

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

浜島 康祐

論文題目

$\alpha 2$ アドレナリン受容体を介した破骨細胞分化抑制

I. 緒言

骨リモデリングや骨折時の治癒過程において、中枢および末梢交感神経系が重要な役割を果たすことが多数報告されてきた。骨芽細胞や破骨細胞では、 α および β アドレナリン受容体（以下、 α -および β -ARs）が発現していることが知られている。

しかし、破骨細胞分化における α -ARsの役割はほとんど解明されていない。特に、 α_2 -ARsは、種々の生理的機能を調節することが見出されてきたが、破骨細胞形成に対する直接的な役割についてはほとんど知られていない。

本研究では、RAW264.7破骨細胞前駆細胞およびマウス骨髄細胞由来マクロファージを破骨細胞分化培地で培養し、 α_2 -AR作動薬 (guanabenz、clonidine、xylazine) および α_2 -AR拮抗薬 (yohimbine、idazoxan) の存在下または非存在下にて、破骨細胞形成における α_2 -ARsの役割を検討した。

II. 実験材料および方法

1. 細胞および培養

35匹の雌性 C57BL/6J マウス（8-10週齢）から単離した骨髄細胞と RAW264.7細胞を用いた。マウス骨髄細胞および RAW264.7細胞を 10% ウシ胎仔血清と抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン）を含む α -Minimum Essential medium で培養した。

2. 定量的リアルタイム PCR

マウス骨髄細胞および RAW264.7 細胞を receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 存在下にて α 2-AR 作動薬/拮抗薬の添加の有無で 2-4 日間培養後、nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1)、TRAP、cathepsin K および α 2A-、 α 2B-、 α 2C-AR の mRNA の発現レベルを評価した。

その際、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内部標準として各遺伝子の発現量を補正した。

3. 破骨細胞形成と TRAP 染色

マウス骨髄細胞をマクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor、M-CSF) 存在下にて 3 日間培養後の接着細胞を破骨細胞前駆細胞として用い、M-CSF と RANKL 存在下にて培養した。guanabenz または xylazine は RANKL と同時に添加し、clonidine は RANKL と同時または RANKL 添加 1 日後に添加した。

RANKL 処理 60 時間後、TRAP 染色を行った。3 つ以上の核を持つ TRAP 陽性細胞の数を光学顕微鏡 (拡大率、x100) を用いて測定した。

4. ウェスタンブロット解析

RAW264.7 細胞を溶解して抽出されたタンパク質を定量し、それらを分離後、Immobilon-P membranes に転写し、ブロッキング処理した。次に、eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α)、リン酸化された(p)-eIF2 α 、 β -アクチンに対する抗体を室温で 1 時間インキュベート

した後、HRP 標識された抗ウサギまたは抗マウス IgG 抗体を室温で 45 分間インキュベーションし、タンパク質の発現レベルを測定した。バンドの強度は、Image J v1.48 を用いて定量した。

5. 統計分析

得られた実験データは平均値と標準偏差で示し、統計的な有意差の検定には Student の t 検定を使用した。 $p < 0.05$ を統計的有意差ありと判定した。

III. 結果

1. 破骨細胞（破骨細胞前駆細胞）における $\alpha 2$ -ARs の mRNA 発現

$\alpha 2A$ -、 $\alpha 2B$ -、 $\alpha 2C$ -AR の遺伝子の発現レベルを検討した結果、全てのサブタイプの $\alpha 2$ -ARs の発現が認められた。RAW264.7 では、RANKL 添加前後で、 $\alpha 2$ -ARs の発現レベルに有意な変化が認められなかったが、マウス骨髄由来マクロファージでは、 $\alpha 2A$ -および $\alpha 2C$ -AR の発現レベルが、RANKL 添加によって低下し、 $\alpha 2B$ -AR の発現レベルは RANKL 添加によって上昇した。

2. $\alpha 2$ -ARs 作動薬による破骨細胞関連遺伝子への影響

RAW264.7 およびマウス骨髄細胞マクロファージにおいて、RANKL 添加 2 日後では、NFATc1、TRAP および cathepsin K の遺伝子の発現レベルは、RANKL 単独添加群に対し、RANKL と guanabenz の同時添加群で有意に抑制された。RAW264.7 細胞において、RANKL 添加 2 日ま

たは4日後では、RANKL と clonidine の同時添加群における NFATc1、TRAP および cathepsin K の発現が抑制された。また、マウス骨髄細胞由来マクロファージでも、clonidine を RANKL と同時に添加すると、RANKL 添加2日後で破骨細胞関連遺伝子の発現が有意に抑制された。しかし、clonidine の添加を RANKL 添加1日後にした場合、RANKL 添加2日後での破骨細胞関連遺伝子の発現抑制作用は示されなかった。また、xylazine を RANKL と同時に添加することで、RAW264.7 およびマウス骨髄細胞由来マクロファージにおける破骨細胞関連遺伝子の発現抑制が認められた。

3. α 2-ARs 作動薬による破骨細胞関連遺伝子抑制作用に対する α 2-ARs拮抗薬の影響

guanabenz および clonidine 添加による破骨細胞関連遺伝子の発現抑制作用は、yohimbine および idazoxan の添加で有意に減弱した。また、yohimbine 単独添加でも破骨細胞関連遺伝子の発現を有意に上昇させた。

4. α 2-ARs 作動薬による破骨細胞分化に対する影響

TRAP 陽性多核細胞数は guanabenz および clonidine 添加により濃度依存的に減少した。

5. α 2-ARs 作動薬による eIF2 α のリン酸化への影響

guanabenz、clonidine および xylazine が eIF2 α の脱リン酸化を阻害するのかを RAW264.7 を用いて検討した。ウエスタンブロット解析の結果、

guanabenz 添加で p-eIF2 α が増加し、clonidine、xylazine 添加では p-eIF2 α のレベルに影響を及ぼさなかった。

IV. 考察

本研究では、 α 2-ARs 作動薬である guanabenz、clonidine、xylazine が、RAW264.7 およびマウス骨髄由来マクロファージにおいて、破骨細胞関連遺伝子 (NFATc1、TRAP、cathepsin K) の発現レベルを抑制し、TRAP 陽性多核細胞数を減少させることが示された。また、 α 2-ARs 拮抗薬である yohimbine、idazoxan は、 α 2-ARs 作動薬による破骨細胞関連遺伝子の抑制効果を減弱した。clonidine と xylazine の結果と比較して、guanabenz による破骨細胞関連遺伝子の mRNA レベルの抑制作用は強く認められた。この理由としては、guanabenz は eIF2 α の脱リン酸化阻害作用をもつため、その作用による破骨細胞分化抑制の増強が考えられる。

α 2-AR 作動薬による破骨細胞関連遺伝子の発現抑制効果は、yohimbine、idazoxan 添加によって減弱したが、興味深いことに、yohimbine 単独添加でも破骨細胞関連遺伝子の発現が上昇した。この上昇は、yohimbine が inverse agonist として作用した可能性があると考えられる。

guanabenz は eIF2 α の脱リン酸化を阻害し、小胞体ストレスを軽減する働きをもち、その結果、破骨細胞関連遺伝子の発現、および破骨細胞分化を抑制する。ウエスタンブロット解析では、RAW264.7 に guanabenz を添加すると p-eIF2 α の発現レベルが上昇するが、clonidine や xylazine を添加

しても、そのリン酸化レベルに対しては影響を及ぼさなかった。以上より、guanabenz は $\alpha 2$ -ARs 作動薬であるとともに、eIF2 α の脱リン酸化阻害剤としても作用し、その結果、clonidine や xylazine と比較して、破骨細胞関連遺伝子の発現レベルや破骨細胞分化に対して強い抑制効果をもたらしたと考えられる。

破骨細胞前駆細胞では、RANKL が c-AMP を上昇させることが報告されており、clonidine、guanabenz の $\alpha 2$ -ARs を介した破骨細胞分化抑制機構に、c-AMP が関与している可能性がある。c-AMP の上昇は exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) の活性を増加させ、その結果、NF- κ B の核内移行によって破骨細胞の分化を促進させることが知られている。さらに、アデニル酸シクラーゼの活性化により上昇する cAMP が、破骨細胞分化促進に関与する c-Fos の発現を増加させることが見出されている。 $\alpha 2$ -ARs が、アデニル酸シクラーゼを抑制し、c-AMP を減少させること、clonidine、guanabenz が c-Fos の発現を低下させることより、 $\alpha 2$ -ARs 作動薬は、RANKL で誘導される c-AMP の上昇を減弱させ、破骨細胞分化を抑制すると考えられる。

本研究では、RAW264.7 およびマウス骨髄細胞由来マクロファージを用いて、 $\alpha 2$ ARs 作動薬の添加によって破骨細胞前駆細胞の破骨細胞分化を抑制することを示したが、本研究は in vitro の実験のみであり、将来的に臨床応用を考えるのであれば、動物実験も必要であると考えている。

V. まとめ

本研究により $\alpha 2$ -ARsの発現が、RAW264.7細胞株およびマウス骨髄由来マクロファージにおいて認められ、 $\alpha 2$ -ARs作動薬が、破骨細胞への分化初期に影響を与え、その結果、破骨細胞を減少させることが示された。以上の結果より、 $\alpha 2$ -ARsが破骨細胞分化を抑制的に制御していることが示唆された。