

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

田中 健二郎

論文題目

モノアミンシグナルによる骨代謝制御

## 1. 緒言

骨組織は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスによるリモデリングによって維持されている動的な組織である。これまでの多くの研究により全身性のホルモン、サイトカインおよび神経伝達物質がこの骨リモデリングに関与していることが明らかにされている。これらのリモデリング制御因子の一つにモノアミンがあり、ノルアドレナリンやセロトニンなどが含まれている。近年、このモノアミンによる骨リモデリングの制御機構について注目が集まっている。

セロトニン (5-HT) は、神経性および非神経性の広範囲かつ多様な情報伝達を仲介する生理活性アミンであり、中枢神経系と同様、末梢組織においても重要な役割を担っている。5-HT 受容体 (5-HTR) は7つのサブタイプに分類されている。ノルアドレナリン (NA) は生体内において神経伝達物質またはホルモンとして働いている。近年、交感神経系が骨代謝においても重要な働きを担っていることが明らかになっている。NA の受容体はアドレナリン受容体 (AR) であり、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\beta$  の三種類と、更に3つずつのサブタイプに分類されている。

骨芽細胞に発現が確認されている5-HTR と AR のサブタイプは5-HT<sub>1B</sub>R、5-HT<sub>2A</sub>R、5-HT<sub>2B</sub>R、 $\alpha_{1B}$ -AR、 $\alpha_{2B}$ -AR、 $\beta_2$ -AR などがある。これまでの研究により、5-HT<sub>2B</sub>R は骨量の正の制御に、5-HT<sub>1B</sub>R および  $\beta_2$ -AR は負の制御に関わっていることが明らかになっている。一方、生体における5-HT<sub>2A</sub>R や

$\alpha_{1B}$ -AR シグナルについての研究は少なく、不明な部分が多く残されている。本研究では、5-HT<sub>2A</sub>R や  $\alpha_{1B}$ -AR を介するモノアミンシグナルによる骨代謝制御機構の一端を明らかにするため、マウスを用いた動物実験および培養骨芽細胞を用いた細胞実験において、薬理的あるいは分子生物学的検討を行った。また、細胞実験での検討の途上、骨芽細胞における  $\alpha_{1B}$ -AR シグナルの下流に転写因子 CCAAT/enhancer binding protein delta (C/ebp $\delta$ 、Cebpd) の存在を認めたので、骨芽細胞における Cebpd の機能的役割についても検討を加えた。

## II. 材料と実験方法

### 1. 動物

8週齢の雄性 C57BL/6J マウスと  $\alpha_{1B}$ -AR ノックアウトマウス ( $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウス) を用いた。

### 2. 薬物と投与方法

5-HT<sub>2A</sub>R 遮断薬として MDL11939(((±)- $\alpha$ -phenyl-1-(2-phenylethyl)-4-piperidinemethanol)hydrochloride)、 $\alpha_1$ -AR 遮断薬としてプラゾシン、 $\alpha_1$ -AR 作動薬としてフェニレフリンを用いた。

### 3. $\mu$ CT 解析

大腿骨の三次元  $\mu$ CT 画像を撮影し、TRI/3DBON ソフトウェアで海綿骨の骨梁構造解析を行った。

#### 4. 骨形態計測解析

大腿骨の非脱灰凍結切片と脛骨の脱灰パラフィン切片を作成し骨形態計測解析を行った。

#### 5. 細胞培養

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞とマウス胚由来細胞株 C3H10T1/2 細胞を用いた。

#### 6. アルカリホスファターゼ活性

MC3T3-E1 細胞を MDL11939 あるいは 0.01% エタノール存在下で 10 日間培養し、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性を測定した。

#### 7. siRNA 遺伝子導入

MC3T3-E1 細胞と C3H10T1/2 細胞に低分子二本鎖干渉 RNA (siRNA) の導入を行った。

#### 8. Cebpd 安定過剰発現株の作成

MC3T3-E1 細胞に pcDNA3-Negative と pcDNA3-Cebpd の導入を行った。

#### 9. 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 取り込み試験

Cell Proliferation ELISA kit を用いて BrdU 取り込み能を評価した。

#### 10. Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction 解析

動物実験では大腿骨遠位部から抽出した total RNA を逆転写反応で cDNA に置換し、Step One Software v2.0 で Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (real time PCR) 解析を行った。

## 1 1. 統計的処理

統計学的な有意差の検定には Student's *t*-test を用いた。3 群以上の比較には ANOVA 後 Bonferroni 法で多重比較を行った。 $P < 0.05$  をもって統計学的有意とした。

## III. 結果および考察

### 1. セロトニンと骨代謝

#### 1) MDL11939 投与による大腿骨骨量の変化 (動物実験)

MDL11939 および対照群として 1.2%エタノールを 2 週間経口投与したマウス大腿骨の  $\mu$ CT 解析を行った。MDL11939 投与群では対照群と比較して骨量/組織量 (BV/TV) の有意な減少がみられた。

#### 2) MDL11939 投与の骨形成への影響 (動物実験)

骨形態計測解析により MDL11939 投与による骨量減少機構を検討した。MDL11939 投与群では対照群と比較して骨石灰化面 (MS/BS)、骨石灰化速度 (MAR)、骨形成速度 (BFR) の有意な減少がみられた。さらに遺伝子発現解析では *Osterix* (*Osx*)、*Osteocalcin* (*OC*) の mRNA 発現の有意な減少がみられた。

これら動物実験の結果は、薬理的な 5-HT<sub>2A</sub>R シグナルの阻害が骨形成の抑制に基づいた骨量の減少を引き起こすことを示している。

#### 3) MDL11939 による骨芽細胞分化への影響 (細胞実験)

MDL11939 を用いて骨芽細胞分化における 5-HT<sub>2A</sub>R シグナルの機能を検討した。MDL11939 存在下で MC3T3-E1 細胞を培養し、ALP 活性を測定したところ、MDL11939 濃度依存的に ALP 活性の減少がみられた。続いて、siRNA を導入し 5-HT<sub>2A</sub>R をノックダウンした C3H10T1/2 細胞で検討を行ったところ、siRNA 群では対照群と比較して *Osx* mRNA 発現の有意な減少がみられた。

これら細胞実験の結果は、骨芽細胞における薬理的な 5-HT<sub>2A</sub>R シグナルの遮断が、*Osx* 遺伝子の発現抑制を介して骨芽細胞分化を抑制していることを示している。

## 2. ノルアドレナリンと骨代謝

### 1) プラゾシン投与による大腿骨骨量の変化 (動物実験)

プラゾシンおよび対照群として生理食塩水を 2 週間腹腔内投与したマウスの大腿骨の  $\mu$ CT 解析を行った。プラゾシン投与群は対照群と比較して BV/TV の有意な減少がみられた。

### 2) プラゾシン投与の骨形成への影響 (動物実験)

骨形態計測解析によりプラゾシン投与による骨量減少機構を検討した。プラゾシン投与群では対照群と比較して、MS/BS、MAR、BFR の有意な減少がみられた。さらに、遺伝子発現解析では *Runx2*、*Osx*、*OC* mRNA 発現の有意な減少がみられた。

### 3) $\alpha_{1B}$ -AR ノックアウトによる大腿骨骨量の変化 (動物実験)

$\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスの大腿骨の $\mu$ CT解析を行った。 $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスでは野生型マウスと比較してBV/TVの有意な減少がみられた。

#### 4) $\alpha_{1B}$ -AR ノックアウトの骨形成への影響 (動物実験)

骨形態計測解析により  $\alpha_{1B}$ -AR ノックアウトによる骨量減少機構を検討した。 $\alpha_{1B}^{-/-}$ マウスでは野生型マウスと比較して、MS/BS、MAR、BFRの有意な減少がみられた。さらに、遺伝子発現解析では *Runx2*、*Osx*、*OC* の mRNA 発現の有意な減少がみられた。

これら動物実験の結果は、薬理的あるいは分子生物学的な  $\alpha_{1B}$ -AR シグナルの除去が、骨形成の抑制に基づく骨量の減少を引き起こしていることを示している。

#### 5) 骨芽細胞における $\alpha_1$ -AR シグナルによる *Cebpd* 遺伝子の制御 (細胞実験)

フェニレフリンによる MC3T3-E1 細胞の遺伝子変動をマイクロアレイで解析し、骨芽細胞における  $\alpha_1$ -AR シグナルの標的分子を探索した。その結果、*Cebpd* 発現の著しい増加がみられた。また、フェニレフリンは MC3T3-E1 細胞における *Cebpd* mRNA の 2 時間をピークとした有意な発現上昇を示し、この発現上昇はプラゾシンにより完全に抑制された。

#### 6) *Cebpd* による骨芽細胞増殖への関与 (細胞実験)

MC3T3-E1 細胞に siRNA (siRNA-*Cebpd*) を導入し BrdU の取り込み試験を行った。siRNA-*Cebpd* 群では対照群と比較して BrdU 取り込みの有意な減

少がみられた。さらに、Cebpd 安定過剰発現株を作製して検討したところ、Cebpd 安定過剰発現株群では対照群と比較して BrdU 取り込みの有意な増加がみられた。

これらの細胞実験の結果は、骨芽細胞における  $\alpha_1$ -AR シグナルが、Cebpd を正に制御することで細胞増殖を促進していることを示している。

## V. 結論

本研究結果は従来のモノアミンシグナルによる骨代謝制御に加えて、

- ① 5-HT<sub>2A</sub>R や  $\alpha_{1B}$ -AR が骨量の正の制御に関わっていること、② 5-HT は骨芽細胞に発現する 5-HT<sub>2A</sub>R を介して骨芽細胞分化を促進すること、および
- ③ NA は骨芽細胞に発現する  $\alpha_{1B}$ -AR を介して Cebpd 発現を正に制御することで細胞増殖を促進することを明らかにし、これら受容体シグナルが骨量増加に寄与していることを新たに示した。