 順誠, 寺井 彰三郎, 中村 博亮. 円板状半月手術後再手術に至った症例検討. *JOSKAS(1884-8842)*38 巻 1 号.

Page(2013.03). 38(1). 172-173. 2013. 査読有.

橋本 祐介, 山崎 真哉, 瀧上 順誠, 寺井 彰三郎, 中村 博亮. 若年者円板状半月損傷に対する半月形成と縫合併用手術後 MRI の経時的変. *JOSKAS(1884-8842)*38 巻 1 号. Page(2013.03). 38(1). 170-171. 2013. 査読有.

Uemura T, Takamatsu K, Okada M, Ikeda M, Nakamura H. Radial artery perforator adiposal flap for coverage of the scarred median nerve. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 66(7). 1019-21. 2013. 査読有.

上村 卓也, 高松 聖仁, 池田 幹則, 岡田 充弘, 香月 憲一, 田畑 泰彦, 筏 義人, 中村 博亮. 末梢神経の再生医療生体吸収性人工神経を用いた iPS cell- & bFGF drug-delivery system の有効性. 末梢神経. 24(1). 90-8. 2013. 査読有.

[学会発表](計 22 件)

Suzuki A, Daubs MD, Hayashi T, Ruangchainikom M, Xiong C, Scott TP, Phan K, Wang JC. Magnetic Resonance Classification System of Cervical Intervertebral Disc Degeneration - Its Validity and Meaning. 第 41 回 Cervical Spine Research Society. 2013/12/5-12/7.

橋本 祐介, 米谷 泰一, 奥平 修三, 平松 久仁彦, 中田 研. 日本ジュニアエリートテニス選手の世代別障害発生率の検討. 第 23 回日本臨床スポーツ医学会. 2013/10/25-26.

橋本 祐介, 山崎 真哉, 瀧上 順誠, 寺井 彰三郎, 金田 国一, 富原 朋弘, 中村 博亮. 若年性外側完全円板状半月に対する半月術後離断性骨軟骨炎発生率の検討. 第 23 回 日本臨床スポーツ医学会. 2013/10/25-26.

上村卓也, 高松聖仁, 池田幹則, 岡田充弘, 田畑泰彦, 筏義人, 中村博亮. iPS 細胞ハイブリッド型人工神経による末梢神経再生. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2013/10/17-10/18.

Uemura T, Takamatsu K, Ikeda M, Okada M, Kazuki K, Nakamura H. Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. 第 68 回 American Society For Surgery Of The Hand. 2013/10/3-10/5. Uemura T, Takamatsu K, Okada M, Ikeda

M, Kazuki K, Nakamura H. Radial artery perforator adiposal flap for the treatment of recurrent adhesion neuropathy of the median nerve. 第 68 回 American Society For Surgery Of The Hand. 2013/10/3-10/5.

上村卓也, 高松聖仁, 池田幹則, 岡田充弘, 田畑泰彦, 筏義人, 香月憲一, 中村博亮. 自家神経移植に匹敵する人工神経の開発 iPS 細胞と FGF-DDS を導入した新規ハイブリッド型人工神経. 第 40 回日本マイクロサージャリー学会学術集会. 2013/9/26-9/28.

橋本 祐介, 瀧上 順誠, 山崎 真哉, 寺井 彰三郎, 金田 国一, 富原 朋弘, 島田 永和, 中村 博亮. 若年性外側円板状半月に対する半月術後離断性骨軟骨炎発生率の検討. 第 38 回日本整形スポーツ医学会. 2013/9/13-14.

橋本 祐介, 山崎 真哉, 瀧上 順誠, 寺井 彰三郎, 中村 博亮. 二重束前十字靭帯再建術後 MRI 評価と前方不安定性の関係. 第 38 回日本整形スポーツ医学会. 2013/9/13-14.

上村卓也, 高松聖仁, 池田幹則, 岡田充弘, 横井卓哉, 香月憲一, 筏義人, 中村博亮. iPS 細胞ハイブリッド型人工神経による末梢神経の再生医療 -マウス坐骨神経欠損モデルにおける長期成績と安全性について-. 第 24 回日本末梢神経学会学術集会. 2013/8/23-8/24.

Suzuki A, Terai H, Toyoda H, Takahashi Y, Nakamura H. Clinical Outcomes of Microsurgical Bilateral Decompression via Unilateral Approach with Midline Spinous Process Splitting for Lumbar Spinal Stenosis -Minimum of 2 years Follow-up -. 第 13 回 The Pacific and Asian Society of the Minimally Invasive Spine Surgery. 2013/8/1-8/3.

橋本 祐介, 瀧上 順誠, 寺井 彰三郎, 中村 博亮. 円板状半月形成術後の MRI を用いた半月形態と内部変化の検討. 第 5 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会. 2013/6/20-22.

橋本 祐介, 山崎 真哉, 瀧上 順誠, 寺井 彰三郎, 中村 博亮. 二重束前十字靭帯再建術後 MRI 評価と不安定性の関係. 第 5 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会. 2013/6/20-22.

Uemura T, Takamatsu K, Ikeda M, Okada M, Kazuki K, Nakamura H. Improvement of peripheral nerve regeneration by tissue-engineered nerve conduits combined with induced pluripotent stem cell technology. 第 18 回 Federation of European Societies for Surgery of the Hand. 2013/5/29-6/1.

上村卓也, 高松聖仁, 岡田充弘, 池田幹

則, 中村博亮. 正中神経剥離後に対する橈骨動脈穿通枝脂肪弁の使用経験. 第 86 回日本整形外科学会学術集会. 2013/5/23-5/26.

橋本 祐介, 山崎 真哉, 瀧上 順誠, 寺井 彰三郎, 中村 博亮. 円板状半月形成術後の MRI を用いた半月形態と内部変化の検討. 第 85 回日本整形外科学会学術集会. 2013/5/23-25.

Suzuki A, Daubs MD, Hayashi T, Aghdasi B, Montgomery SR, Phan K, Scott TP, Nakamura H, Wang JC. Incidence of disc degeneration of the thoracic spine and its effect on the segmental motion and spinal canal in symptomatic patients. 第 40 回 International Society for the Study of Lumbar Spine. 2013/5/13-5/17.

Suzuki A, Inoue H, Hayashi T, Nakamura H, Daubs MD, Wang JC. Prevalence and Motion Characteristics of Degenerative Cervical Spondylolisthesis in Symptomatic Adult. 第 42 回日本脊椎脊髄病学会. 2013/4/25-4/27.

Suzuki A, Hayashi T, Nakamura H, Daubs MD, Wang JC. Incidence of disc degeneration of the thoracic spine and its effect on the segmental motion and spinal canal in symptomatic patients. 第 42 回日本脊椎脊髄病学会. 2013/4/25-4/27.

上村卓也, 高松聖仁, 岡田充弘, 池田幹則, 中村博亮. 正中神経剥離後に対する橈骨動脈穿通枝脂肪弁の有用性. 第 56 回日本手外科学会学術集会. 2013/4/18-4/19.

21 橋本 祐介, 瀧上 順誠, 山崎 真哉, 中村 博亮. 二重束前十字靭帯再建術後 MRI 評価と不安定性の関係. 第 120 回 中部日本整形外科災害外科学会. 2013/4/5,6.

22 Uemura T, Takamatsu K, Ikeda M, Okada M, Nakamura H. Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Neurospheres for Peripheral Nerve Repair. 2013 American Society for Peripheral Nerve. 2013/1/11-1/13.

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 橋本祐介. ジャンパー膝. 今日の治療指針. 1013-1014. 2014.
- 2) 上村卓也, 高松 聖仁, 中村 博亮. 【整形外科領域と再生医療】神経再生 iPS 細胞と人工神経を用いた末梢神経再生治療開発. Pharma Medica. 31(4). 37-42. 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 亨暢 (SUZUKI, Akinobu)

大阪市立大学大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：00445016

(2)研究分担者

高岡 邦夫 (TAKAOKA, Kunio)
大阪市立大学大学院医学研究科・名誉教授
研究者番号：30112048

橋本 祐介 (Hashimoto, Yusuke)
大阪市立大学大学院医学研究科・講師
研究者番号：10382178

上村 卓也 (UEMURA, Takuya)
大阪市立大学大学院医学研究科・病院講師
研究者番号：10597321

(3)連携研究者

なし