

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792009

研究課題名(和文) リゾホスファチジン酸による破骨細胞活性と機能発現調節機構の分子生物学的解明

研究課題名(英文) The effects of lysophosphatidic acid on osteoclast activity.

研究代表者

田邊 奈津子 (TANABE, Natsuko)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10409097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞前駆細胞にリゾホスファチジン酸(LPA)を刺激するとIL-1betaの産生が促進し、IL-1betaのオートクリン作用によって自身の細胞に作用し、破骨細胞の生存を延ばすことが示唆された。

さらに関連実験として、メカニカルストレスとして低出力超音波(LIPUS)と牽引力(TF)を用い、これらのメカニカルストレスを負荷すると細胞外ATPが産生されATPの受容体であるP2X7の活性化を介して骨形成に關与する細胞外マトリックスタンパク産生が促進され、骨芽細胞の石灰化物形成が促進された。しかしながらTFはALPase活性を促進する一方、LIPUSはALPase非依存的に石灰化物形成を促進した。

研究成果の概要(英文)：LPA stimulated the expression of IL-1beta in osteoclast precursor cell line RAW 264.7. LPA-induced IL-1beta also enhanced osteoclast survival.

Mechanical stimuli such as Low-intensity pulsed ultrasounds (LIPUS) and tension force (TF) induced extracellular ATP release. Mechanical stimuli-induced ATP activated P2X7 receptor increased extracellular matrix proteins and bone formation. However, LIPUS enhanced bone formation without the increases of ALPase activity.

研究分野：細胞生物学

キーワード：メカニカルストレス ATP P2X7 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

Lysophosphatidic acid (LPA)はリン脂質性生理活性脂質の一つであり、細胞内あるいは細胞膜間のシグナル分子として機能し、生体内で重要な役割を担っている。LPAはホスホリパーゼ A₂ とホスホリパーゼ D を介して産生される。また、これらの物質は、プロスタグランジンやロイコトリエンとは構造および機能が大きく異なる第二世代の生理活性物質として注目されている。特に炎症時や癌細胞の浸潤の際に多量に産生される。

2. 研究の目的

破骨細胞に着目し、LPA 刺激後のシグナル伝達機構、また LPA が破骨細胞の炎症性サイトカイン産生および機能発現に及ぼす影響を解明するために本研究を企図した。

3. 研究の方法

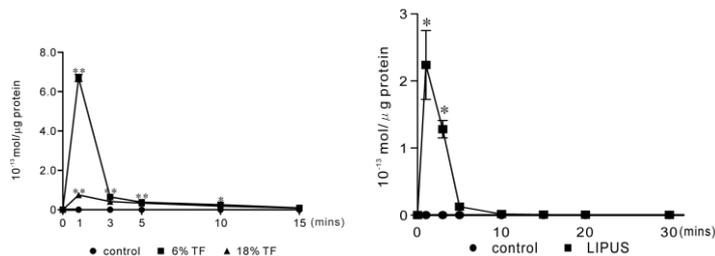
破骨細胞には胎生 1~7 日齢ラットまたはウサギの長骨より分離した成熟破骨細胞、あるいは破骨細胞前駆細胞として株化マウス単球細胞(RAW264.7)およびマウス骨髄由来マクロファージより分化させた破骨細胞様細胞を用いる。細胞を LPA または RANKL との共刺激後、NF-κB, NFATc1 の活性はサンプルの細胞の細胞質から核への核内移動を蛍光免疫染色によって調べる。またこれらの転写因子の上流にあるシグナル因子の特異的な阻害剤や LPA 受容体のアンタゴニスト、LPA 受容体の siRNA を用いこれらの転写因子の活性の確認を行い、pathway を解明する。また、骨吸収関連因子の遺伝子発現を real-time PCR 法、タンパク発現は Western Blot 法、ELISA 法または蛍光免疫染色で調べる。サイトカイン発現は ELISA 法または Western Blot 法にて調べる。発現したサイトカインによる autocrine 作用有無は、それらの中和抗体またはレセプターアンタゴニストを用いて調べる

4. 研究成果

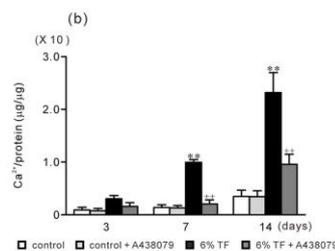
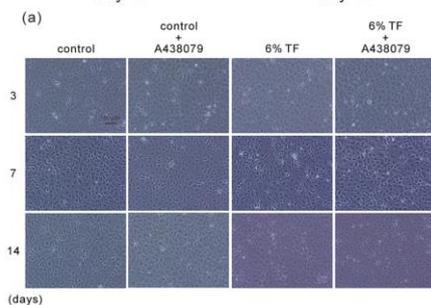
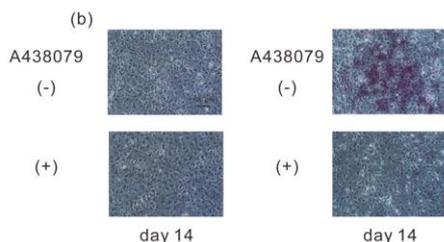
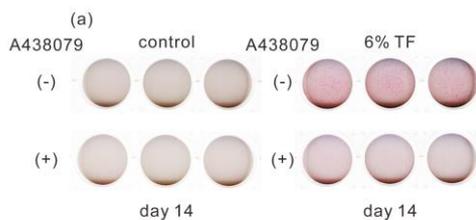
破骨細胞前駆細胞に LPA を刺激すると、炎症性サイトカインの 1 つである IL-1β の産生が増加し、IL-1β のオートクリン作用によって自身の細胞に作用し、破骨細胞の延命を促進することが示唆された。

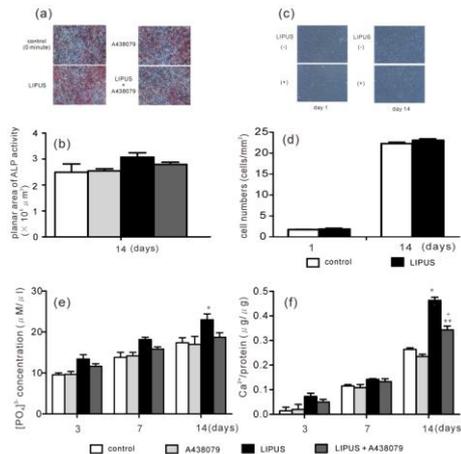
LPA は骨芽細胞において、細胞外 ATP が P2X7 受容体を活性化することにより産生し、産生された LPA が骨芽細胞による骨形成を促進すること、さらに細胞外 ATP 産生はメカニカルストレスによって誘導されることがすでに報告されていることから、関連実験として申請者は、メカニカルストレスとして填出力超音波 (LIPUS) と牽引力 (TF) を用いて、メカニカルストレスが骨芽細胞の骨形成に ATP-P2X7 受容体が及ぼす影響について検討した。まず、TF は骨芽細胞の細胞外 ATP 産生を促進し、産生された ATP はオートクリン作用によって P2X7 受容体を活性化

し、骨形成関連転写因子、細胞外マトリックスタンパク発現およびアルカリホスファターゼ(ALPase)活性の上昇を介して骨形成を促進した。

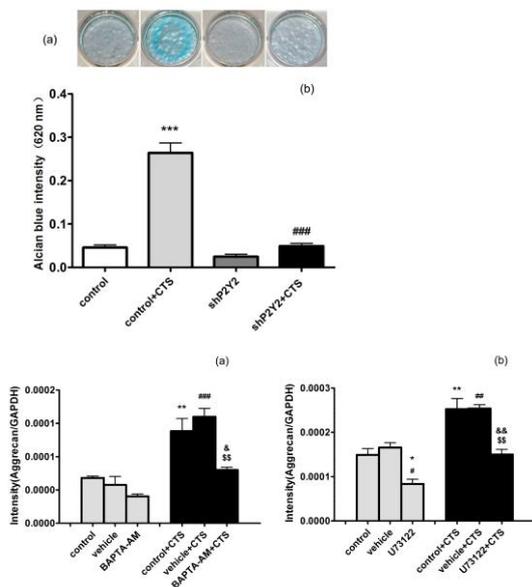


LIPUS を骨芽細胞に作用させると、TF 同様骨形成関連転写因子および細胞外マトリックスタンパク発現の上昇が見られたが、ALPase 活性には影響は見られなかった。しかしながら、LIPUS は細胞外リン酸濃度を促進させることにより骨形成を促進されることが示唆された。これらの結果により、適度かつ継続的なメカニカルストレスは、ATP-P2X7 経路を介して骨形成を促進するが、ストレスの種類によって骨形成のメカニズムが異なることが示唆された。





さらに、TF が軟骨細胞の分化に及ぼす影響を検討した。その結果、継続的なメカニカルストレスは、ATP の関連受容体である P2Y2 受容体を介して、肥大軟骨細胞分化には影響を及ぼさない一方、増殖軟骨細胞分化を促進することにより軟骨の主要な細胞外マトリックスタンパクであるプロテオグリカン(アグリカン)産生を促進することを明らかにした。さらに、これらの発現はカルシウム依存的かつ P2Y2-PLC 経路を介してシグナル伝達が行われていることが示唆された。



これらの結果より、メカニカルストレスによる骨形成および軟骨基質の形成は細胞外 ATP が関与していることが示唆された。これらの知見は、骨粗鬆症、関節リウマチおよび歯周病などの疾患に対してのメカニカルストレスの有用性が示唆されるだけでなく、化学物質を使用することなく、メカニカルストレスを付与することにより細胞に対して非侵襲的に硬組織を形成する可能性が示唆された。

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 Manaka S, Tanabe N, Kariya T, Naito M, Takayama T, Nagao M, Liu D, Ito K, Maeno M, Suzuki N, Miyazaki M. (2015) Low-intensity pulsed ultrasound-induced ATP increases bone formation via the P2X7 receptor in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. FEBS Lett. Jan 30;589(3):310-8. doi: 10.1016/j.resinv.2014.07.002. Epub 2014 Sep 4. 査読有
- ② Kariya T, Tanabe N, Shionome C, Kawato T, Zhao N, Maeno M, Suzuki N, Shimizu N. (2014) Tension force-induced ATP promotes osteogenesis through P2X7 receptor in osteoblasts. J Cell Biochem. Jan;116(1):12-21. doi: 10.1002/jcb.24863. 査読有
- ③ Wheal BD, Beach RJ, Tanabe N, Dixon SJ, Sims SM (2014), Subcellular elevation of cytosolic free Ca^{2+} is required for osteoclast migration. J Bone Miner Res. 23(3), 725-734 doi: 10.1002/jbmr.2068. doi: 10.1074/jbc.M113.507525. Epub 2013 Oct 16. 査読有
- ④ Shugg RP, Thomson A, Tanabe N, Kashishian A, Steiner BH, Puri KD, Pereverzev A, Lannutti BJ, Jirik FR, Dixon SJ, Sims SM. (2013) Effects of Isoform-Selective Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitors on Osteoclasts: Actions on cytoskeletal organization, survival and resorption. J Biol Chem. 288, 35346-35357 査読有

〔学会発表〕(計6件)

- ① Manaka S, Low-intensity pulsed ultrasound-induced ATP increases osteogenesis via P2X7 in MC3TE1 cells. American Academy of Periodontology 100th Annual Meeting, 2014/09/20, San Francisco, LA, USA
- ② Tanabe N, Tension force-induced ATP promotes osteoblast differentiation-related transcription factors and osteogenesis through P2X7 receptor in osteoblasts. American Society of Bone and Mineral Research 2014 Annual Meeting, 2014/09/15, Houston, TX, USA
- ③ 仮谷太良, 牽引力負荷は ATP 産生を介して骨芽細胞の分化と石灰化物形成を促進する, 第 63 回日本口腔衛生学会・総会, 2014 年 5 月 30 日, 熊本国際交流会館 (熊本県, 熊本市)
- ④ 間中総一郎, LIPUS 誘導性 ATP は P2X7 受容体の活性化を介して骨芽細胞の石灰化物形成を促進する, 第 63 回日本口腔衛生学会・総会, 2014 年 5 月 30 日, 熊本国際交流会館 (熊本県, 熊本市)
- ⑤ 間中総一郎, 低出力超音波刺激は ATP

産生増加を介して骨芽細胞の分化を促進する, 第 57 回春季歯周病学会・学術大会, 2014 年 5 月 24 日, 長良川国際会議場 (岐阜県, 岐阜市)

- ⑥ 長尾麻由, LIPUS 刺激は LPS 存在下における骨芽細胞の IL-1 α , IL-6 および RANKL 産生を抑制する, 第 57 回春季歯周病学会・学術大会, 2014 年 5 月 24 日, 長良川国際会議場 (岐阜県, 岐阜市)

[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 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

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

田邊 奈津子 (TANABE, Natsuko)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号: 10409097