

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592729

研究課題名(和文)ドコサヘキサエン酸による破骨細胞分化抑制機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of osteoclast differentiation mechanism of suppression by docosahexaenoic acid

研究代表者

穉山 雅子 (Akiyama, Masako)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：30436646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：DHAの処理時間を検討した結果、DHAは破骨細胞の後期に存在することが必須であり、破骨細胞融合過程に作用していると考えられた。sRANKL存在下で3日間培養したBMMsの遺伝子発現プロファイルを調べ、DHAおよびEPAによって相反する方向に発現が変動する遺伝子を比較した。GO解析の結果、細胞運動、細胞接着、細胞間シグナル伝達および細胞形態形成に関連する遺伝子群が抽出された。また、定量的PCR分析によって破骨細胞における細胞融合過程に不可欠な遺伝子であるDC-STAMPの他、Siglec-15、Tspan7、およびMst1rなどの遺伝子がDHAにより阻害されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We performed gene expression analysis using microarrays to identify genes affected by the DHA treatment during osteoclastogenesis. DHA strongly inhibited osteoclastogenesis at the late stage. Among the genes up-regulated by the sRANKL treatment, 4779 genes were down-regulated by DHA and up-regulated by the EPA treatment. Gene ontology analysis identified sets of genes related to cell motility, cell adhesion, cell-cell signaling, and cell morphogenesis. Quantitative PCR analysis confirmed that DC-STAMP, an essential gene for the cell fusion process in osteoclastogenesis, and other osteoclast-related genes such as Siglec-15, Tspan7, and Mst1r were inhibited by DHA.

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：ドコサヘキサエン酸 破骨細胞 分化

### 1. 研究開始当初の背景

不飽和脂肪酸 (PUFA) は n-3 系、n-6 系に大別される。前者の代表であるエイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) は動脈硬化、脂質異常症、認知症などに対する効果が検討されており、中性脂肪に対しては特定保健用食品として許可されるなど注目されている。

PUFA の骨への効果については、マウスに n-3 PUFA を含む魚油を投与する実験では加齢による骨密度低下の抑制 (Shen, CL., et al., Br.J.Nutr., 462-468, 2006)、慢性関節リウマチ、骨粗鬆症について骨ミネラル量の増加及び滑膜炎の低下が報告されているが、その作用機序については未だ不明な点が多い。

我々はマウスの骨髄由来単核球を用いた系で生理的濃度 (1, 3 および 10 $\mu$ M) の PUFA の効果を検討したところ、同じ n-3 系 PUFA の中でも DHA は強力な破骨細胞分化抑制作用を示し、EPA は破骨細胞促進作用を示すという結果を得た (Yuan J, et al., Prostaglandins & Other Lipid Mediators 92, 85-90, 2010)。我々は DHA による破骨細胞形成抑制機序を明らかにすることにより、新たな骨疾患の治療標的を提示することを目的とした。

### 2. 研究の目的

DHA の破骨細胞形成抑制作用は EPA とは明らかに異なっていることから、これまでに明らかになっていない新たな作用機序によるものと考えた。

EPA による破骨細胞形成促進作用については EPA のシクロオキシゲナーゼ代謝産物の PGE3 によるものであることが判明した (Yuan J, et al., Prostaglandins & Other Lipid Mediators 92, 85-90, 2010) が、DHA のシクロオキシゲナーゼ代謝産物として、PG は存在しない。PUFA のリポキシゲナーゼ代謝産物として EPA の代謝産物である resolvin E (RvE) シリーズ、DHA の代謝産物である resolvin D (RvD) シリーズ及び neuroprotectin D1 (NPD1) が同定されている。特に RvE1 については破骨細胞形成や骨吸収に影響を与えることが報告されている (Herrera BS., et al., Br.J.Pharmacol., 2008)。一方、DHA のリポキシゲナーゼ代謝産物である RvD1、NPD1 の破骨細胞形成に対するいは未だ明らかでない。RvD1、NPD1 の作用について検討したが、それぞれの作用は DHA の作用と比較して弱いものであった。

そこで、DHA が破骨細胞形成過程のどの段階に作用するのかを明らかにし、更に遺伝子発現解析を行い DHA と EPA の比較することから DHA の作用機序を解明することを試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 破骨細胞形成試験

マウス大腿骨及び脛骨から骨髄由来単核

球 (BMM) を採取し、Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) および Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand (RANKL) 存在下で培養し、破骨細胞への分化を誘導する in vitro 単培養系を用いた。

Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行い、TRAP 陽性かつ 3 核以上の多核細胞を破骨細胞と同定し、顕微鏡下で破骨細胞が占める面積を測定して形成率を評価した。

#### (2) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

72 時間培養した BMM から total RNA を抽出し、マイクロアレイにより遺伝子解析を行った。マイクロアレイによる測定は Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) および Takara Bio (Osaka, Japan) に依頼した。データ解析には Gene Spring GX (Agilent Technology) を使用した。

#### (3) 定量的 PCR による遺伝子発現解析

72 時間培養した BMM (RANKL および PUFA は培養開始時から添加) から total RNA を抽出し、逆転写 (ReverTra Ace, TOYOBO) 後、KAPA SYBR<sup>®</sup> Fast qPCR Kit (KAPA BIOSYSTEMS) を用い、検量線法で定量的 PCR を行った。遺伝子発現量は GAPDH 発現量で補正した。

### 4. 研究成果

(1) DHA と EPA の作用を比較すると、EPA 処理ではより大きな破骨細胞が形成されるのに対し、DHA 処理では大きさ及び核数とも小さい破骨細胞しか観察されなかった (図 1)。

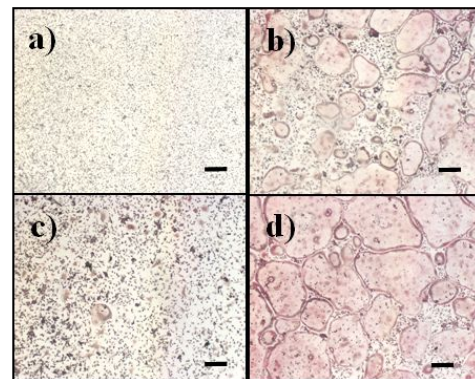


図 1 DHA および EPA の破骨細胞形成に対する作用

a) RANKL 無処置、b) RANKL 処置対照、c) RANKL 処置 + DHA 10 $\mu$ M 添加、d) RANKL 処置 + EPA 10 $\mu$ M 添加  
bar : 200 $\mu$ m

また、DHA 処理において多核化していない細胞が TRAP 陽性を示していることから、DHA は細胞融合過程を抑制している可能性が高いと考え、DHA 処理時間を変えて検討したところ、DHA は分化過程の後期、特に 72 時間前後に存在することが重要であることが示された (図 2)。

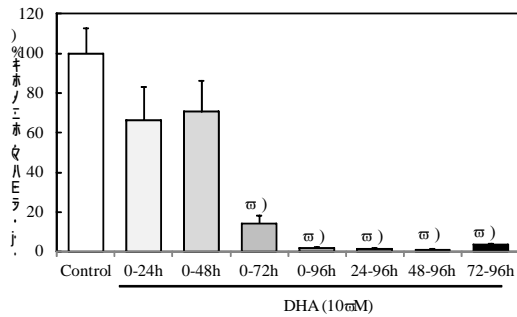


図 2 DHA 処理時間と破骨細胞形成抑制作用の関連

平均値 ± SEM (n=4 ~ 5)

\*\*\* : 対照群 (RANKL 処置) に対する有意差 (p<0.001, Dunnett 多重比較検定)

(2)前述の結果から、DHA 処理 72 時間での遺伝子発現に注目し、マイクロアレイによる解析を行った。RANKL(-)、RANKL(-)+DHA(+)、RANKL(+), RANKL(+)+DHA(+ )の 4 群で比較したところ、RANKL によって発現が上昇しかつ DHA によってその上昇が低下した遺伝子の中には破骨細胞分化に関連する DC-STAMP、Nfat-c1、接着分子 Itgβ 3、レクチンファミリーの Siglec-15 などが含まれていた。

(3)RANKL で発現が上昇し、DHA によって上昇が低下した遺伝子の中から Tspan7、Mst1r、DC-STAMP 及び Siglec-15 について定量的 PCR を行い、発現量の変化を確認するとともに EPA の作用と比較した(図 3)。

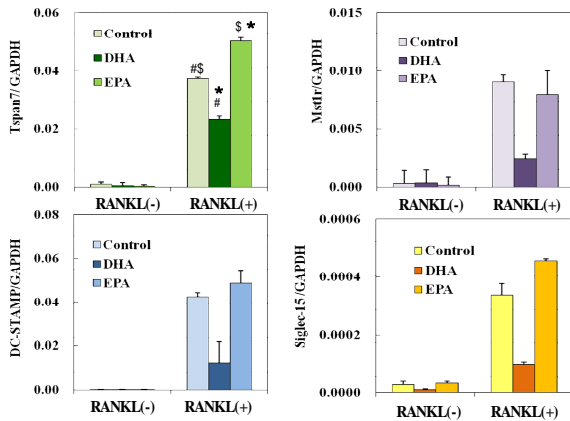


図 3 real time PCR による定量

平均値 ± SEM (n=3)

DHA(10μM)、EPA(10μM)使用

#: 対照群との有意差, \$:DHA との有意差, #:EPA との有意差 (いずれも p<0.05, Tukey-Kramer 多重比較検定)

Tspan7、Mst1r、DC-STAMP 及び Siglec-15 のいずれも DHA による発現量の低下は再現良く確認できたが、一方、EPA による発現量の増加については Tspan7、DC-STAMP および Siglec-15 については増加傾向がみられたが、Mst1r では増加が認められなかった。これら遺伝子は DHA による破骨細胞形成抑制作用へ

の関与は認められるが、EPA の作用との関係については更なる検討が必要と思われる。

(4)DHA(10μM)及び EPA(10μM)処理 72 時間後に BMM から RNA を抽出し、RANKL(-)、RANKL(+), RANKL(+)+DHA 及び RANKL(+)+EPA の 4 群についてマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現を比較した。RANKL によって発現が上昇した遺伝子のうち、DHA で遺伝子発現が減少し、かつ EPA によって増加した遺伝子は 4779 認められた。

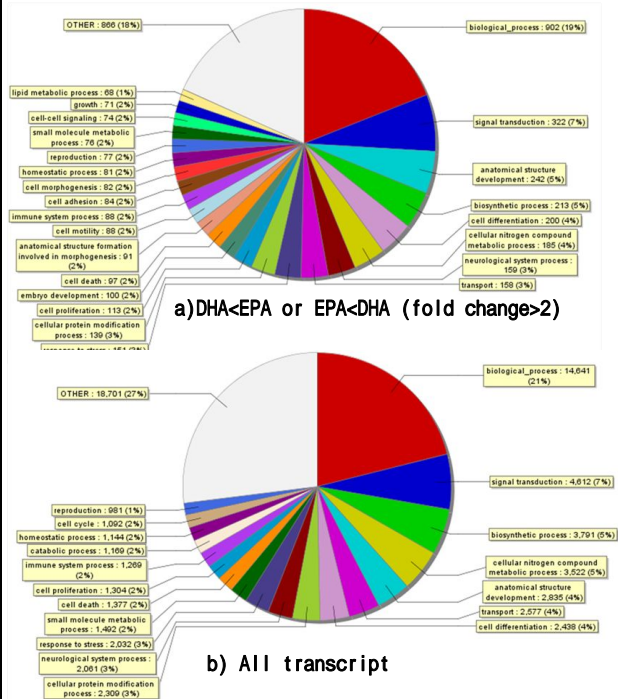


図 4 Gene Ontology 解析

DHA と EPA で発現量が 2 倍以上変化していた遺伝子について Gene Ontology 解析を行った結果、“embryo development”、“cell motility”、“cell adhesion”、“cell morphogenesis”、“cell-cell signaling”及び“lipid metabolic process”の遺伝子群が enrich されていることが明らかとなった(図 4)。

本研究では本研究では、破骨細胞形成に対する DHA の効果が破骨細胞分化のうち細胞融合過程に重要であることが示された。通常 n-3系 PUFA として類似の働きをすると思われるがちな EPA と DHA が反対の作用を示すという結果は重要なものであり、今回遺伝子解析によっていくつかの注目すべき遺伝子変化が観察された。しかしながら、DHA の作用機序を明らかにするには至らず、これらの遺伝子の相互作用についての解析が、DHA の破骨細胞形成抑制機序を明らかにするために必要と考えられる。

## 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 1件)

Akiyama M, Nakahama K, Morita I.,  
Impact of docosahexaenoic acid on gene  
expression during osteoclastogenesis in  
vitro--a comprehensive analysis.,  
Nutrients, 2013 Aug 13;5(8):3151-62. 査  
読あり  
doi: 10.3390/nu5083151

〔学会発表〕(計 3件)

穠山雅子、中浜健一、李香蘭、竹田省、森  
田育男「Involvement of adhesion molecules  
in osteoclastogenesis」第84回日本生化学  
会大会、2011年9月23日、京都国際会議場  
穠山雅子、中浜健一、森田育男「ドコサエ  
キサエン酸の破骨細胞分化阻害作用に関す  
る遺伝子発現の解析」第85回日本生化学会、  
2012年12月16日、マリンメッセ福岡  
穠山雅子、中浜健一、森田育男「破骨細胞  
形成に関する遺伝子発現に及ぼすドコサヘ  
キサエン酸およびエイコサペンタエン酸の  
影響」第34回日本炎症・再生医学会、2013  
年7月2日、国立京都国際会館

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0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

穠山 雅子 (AKIYAMA, Masako)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・特任助教  
研究者番号：30436646

### (2) 研究分担者

中浜 健一 (NAKAHAMA, Ken-ichi)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・准教授

研究者番号：60281515

### (3) 連携研究者

森田 育男 (MORITA, Ikuo)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・教授

研究者番号：60100129