

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860764

研究課題名(和文) 神経伝達物質が骨リモデリングに与える影響に関する研究

研究課題名(英文) Dopamine receptor signaling regulates human osteoclastogenesis.

研究代表者

花見 健太郎 (HANAMI, Kentaro)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：50441853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト破骨細胞前駆細胞は、D1～D5ドパミン受容体を発現しており、ドパミン及びD2受容体細胞動薬添加により、成熟破骨細胞は有意に減少させ、RANKL依存性のcathepsin Kの発現を有意に抑制し、象牙切片上の骨吸収窩面積を減少させた。さらに、細胞内cAMP濃度、c-Fosの発現及び破骨細胞前駆細胞核内への移行、NFATc1の発現を抑制した。ドパミン受容体D2様受容体シグナルは細胞内cAMP濃度の低下とともに、c-Fos及びNFATc1の発現を抑制し、ヒト破骨細胞形成を直接的に抑制する事を示し、ドパミン受容体シグナルが破骨細胞形成系へ直接的に作用し、骨代謝に重要な役割を担っていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Human monocyte-derived osteoclast precursor cells express all dopamine-receptor subtypes. Dopamine and dopamine D2-like receptor agonists such as pramipexole reduced the formation of TRAP-positive multi-nucleated cells, cathepsin K mRNA expression, and pit formation area in vitro. These inhibitory effects were reversed by pre-treatment with a D2-like receptor antagonist haloperidol or a G_i inhibitor pertussis toxin. Dopamine and dopamine D2-like receptor agonists suppressed intracellular cAMP concentration as well as RANKL-mediated induction of c-Fos and NFATc1 mRNA expression in human osteoclast precursor cells. Finally, the dopamine D2-like receptor agonist suppressed LPS-induced osteoclast formation in murine bone marrow culture ex vivo. These findings indicate that dopaminergic signaling plays an important role in bone homeostasis via direct effects upon osteoclast differentiation and further suggest that the clinical use of neuroleptics is likely to affect bone mass.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：神経伝達物質 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

ドパミンは中枢神経における主要な神経伝達物質である。細胞内 cAMP 濃度を上昇させる作用をもつ G_s サブユニットと共役する D1 様受容体 (D1, D5) 細胞内 cAMP 濃度を低下させる G_i サブユニットと共役する D2 様受容体 (D2, D3, D4) に分類される 5 つのドパミン受容体を介してシグナルを伝達する。造血細胞は様々な神経伝達物質の受容体を発現する事より、神経伝達物質による末梢血単球由来破骨細胞形成系に対する影響が考えられる。しかしながら、ドパミンシグナル伝達による破骨細胞形成系への影響は依然として不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ドパミン受容体シグナルを介するヒト破骨細胞への直接的な影響について解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

健常人末梢血より分離した CD14 陽性細胞に培養開始時より M-CSF、培養開始 4 日目より RANKL を分化刺激因子として添加して破骨細胞分化誘導を行い、RANKL 添加時にドパミン関連刺激を加えた際の破骨細胞分化への影響を検討した。破骨細胞分化については、培養開始 14 日後に酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (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様細胞として評価した。破骨細胞機能評価として、破骨細胞特異的遺伝子である cathepsin K の発現は定量的 PCR 法、象牙切片上の骨吸収窩形成は pit assay で評価した。培養開始 4 日目 RANKL 刺激後の細胞内 cAMP 濃度は蛍光アッセイ法、c-Fos の発現は定量的 PCR 法及び蛍光染色法、破骨細胞分化のマスターレギュレーターである NFATc1 の発現は定量的 PCR 法を用いて評価した。加えて、LPS 誘導骨粗鬆症モデルマウスに対する影響を ex vivo 破骨細胞培養系を用いて評価した。

4. 研究成果

培養開始前 CD14 陽性細胞及び培養 10 日目までのヒト破骨細胞前駆細胞は、D1 ~ D5 ドパミン受容体を発現していた。RANKL 刺激時のドパミン添加により、14 日目の TRAP 陽性多核細胞は濃度依存性に有意に減少した。また、D2 様受容体作動薬の添加にて、TRAP 陽性多核細胞は減少した。ドパミン及び D2 様受容体作動薬は、RANKL 依存性の cathepsin K の発現を有意に抑制し、象牙切片上の骨吸収窩面積を減少させた。さらに、ドパミン及び D2 様受容体作動薬は、培養 4 日目の細胞内 cAMP 濃度、c-Fos の発現及び破骨細胞前駆細胞核内への移行、NFATc1 の発現を抑制した。ex vivo においては、LPS 刺激マウスに経口的に

D2 受容体作動薬を加える事により、マウス骨髄由来破骨細胞分化を抑制した。以上より、ドパミン受容体 D2 様受容体シグナルは細胞内 cAMP 濃度の低下とともに、c-Fos 及び NFATc1 の発現を抑制し、ヒト破骨細胞形成を直接的に抑制する事が示された。

本研究の結果より、ドパミン受容体シグナルが破骨細胞形成系へ直接的に作用し、骨代謝における重要な役割を担っていることが示された。実際、シナプス前終末への迅速な取り込みによってドパミン活性を制御するドパミントランスポーターを欠くノックアウトマウスでは、骨量の減少を示すことが報告されている。我々の結果と併せると、ドパミン等の交感神経系から骨代謝を調節するシグナルが伝達されること、また、臨床的に抗精神病薬として使用する D2 様受容体阻害薬やパーキンソン病薬として使用する D2 様受容体作動薬は、骨量へ影響を与えてい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 6 件)

Hirata S, Marotta A, Gui Y, Hanami K, Tanaka Y.

Serum 14-3-3 level is associated with severity and clinical outcomes of rheumatoid arthritis, and its pretreatment levels is predictive of DAS 28 remission with tocilizumab.

Arthritis Res Ther. 2015 17:280 (査読有)

Kubo S, Nakayamada S, Nakano K, Hirata S, Fukuyo S, Miyagawa I, Hanami K, Saito K, Tanaka Y.

Comparison of the efficacies of abatacept and tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis by propensity score matching.

Ann Rheum Dis. 2015 (Epub ahead of print) (査読有)

Tanaka Y, Hirata S, Kubo S, Fukuyo S, Hanami K, Sawamukai N, Nakano K, Nakayamada S, Yamaoka K, Sawamura F, Saito K.

Discontinuation of adalimumab after achieving remission in patients with established rheumatoid arthritis: 1-year outcome of the HONOR study.

Ann Rheum Dis. 2015 74(2):389-95 (査読有)

Tanaka Y, Takeuchi T, Amano K, Saito K, Hanami K, Nawata M, Fukuyo S, Kameda H, Kaneko Y, Kurasawa T, Nagasawa H, Hoshi D, Sato E, Yamanaka H.

Effect of interleukin-6 receptor inhibitor, tocilizumab, in preventing joint destruction in patients with rheumatoid arthritis showing inadequate response to TNF inhibitors.

Mod Rheumatol. 2014 24(3):399-404 (査読有)

Miyagawa I, Nakayamada S, Saito K, Hanami K, Nawata M, Sawamukai N, Nakano K, Yamaoka K, Tanaka Y.

Study on the safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6 receptor antibody, in patients with rheumatoid arthritis complicated with AA amyloidosis.

Mod Rheumatol. 2014 24(3):405-9 (査読有)

Hanami K, Nakano K, Saito K, Okada Y, Yamaoka K, Kubo S, Kondo M, Tanaka

Y.

Dopamine D2-like receptor signaling suppresses human osteoclastogenesis.

Bone 2013 56(1):1-8. (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

発表者: 花見 健太郎、平田 信太郎、Anthony Marotta、田中良哉

題名: Serum 14-3-3 is a Modifiable, Mechanistic Biomarker that Predicts Tocilizumab Response,

第16回欧州リウマチ学会、2015年6月(ローマ、イタリア)

発表者: 花見 健太郎、平田 信太郎、宮川 一平、久保 智史、福與 俊介、澤向 範文、中野 和久、中山田 真吾、齋藤 和義、田中 良哉

題名: 血清 14-3-3 と関節リウマチの疾患活動性の関連について

第59回日本リウマチ学会、2015年4月名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

発表者: 花見 健太郎、平田 信太郎、宮川 一平、久保 智史、福與 俊介、澤向 範文、中野 和久、中山田 真吾、齋藤 和義、田中 良哉

題名: 関節リウマチに対する Tocilizumab と Adalimumab 投与による MBDA スコアと 12 パイマーカーの挙動比較

第59回日本リウマチ学会、2015年4月名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

発表者: 花見 健太郎、平田 信太郎、齋藤 和義、Nadine A. Defranoux、Rebecca

Bolce、宮川 一平、福與 俊介、久保 智史、
澤向 範文、中山田 真吾、中野 和久、山岡
邦宏、田中 良哉

題名: Tocilizumab (TCZ) 投与下の RA 患者に
おける multi-biomarker disease activity
(MBDA) スコアの評価

第 58 回日本リウマチ学会、2014 年 3 月グラン
ドプリンスホテル新高輪(東京都品川区)

〔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：
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

花見 健太郎 (HANAMI, Kentaro)
産業医科大学・医学部・第一内科学講座・
助教
研究者番号：50441853

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：