

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 31日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792240

研究課題名（和文） 骨芽細胞分の分化およびメカニカルストレス応答性におけるAMPKの役割

研究課題名（英文） Roles of AMPK in Osteogenic Differentiation

研究代表者

葛西 貴行 (KASAI TAKAYUKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30457650

研究成果の概要（和文）：

骨芽細胞分化過程において、AMP-activated protein kinase(AMPK)のリン酸化レベルの低下が見られた。AMPK 活性化剤 metformin 刺激により、基質石灰化の抑制、骨基質特異的タンパク質および Runx2 遺伝子発現レベルの低下、さらに ALP 活性の低下が認められた。活性型 AMPK 発現誘導によっても、基質石灰化が抑制された。骨折治療に応用されている低周波超音波（LIPUS）刺激を骨芽細胞に与えた結果、AMPK リン酸化レベルが低下した。LIPUS による AMPK リン酸化の抑制が骨芽細胞分化を促進する可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

AMP-activated protein kinase(AMPK) is a kinase responds to mechanical stress. Phosphorylation of AMPK $\alpha$  was significantly decreased during osteoblastic differentiation in both primary osteoblasts and MC3T3-E1, a mouse osteoblastic cell line. Conversely, the terminal differentiation of primary osteoblasts and MC3T3-E1 cells, represented by matrix mineralization, was significantly inhibited by stimulation with metformin, an activator of AMPK. Matrix mineralization of MC3T3-E1 cells was also inhibited by the forced expression of a constitutively active form of AMPK $\alpha$ . Metformin significantly inhibited gene expression of Runx2 along with osteoblast differentiation markers. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS), which is used clinically to promote bone fracture healing, decreased AMPK $\alpha$  phosphorylation. Thus, LIPUS may promote osteoblast differentiation through dephosphorylation of AMPK.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：AMPK、骨芽細胞、メカニカルストレス、シグナル伝達、LIPUS

## 1. 研究開始当初の背景

メカニカルストレス (MS) を負荷すると骨量が増加することは良く知られているが、これには骨芽細胞の分化および活性化を伴う。

MS の一つである低周波超音波 (Low intensity pulsed ultrasound: LIPUS) 刺激は、骨折の治療を促進させることが知ら

れており、臨床で広く利用されている。LIPUS 刺激受容から骨形成に至るまでのメカニズムについては不明な点が多いが、マウス骨芽細胞株を使った予備実験において、AMP-activated kinase (AMPK)  $\beta$  サブユニットの遺伝子発現量が LIPUS 刺激により著明に増加する所見が得られた。

AMPK は、ほとんどの細胞腫に  $\alpha$   $\beta$   $\gamma$  のへ

テロ3量体として存在するキナーゼであり、細胞がエネルギー不足に陥った際にリン酸化を受けることにより活性化され、糖および脂質代謝を促進し、エネルギー産生を高める働きを持つことが知られている。しかし、AMPKの骨代謝における機能についてはほとんど解明されていない。

## 2. 研究の目的

MS 負荷による骨芽細胞の応答性を明らかにするために、in vitro における MS による AMPK 遺伝子の誘導が骨芽細胞の機能に及ぼす影響を解析することである。特に AMPK と骨芽細胞分化との関係に注目し、AMPK 活性化剤などによって骨細胞への分化過程を調節できる可能性についても検討を加える。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨芽細胞における MS 応答性遺伝子；AMPK の機能・意義検索

#### ①骨芽細胞分化過程における AMPK 発現およびリン酸化の解析

MC3T3-E1 細胞およびマウス頭頂骨由来の初代培養骨芽細胞（以下初代骨芽細胞）をアスコルビン酸含有分化培地で 1~4 週間培養し、骨細胞様細胞へ分化させた後タンパクを回収し、AMPK 各サブユニットタンパクの発現レベル、および AMPK リン酸化レベルの変化をウェスタンブロッティング法により確認した。

#### ②AMPK 特異的活性化剤 metformin が骨芽細胞分化に及ぼす影響の解析

MC3T3-E1 細胞および初代培養骨芽細胞に、AMPK の特異的活性化剤 metformin (0, 0.1, 0.5, 2 mM) を作用させ、基質石灰化レベルをアリザリンレッド染色にて、骨分化マーカー（オステオカルシン、骨シアロタンパク、オステオポンチン）および Runx2 遺伝子発現をノーザンブロッティング法にて解析した。さらにアルカリフォスファターゼ活性の解析も行った。

#### ③恒常的活性型 AMPK 発現誘導が骨芽細胞分化に及ぼす影響

マウス AMPK $\alpha$  の第 183 塩基配列であるスレオニンをアスパラギン酸に変異させた AMPK は、恒常的に活性型である。この恒常的活性型 AMPK をドキシサイクリン添加により発現誘導する Tet-on inducible system を用い、基質石灰化に及ぼす影響をアリザリンレッド染色にて解析した。

## (2) MS と骨芽細胞分化シグナルにおける AMPK の意義検索

### ①LIPUS が AMPK 活性に及ぼす影響

MC3T3-E1 細胞をアスコルビン酸および  $\beta$  グリセロフォスフェート含有  $\alpha$ -MEM 培地にて 2 週間分化誘導し、LIPUS（帝人ファーマ US-Vitro-N06-038）刺激を与え、1, 20, 40 分後にタンパクを採取し、AMPK リン酸化レベルの変化を Western blotting 法により解析した。LIPUS の出力および刺激時間は、臨床応用されている条件と同じ 30mW/cm<sup>2</sup>、20 分間とした。

## 4. 研究成果

### (1) 骨芽細胞における MS 応答性遺伝子；AMPK の機能・意義検索

#### ①骨芽細胞分化過程における AMPK 発現およびリン酸化の解析

初代骨芽細胞、MC3T3-E1 細胞いずれの分化過程においても、AMPK $\alpha$  サブユニットの発現レベルに変化はなかったが、AMPK リン酸化レベルには低下が見られた。（図 1. MC3T3-E1 細胞）

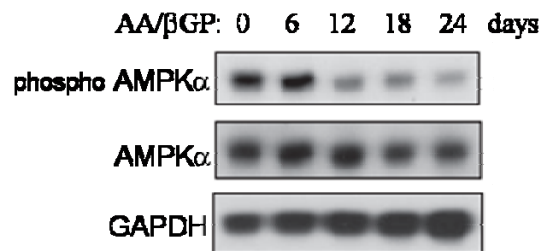


図 1. MC3T3-E1 細胞における AMPK $\alpha$  発現およびリン酸化レベルの変化

#### ②AMPK 特異的活性化剤 metformin が骨芽細胞分化に及ぼす影響の解析

a) MC3T3-E1 細胞および初代培養骨芽細胞において、metformin (0, 0.1, 0.5, 2 mM) を添加培養した際の AMPK リン酸化レベルをウェスタンブロッティング法により確認したところ、2mM metformin 添加においてのみ持続的な AMPK リン酸化効果が見られた。（データ省略）基質石灰化レベルをアリザリンレッド染色にて確認した結果、持続的 AMPK リン酸化効果のあった 2mM metformin 添加培養において著明な基質石灰化の抑制が見られた。（図 2）

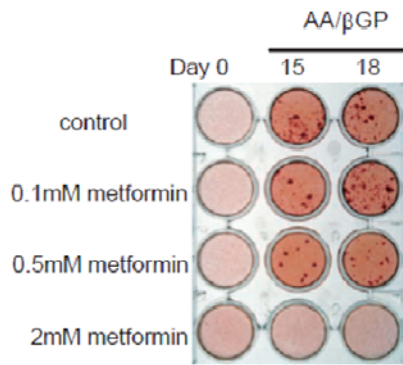


図2. Metformin による基質石灰化への影響 (MC3T3-E1 細胞)

b) 2mM metformin 添加培養により、オステオカルシンや骨シアロタンパク、オステオポンチン等の骨分化マーカー発現レベルは低下し、さらに、これら骨分化マーカーの発現を調節する転写因子である Runx2 遺伝子の発現レベルも有意に抑制した。(図3)

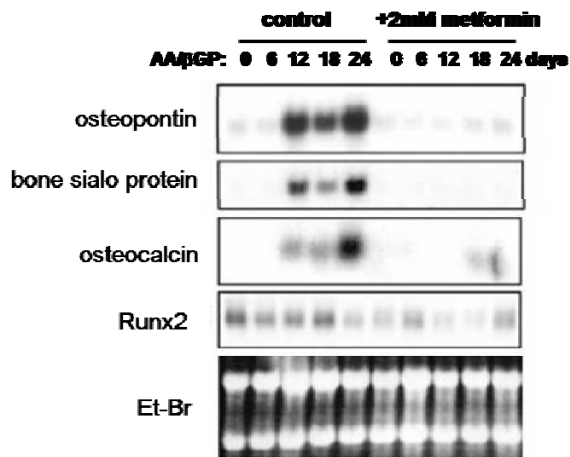


図3. Metformin による骨分化マーカーおよび Runx2 発現への影響 (MC3T3-E1 細胞)

c) 2mM metformin 添加培養により、アルカリフォスファターゼ活性は抑制した。(図4)

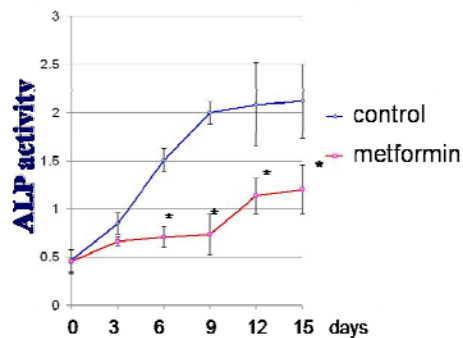


図4. Metformin によるアルカリフォスファターゼ活性への影響 (MC3T3-E1 細胞)

### ③恒常的活性型 AMPK 発現誘導が骨芽細胞分化及ぼす影響

Tet-on inducible system を用い、ドキシサイクリンにより恒常的活性型 AMPK 発現誘導を行ったところ、骨芽細胞による基質石灰化は有意に抑制された。(図5)

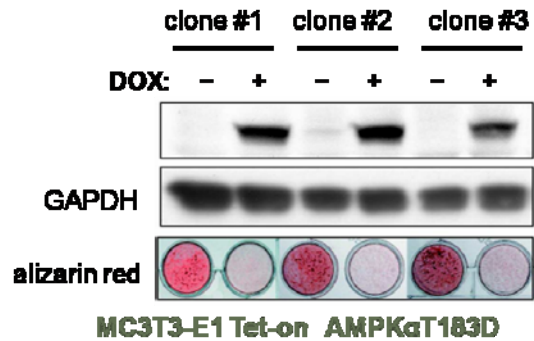


図5. 恒常的活性型 AMPK 発現誘導が基質石灰化へ及ぼす影響 (MC3T3-E1 細胞)

### (2) MS と骨芽細胞分化シグナルにおける AMPK の意義検索

#### ①LIPUS が AMPK 活性に及ぼす影響

MC3T3-E1 細胞への LIPUS 刺激を与えたところ、20 分後に AMPK 活性の低下が認められた。

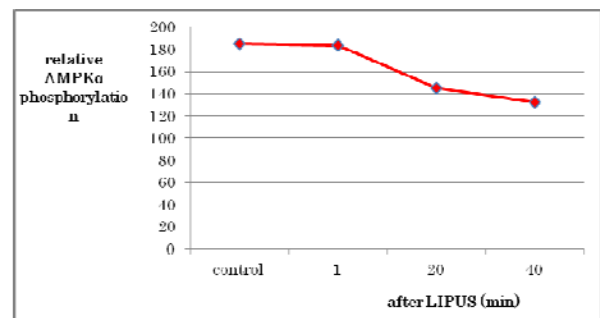
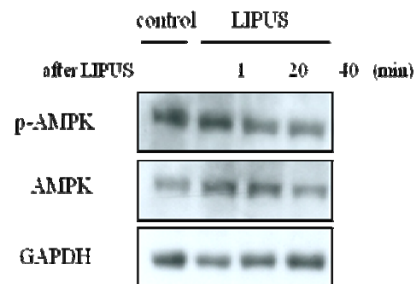


図6. LIPUS が AMPK 活性に及ぼす影響 (MC3T3-E1 細胞)

図1～図5の結果より、in vitro における骨芽細胞分化過程において AMPK のリン酸化

レベルで示す活性は低下するが、活性レベルを持続させると Runx2 の発現レベルが低下し、骨芽細胞の分化に抑制的に働く所見が得られた。このことから、生理的な AMPK 活性の低下は骨芽細胞の分化を誘導する一つの要因であり、そのシグナルには Runx2 の発現誘導が関わりを持つことが示唆された。

また、図 6 に示すように LIPUS 刺激により AMPK リン酸化レベルの低下が見られたことから、その機序は不明であるが、LIPUS による AMPK 脱リン酸化の誘導が骨芽細胞分化を促進する可能性が考えられた。

LIPUS 刺激による、骨芽細胞における RUNX2 や骨芽細胞分化マーカー発現の変化に及ぼす影響に関しては研究途中である。また、AMPK ノックアウトマウスや、AMPK 活性化剤をマウスに投与した際の vivo における骨形成の評価も行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

①葛西貴行, 川本真一郎, 長岡英一, 松口徹也「低周波超音波刺激が骨芽細胞分化シグナル伝達に及ぼす影響」2011. 11. 6 社団法人日本補綴歯科学会九州支部学術大会 長崎

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

葛西 貴行 (KASAI TAKAYUKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・  
助教

研究者番号：30457650