

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、①oncostatin M は tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  刺激に対する macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 産生を抑制し、その作用点は p70 S6 kinase ではなく Akt および p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase の上流であること、②ストレス蛋白質(HSP70)阻害剤はプロスタグランジン E1 刺激に対するインターロイキン-6 産生を増強し、その作用は p38 MAP kinase 経路を介すること、③selective estrogen receptor modulator (SERM) であり、骨粗鬆症治療薬として用いられている raloxifene および bazedoxifene は、エストロゲン受容体(ER)のうち ER $\alpha$  を介した SAPK/JNK 経路の抑制により、transforming growth factor (TGF)- $\beta$  刺激に対する M-CSF 産生を抑制す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、経口摂取による食事に伴い小腸から分泌され、膵ランゲルハンス島  $\beta$  細胞からの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ストレス蛋白質 (HSP)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 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 刺激により惹起される macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 産生に対する oncostatin M の作用

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞に oncostatin M を作用させた後、TNF- $\alpha$  で刺激した。培地中への M-CSF 遊離を ELISA 法にて、M-CSF mRNA 発現を RT-PCR 法にて、細胞質画分中の Akt、p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase および p70 S6 kinase のリン酸化を Western blot 法にて解析した。

### 2) 骨芽細胞におけるプロスタグランジン (PG)E1 刺激により惹起されるインターロイキン (IL)-6 産生に対する HSP70 阻害剤の作用

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞に HSP70 阻害剤である VER-155008 あるいは YM-08、MEK1 阻害剤である PD98059、p38 MAP kinase 阻害剤である SB203580 および stress-activating protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) 阻害剤である SP600125 を作用させ

た後、PGE1 で刺激した。培地への IL-6 遊離を ELISA 法にて、IL-6 mRNA 発現を RT-PCR 法にて、細胞質画分中の p38 MAP kinase のリン酸化を Western blot 法にて解析した。

3) 骨芽細胞における transforming growth factor (TGF)- $\beta$  刺激により惹起される M-CSF 産生に対する selective estrogen receptor modulator (SERM) の作用

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞に、SERM であり、骨粗鬆症治療薬として用いられている raloxifene および bazedoxifene、エストロゲン受容体(ER) $\alpha$  アゴニストである PPT、ER $\beta$  アゴニストである ERB041 および ER $\alpha$  アンタゴニストである MPP を作用させた後、TGF- $\beta$  で刺激した。培地中への M-CSF 遊離を ELISA 法にて、M-CSF mRNA 発現を RT-PCR 法にて、細胞質画分中の p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase、SAPK/JNK および SMAD3 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) 骨芽細胞における TNF- $\alpha$  刺激により惹起される M-CSF 産生に対する oncostatin M の作用

①Oncostatin M は TNF- $\alpha$  刺激に対する M-CSF 遊離および M-CSF mRNA 発現を抑制した。

②mTOR/p70 S6 kinase 阻害剤である rapamycin は TNF- $\alpha$  刺激に対する M-CSF 遊離に何ら影響を及ぼさなかった。

③Oncostatin M は TNF- $\alpha$  刺激に対する Akt および p44/p42 MAP kinase のリン酸化を抑制したが、p70 S6 kinase のリン酸化には何ら影響を及ぼさなかった。

2) 骨芽細胞における PGE1 刺激により惹起される IL-6 産生に対する HSP70 阻害剤の作用

①PGE1 刺激による IL-6 遊離及び IL-6 mRNA 発現は、VER-155008 により増強された。

②SB203580 は PGE1 刺激による IL-6 産生を抑制したが、PD98059 あるいは SP600125 は抑制しなかった。

③YM-08 は、PGE1 刺激により惹起される IL-6 産生および p38 MAP kinase のリン酸化を増強した。

④SB203580 は PGE1 刺激による IL-6 産生に対する YM-08 の増強作用を抑制した。

3) 骨芽細胞における TGF- $\beta$  刺激により惹起される M-CSF 産生に対する SERM の作用

①Raloxifene および bazedoxifene は TGF- $\beta$  刺激に対する M-CSF 遊離および M-CSF mRNA 発現を抑制した。

②PPT は TGF- $\beta$  刺激による M-CSF 遊離を抑制したが、ERB041 は影響を及ぼさなかった。

③MPP は、TGF- $\beta$  刺激による M-CSF 遊離に対する raloxifene の抑制作用を解除した。

④Raloxifene は TGF- $\beta$  刺激に対する SAPK/JNK のリン酸化を抑制したが、SMAD3、p44/p42 MAP kinase あるいは p38 MAP kinase のリン酸化に影響を及ぼさなかった。

⑤MPP は TGF- $\beta$  刺激による SAPK/JNK のリン酸化に対する raloxifene および bazedoxifene の抑制作用を解除した。

#### D. 考察と結論

Oncostatin M が TNF- $\alpha$  により惹起される M-CSF の遊離およびその mRNA 発現を抑制したことから、oncostatin M は TNF- $\alpha$  による M-CSF 産生を抑制すると考えられた。既に私共は骨芽細胞において TNF- $\alpha$  は Akt、p44/p42 MAP kinase および p70 S6 kinase を活性化すること、M-CSF 産生においては Akt が関与するが p44/p42 MAP kinase は関与しないことを報告している。今回 rapamycin が M-CSF 遊離に何ら影響を及ぼさなかったことから、p70 S6 kinase も M-CSF 産生に関与しないと考えられた。さらに oncostatin M は TNF- $\alpha$  により惹起される Akt のリン酸化を抑制したこと、および p70 S6 kinase のリン酸化に何ら影響を及ぼさなかったことから、oncostatin M は TNF- $\alpha$  による M-CSF 産生を抑制すること、およびその作用は Akt 情報伝達経路の抑制を介することが強く示唆された。Oncostatin M 受容体の活性化により JAK/STAT 経路が活性化されることはよく知られている。骨芽細胞においても、JAK2 の活性化が TNF- $\alpha$  による Akt の活性化を抑制的に制御することが知られており、今回の知見との関連が注目される。

HSP70 阻害剤が PGE1 による IL-6 の遊離およびその mRNA 発現を増強したことから、HSP70 は PGE1 による IL-6 産生を抑制的に制御していると考えられた。既に私共は骨芽細胞において PGE1 が p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase および SAPK/JNK を活性化することを明らかとしている。今回、SB203580 のみが PGE1 による IL-6 遊離を抑制したことから、PGE1 による IL-6 産生は p38 MAP kinase の活性化を介するものと考えられた。さらに HSP70 阻害剤は、PGE1 による p38 MAP kinase のリン酸化レベルを増加したこと、SB203580 が PGE1 により惹起される p38 MAP kinase リン酸化レベルおよび IL-6 遊離の増強を減弱したことから、HSP70 は p38 MAP kinase の上流において、PGE1 による IL-6 産生を抑制的に制御していると考えられた。閉経後骨粗鬆症等の骨代謝亢進状態において、IL-6 は osteotropic に作用することが知られている。一方、HSP70 阻害剤は抗腫瘍薬として開発されてきたが、今回の知見は drug repositioning の観点から、HSP70 阻害剤の骨代謝調節薬としての可能性を示唆するものとして注目される。

骨粗鬆症治療薬として実際に用いられている SERM である raloxifene および bazedoxifene が、TGF- $\beta$  による M-CSF の遊離およびその mRNA 発現を抑制したことから、これらの薬剤は M-CSF 産生を抑制すると考えられた。TGF- $\beta$  による M-CSF 遊離に対して、PPT はこれを抑制したが、ERB041 は何ら影響を及ぼさなかったことから、SERM の抑制作用はエストロゲン受容体のうち、ER $\beta$  ではなく ER $\alpha$  を介すると考えられた。さらに raloxifene は TGF- $\beta$  刺激による SAPK/JNK のリン酸化を抑制したが、SMAD3、p44/p42 MAP kinase および p38 MAP kinase のリン酸化に何ら影響を及ぼさなかったこと、raloxifene による SAPK/JNK

リン酸化抑制作用はMPPにより解除されたことから、骨芽細胞においてSERMはER $\alpha$ を介した作用により、TGF- $\beta$ により惹起されるSAPK/JNK活性化を抑制的に制御し、M-CSF産生を抑制する可能性が強く示唆された。

以上、骨芽細胞様MC3T3-E1細胞において、oncostatin MはTNF- $\alpha$ より惹起されるAktおよびp44/p42 MAP kinaseの活性化を阻害することにより、M-CSF産生を抑制すること、HSP70阻害剤がPGE1刺激により活性化されるp38 MAP kinase経路を介しIL-6産生を増強すること、SERMはER $\alpha$ を介した作用によりTGF- $\beta$ により活性化されるp38 MAP kinaseを阻害することにより、M-CSF産生を抑制することを明らかとした。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) Kuroyanagi G, Tokuda H, Fujita K, Kawabata T, Sakai G, Kim W, Hioki T, Tachi J, Matsushima-Nishiwaki R, Otsuka T, Iida H, Kozawa O. Upregulation of TGF- $\beta$ -induced HSP27 by HSP90 inhibitors in osteoblasts. *BMC Musculoskelet Disord.* 2022;23:495.
- 2) Doi T, Hori T, Onuma T, Mizutani D, Ueda K, Enomoto Y, Matsushima-Nishiwaki R, Tanabe K, Hioki T, Tokuda H, Iwama T, Iida H, Kozawa O, Ogura S. Thrombopoietin and collagen in low doses cooperatively induce human platelet activation. *Acute. Med. Surg.* 2022;9:e769.
- 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.* 2022;63:359-369.
- 4) Hori T, Mizutani D, Onuma T, Okada Y, Kojima K, Doi T, Enomoto Y, Iida H, Ogura S, Sakurai T, Iwama T, Kozawa O, Tokuda H. Relationship between the responsiveness of amyloid  $\beta$  protein to platelet activation by TRAP stimulation and brain atrophy in patients with diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:14100.
- 5) Hioki T, Matsushima-Nishiwaki R, Tokuda H, Kozawa O. Selective estrogen receptor modulators, acting as agonists of estrogen receptor  $\alpha$  in osteoblasts, reduce the TGF- $\beta$ -induced synthesis of macrophage colony-stimulating factor via

- inhibition of JNK signaling pathway. Biomed. Res. 2022;43:211-221.
- 6) 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- $\beta$  via suppression of p44/p42 MAP kinase and JNK in osteoblasts. Biomed. Res. 2022;43:41-51.
  - 7) Kuroyanagi G, Tachi J, Fujita K, Kawabata T, Sakai G, Nakashima D, Kim W, Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Otsuka T, Iida H, Kozawa O, Tokuda H. HSP70 inhibitors upregulate prostaglandin E<sub>1</sub>-induced synthesis of interleukin-6 in osteoblasts. PLoS One. 2022;17:e0279134.
  - 8) Iida H, Onuma T, Nakashima D, Mizutani D, Hori T, Ueda K, Hioki T, Kim W, Enomoto Y, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Yamaguchi S, Tachi J, Tanabe K, Ogura S, Iwama T, Kozawa O, Tokuda H. Tramadol regulates the activation of human platelets via Rac but not Rho/Rho-kinase. PLoS One. 2023;18:e0279011.
  - 9) Hioki T, Kuroyanagi G, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Oncostatin M attenuates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced synthesis of macrophage colony-stimulating factor via suppression of Akt in osteoblasts. Connect. Tissue Res. 2023;64:139-147.

## 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