

培養骨芽細胞を用いた骨代謝（骨リモデリング）制御機構の解明（21-1）

主任研究者 徳田 治彦 国立長寿医療研究センター 代謝・内分泌研究部（部長）

研究要旨

骨代謝は骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞により活発に営まれ、骨は絶えずリモデリングされ、その強度が維持されている。二つの機能細胞は、種々のサイトカイン、細胞増殖因子、オートコイド等の生理活性物質により巧緻に制御されている。骨のリモデリングの破綻は骨粗鬆症および骨折治癒の遅延の原因となる。最近、骨表面の骨芽細胞に隣接し存在するマクロファージ(osteal macrophage;骨マクロファージ)により産生されるサイトカインの oncostatin M が骨損傷動物モデルにおいてその治癒を促進することが報告され、現在では骨マクロファージが、骨リモデリングの制御に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながらその制御機構の詳細は未だ明らかにされていない。本研究は、私共のこれまでの知見を踏まえ、新生仔マウス頭蓋冠より分離株化された骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞など培養骨芽細胞を用いて、マクロファージにより産生されるサイトカイン・ケモカインの骨芽細胞機能に及ぼす影響を詳細に解析し、骨マクロファージによる骨代謝・骨リモデリング制御機構、特に骨芽細胞との相互作用を解明するものである。

本年度は、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、transforming growth factor- β (TGF- β) による macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 産生に対する oncostatin M の作用を検討し、oncostatin M が TGF- β により惹起される M-CSF 産生および vascular endothelial growth factor (VEGF) 産生を抑制すること、その作用点は p44/p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) および stress activated protein kinase/c-Jun N terminal kinase (SAPK/JNK) の上流であることを明らかとした。一方、オリーブオイルに含まれるポリフェノールである hydroxytyrosol および oleuropein が、tumor necrosis factor- α (TNF- α) 刺激に対する M-CSF 産生および interleukin-6 (IL-6) 産生を抑制すること、その作用点は p44/p42 MAP kinase と Akt の上流であることを明らかとした。

主任研究者

徳田 治彦 国立長寿医療研究センター 代謝・内分泌研究部（部長）

A. 研究目的

骨代謝は骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞により活発に営まれ、骨は絶え

ずリモデリングされ、その強度が維持されている。二つの機能細胞は、種々のサイトカイン、細胞増殖因子、オートコイド等の生理活性物質により巧緻に制御されている。骨のリモデリングの破綻が骨粗鬆症および骨折治癒の遅延の原因となると考えられている。最近、骨表面の骨芽細胞に隣接し存在する骨マクロファージにより産生される炎症性サイトカインである oncostatin M が骨損傷動物モデルにおいてその治癒を促進することが報告され (Guihard P *et al.*, Am J Pathol 2015;185:765-775)、現在では骨マクロファージが、骨リモデリングの制御に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながらその制御機構の詳細は未だ明らかにされていない。私共は、骨芽細胞培養系を用いて種々の骨代謝調節因子による骨芽細胞の機能の制御機構について検討し、多くの新知見を報告してきた。最近では、骨リモデリングの過程における骨芽細胞の骨吸収部位への移動(migration)の重要性に注目し、その制御機構の詳細を検討している。そして、食事とともに小腸から分泌され、膵ランゲルハンス島 β 細胞からインスリン分泌を促進するインクレチンは血小板由来増殖因子 (PDGF-BB) 刺激による骨芽細胞の migration を増強すること (Kawabata T *et al.*, Sci Rep 2020;10:2341)、一方、senolytics の候補として知られる heat shock protein 90 阻害薬は PDGF-BB による migration を抑制すること (Kawabata T *et al.*, Biomedical Res. 2019;40:169-178) を明らかとしている。

本研究は、培養骨芽細胞を用いて、マクロファージにより産生されるサイトカイン・ケモカインの骨芽細胞機能に及ぼす影響を詳細に解析することにより、骨マクロファージによる骨代謝・骨リモデリング制御機構、特に骨芽細胞との相互作用を解明するもので、骨粗鬆症や骨折治癒の遅延など高齢期の代謝性骨疾患の新たな治療法開発の一助とすることを目的としている。30 年におよぶ一連の研究成果を基に遂行するもので、極めて独創性が高い。

B. 研究方法

1) 骨芽細胞における TGF- β による M-CSF 産生および VEGF 産生に対する oncostatin-M の作用

新生仔マウス頭蓋冠より分離株化された骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞に oncostatin M を作用させた後、TGF- β で刺激し、培地中への M-CSF 遊離および VEGF 遊離を ELISA にて、M-CSF mRNA 発現および VEGF mRNA 発現を RT-PCR 法にて解析した。SMAD-3、p38 MAPK、p44/p42 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化を Western blot 法にて解析した。

2) 骨芽細胞における TNF- α による M-CSF 産生および IL-6 産生に対するオリーブポリフェノールの作用

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞に hydroxytyrosol および oleuropein を作用させた後、TNF- α で刺激し、培地中への M-CSF 遊離および IL-6 遊離を ELISA にて、M-CSF mRNA 発現および IL-6 mRNA 発現を RT-PCR 法にて解析した。Akt、p44/p42 MAPK および NF- κ B のリン酸化を Western blot 法にて解析した。

(倫理面への配慮)

株化された培養細胞を用いた研究であり、倫理的問題は発生しない。

C. 研究結果

1) 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞における TGF- β による M-CSF 産生および VEGF 産生に対する oncostatin-M の作用

① oncostatin-M は TGF- β により惹起される M-CSF の遊離および mRNA 発現を抑制した。

② SMAD-3 リン酸化の阻害薬である SIS3、p38 MAPK の阻害薬である SB203580、MEK1/2 の阻害薬である PD98059 および SAPK/JNK の阻害薬である SP600125 は、TGF- β による M-CSF 遊離を抑制した。

③ oncostatin-M は TGF- β により惹起される p44/p42 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化を抑制したが、SMAD-3 あるいは p38 MAPK のリン酸化に何ら影響しなかった。

④ oncostatin-M は TGF- β により惹起される VEGF の遊離および mRNA 発現を抑制した。

2) 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞における TNF- α による M-CSF 産生および IL-6 産生に対するオリーブポリフェノールの作用

① オリーブオイルに含まれるポリフェノールである hydroxytyrosol および oleuropein は、TNF- α により惹起される M-CSF の遊離および mRNA 発現、IL-6 の遊離および mRNA 発現を抑制した。

② Akt 阻害薬である deguerin は TNF- α により惹起される M-CSF 遊離を抑制したが、PD98059 は何ら影響しなかった。

③ I κ B の阻害薬である wedelolactone は、TNF- α により惹起される IL-6 遊離を抑制したが、M-CSF 遊離に何ら影響しなかった。

④ hydroxytyrosol および oleuropein は、TNF- α により惹起される Akt および p44/p42 MAPK のリン酸化を抑制したが、NF- κ B のリン酸化に何ら影響しなかった。

D. 考察と結論

oncostatin M が TGF- β により惹起される M-CSF の遊離および mRNA 発現、VEGF の遊離および mRNA 発現を抑制したことから、骨芽細胞において、oncostatin M は TGF- β による M-CSF 産生および VEGF 産生を抑制すると考えられた。一方、各種阻害薬を用いた検討より、TGF- β による M-CSF 産生には SMAD2/3、p38 MAPK、p42/p44 MAPK および SAPK/JNK が促進的に関与することが示唆された。この結果は既に明らかとしている VEGF 産生と同様であった (Kanno Y *et al.*, 2005; Tokuda H *et al.*, 2003; Yamamoto N *et al.*, 2015)。さらに、oncostatin M は TGF- β により惹起される p44/p42 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化を抑制したが、SMAD-3 あるいは p38 MAPK のリン酸化に何ら影響しなかったことから、その作用点

は p44/p42 MAPK および SAPK/JNK の上流であると考えられた。骨折治癒機転において、TGF- β は主に骨形成の促進に重要な役割を果たしている。M-CSF は破骨細胞前駆細胞が骨吸収活性を有する成熟破骨細胞へ分化する過程において必要不可欠な役割を担っていると考えられている。したがって今回明らかとなった oncostatin M の TGF- β による M-CSF 産生に対する抑制作用から、骨折治癒の早期において、oncostatin M は破骨細胞による骨吸収を抑制することが示唆された。一方 VEGF 産生に対する抑制作用は、骨折治癒早期における血管新生抑制作用を示唆すると考えられ、非常に興味深い知見である。今後さらに解析を進め、骨芽細胞機能に対する oncostatin M、ケモカインである CXCL12 および sphingosine 1-phosphate の影響を検討し、骨代謝調節因子の産生に係る細胞内情報伝達機構を解析する予定である。

一方、オリーブオイルに含まれるポリフェノールである hydroxytyrosol および oleuropein は、TNF- α 刺激に対する M-CSF 産生および IL-6 産生を抑制することを明らかにした。細胞内情報伝達機構に関し、TNF- α による M-CSF 産生には Akt のみが促進的に機能すること、IL-6 産生には p44/p42 MAPK と Akt が促進的に、NF- κ B が抑制的に機能することを今回までの研究で明らかにした。今回、hydroxytyrosol および oleuropein は、TNF- α により惹起される Akt および p44/p42 MAPK のリン酸化を抑制したが、NF- κ B のリン酸化に何ら影響しないことを示した。以上より、hydroxytyrosol および oleuropein は p44/p42 MAPK と Akt の上流において抑制作用を示すと考えられた。M-CSF は前述のように、骨吸収活性を有する破骨細胞への分化において必要不可欠な役割を果たす。また、IL-6 は、骨吸収因子として作用することが知られている。以上の結果から、オリーブポリフェノールは骨芽細胞の機能制御を介して骨吸収を抑制する可能性が示唆された。これは植物性化学物質の骨代謝への興味深い作用を示す新知見である。

以上、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、oncostatin M は TGF- β により惹起される M-CSF 産生および VEGF 産生を抑制すること、およびその作用点は p44/p42 MAPK および SAPK/JNK の上流であることを明らかにした。さらに、オリーブポリフェノールは、TNF- α 刺激に対する M-CSF 産生および IL-6 産生を抑制すること、その作用点は p44/p42 MAPK および Akt の上流であることを明らかにした。このように、研究は極めて順調に進捗しており、本研究の継続により、長寿科学における重要な新知見が引き続き創出されることが大いに期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tachi J, Onuma T, Yamaguchi S, Kim W, Hioki T, Matsushima-Nishiwaki R, Tanabe K, Tokuda H, Kozawa O, Iida H. Duloxetine suppresses BMP-4-induced release of osteoprotegerin via inhibition of the SMAD signaling pathway in osteoblasts. *Biochem. Cell. Biol.* 2021;99(5):578-586.
- 2) Kim W, Tokuda H, Tanabe K, Yamaguchi S, Hioki T, Tachi J, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Iida H. Acetaminophen reduces osteoprotegerin synthesis stimulated by PGE₂ and PGF_{2α} in osteoblasts: Attenuation of SAPK/JNK but not p38 MAPK or p44/p42 MAPK. *Biomed. Res.* 2021;42(2):77-84.
- 3) Kuroyanagi G, Kawabata T, Tokuda H, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Sakai G, Tachi J, Hioki T, Kim W, Iida H, Otsuka T, Kozawa O. Attenuation by HSP90 inhibitors of EGF-elicited migration of osteoblasts: Involvement of p44/p42 MAP kinase. *Connect. Tissue. Res.* 2021;8:1-11.
- 4) Hioki T, Tokuda H, Kuroyanagi G, Kim W, Tachi J, Matsushima-Nishiwaki R, Iida H, Kozawa O. Olive polyphenols attenuate TNF- α -stimulated M-CSF and IL-6 synthesis in osteoblasts: Suppression of Akt and p44/p42 MAP kinase signaling pathways. *Biomed. Pharmacother.* 2021;141:111816.
- 5) Hioki T, Tokuda H, Tanabe K, Kim W, Tachi J, Yamaguchi S, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Iida H. Amplification by tramadol of PGD₂-induced osteoprotegerin synthesis in osteoblasts: Involvement of m-opioid receptor and 5-HT transporter. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2021;172:102323.
- 6) Hioki T, Kuroyanagi G, Fujita K, Sakai G, Kawabata T, Kim W, Tachi J, Matsushima-Nishiwaki R, Iida H, Kozawa O, Tokuda H. Incretins enhance PGF_{2α}-induced synthesis of IL-6 and osteoprotegerin in osteoblasts. *Horm. Metab. Res.* 2022;54(1):42-49.
- 7) Mizutani D, Tokuda H, Onuma T, Uematsu K, Nakashima D, Ueda K, Doi T, Enomoto Y, Matsushima-Nishiwaki R, Ogura S, Iida H, Kozawa O, Iwama T. Amyloid β protein negatively regulates human platelet activation induced by thrombin receptor-activating protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2022;86(2):185-198.
- 8) Doi T, Hioki T, Tachi J, Ueda K, Matsushima-Nishiwaki R, Iida H, Ogura S, Kozawa O, Tokuda H. Oncostatin M reduces the synthesis of macrophage-colony stimulating factor stimulated by TGF- β via suppression of p44/p42 MAP kinase and JNK in osteoblasts. *Biomedical. Res.* in press.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし