

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462899

研究課題名(和文) 活性脂質による骨代謝調節機構の解明に関する研究

研究課題名(英文) Effect of lipid mediators on osteoclast differentiation

研究代表者

天野 均 (AMANO, Hitoshi)

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：90212571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：活性脂質のひとつであるS1Pの破骨細胞分化制御に及ぼす影響を破骨細胞分化誘導系を用いて検討した。全骨髓細胞から赤血球を除去すると、破骨細胞形成数が少なくなり、S1Pを添加することにより細胞数は回復した。RT-PCRの結果より、骨髓細胞ではS1P1mRNA発現が、逆にS1P2mRNAは破骨細胞での発現が亢進していた。赤血球由来のS1Pが破骨細胞形成過程に関与し、S1P1/3阻害により、破骨細胞増殖が抑制され、S1P2阻害により、S1P1作用が助長されることが示唆された。以上のことにより、S1Pが破骨細胞の分化調節において重要な役割を果たすことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine-1-phosphate (S1P), which is mainly erythrocyte-derived, is a lipid mediator, which exists at high levels in plasma and acts on its receptors. S1P displays physiological functions through the S1P receptor. This study examined the influence of S1P in terms of controlling osteoclastic differentiation. Upon separation of erythrocytes from all bone marrow cells, the level of osteoclast formation decreased; subsequently, following the addition of S1P, the number of cells recovered. Furthermore, the number of osteoclasts decreased in the S1P1/3 antagonist. RT-PCR revealed that S1P1 mRNA expression is higher in bone marrow cells in comparison to osteoclasts; in contrast, S1P2 mRNA expression is higher in osteoclastic cells. On the other hand, S1P1 function was aided and cell differentiation was accelerated by inhibition of S1P2. Based on the aforementioned findings, it is clear that S1P plays an important role in the regulation of osteoclast differentiation.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：活性脂質 S1P 破骨細胞 分化

### 1. 研究開始当初の背景

加齢とともに過大な骨吸収により拡大した骨髓腔は、造血機能を失って、脂肪細胞が占め黄色骨髓に変性する。ところが破骨細胞は分化を支持する骨細胞や骨芽細胞が消失しても引き続き骨吸収を行い続け、最終的に骨粗鬆症を進行させていく。また代表的な生活習慣病として高脂血症も骨粗鬆症と同時に発症する患者が増加している。互いの生活習慣病の発症機序には、密接な関連が必ずあるはずで、共通の発症原因を解決する治療の確立は、現在の高齢者社会において急務と考えられる。

### 2. 研究の目的

スフィンゴシン 1 リン酸(S1P)は、血漿中に多量に存在し、細胞間伝達物質として働く脂質メディエーターである。S1P は5種類あるS1P 受容体を介して細胞増殖、細胞遊走、形態変化などの生理作用を示す。受容体のうち、S1P1 を介した刺激は細胞運動に促進的に働くが、S1P2 は逆に抑制的に働く。また老化に伴い骨髓腔は脂肪組織に置き換えられ骨吸収が亢進する。ところが脂肪組織由来の生理活性脂質及びその調節因子による破骨細胞分化調節への関与の有無は不明であった。本研究では、骨吸収に及ぼす生理活性脂質の影響を検索することによって、骨代謝と脂質代謝のクロストークを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

ddY マウスの脛骨および大腿骨より、全骨髓細胞を採取する。細胞を Sephadex G10 カラムを通過させ、造血幹細胞を集める。造血幹細胞に CSF-1 と RANKL を共添加する破骨細胞形成系に対する S1P による作用の検討をまず行う。S1P を濃度依存的に添加し、最終濃度を炎症に上昇する血漿に含まれる濃度に等しい 100 μM とし、破骨細胞形成数および吸収窩面積を指標とした用量反応曲線を描く。S1P1/3 阻害薬 (VPC23019, Avanti Polar Lipids, Inc., AL, USA, FTY720,) 及び S1P2 阻害薬 (JTE013; Tocrisbioscience, MI, USA) との競合的拮抗関係を確認する。

### 4. 研究成果

S1P<sub>1</sub> および S1P<sub>3</sub> を抑える S1P<sub>1/3</sub> アンタゴニストの共添加にて培養すると、破骨細胞数は減少し、S1P<sub>2</sub> アンタゴニストを用いると逆に破骨細胞形成能は上昇した。RT-PCR の結果、骨髓細胞では S1P1 mRNA 発現が破骨細胞に比べ高く、逆に S1P2 mRNA は破骨細胞での発現が亢進していた。これらの結果により、血漿中 S1P の供給源として赤血球が破骨細胞形成過程に関与し、S1P<sub>1/3</sub> 阻害により、破骨細胞増殖が抑制され、一方 S1P<sub>2</sub> 阻害により、S1P1 作用が助長され、分化が促進されることが示唆された。以上のことにより、S1P が破骨細胞の分化調節において重要な役割を果たすことがわかった。

### 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 16件)

Iwaki F., Amano H., Ohura K. Nicotinic inhibits osteoclast differentiation in vitro. , Eur J Pharmacol. 査読有793, 2016, 14-20. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.10.034.

Miyazawa M., Iwai S., Hayashi T., Uda Y., Sasaki A., Hashimoto S., Sambe T., Fukuhara K., Oguchi K Quantification of (-) - epigallocatechin-3-gallate inhibition of anaplastic thyroid cancer cell line adhesion and proliferation using real-time cell analysis, Showa Univ. J. Med. Sci. 査読有, 28(2), 2016, 135-145

Yonezawa R, Yamamoto S, Takenaka M, Kage Y, Negoro T, Toda T, Ohbayashi M, Numata T, Nakano Y, Yamamoto T, Mori Y, Ishii M, Shimizu S, TRPM2 channels in alveolar epithelial cells mediate bleomycin-induced lung inflammation., Free Radical Biology and Medicine 査読有, 90, 2016, 101 - 113, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.021

中野泰子、平野勉、芳野原、菅沼理恵、土岐彰、都島基夫、バイオマーカーとしてのアディポネクチン、昭和学術会雑誌, 査読有, 75(3), 2015, 256-265

天野均、中野泰子、岩井信市、大浦清  
活性脂質を介した骨・血管連関 月刊細胞、  
査読無、47(10), 2015, 510-512

Egawa S, Iwai S, Iijima K, Toju A, Yamamoto R, Hayashi T, Sambe T, Oguchi K, Quantification of (-) - epigallocatechin - 3-gallate inhibition of migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cell lines using real-time cell analysis, Showa Univ. J. Med. Sci., 査読有, 27(2), 2015, 71-81

Emori H., Iwai S., Ryu K., Amano H., Sambe T., Kobayashi T., Oguchi T., Ohura K., Oguchi K. A new method for measuring osteoclast formation by electrical impedance. J Pharmacol Sci. 査読有, 128(2), 2015, 87-91, doi: 10.1016/j.jphs.2015.05.002

Tanaka M., Watanabe M., Yokomi I., Matsumoto N., Sudo K., Satoh H., Igarashi T., Seki A., Amano H., Ohura K., Ryu K., Shibata S., Nagayama M., Tanuma J. Establishment of a novel dwarf rat strain, cartilage calcification insufficient (CCI) rats, Experimental Animals. 査読有, 64(2), 2015, 121-128, doi: 10.1538/expanim.14-0072

Kohda C, Chiba N, Shimokoba K, Mizuno K,

Negoro T, Nakano Y, Tanaka K., A simple smart amplification assay for the rapid detection of human cytomegalovirus in the urine of neonates. *J. Virol. Methods*, 査読有, 208, 2014 160-165, doi: 10.1016/j.jviromet.2014.07.034

Negoro T, Shimizu S, Narushima M, Banham AH, Wakabayashi H, Takayanagi R, Hagiwara T, Roncador G, Osabe T, Yanai T, Kin M, Ikeda K, Endo A, Akiyama H, Nakano Y. Elevated receptor for activated C kinase 1 expression is involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> influx and potentially associated with compromised regulatory T cell function in patients with asthma., *Clin. Exp. Allergy*, 査読有, 44(19),2014, 1154-1169, doi: 10.1111/cea.12375.

龍家圭、小口勝司、三邊武彦、天野均、亀井大輔、岩井信市、選択的 COX-2 阻害薬の破骨細胞分化過程に及ぼす影響 昭和学術会雑誌, 査読有, 74(3), 2014, 333-339

Irie Y., Iwai S., Amano H., Ryu K., Emori H., Kawakami T., Kochidaira H., Kobayashi Y., Oguchi K. (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits differentiation and matrix metalloproteinases expression in osteoclasts.: *Showa Univ. J. Med Sci.*, 査読有, 26(1), 2014, 63-74

江守永、龍家圭、小口勝司、岩井信市、天野均、リアルタイム細胞分析システムによる破骨細胞定量法を用いたエピガロカテキンガレートの細胞分化抑制効果 昭和学術会雑誌, 査読有, 74(1),2014, 73-80

Negoro T, Kin M, Takuma A, Saito K, Shimizu S, Nakano Y. Potentiated macrophage activation by acid sensing under low adiponectin levels., *Molecular Immunology*, 査読有, 2014; 57(2):141-150. doi:10.1016/j.molimm.2013.08.015. 2014.2

Shinmura K, Negoro T, Shimizu S, Roncador G, Hirano T, Nakano Y. Metformin modulates GLP-1- and GIP-mediated intracellular signaling under normoglycemic conditions. *Open J Endocri Metab Dis*, 査読有, 3(7): 263-270. 2013, doi:10.4236/ojemd.2013.37036

Nobe K, Fujii A, Saito K, Negoro T, Ogawa Y, Nakano Y, Hashimoto T, Honda K Adiponectin enhances calcium-dependency of mouse bladder contraction mediated by protein kinase C expression. *J Pharmacol Exp Ther* 査読有, 345(1):2013. 62-68, doi:10.1124/jpet.112.202028.

〔学会発表〕(計 32 件)

犬伏正和、岩城太、天野均、大庭伸介、大浦清、ヘリオキサンチン誘導体の破骨細胞分化過程に及ぼす抑制効果、昭和大学歯学部

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 28 年度シンポジウム、2017 年 3 月 4 日、昭和大学(東京都・大田区)

天野均、犬伏正和、岩城太、大浦清、ニコランジルの骨代謝における影響に関する研究、第 23 回日本歯科医学会総会 2016 年 10 月 21 日、22 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Iwaki F, Amano H, Ohura K., Nicorandil inhibits osteoclast differentiation in vitro, 第 57 回歯科基礎医学会 学術大会・総会 2016 年 8 月 26 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

天野均、大浦清、Web Class(教育学習支援システム)を利用した講義の改善、

第 35 回 日本歯科医学教育学会総会・学術大会、2016 年 7 月 1 日、2 日、大阪大学(大阪府・吹田市)

秋山晴代、長部隆広、根来孝治、荒木真由美、瀬戸山央、青木信義、渡邊裕子、甲斐茂美、中野泰子、宮澤真紀、易炎症性マウスを用いた未病に關与するターゲット因子の探索、日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月 26 日-29 日、横浜パシフィコ(神奈川県・横浜市)

Kuzushima K, Takeuchi A, Nagayama M, Tanaka M, Watanabe M, Amano H, Tanuma J, Kitai N. Study of Cartilage Calcification Insufficient (CCI) Rat., 45th Annual Meeting of the AADR/40th Annual Meeting of the CADR, March 18, 2016, Los Angeles, CA, USA

岩城太、天野均、大浦清、破骨細胞分化過程におけるニコランジルの抑制効果、第 128 回日本薬理学会近畿部会 2015 年 11 月 20 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

天野均、大浦清、アディポネクチンによる破骨細胞形成系に及ぼす影響、第 57 回歯科基礎医学会学術大会 2015 年 9 月 13 日、新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)

葛島康平、竹内綾、永山元彦、田中政己、渡辺実、天野均、田沼順一、永井則行、軟骨石灰化不全ラットの形態学的ならびに分子生物学的解析 頭蓋底軟骨結合と下顎頭軟骨 - 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 2015 年 9 月 12 日、新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)

岩城太、天野均、大浦清、ニコランジルによる破骨細胞分化過程に及ぼす抑制効果 第 24 回硬組織再生生物学会、2015 年 8 月 22 日、大阪歯科大学(大阪府・大阪市)

Tanioka T, Tainaga Y, Yamada M, Kamimura Y, Suzuki M, Takatori S, Tateno M, Matsumoto M, Nakano Y HMW Adiponectin Suppresses LPS-Induced IL-1 Expression through Inhibiting Akt-C/EBP $\beta$  Inflammatory Signaling in RAW 264.7 Macrophage. The 12th World Congress on Inflammation, August 8-12, 2015, Boston,

Massachusetts, USA,

天野均、大浦清、臨床歯科薬理学におけるスマートフォン活用に関するアンケート調査、第34回日本歯科医学教育学会総会および学術大会、2015年7月11日、かごしま県民交流センター（鹿児島県・鹿児島市）

岩城太、天野均、大浦清、ニコランジルの破骨細胞分化過程に及ぼす抑制効果、第35回日本骨形態計測学会、2015年6月5日、倉敷市芸文館（岡山県・倉敷市）

Amano H, Ryu K, Watanabe M, Nagayama M, Shibata S 5), Tanuma J, Tanaka M, Ohura K (2015) Craniofacial anomalies in cartilage calcification insufficient (CCI) rat. 13th Congress of the International of Bone Morphometry, 2015年4月28日、東京ガーデンパレスホテル（東京都・文京区）

天野均、野崎中成、納富拓也、河井まりこ、大浦清、動物実験とシミュレーションソフト実験の併用による効率的学習法 歯科基礎医学会 第1回定期特別講演会 分野別分科会「薬理」2015年4月25日、日本歯科大学（東京都・千代田区）

天野均、龍家圭、渡辺実、永山元彦、柴田俊一、田沼順一、田中政巳、大浦清、CCI（軟骨石灰化不全）ラットにおける頭蓋顔面骨の異常と発症原因の検索、昭和大学歯学部 文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成26年度シンポジウム、2015年3月28日、昭和大学（東京都・大田区）

岩城太、天野均、大浦清、ニコランジルの破骨細胞分化過程に及ぼす抑制効果、昭和大学歯学部 文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成26年度シンポジウム、2015年3月28日、昭和大学（東京都・大田区）

天野均、納富拓也、大浦清、スフィンゴシン1リン酸は in vitro の破骨細胞形成系において分化促進する、第56回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014年9月26日、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

佐野恒吉、天野均、篠田寿、中村雅典、カルシウム-キレート化合物の硬組織内沈着の機構、第32回日本骨代謝学会学術集会、2014年7月26日、大阪国際会議場（大阪府・大阪市）

天野均、大浦清、臨床歯科薬理学講義にスマートフォンを用いた情報リテラシー教育の試み、第33回日本歯科教育学会、2014年7月4日、北九州国際会議場（福岡県・北九州市）

①佐野恒吉、天野均、龍家圭、金属キレート化合物による硬組織内沈着機序について、第34回日本骨形態計測学会、2014年6月13日、札幌芸文館（北海道・札幌市）

②Amano H, Ryu K, Iwai S, Kikuta J, Ishii M, Oguchi K., Effect of sphingosine 1 phosphate on osteoclast differentiation, 第87回日本薬理学会年会、2014年3月21日、

仙台国際センター（宮城県・仙台市）

③谷岡利裕、舩長義直、山田倫世、根来孝治、中野泰子、アディポネクチンによる抗炎症作用の解析、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日～6日、神戸ポートアイランドホテル（兵庫県・神戸市）

④龍家圭、天野均、三邊武彦、江守永、亀井大輔、佐々木由香、原俊太郎、岩井信市、小口勝司、PGE2を介した選択的COX-2阻害薬の破骨細胞分化過程に及ぼす阻害効果 第60回昭和大学学士会総会、2013年11月30日、昭和大学（東京都・品川区）

⑤江守永、岩井信市、天野均、岡良臣、入江悠子、龍家圭、小口勝司、稲垣克記、(-)-epigallocatechin-3-gallateによる破骨細胞分化および活性の抑制効果、第28回日本整形外科学会基礎学術総会、2013年10月17日、幕張メッセ国際会議場（千葉県・千葉市）

⑥Ryu K, Amano H, Emori H, Sambe T, Oguchi K, Iwai S, Effect of celecoxib on osteoclast differentiation., ASBMR 2013 Annual Meeting, October 5, 2013, Baltimore, Maryland USA,

⑦Shinmura K, Negoro T, Nakano Y, Hirano T., Modulation of incretin actions in pancreatic  $\beta$ -cells by metformin. 49th Annual meeting of the European association for the study of diabetes, September 23 - 27, 2013, Barcelona Spain,

⑧竹内綾、永山元彦、葛島康平、渡部博之、江原道子、天野均、田中政巳、渡辺実、田沼順一、北井則行、軟骨石灰化不全ラット（CCIラット）における頭蓋底軟骨結合の形態学的解析、第55回歯科基礎医学会学術大会、2013年9月21日、岡山コンベンションセンター（岡山県・岡山市）

⑨江守永、岩井信市、天野均、岡良臣、入江悠子、龍家圭、稲垣克記、小口勝司、骨髄細胞と脾細胞を用いた破骨細胞誘導系におけるRTCAによる定量化、第13回東京骨関節フォーラム、2013年7月20日、東京大学（東京都・文京区）

⑩天野均、唐川亜希子、龍家圭、電子ポートフォリオの長所と短所について、第32回日本歯科教育学会、2013年7月12日、北海道大学（北海道・札幌市）

⑪龍家圭、岩井信市、江守永、三邊武彦、天野均、小口勝司、破骨細胞への形態的变化における新たな電氣的定量化、第33回日本骨形態計測学会、2013年7月5日、アクトシティ浜松コンgresセンター（静岡県・浜松市）

⑫メトホルミンによる膵細胞のインクレチン刺激細胞内シグナル制御機構の検討 新村京子、根来孝治、中野泰子、平野勉 第56回日本糖尿病学会年次学術集会 熊本 2013年5月16日～18日、ホテル日航熊本（熊本県・熊本市）

〔図書〕(計 1 件)

西島正弘・川崎ナナ編 中野泰子他 22 名  
化学同人「バイオ医薬品開発の基礎から次世代医薬まで」、2013、280 (pp245-252)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.osaka-dent.ac.jp/study/course/yakuri>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

天野 均 (AMANO, Hitoshi)  
大阪歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：90212571

### (2)研究分担者

中野 泰子 (NAKANO, Yasuko)  
横浜薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：20155790

研究分担者

岩井 信市 (IWAI, Shinichi)  
昭和大学・歯学部・教授  
研究者番号：70317519

### (3)連携研究者

石井 優 (ISHII, Masaru)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：10324758

### (4)研究協力者

なし ( )