

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

|                                              |             |
|----------------------------------------------|-------------|
| 甲 第 755 号                                    | 論文提出者 浜島 康祐 |
| 論文題目<br><br>$\alpha 2$ アドレナリン受容体を介した破骨細胞分化抑制 |             |

# $\alpha$ 2 アドレナリン受容体を介した破骨細胞分化抑制

浜 島 康 祐

愛知学院大学大学院歯学研究科 歯科臨床系（歯科矯正学）  
（指導：後藤 滋巳教授）

愛知学院大学大学院歯学研究科博士（歯学）学位申請論文

Suppression of osteoclastogenesis via  $\alpha$  2-adrenergic receptors

KOSUKE HAMAJIIMA

Graduate School of Dentistry, Aichi Gakuin University  
Clinical Dentistry（Orthodontics）  
Supervisor : Prof. Shigemi Goto

The thesis submitted to the Graduate School of Dentistry,  
Aichi Gakuin University for Ph.D. degree

本論文の基盤論文は次のような論文です。

タイトル：Suppression of osteoclastogenesis via  $\alpha$  2-adrenergic receptors

掲載誌名：BIOMEDICAL REPORTS 8, 407-416, 2018

著 者：KOSUKE HAMAJIMA<sup>1,2)</sup>, KAZUNORI HAMAMURA<sup>1)</sup>, ANDY CHEN<sup>3)</sup>  
HIROKI YOKOTA<sup>3)</sup>, HIRONORI MORI<sup>1,2)</sup>, SHOYOKU YO<sup>1,2)</sup>,  
HISATAKA KONDO<sup>1)</sup>, KENJIRO TANAKA<sup>1)</sup>, KYOKO ISHIZUKA<sup>1)</sup>,  
DAISUKE KODAMA<sup>4)</sup>, TAKAO HIRAI<sup>5)</sup>, KEN MIYAZAWA<sup>2)</sup>,  
SHIGEMI GOTO<sup>2)</sup>, and AKIFUMI TOGARI<sup>1)</sup>

所 属：<sup>1)</sup> Department of Pharmacology, School of Dentistry, Aichi Gakuin  
University, Nagoya 464-8650, Japan

<sup>2)</sup> Department of Orthodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin  
University, Nagoya 464-8650, Japan

<sup>3)</sup> Department of Biomedical Engineering, Indiana University –  
Purdue University Indianapolis, Indianapolis, IN 46202, USA

<sup>4)</sup> Laboratory of Neuropharmacology, School of Pharmacy,  
Aichi Gakuin University, Nagoya 464-8650, Japan

<sup>5)</sup> Laboratory of Medical Resources, School of Pharmacy,  
Aichi Gakuin University, Nagoya 464-8650, Japan

# 目 次

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. 緒 言                                                                        | 1  |
| II. 実験材料および方法                                                                 | 1  |
| 1. 動物                                                                         | 1  |
| 2. 細胞培養                                                                       | 1  |
| 3. 定量的リアルタイム PCR                                                              | 1  |
| 4. 破骨細胞形成と tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色                      | 2  |
| 5. ウェスタンブロット解析                                                                | 2  |
| 6. 統計分析                                                                       | 5  |
| III. 結 果                                                                      | 5  |
| 1. 破骨細胞（破骨細胞前駆細胞）における $\alpha 2$ アドレナリン受容体の mRNA 発現                           | 5  |
| 2. $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬による破骨細胞関連遺伝子への影響                                    | 5  |
| 3. $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬による破骨細胞関連遺伝子抑制作用に<br>対する $\alpha 2$ アドレナリン受容体拮抗薬の影響 | 8  |
| 4. $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬による破骨細胞分化に対する影響                                     | 8  |
| 5. $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬による eIF2 $\alpha$ のリン酸化への影響                         | 8  |
| IV. 考 察                                                                       | 8  |
| V. ま と め                                                                      | 9  |
| 謝 辞                                                                           | 9  |
| 文 献                                                                           | 10 |

## 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<sup>1-4)</sup>。骨形成を担う骨芽細胞や骨吸収を担う破骨細胞では、 $\alpha$  および  $\beta$  アドレナリン受容体（以下、 $\alpha$ -および  $\beta$ -ARs）が発現していることが知られている<sup>5-7)</sup>。骨芽細胞では、 $\alpha$  1-ARs がカリウムチャネルを抑制することで細胞増殖が亢進すること<sup>8)</sup>、cebp $\delta$  (CCAAT/enhancer-binding protein  $\delta$ ) の発現上昇による細胞増殖の亢進を介して、骨形成が促進することが示されている<sup>9)</sup>。また、 $\alpha$  1-AR 作動薬が骨折時の仮骨形成を促進させることが報告されている<sup>10)</sup>。さらに、視床下部受容体に結合するレプチンが  $\beta$  2-AR を介して骨の恒常性の制御に関与すること、この  $\beta$  2-AR が CREB (cAMP response element-binding protein) のリン酸化を阻害することで、骨芽細胞の増殖の低下が引き起こされることが報告されている<sup>11)</sup>。

破骨細胞形成においては、 $\beta$ -ARs 作動薬（イソプレナリン）がヒト破骨細胞による骨吸収を促進させること<sup>6)</sup>、 $\beta$  2-AR シグナルによる活性酸素生成が、破骨細胞形成を促進させることが報告された<sup>12)</sup>。 $\alpha$  1- および  $\beta$ -ARs が骨芽細胞における receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) の発現を誘発し、その結果、RANKL による破骨細胞形成が促進されることが見出され、ARs は骨芽細胞と破骨細胞との相互作用に重要な役割を果たしていることが示されている<sup>13-15)</sup>。しかし、我々の渉猟し得た限りでは、破骨細胞分化における  $\alpha$ -ARs の役割はほとんど明らかになっていない。

$\alpha$  2-ARs は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) ファミリーに属し、3つのサブタイプ ( $\alpha$  2A、 $\alpha$  2B、 $\alpha$  2C) があり、アデニル酸シクラーゼの抑制と cAMP の減少を介して、種々の生理的機能を調節する<sup>16-21)</sup>。例えば、シナプス前膜にある  $\alpha$  2-ARs は、交感神経によるノルエピネフリンの分泌を阻害する<sup>16)</sup>。また、 $\alpha$  2A-AR は降圧反応<sup>17)</sup>、鎮静および鎮痛作用<sup>18)</sup>に重要な役割を果たしていることが報告されている。さらに、膵臓  $\beta$  細胞上の  $\alpha$  2A-AR は、インシュリン分泌を阻害することが示されている<sup>19)</sup>。 $\alpha$  2-ARs が生体の恒常性に、種々の役割を果たすことが見出されてきたが、破骨細胞形成への直接的な作用についてはほとんど明らかになっていない。

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用いて、破骨細胞形成における  $\alpha$  2-ARs の役割を検討した。これらの細胞を、 $\alpha$  2-AR 作動薬 (guanabenz, clonidine, xylazine) お

よび  $\alpha$  2-AR 拮抗薬 (yohimbine, idazoxan) の存在下または非存在下において、破骨細胞分化培地下で培養した。また、破骨細胞形成におけるこれらの作動薬および拮抗薬の効果を評価するために、リアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) と酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色、およびウエスタンブロット解析を行った。

## II. 実験材料および方法

### 1. 動物

中部科学資材株式会社（名古屋、日本）より C57BL/6J マウスを購入し、骨髄細胞を採取した。本研究では、合計 35 匹の雌性マウス（8-10 週齢）を使用した。マウスは 12 時間の明暗周期で飼育され、水と食物が自由に提供された。動物実験のプロトコルは、愛知学院大学動物実験委員会の承認を受けた（承認番号：AGUD321）。

### 2. 細胞培養

雌性マウスを頸椎脱臼後、長管骨（大腿骨および脛骨）から骨髄細胞を単離した。簡潔に述べると、長管骨の遠位部と近位端の除去後、25G 針を用いて、骨髄腔内をリン酸緩衝生理食塩水で流し出した。次に細胞を含む流し出された緩衝液を細胞ストレーナー（100  $\mu$ m; BD Falcon<sup>TM</sup>; BD Biosciences, Durham, NC, USA）に通し、通過した骨髄細胞を用いた<sup>22)</sup>。

マウス骨髄細胞および American Type Culture Collection から購入した RAW264.7 マウス破骨細胞前駆細胞 (Manassas, VA, USA) を 10% ウシ胎仔血清と抗生物質（100 U/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン）を含む  $\alpha$ -Minimum Essential medium (Wako, 大阪、日本) で培養した。培養は加湿インキュベーター内で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で行った。

### 3. 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 RANKL 存在下にて  $\alpha$  2 アドレナリン作動薬 / 拮抗薬の添加の有無で、37°C で 24 日間培養後、RNeasy Plus mini kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) を用いて全 RNA を抽出した。逆転写は、high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いて行った。定量的リアルタイム PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR mix kits (TOYOBO, 大阪、日本) を用いて、TaKaRa Thermal

Cycler Dice Real Time System III にて行った。

PCR のサイクル条件は、95℃で 10 分間の初期変性を行った後、95℃で 15 秒間の変性反応および 60℃で 1 分間の伸長反応を 40 サイクルで行なった。表1 に列挙した PCR プライマーを用いて、NFATc1、TRAP、cathepsin K および  $\alpha 2A$ 、 $\alpha 2B$ 、 $\alpha 2C$ -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。PCR 結果は、 $2^{-\Delta C_q}$  (図1) および  $2^{-\Delta \Delta C_q}$  (図2-6) 法を使用して解析した<sup>23)</sup>。

#### 4. 破骨細胞形成と tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色

マウス骨髄細胞を 12well plate と 60mm dish に、それぞれ  $1.2 \times 10^5$  と  $1.0 \times 10^6$  個の細胞を播種し、10ng/ml マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor、M-CSF; PeproTech、Rocky Hills、NJ、USA) 存在下にて 37℃で 3 日間培養し、接着細胞を破骨細胞前駆細胞として使用した<sup>22)</sup>。

これらの細胞は、10ng/ml の M-CSF と 50ng/ml の RANKL (PeproTech) 存在下にて培養した。5-20  $\mu M$  の guanabenz (R&D Systems、Minneapolis、MN、USA) または 10-20  $\mu M$  の xylazine (Sigma-Aldrich; Merck KGaA、Darmstadt、Germany) は RANKL と同時に添加され、10-20  $\mu M$  の clonidine (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) は RANKL と同時または RANKL 添加 1 日後に添加された。

RANKL 処理 60 時間後、細胞を室温にて 10% ホルマリン中性緩衝液で固定した。その後、Naphthol AS-MX phosphate、Fast Red Violet LB Salt、塩化マンガン、酒石酸ナトリウムを含む酢酸ナトリウム緩衝液 (0.1M、pH5) を 37℃で 60 分間反応させ、TRAP 染色を行った。

3 つ以上の核を持つ TRAP 陽性細胞を TRAP 陽性の多核細胞として、その数を測定した。TRAP 陽性細胞は光学顕微鏡 (拡大率、x100; Zeiss AG、Oberkochen、Germany) を用いて計数した。

qPCR 解析のため、RAW264.7 細胞を 60mm dish に  $1.0 \times 10^5$  個播種し、25ng/ml の RANKL 存在下で、10-20  $\mu M$  の yohimbine または idazoxan (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) の存在下または非存在下、および 5-20  $\mu M$  の guanabenz、10-20  $\mu M$  の clonidine または xylazine の存在下または非存在下で 2-4 日間 37℃で培養した。

#### 5. ウェスタンブロット解析

プロテアーゼ阻害剤 (Santa Cruz Biotechnology、Inc.、Dallas、TX、USA) とホスファターゼ阻害剤 (Merck KGaA) を含む 1x radioimmunoprecipitation assay (RIPA) バッファにて、RAW264.7 細胞を溶解した。抽出されたタンパク質を Pierce bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific、Inc.) を用いて定量し、それらを 10% SDS ゲルで分離後、Immobilon-P membranes (EMD Millipore、Billerica、MA、USA) に転写した。その後、そのメンブレンは、1% スキムミルク (Bio-Rad Laboratories、Inc.、Hercules、CA、USA) を用いて、4℃で一晩中ブロッキング処理された。次に、eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ; cat. no. 9722; Cell Signaling Technology、Inc. Danvers、MA、USA)、リン酸化された (p)-eIF2 $\alpha$  (cat. no. PA1-26686; Thermo Fisher Scientific、Inc.)、 $\beta$ -アクチン (cat. no. A5441; Sigma-Aldrich; Merck KGaA) 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 (cat. nos. 7074、7076; Cell Signaling Technology、Inc.) を室温で 45 分間インキュベーションした。タンパク質の発現レベルは、SuperSignal

表 1. 本研究で使用したリアルタイム PCR プライマーの塩基配列

| gene            | forward primer             | backward primer            |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|
| $\alpha 2A$ -AR | 5'-GGTGTGTTGGTTTCCGTTCT-3' | 5'-CGGAAGTCGTGGTTGAAGAT-3' |
| $\alpha 2B$ -AR | 5'-TCGAGAGAGCTAATGGACAC-3' | 5'-TCTTCAGCTCCCTTCTCTGC-3' |
| $\alpha 2C$ -AR | 5'-CATGGGCGTGTTCTGACTGT-3' | 5'-CAGGCCTCACGGCAGATG-3'   |
| cathepsin K     | 5'-CAGCTTCCCCAAGATGTGAT-3' | 5'-AGCACCAACGAGAGGAGAAA-3' |
| NFATc1          | 5'-GGTGCTGTCTGGCCATAACT-3' | 5'-GCGGAAAGGTGGTATCTCAA-3' |
| TRAP            | 5'-TCCTGGCTCAAAAAGCAGTT-3' | 5'-ACATAGCCCACACCGTTCTC-3' |
| GAPDH           | 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'  | 5'-GGATGCAGGGATGATGTTTC-3' |



図1 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  $\alpha$ 2-ARs の mRNA 発現レベル

RAW264.7 およびマウス骨髄細胞由来マクロファージを、RANKL (RAW264.7 : 25ng/ml、マクロファージ : 50ng/ml) の存在下で、 $\alpha$ 2-ARs ( $\alpha$ 2A-、 $\alpha$ 2B-、 $\alpha$ 2C-AR) の mRNA 発現レベルを測定した。

(A) RAW264.7 における  $\alpha$ 2-ARs の mRNA 発現レベル (Day 0、2、4; n=3)

(B) マウス骨髄細胞由来マクロファージにおける  $\alpha$ 2-ARs の mRNA 発現レベル (Day 0、2; n=3)

データは平均値  $\pm$  S.D. で表した。

\*: Day 0 群に対して、 $p < 0.05$  \*\* : Day 0 群に対して、 $p < 0.01$



図2 guanabenz 添加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由来マクロファージを、RANKL (RAW264.7 : 25ng/ml、マクロファージ : 50ng/ml) の存在下で guanabenz の添加あるいは非添加で、2日間培養後、RNA を回収し、破骨細胞関連遺伝子 (NFATc1、TRAP、cathepsin K) の mRNA 発現レベルを測定した。

(A) RAW264.7 における破骨細胞関連遺伝子 (NFATc1、TRAP、cathepsin K) の mRNA 発現レベル (n=4)

(B) 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 (NFATc1、TRAP、cathepsin K) の mRNA 発現レベル (n=4)

データは平均値  $\pm$  S.D. で表した。RANKL および guanabenz 非添加群を 1 とした。

\*: RANKL 単独添加群に対して、 $p < 0.05$  \*\* : RANKL 単独添加群に対して、 $p < 0.01$

基盤論文参照

(BIOMEDICAL REPORTS 8, 407-416, 2018)

図3 clonidine 添加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由来マクロファージを、RANKL (RAW264.7 : 25ng/ml、マクロファージ : 50ng/ml) の存在下で clonidine の添加 (RANKL と同時添加または RANKL 添加 1 日後に添加) あるいは非添加で、2 または 4 日間培養後、RNA を回収し、破骨細胞関連遺伝子 (NFATc1、TRAP、cathepsin K) の mRNA 発現レベルを測定した。

(A) RAW264.7 における破骨細胞関連遺伝子 (NFATc1、TRAP、cathepsin K) の mRNA 発現レベル (Day 2; n=4)

(B) RAW264.7 における破骨細胞関連遺伝子 (NFATc1、TRAP、cathepsin K) の mRNA 発現レベル (Day 4; n=4)

(C) 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 (NFATc1、TRAP、cathepsin K) の mRNA 発現レベル (Day 2; n=4)

(D) Day 1 で clonidine を添加した時の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 (NFATc1、TRAP、cathepsin K) の mRNA 発現レベル (Day 2; n=4)

データは平均値  $\pm$  S.D. で表した。RANKL および clonidine 非添加群を 1 とした。

\* : RANKL 単独添加群に対して、 $p < 0.05$  \*\* : RANKL 単独添加群に対して、 $p < 0.01$

基盤論文参照  
(BIOMEDICAL REPORTS 8, 407-416, 2018)

図4 xylazine 添加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由来マクロファージを、RANKL (RAW264.7 : 25ng/ml、マクロファージ : 50ng/ml) の存在下で xylazine の添加あるいは非添加で、2日間培養後、RNAを回収し、破骨細胞関連遺伝子 (NFATc1、TRAP、cathepsin K) の mRNA 発現レベルを測定した。

(A) RAW264.7 における破骨細胞関連遺伝子 (NFATc1、TRAP、cathepsin K) の mRNA 発現レベル (n=4)

(B) 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 (NFATc1、TRAP、cathepsin K) の mRNA 発現レベル (n=4) データは平均値±S.D.で表した。RANKL および xylazine 非添加群を1とした。

\* : RANKL 単独添加群に対して、 $p < 0.05$  \*\* : RANKL 単独添加群に対して、 $p < 0.01$

West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて測定した。バンドの強度を測定するために、イメージは luminescent image analyzer (LAS-3000; Fujifilm, Tokyo, Japan) でスキャンし、Image J v1.48 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて定量した。

## 6. 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

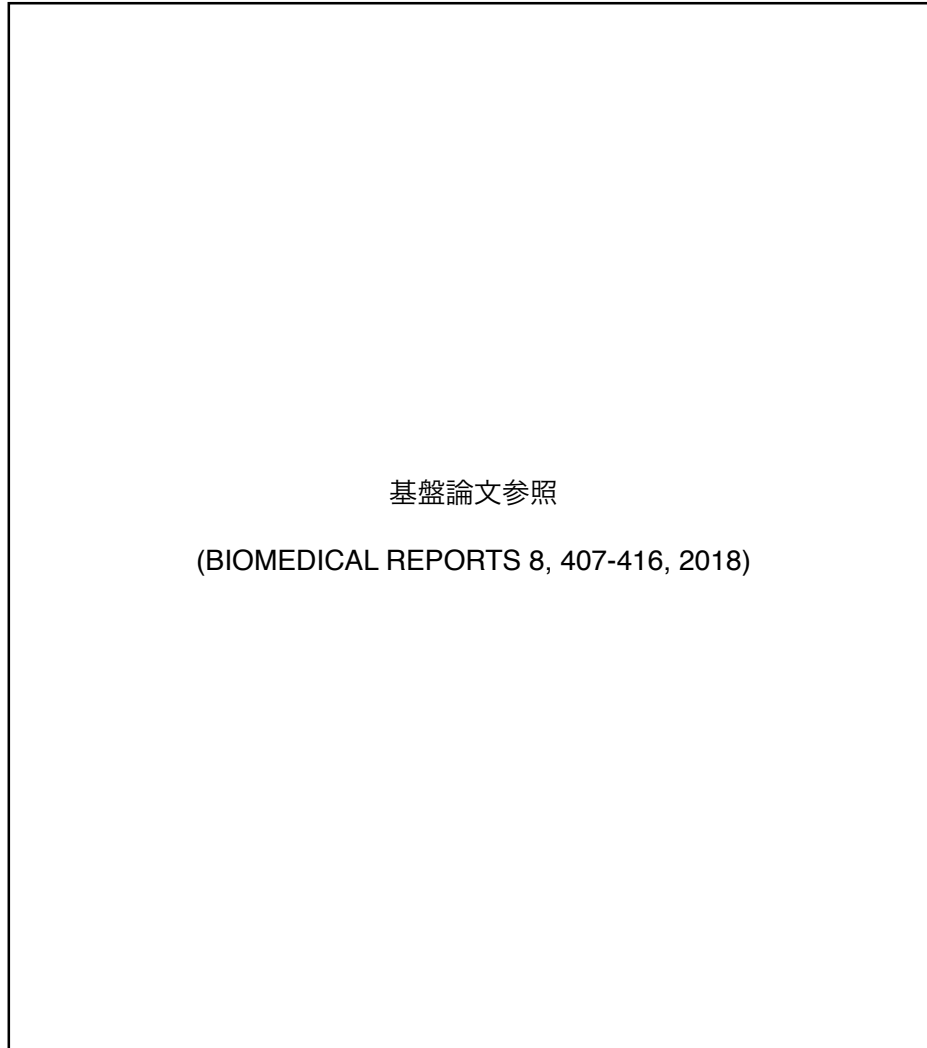
### 1. 破骨細胞 (破骨細胞前駆細胞) における $\alpha 2$ -ARs の mRNA 発現

$\alpha 2A$ 、 $\alpha 2B$ 、 $\alpha 2C$ -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 (図1)。しかし、RAW264.7 とマウス骨髄細胞由来マクロファージでは、RANKL 添加による  $\alpha 2$ -AR の

発現への影響が異なった。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 (図1A)。一方、マウス骨髄細胞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 (図1B)。

### 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 5-20  $\mu M$  の guanabenz の同時添加群で有意に抑制された (図2)。RAW264.7 細胞において、RANKL 添加2日または4日後では、RANKL と 20  $\mu M$  の clonidine の同時添加群における NFATc1、TARP および cathepsin K の発現が抑制された (図3A、B)。また、マウス骨髄細胞由来マクロファージでも、10-20  $\mu M$  の 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



基盤論文参照

(BIOMEDICAL REPORTS 8, 407-416, 2018)

図5 guanabenz、clonidine による破骨細胞関連遺伝子の発現抑制作用に対する yohimbine の影響

RAW264.7 を 25ng/ml の RANKL と guanabenz または clonidine の存在下で yohimbine の添加あるいは非添加で、2 日間培養後、RNA を回収し、破骨細胞関連遺伝子 (NFATc1、TRAP、cathepsin K) の mRNA 発現レベルを測定した。

(A) guanabenz の破骨細胞関連遺伝子の発現抑制作用に対する yohimbine の影響 (n = 4)

(B) clonidine の破骨細胞関連遺伝子の発現抑制作用に対する yohimbine の影響 (n = 4)

(C) yohimbine 単独添加による影響 (n = 4)

データは平均値  $\pm$  S.D. で表した。RANKL、 $\alpha 2$ -AR 作動薬 (guanabenz または clonidine) および yohimbine 非添加群を 1 とした。

\* : RANKL および guanabenz 添加群に対して、 $p < 0.05$  \*\* : RANKL および guanabenz 添加群に対して、 $p < 0.01$

# : RANKL および clonidine 添加群に対して、 $p < 0.05$  ## : RANKL および clonidine 添加群に対して、 $p < 0.01$

\$ : RANKL 単独添加群に対して、 $p < 0.05$  \$\$ : RANKL 単独添加群に対して、 $p < 0.01$

## 基盤論文参照

(BIOMEDICAL REPORTS 8, 407-416, 2018)

図6 guanabenzによる破骨細胞関連遺伝子の発現抑制作用に対する idazoxan の影響

RAW264.7 を 25ng/ml の RANKL と guanabenz の存在下で idazoxan の添加あるいは非添加で、2 日間培養後、RNA を回収し、破骨細胞関連遺伝子 (NFATc1、TRAP、cathepsin K) の mRNA 発現レベルを測定した。データは平均値  $\pm$  S.D. n=4 で表した。RANKL、guanabenz および idazoxan 非添加群を 1 とした。

\* : RANKL および guanabenz 添加群に対して、 $p < 0.05$  \*\* : RANKL および guanabenz 添加群に対して、 $p < 0.01$

## 基盤論文参照

(BIOMEDICAL REPORTS 8, 407-416, 2018)

図7  $\alpha$ 2-ARs 作動薬による破骨細胞分化に対する影響

マウス骨髄由来マクロファージを 50ng/ml の RANKL の存在下で  $\alpha$ 2-ARs 作動薬の添加あるいは非添加で、60 時間培養後、TRAP 染色を行い、3 つ以上の核を持つ TRAP 陽性細胞数を計数した。

(A) guanabenz 添加による TRAP 陽性細胞数の変化 (n=3)

(B) clonidine 添加による TRAP 陽性細胞数の変化 (n=3)

データは平均値  $\pm$  S.D. で表した。RANKL および  $\alpha$ 2-AR 作動薬 (guanabenz または clonidine) 非添加群を 1 とした。

\* : RANKL 単独添加群に対して、 $p < 0.05$  \*\* : RANKL 単独添加群に対して、 $p < 0.01$

に抑制された (図3C)。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 (図3D)。また、20  $\mu$ M の 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 (図4)。

### 3. $\alpha 2$ -ARs 作動薬による破骨細胞関連遺伝子抑制作用に対する $\alpha 2$ -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、20  $\mu$ M の yohimbine (図5A、B) および 20  $\mu$ M の idazoxan (図6) の添加で有意に減弱した。以上の結果より、 $\alpha 2$ -ARs 作動薬の作用をその拮抗薬が抑制することが示され、 $\alpha 2$ -AR は破骨細胞関連遺伝子の発現に関与していることが示唆された。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 (図5C)。

### 4. $\alpha 2$ -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 5-20  $\mu$ M の guanabenz および 10、20  $\mu$ M の clonidine 添加により濃度依存的に減少した。この結果より、 $\alpha 2$ -ARs 作動薬は、破骨細胞形成を抑制することが示された (図7)。

### 5. $\alpha 2$ -ARs 作動薬による eIF2 $\alpha$ のリン酸化への影響

guanabenz は eIF2  $\alpha$  の脱リン酸化を阻害することで破骨細胞分化を抑制することが知られている<sup>24-26)</sup>。そこで、clonidine、xylazine が eIF2  $\alpha$  の脱リン酸化を阻害するのかわを RAW264.7 を用いて検討した。ウエスタンブロット解析の結果、20  $\mu$ M の guanabenz 添加で p-eIF2  $\alpha$  が増加した。一方、20  $\mu$ M の clonidine、xylazine 添加では p-eIF2  $\alpha$  のレベルに影響を及ぼさなかった (図8)。

## IV. 考 察

本研究では、 $\alpha 2$ -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、 $\alpha 2$ -ARs 拮抗薬である yohimbine、idazoxan は、 $\alpha 2$ -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  $\alpha$  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。

$\alpha 2$ -ARs 拮抗薬として知られている yohimbine、idazoxan<sup>27)</sup> を用いて、 $\alpha 2$ -ARs 作動薬 guanabenz、

## 基盤論文参照

(BIOMEDICAL REPORTS 8, 407-416, 2018)

図8 guanabenz による eIF2  $\alpha$  の脱リン酸化阻害作用

RAW264.7 を 25ng/ml の RANKL と guanabenz または clonidine、xylazine の存在下で eIF2  $\alpha$  のリン酸化レベルをウエスタンブロット法にて測定した。

(A) guanabenz、clonidine または xylazine による eIF2  $\alpha$  のリン酸化への影響

(B) eIF2  $\alpha$  のリン酸化レベルを (p-eIF2  $\alpha$ ) / (total eIF2  $\alpha$ ) で算出した

データは平均値  $\pm$  S.D. で表した。RANKL および  $\alpha 2$ -AR 作動薬 (guanabenz、clonidine および xylazine) 非添加群を 1 とした。

\*: RANKL 単独添加群に対して、 $p < 0.05$

clonidine の効果を拮抗することができるのかを検討した。その結果、 $\alpha$ 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。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。アドレナリン受容体、ヒスタミン受容体、アデノシン受容体などのGPCRs は、作動薬が存在しない状態でも持続的に活性化されており、それらの受容体の拮抗薬を添加することで、その活性が低下するという報告があり、このような拮抗薬は inverse agonist と呼ばれる<sup>28-32)</sup>。例えば、アデノシン A1 受容体は破骨細胞前駆細胞で恒常的に活性化されており、その拮抗薬である rollophylline を添加すると、inverse agonist として作用し、破骨細胞の分化を抑制することが報告されている<sup>32)</sup>。よって、yohimbine 単独添加による破骨細胞関連遺伝子の mRNA 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、clonidine、xylazine は全て  $\alpha$ 2-ARs 作動薬であるが、異なる特性を合わせもつ。guanabenz は eIF2 $\alpha$  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<sup>24-26)</sup>。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 $\alpha$  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。以上の結果より、guanabenz は  $\alpha$ 2-ARs 作動薬であるとともに、eIF2 $\alpha$  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<sup>33)</sup>。c-AMP の上昇は exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) の活性を増加させ<sup>34,35)</sup>、その結果、NF- $\kappa$ 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<sup>33)</sup>。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<sup>36,37)</sup>。 $\alpha$ 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<sup>21)</sup>、clonidine、guanabenz が c-Fos の発現を低下させることより<sup>25,38)</sup>、 $\alpha$ 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、clonidine が破骨細胞分化に対して抑制的に作用することを示したが、その詳細は十分には明らかになっていない。マウス骨髄細胞に対する clonidine 添加によって TRAP 陽性破骨細胞数が増加し、 $\alpha$ 2A- および  $\alpha$ 2C-AR ノックアウトマウスにおける clonidine 添加では、TRAP 陽性破骨細胞数に変化を示さなかったという報告がある<sup>7)</sup>。また、CD14 陽性破骨細胞前駆細胞において、clonidine 添加による TRAP 陽性破骨細胞数には変化を示さなかったという報告もある<sup>39)</sup>。これらの研究で用いた実験条件との主な相違は、clonidine の添加時期である。本研究では、RANKL と同時に、もしくは RANKL 添加1日後に添加しているのに対し、これまでの報告では RANKL 添加2日後、もしくは11日後に添加していた<sup>7,39)</sup>。本研究において、RANKL と clonidine を同時に添加した場合は、NFATc1、TRAP、cathepsin K の mRNA 発現を抑制した。しかし、RANKL 添加1日後に clonidine を添加した場合は、それらの mRNA の発現に影響を及ぼさなかった。RANKL 添加2日後では、 $\alpha$ 2A- および  $\alpha$ 2C-AR の mRNA の発現が低下することより、clonidine の破骨細胞分化抑制作用は、添加する時期の  $\alpha$ 2A- および  $\alpha$ 2C-AR の mRNA の発現レベルに依存すると考えられる。

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、 $\alpha$ 2ARs 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。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました歯科矯正学講座、恩師後藤滋己教授ならびに宮澤健特殊診療科教授に深く感謝の意を表すと共に、日

頃から格別な御指導と御校閲を賜りました本学薬理学講座、戸荻彰史教授に深謝いたします。また、本研究に際し御指導、御協力を頂きました本学薬理学講座、濱村和紀准教授に謹んで感謝の意を表します。加えて、本研究にあたりご協力を頂きました本学薬理学講座の皆様、ならびに歯科矯正学講座の皆様に御礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) Karsenty G: Convergence between bone and energy homeostases: Leptin regulation of bone mass. *Cell Metab.*, **4**: 341-348, 2006.
- 2) Togari A, Arai M and Kondo A: The role of the sympathetic nervous system in controlling bone metabolism. *Expert Opin Ther. Targets*, **9**: 931-940, 2005.
- 3) Elefteriou F, Campbell P and Ma Y: Control of bone remodeling by the peripheral sympathetic nervous system. *Calcif. Tissue Int.*, **94**: 140-151, 2014
- 4) Niedermair T, Kuhn V, Doranegard F, Stange R, Wieskötter B, Beckmann J, Salmen P, Springorum H-R, Straub RH, Zimmer A, et al: Absence of substance P and the sympathetic nervous system impact on bone structure and chondrocyte differentiation in an adult model of endochondral ossification. *Matrix Biol.*, **38**: 22-35, 2014.
- 5) Togari A: Adrenergic regulation of bone metabolism: Possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. *Microsc. Res. Tech.*, **58**: 77-84, 2002.
- 6) Arai M, Nagasawa T, Koshihara Y, Yamamoto S and Togari A: Effects of beta-adrenergic agonists on bone-resorbing activity in human osteoclast-like cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1640**: 137-142, 2003.
- 7) Fonseca TL, Jorgetti V, Costa CC, Capelo LP, Covarrubias AE, Moulatlet AC, Texeria MB, Hesse E, Morethson P, Beber EH, et al: Double disruption of  $\alpha 2A$ - and  $\alpha 2C$ -adrenoceptors results in sympathetic hyperactivity and high-bone-mass phenotype. *J. Bone Miner. Res.*, **26**: 591-603, 2011.
- 8) Kodama D and Togari A: Noradrenaline stimulates cell proliferation by suppressing potassium channels via G(i/o)-protein-coupled  $\alpha (1B)$ -adrenoceptors in human osteoblasts. *Br. J. Pharmacol.*, **168**: 1230-1239, 2013.
- 9) Tanaka K, Hirai T, Kodama D, Kondo H, Hamamura K and Togari A:  $\alpha 1B$ -adrenoceptor signaling regulates bone formation through the up-regulation of CCAAT/enhancer-binding protein  $\delta$  expression in osteoblasts. *Br. J. pharmacol.*, **173**: 1058-1069, 2016.
- 10) McDonald SJ, Dooley PC, McDonald AC, Djouma E, Schuijers JA, Ward AR and Grills BL:  $\alpha (1)$  adrenergic receptor agonist, phenylephrine, actively contracts early rat rib fracture callus *in vivo*. *J. Orthop. Res.*, **29**: 740-745, 2011
- 11) Kajimura D, Hinoi E, Ferron M, Kode A, Riley KJ, Zhou B, Guo XE and Karsenty G: Genetic determination of the cellular basis of the sympathetic regulation of bone mass accrual. *J. Exp. Med.*, **208**: 841-851, 2011.
- 12) Kondo H, Takeuchi S and Togari A:  $\beta$ -Adrenergic signaling stimulates osteoclastogenesis via reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **304**: E507-E515, 2013.
- 13) Takeuchi T, Tsuboi T, Arai M and Togari A: Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Biochem. Pharmacol.*, **61**: 579-586, 2001
- 14) Nishiura T and Abe K:  $\alpha 1$ -adrenergic receptor stimulation induces the expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand gene via protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase pathways in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Arch. Oral. Biol.*, **52**: 778-785, 2007
- 15) Aitken SJ, Landao-Bassonga E, Ralston SH and Idris AI: Beta2-adrenoceptor ligands regulate osteoclast differentiation *in vitro* by direct and indirect mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.*, **482**: 96-103, 2009
- 16) Hein L, Altman JD and Kobilka BK: Two functionally distinct  $\alpha 2$ -adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*,

- 402:** 181-184, 1999
- 17) MacMillan LB, Hein L, Smith MS, Piascik MT and Limbird LE: Central hypotensive effects of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtype. *Science*, **273**: 801-803, 1996
  - 18) Lakhani PP, MacMillan LB Guo TZ, McCool BA, Lovinger DM, Maze M and Limbird LE: Substitution of a mutant  $\alpha_2$ -adrenergic receptor via 'hit and run' gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**: 9950-9955, 1997
  - 19) Fagerholm V, Haaparanta M and Scheinin M:  $\alpha_2$ -adrenoceptor regulation of blood glucose homeostasis. *Basic Clin. pharmacol. Toxicol.*, **108**: 365-370, 2011
  - 20) Albarran-Juarez J, Gilsbach R, Piekorz RP, Pexa K, Beetz N, Schneider J, Nurnberg B, Brinbaumer L and Hein L: Modulation of  $\alpha_2$ -adrenoceptor functions by heterotrimeric G $\alpha$  protein isoforms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **331**: 35-44, 2009
  - 21) Storch U, Straub J, Erdogmus S, Gudermann T and Mederos Y Schnitzler M: Dynamic monitoring of G $\alpha$ /o-protein-mediated decreases of intracellular cAMP by FRET-based Epac sensors. *Pflugers. Arch.*, **469**: 725-737, 2017
  - 22) Hamamura K, Chen A, Nishimura A, Tanjung N, Sudo A and Yokota H: Predicting and validating the pathway of Wnt3a-driven suppression of osteoclastogenesis. *Cell Signal.*, **26**: 2358-2369, 2014
  - 23) Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods*, **7**: 402-408, 2011
  - 24) Hamamura K, Tanjung N and Yokota H: Suppression of osteoclastogenesis through phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2  $\alpha$ . *J. Bone Miner Metab.*, **31**: 618-628, 2013
  - 25) Hamamura K, Chen A, Tanjung N, Takigawa S, Sudo A and Yokota H: In vitro and in silico analysis of an inhibitory mechanism of osteoclastogenesis by salubrinal and guanabenz. *Cell Signal.*, **27**: 353-362, 2015
  - 26) Hamamura K, Tanjung N, Chen A, Yokota H and Togari A: Suppression of Osteoclastogenesis via upregulation of Zfyve21 and Ddit4 by salubrinal and guanabenz. *Oral Therap. Pharmacol.*, **35**: 127-135, 2016
  - 27) Wade SM, Lan K, Moore DJ and Neubig RR: Inverse agonist activity at the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.*, **59**: 532-542, 2001
  - 28) Strange PG: Mechanisms of inverse agonist at G-protein-coupled receptors. *Trends pharmacol Sci.*, **23**: 89-95, 2002
  - 29) Milligan G: Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: A current perspective. *Mol. Pharmacol.*, **64**: 1271-1276, 2003
  - 30) Soudjin W, van Wijngaarden I and Ijzerman AP: Structure-activity relationships of inverse agonists for G-protein-coupled receptors. *Med. Res. Rev.*, **25**: 398-426, 2005
  - 31) Cotecchia S: Constitutive activity and inverse agonism at the  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *Biochem. Pharmacol.*, **73**: 1076-1083, 2007
  - 32) He W, Wilder T and Cronstein BN: Rolofylline, an adenosine A $_1$  receptor antagonist, inhibits osteoclast differentiation as an inverse agonist. *Br. J. Pharmacol.*, **170**: 1167-1176, 2013
  - 33) Mediero A, Perez-Aso and Cronstein BN: Activation of EPAC1/2 is essential for osteoclast formation by modulating NF $\kappa$ B nuclear translocation and actin cytoskeleton rearrangements. *FASEB. J.*, **28**: 4901-4913, 2014
  - 34) de Rooji J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A and Bos JL: EPAC is Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, **396**: 474-477, 1998.
  - 35) Ferrero JJ, Alvarez AM, Ramirez-Franco J, Godino MC, Bartolome-Martin D, Aguado C, Torres M, Lujan R, Ciruela F and Sanchez-Prieto J:  $\beta$ -Adrenergic receptors activate exchange protein directly activated by cAMP (EPAC), translocate Munc13-1, and enhance the Rab3A-

- RIM1  $\alpha$  interaction to potentiate glutamate release at cerebrocortical nerve terminals. *J. Biol. Chem.*, **288**: 31370-31385, 2013
- 36) Aerts I, Grobben B, Van Ostade X and Slegers H: Cyclic AMP-dependent down regulation of ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (NPP1) in rat C6 glioma. *Eur. J. Pharmacol.*, **654**: 1-9, 2011
- 37) Inda C, Bonfiglio TT, Dos Santos Claro PA, Senin SA, Armando NG, Deussing JM and Silberstein S: cAMP-dependent cell differentiation triggered by activated CRHR1 in hippocampal neuronal cells. *Sci. Rep.*, **7**: 1994, 2017
- 38) El-Mas MM and Abdel-Rahman AA: Clonidine diminishes c-jun gene expression in the cardiovascular sensitive areas of the rat brainstem. *Brain Res.*, **856**: 245-249, 2000
- 39) Limonard EJ, Schoenmaker T, de Vries TJ, Tanck MW, Heijboer AC, Endert E, Fliers E, Everts V and Bisschop PH: Clonidine increases bone resorption in humans. *Osteoporos. Int.*, **27**: 1063-1071, 2016

論文提出先：愛知学院大学大学院歯学研究科委員会  
(名古屋市千種区楠元町 1-100)