

アンジオテンシンⅡが骨芽細胞の細胞外
マトリックスタンパク代謝調節および石灰化物形成
に及ぼす影響

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

中井 久美子

(指導：前野 正夫 教授，川戸 貴行 准教授)

目 次

概 要	2
第 1 章 アンジオテンシン II は AT ₁ 受容体と MAPK シグナル伝達経路を介して骨芽細胞の MMP-3 と MMP-13 の産生を誘導する	
緒 言	5
材料および方法	7
成 績	10
考 察	29
第 2 章 アンジオテンシン II は AT ₁ 受容体を介して骨芽細胞の分化と石灰化物形成を抑制する	
緒 言	33
材料および方法	35
成 績	37
考 察	45
総 括	48
謝 辞	50
引用文献	51
参考論文	58

Nakai et al. (2013) Biochimie 95 (4), 922-933.

Nakai et al. (2013) Arch Med Sci, in press.

概 要

高血圧は、高血糖および血中脂質異常とともにメタボリックシンドロームの判定要因の一つとして捉えられ、血管疾患のリスク因子となることが知られている。最近、高血圧症が骨粗鬆症のリスク因子となることや、炎症性骨吸収を主症状とする成人性歯周炎の罹患者では健常者に比べて収縮期血圧が高いことが疫学研究で明らかにされ、高血圧症と骨代謝の関連性は重視されている。

アンジオテンシン (angiotensin; Ang) II は、Ang II type 1 (AT₁) および Ang II type 2 (AT₂) 受容体を介して、細胞外液量と血圧の調節に関与する生理活性物質である。Ang II を標的にした薬剤は、血圧降下だけでなく骨量の増加にも有効であることが報告されており、骨代謝における Ang II の役割が注目されている。

正常な骨組織では、骨リモデリングにおける骨形成と骨吸収の均衡が厳密に調節され、恒常性が維持されている。しかし、骨粗鬆症や炎症性骨吸収などの骨疾患では、この均衡が崩れて骨吸収系に傾くことで骨組織の破壊が進行する。骨芽細胞は高い alkaline phosphatase (ALPase) 活性を有し、I 型コラーゲン、bone sialoprotein (BSP)、osteopontin (OPN) および osteocalcin (OCN) などの細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) タンパクを多く産生し、骨形成において中心的な役割を担っている。また、骨芽細胞は、matrix metalloproteinases (MMPs) および plasminogen activators (PAs) などの ECM タンパク分解酵素と、これらの内因性阻害剤である tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) および plasminogen activator inhibitor (PAI) を産生し、骨組織の osteoid 層における ECM タンパク代謝を調節している。さらに、骨芽細胞は、破骨細胞分化促進因子である receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) とその decoy 受容体を産生して、破骨細胞の分化を調節している。

Ang II が骨代謝に影響するメカニズムとしては、Ang II が破骨細胞に直接作用して、あるいは骨芽細胞の RANKL 産生増加を介して破骨細胞による骨吸収を促進することが報告されている。しかし、骨芽細胞による ECM タンパク代謝に及ぼす Ang II の影響は調べられていない。著者は、Ang II は、骨芽細胞の RANKL 産生を増加させるだけでなく、ECM タンパク分解酵素とそれらの内因性阻害剤の発現にも影響することで、骨代謝とくに ECM タンパク代謝を分解系に傾けるのではないかと考えた。

そこで本研究の第 1 章では、骨芽細胞による osteoid 層の ECM タンパク代謝を想定し、骨芽細胞のモデルとしてラット骨肉腫由来株化骨芽細胞である ROS17/2.8 細胞を用いて、Ang II が ROS17/2.8 細胞の増殖、ALPase 活性、AT₁

および AT₂ 受容体, MMPs および PAs とそれらの阻害剤である TIMPs および PAI-1 の発現に及ぼす影響を調べた。その結果, Ang II 刺激で, ROS17/2.8 細胞の増殖, MMP-3 および MMP-13 の発現は増加し, ALPase 活性は低下した。一方, MMP-2, MMP-9, MMP-14, tissue-type PA (tPA), urokinase-type PA (uPA), TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 および PAI-1 の発現は Ang II 刺激の影響を受けず, MMP-1 と TIMP-4 の発現は Ang II 刺激の有無に関わらず検出されなかった。さらに, Ang II 刺激で誘導される MMP-3 および MMP-13 の発現増加は AT₁ 受容体拮抗剤 losartan で抑制されたが, AT₂ 受容体拮抗剤 PD123319 はこれらの発現増加に影響しなかった。次に, Ang II 誘導性の MMP-3 および MMP-13 発現増加に関与する細胞内シグナル伝達経路を調べるために, ROS17/2.8 細胞内の mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達経路に及ぼす Ang II の影響を調べた。その結果, Ang II 刺激で extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, p38 MAPK および stress-activated protein kinases/c-jun N-terminal kinases (SAPK/JNK) のリン酸化が増加した。また, Ang II 刺激で誘導されるこれらのリン酸化の増加は losartan で, Ang II 刺激で誘導される MMP-3 および MMP-13 の発現増加は ERK1/2 および SAPK/JNK の特異的リン酸化阻害剤である PD98059 および SP600125 で, それぞれ完全に抑制された。なお, p38 MAPK 特異的リン酸化阻害剤 SB20358 は, ROS17/2.8 細胞の増殖を著しく抑制した。

以上の結果から, Ang II は, 骨芽細胞の AT₁ 受容体に結合して MAPK シグナル伝達経路を活性化させ, MMP-3 および MMP-13 の産生増加を誘導することが明らかになった。

骨芽細胞の分化は, そのプロセスにおけるさまざまな段階において, 複数の転写因子によって調節されている。Runx2 と Osterix は, 膜性骨化と軟骨内骨化のいずれにおいても不可欠な転写因子である。また, Msx2 や Dlx5 などの骨に非特異的な転写因子も骨芽細胞の分化を促進する。一方, AJ18 は骨芽細胞の分化を抑制する転写因子である。Ang II は, ラット胎児頭蓋冠由来骨芽細胞の ALPase 活性と OCN 発現を低下させたと報告されており, 著者も第 1 章において, Ang II が ROS17/2.8 細胞の ALPase 活性を低下させることを確認した。しかし, 骨芽細胞の分化に関与する転写因子や, OCN 以外の ECM タンパクの発現に及ぼす Ang II の影響については調べられていない。

そこで第 2 章では, Ang II が ROS17/2.8 細胞の転写因子とコラーゲン性および非コラーゲン性の ECM タンパク発現に及ぼす影響を検討した。また, ROS17/2.8 細胞による石灰化物形成と, それに含まれるカルシウム蓄積量に及ぼす Ang II の影響についても併せて検討した。その結果, Ang II 刺激で Runx2, Msx2 および OCN の発現は低下し, AJ18 の発現は増加した。なお, Osterix, Dlx5, I

型コラーゲン、BSP および OPN の発現には Ang II 刺激の影響は認められなかった。また、石灰化物形成とそれに含まれるカルシウム量は Ang II 刺激で減少した。さらに、losartan は、Ang II 刺激による Runx2、Msx2 および OCN の発現低下と AJ18 の発現増加を完全に抑制した。

以上の結果から、Ang II は、ROS17/2.8 細胞の AT₁ 受容体に結合し、Runx2 および Msx2 発現を減少させる一方で AJ18 発現を増加させ、骨芽細胞分化を抑制すると考えられた。さらに、Ang II は ALPase 活性と OCN 発現を低下させて、ROS17/2.8 細胞の石灰化物形成を抑制することが示唆された。

第 1 章および第 2 章で得られた結果から、Ang II は、骨芽細胞の AT₁ 受容体と MAPK シグナル伝達経路を介して MMP-3 と MMP-13 の産生を増加させ、ECM タンパク代謝を分解系に傾けることが明らかになった。また、Ang II は、骨芽細胞の分化を促進する転写因子 Runx2 と Msx2 の発現低下と分化を抑制する転写因子 AJ18 の発現増加を介して骨芽細胞分化を抑制し、ALPase 活性と OCN 発現を低下させて石灰化物形成を抑制することが明らかとなった。

なお、本論文は、2013 年に掲載された原著論文 (Nakai et al., Biochimie 95, 922-933) を基幹論文とし、これに掲載予定の原著論文 (Nakai et al., Archives of Medical Science) を副論文として加え、総括したものである。

第 1 章

アンジオテンシン II は AT₁ 受容体と MAPK シグナル伝達経路を介して骨芽細胞の MMP-3 と MMP-13 の産生を誘導する

Nakai K, Kawato T, Morita T, Iinuma T, Kamio N, Zhao N, Maeno M (2013) Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT₁ receptor in osteoblasts. *Biochimie* 95 (4), 922-933.

緒 言

MMPs は、活性中心に亜鉛イオンを含む酵素群である。骨芽細胞が産生する MMPs は中性の pH 領域で活性化され、osteoid 層のコラーゲン、プロテオグリカンおよび非コラーゲン性タンパクなどの ECM 分子の正常な turnover を触媒している (Malemud, 2006)。MMP ファミリーは、基質特異性の違いによって、コラゲナーゼ (MMP-1, MMP-8 および MMP-13), ゼラチナーゼ (MMP-2 および MMP-9), ストロムライシン (MMP-3, MMP-10 および MMP-11), マトリライシン (MMP-7 および MMP-26), 膜型 MMP (MMP-14 および MMP-17) およびその他の MMP の 6 種のサブグループに分類される。これらは、アミノ酸配列の類似性およびドメイン構成などによって一次構造が類似している (John et al., 2001; Egeblad et al., 2002)。MMPs の酵素活性は、MMPs と TIMPs との相互作用によって調節される (Visse et al., 2003)。哺乳類では 4 種類の TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 および TIMP-4) がクローン化されており、その一次構造と機能が解析されている (Olson et al., 1997; Yu et al., 2000; Huang et al., 2002)。PAs は、骨芽細胞を含むさまざまな種類の細胞から分泌され、不活性型のプラスミノゲンを活性型のプラスミンへ変換する。PAs には tPA と uPA の 2 種類が存在し、それらの酵素活性は PAI-1 によって阻害される (Nagamine et al., 2005)。プラスミンは、基質特異性が広いセリンプロテアーゼであり、ECM 中の非コラーゲン性タンパクを分解する (Skrzydowska et al., 2005)。さらに、プラスミンは不活性型 MMPs を活性化させることで、間接的に ECM タンパク分解に関与する (Pins et al., 2000)。

Ang II は、生理活性を有するオクタペプチドであり、細胞外液量と血圧の維持に重要な役割を担っている。Ang II は、7 回膜貫通 G タンパク質共役型受容体である AT₁ および AT₂ 受容体を介して MAPK を活性化させる (Senbonmatsu et

al., 2003)。Ang II は、破骨細胞の AT₁ 受容体を介して骨吸収を促進することが *in vitro* あるいは卵巣摘出マウスおよびラットでの動物実験で報告されており、Ang II は骨粗鬆症の発症、進行に関与すると考えられている (Hatton et al., 1997; Shimizu et al., 2008; Guan et al., 2011; Kaneko et al., 2011)。また、Ang II は、骨芽細胞が産生するサイトカインや RANKL を介して、間接的に破骨細胞を活性化させる (Bandow et al., 2007; Shimizu et al., 2008; Guan et al., 2011; Kaneko et al., 2011)。しかし、骨芽細胞による osteoid 層の turnover における Ang II の役割は不明である。

そこで、本研究では、骨芽細胞による osteoid 層の ECM タンパク代謝を想定し、骨芽細胞のモデルとして ROS17/2.8 細胞を用いて、Ang II、AT₁ 受容体拮抗剤 losartan および AT₂ 受容体拮抗剤 PD123319 が、ROS17/2.8 細胞の増殖、ALPase 活性、AT₁ および AT₂ 受容体、MMPs および PAs とそれらの阻害剤である TIMPs および PAI-1 の発現に及ぼす影響を調べた。また、Ang II が、ERK1/2, p38 MAPK, SAPK/JNK のリン酸化に及ぼす影響についても併せて検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

本研究には、骨芽細胞として ROS17/2.8 細胞を用いた。ROS17/2.8 細胞の培養は、10% ウシ胎児血清 (FBS) と 1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を含む α -MEM を培養液として用いて 37°C, 5% CO₂ 存在下で行った。ROS17/2.8 細胞を刺激する際の Ang II 濃度は、Lamparter ら (1998), Shimizu ら (2008) および Guo ら (2011) の報告を基に、0, 10⁻⁸, 10⁻⁷ および 10⁻⁶ M とした。

2. 細胞増殖および ALPase 活性

細胞増殖は cell-counting kit を用いて細胞数を調べた。ALPase 活性は、*p*-ニトロフェニルリン酸を基質とし、酵素反応の結果生じる *p*-ニトロフェノール量を測定して求めた。

3. Real-time PCR

細胞から全 RNA を抽出後、逆転写酵素で mRNA から cDNA を作成し、SYBER-Green I を用いた intercalater 法、または TaqMan Fast Advanced Master Mix を用いた TaqMan probe 法で real-time PCR を行った。Table 1 に intercalater 法で使用したプライマーの配列を示す。また、TaqMan probe 法では、TaqMan Gene Expression Assay (MMP-3: Rn00591740, MMP-13: Rn01448194) を probe および primer として用いた。遺伝子の増幅は、intercalater 法では Smart Cycler を、TaqMan probe 法では Thermal Cycler Dice Real Time System を用いて行い、それぞれの装置に付属の解析ソフトで結果を解析した。すなわち、intercalater 法ではあらかじめ作成した検量線をもとに、TaqMan probe 法では 2 ^{$\Delta\Delta C_t$} 法により遺伝子の増幅量を求め、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の増幅量で補正した値を mRNA 発現量とした。

4. SDS-PAGE および Western blotting

SDS-PAGE は 4-20% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動後、ゲル内のタンパクを PVDF 膜に転写した。Western blotting は、1 次抗体として抗 AT₁, 抗 AT₂, 抗 MMP-2, 抗 MMP-3, 抗 MMP-9, 抗 MMP-13, 抗 MMP-14, 抗 TIMP-1, 抗 TIMP-2, 抗 TIMP-3, 抗 tPA, 抗 uPA, 抗 PAI-1, 抗 ERK1/2, 抗リン酸化 ERK1/2, 抗 p38 MAPK, 抗リン酸化 p38 MAPK, 抗 SAPK/JNK, 抗リン酸化 SAPK/JNK または抗 β -tubulin 抗体を用いて、2 次抗体としてビオチン標識の各免疫動物に対する抗体を用いて行った。さらに、ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジン

ン溶液を加えた後、化学発光反応を行い X 線フィルムに感光させた。タンパク発現の強さは、scanner と digital image analysis software を用いて測定し、 β -tubulin 発現量で補正して求めた。

5. ゼラチンザイモグラフィ

ゼラチナーゼによるゼラチン分解活性を評価するために、0.1% ゼラチンを含有する 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動後、ゲルを 2.5% Triton X-100 および 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) に浸漬し、37°C で 4 時間、ゼラチンの消化反応を行った。ゼラチナーゼ活性の強さは、Coomassie Brilliant Blue R-250 を含む 40% 酢酸メタノールでゲルを染色して確認した。

6. AT 受容体拮抗剤および MAPK リン酸化阻害剤処理

Ang II 誘導性の MMP-3 および MMP-13 発現における AT₁ 受容体、AT₂ 受容体 および MAPK シグナル伝達経路の役割を調べるために、細胞を AT₁ 受容体拮抗剤 losartan (5 μ M)、AT₂ 受容体拮抗剤 PD123319 (5 μ M)、ERK 1/2 リン酸化阻害剤 PD98059 (10 μ M)、p38 MAPK リン酸化阻害剤 SB20358 (10 μ M) あるいは JNK リン酸化阻害剤 SP600125 (1 μ M) で前処理後、各阻害剤の存在下で細胞を Ang II で刺激した。なお、AT 受容体拮抗剤の濃度は Hagiwara ら (1998) および Shimizu ら (2008) の報告を基に、リン酸化阻害剤の濃度は、Onodera ら (2002)、Yang ら (2004) および Chin ら (2008) の報告を基に決定した。なお、real-time PCR および Western blotting による分析の前に、上記の阻害剤が細胞の形態と増殖に影響を及ぼさないことを確認した。

7. 統計学的分析

すべての実験は 3 回繰り返す、結果は平均値と標準偏差で表した。統計処理は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Tukey の多重比較検定を用いて行い、危険率 5% 未満を統計的な有意差とした。

Table 1

PCR primer used in the experiments

Target	Forward Primer	Reverse Primer	Genbank acc No.
MMP-1	5'-CTGGCCAAATCTGCCAGGT-3'	5'-TCACAAACGGCAGCGTCAA-3'	NM_001134530.1
MMP-2	5'-CCAAGAACTCCGACTATCCAATGA-3'	5'-CAGTGTAGGCGTGGGTCCAGTA-3'	NM_031054.2
MMP-3	5'-TCCCAGGAAAATAGCTGAGAACTT-3'	5'-GAAACCCAAATGCTTCAAAGACA-3'	NM_133523
MMP-9	5'-AGCCGGGAACGTATCTGGA-3'	5'-TGGAAACTCACACGCCAGAAG-3'	NM_031055
MMP-13	5'-TGACCTGGGATTTCCAAAAGAG-3'	5'-GTCTTCCCCGTGCCTCAA-3'	XM_343345
MMP-14	5'-GAGAACTTCGTGTTGCCTGATGAC-3'	5'-TTCTGGGCTTATCTGGGACAGAG-3'	BC072509
TIMP-1	5'-GGGCTACCAGAGCGATCACTT-3'	5'-AAGGTATTGCCAGGTGCACAA-3'	AF411319
TIMP-2	5'-ACATCTCCTCCCCGGATGA-3'	5'-GGTGCCCATGATGCTCTTC-3'	BC084714
TIMP-3	5'-GGGCTGTGCAACTTTGTGGA-3'	5'-ATTCTTGAGGTACAAAAGCAAGG-3'	NM_012886.2
TIMP-4	5'-AGGACCTGTCCTTGGTGCAGA-3'	5'-GAGATGGTACACGGCACTGCATA-3'	NM_001109393.1
tPA	5'-GTCAGATTCCAGTCAGTGTG-3'	5'-GTTGCTCGTGATGGTTTTG-3'	NM013151
uPA	5'-TCGGACAAGAGAGTGCCA-3'	5'-TCACAATCCCGCTCAGAG-3'	NM_013085
PAI-1	5'-GACAATGGAAGAGCAACATG-3'	5'-ACCTCGATCTTGACCTTTTG-3'	NM_012620
AT ₁	5'-CCCCTCAAGCCTGTCTACGAA-3'	5'-GTGTGCTTTGAACCTGTCACTCC-3'	NM_030985.4
AT ₂	5'-CTTGGATGCTCTGACCTGGATG-3'	5'-AAGCGGTTTCCAACGAAACAATAC-3'	NM_012494.3
GAPDH	5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'	5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'	NG_028301.1

成 績

1. 細胞増殖と ALPase 活性に及ぼす Ang II の影響

細胞数および ALPase 活性は、Ang II の有無に関わらず、7 日間の培養期間を通して増加した (Fig. 1a and b)。

培養 3, 5 および 7 日目の細胞数は、 10^{-6} M Ang II 存在下でコントロールに比べて有意に増加したが、 10^{-8} および 10^{-7} M Ang II 存在下ではその影響は認められなかった (Fig. 1a)。一方、培養 3, 5 および 7 日目の ALPase 活性は、 10^{-6} M の Ang II 存在下でコントロールに比べて有意に減少したが、 10^{-8} M および 10^{-7} M Ang II 存在下ではその影響は認められなかった (Fig. 1b)。

この結果から、以後の実験は細胞増殖と ALPase 活性に影響を認めた 10^{-6} M Ang II 存在下および非存在下で行った。

2. MMPs の遺伝子およびタンパク発現に及ぼす Ang II の影響

MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 および MMP-14 の遺伝子およびタンパク発現は、Ang II の有無に関わらず、培養 5 日目に最も高い値を示した (Fig. 2)。なお、MMP-1 の遺伝子発現は、Ang II の有無にかかわらず検出されなかった。

MMP-3 および MMP-13 の遺伝子発現は、培養 5 日目に 10^{-6} M Ang II 存在下でコントロールに比べて有意に増加したが (Fig. 2b and d), MMP-2, MMP-9 および MMP-14 の遺伝子発現には、7 日間の培養期間を通して Ang II 添加の影響は認められなかった (Fig. 2a, c, and e)。

MMP-3 のタンパク発現は培養 3 および 5 日目において、MMP-13 のタンパク発現は 5 日目において、それぞれ 10^{-6} M Ang II 存在下でコントロールに比べて有意に増加した (Fig. 2g and i)。一方、MMP-2, MMP-9 および MMP-14 のタンパク発現には、7 日間の培養期間を通して Ang II 添加の影響は認められなかった (Fig. 2f, h and j)。

3. TIMPs の遺伝子およびタンパク発現に及ぼす Ang II の影響

Ang II の有無に関わらず、TIMP-1 の遺伝子およびタンパク発現は培養 3 日目に最も高い値を示し (Fig. 3a and d), TIMP-2 および TIMP-3 の遺伝子およびタンパク発現は 5 日目に最も高い値を示した (Fig. 3b, c, e and f)。

TIMP-1, TIMP-2 および TIMP-3 の遺伝子およびタンパク発現には、7 日間の培養期間を通して 10^{-6} M Ang II 添加の影響は認められなかった (Fig. 3a-f)。なお、TIMP-4 の遺伝子発現は、Ang II の有無にかかわらず検出されなかった。

4. PAs と PAI-1 の遺伝子およびタンパク発現に及ぼす Ang II の影響

Ang II の有無に関わらず, tPA, uPA および PAI-1 の遺伝子およびタンパク発現は培養 5 日目に最も高い値を示した (Fig. 4)。

tPA, uPA および PAI-1 の遺伝子およびタンパク発現には, 7 日間の培養期間を通して 10^{-6} M Ang II 添加の影響は認められなかった (Fig. 4a-f)。

5. ゼラチン分解活性に及ぼす Ang II の影響

MMP-2 および MMP-9 のゼラチン分解活性のポジティブコントロールには, FBS 非存在下でのヒト歯肉線維芽細胞の培養上清と, FBS 存在下で RANKL 刺激を行った RAW264.7 細胞の培養上清を用いた。なお, Fujisaki ら (2007) は, RANKL 刺激によって RAW264.7 細胞の MMP-9 発現は増加したと報告している。

RAW264.7 細胞の培養上清では, 92 kDa 付近に MMP-9 の酵素活性が, また 63 kDa 付近に MMP-2 の酵素活性がそれぞれ認められた (Fig. 5A, lane 8)。一方, ヒト歯肉線維芽細胞の培養上清では, MMP-2 の酵素活性のみが認められた (Fig. 5A, lane 1)。

ROS17/2.8 細胞の培養上清では, MMP-2 の酵素活性は確認されたが, MMP-9 の酵素活性は認められなかった。また, 7 日間の培養期間を通して, MMP-2 の酵素活性には 10^{-6} M Ang II 添加の影響は認められなかった (Fig. 5A, lanes 2-7)。なお, これらすべてのゼラチン分解活性は, 10 mM EDTA の添加で阻害された (Fig. 5B)。

6. AT₁ と AT₂ 受容体の遺伝子およびタンパク発現に及ぼす Ang II の影響

Ang II の有無に関わらず, AT₁ と AT₂ 受容体の遺伝子およびタンパク発現は培養 5 日目に最も高い値を示した (Fig. 6)。

AT₁ と AT₂ 受容体の遺伝子およびタンパク発現には, 7 日間の培養を通して 10^{-6} M Ang II 添加の影響は認められなかった。

7. Ang II によって誘導された MMP-3 および MMP-13 発現に及ぼす losartan と PD123319 の影響

AT₁ 受容体拮抗剤 losartan は, 10^{-6} M Ang II 添加による MMP-3 と MMP-13 の遺伝子およびタンパク発現の増加をコントロールレベルまで完全に抑制した (Fig. 7a, b, e and f)。一方, AT₂ 受容体拮抗剤 PD123319 は, これらの発現増加に影響を及ぼさなかった (Fig. 7c, d, g and h)。

8. ERK1/2, p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化に及ぼす Ang II と

losartan の影響

ERK1/2 のリン酸化は、 10^{-6} M Ang II 添加の 15 分後にコントロールに比べて有意に増加したが、30 分後にはコントロールレベルと同程度であった (Fig. 6a)。p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化は、 10^{-6} M Ang II 添加の 15 および 30 分後にコントロールに比べて有意に増加した (Fig. 8b and c)。

AT₁ 受容体拮抗剤 losartan は、 10^{-6} M Ang II 添加の 15 分後に増加した ERK1/2, p38 MAPK, SAPK/JNK のリン酸化をコントロールレベルまで完全に抑制した (Fig. 8d-f)。

9. Ang II によって誘導された MMP-3 と MMP-13 発現に及ぼす PD98059, SB20358 および SP600125 の影響

ERK1/2 のリン酸化阻害剤 PD98059 および SAPK/JNK のリン酸化阻害剤 SP600125 は、Ang II 添加によって誘導された MMP-3 と MMP-13 の遺伝子およびタンパク発現の増加をコントロールレベルまで完全に抑制した (Fig. 9a-h and Fig. 10a-d)。なお、本研究では PD98059 および SP600125 は、ROS17/2.8 細胞の増殖を抑制しなかったが、p38 MAPK のリン酸化阻害剤である SB20358 はこれを阻害したため、SB20358 存在下における MMP-3 と MMP-13 の遺伝子およびタンパク発現を調べることはできなかった (Fig. 11)。

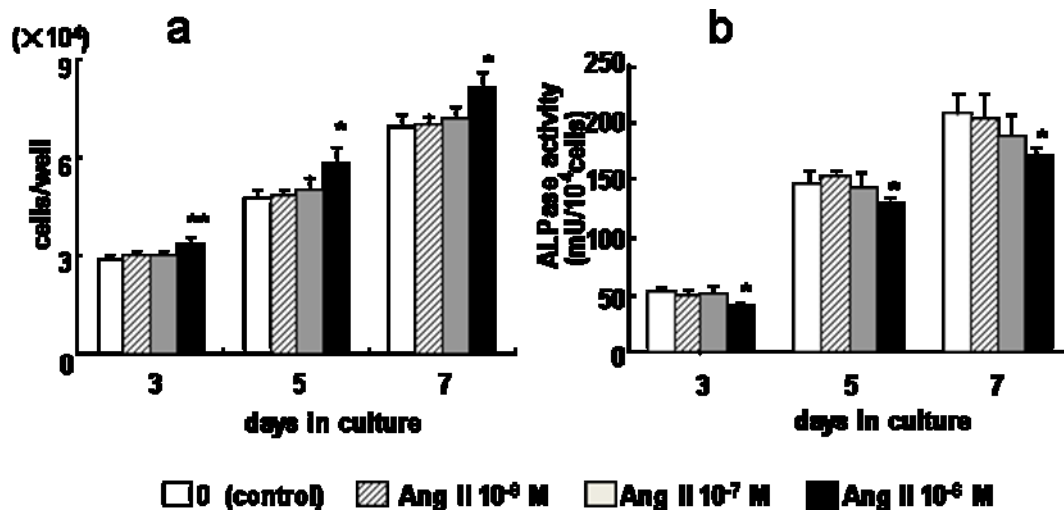
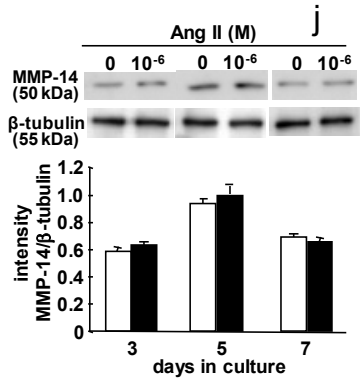
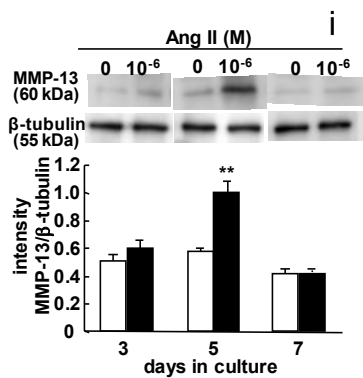
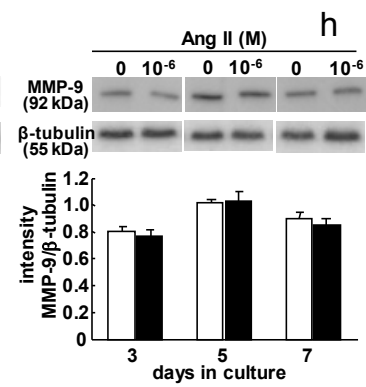
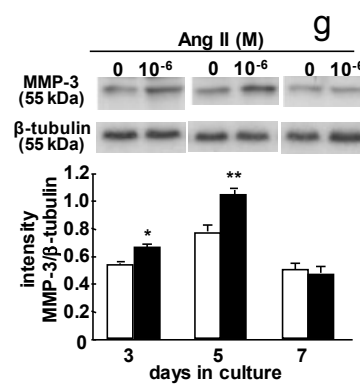
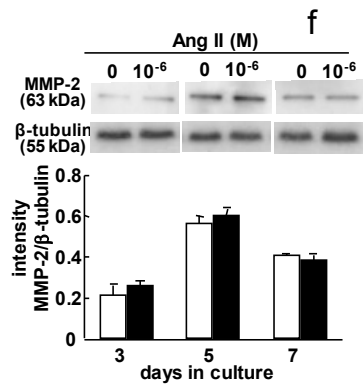
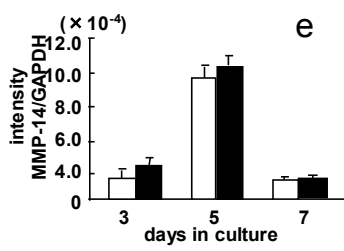
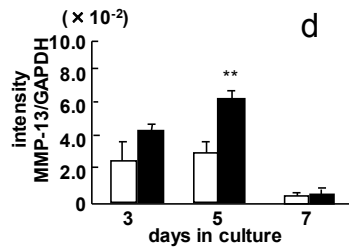
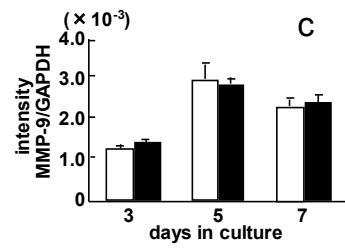
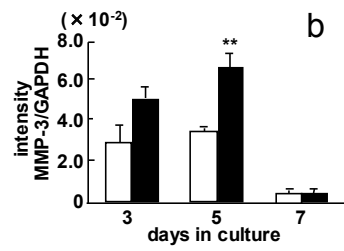
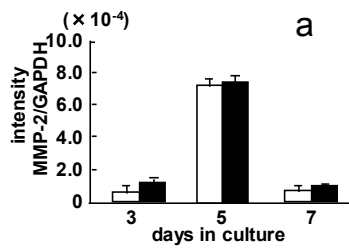


Fig. 1. Effect of Ang II on cellular proliferation and ALPase activity. ROS17/2.8 cells were cultured in 96-well plates with 0 (control), 10⁻⁸, 10⁻⁷, or 10⁻⁶ M Ang II for up to 7 days. (a) Cell number and (b) ALPase activity were determined on days 3, 5, and 7 of culture. Each bar indicates the mean \pm standard deviation (SD) of six (cell numbers), or three (ALPase activity) independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Ang II treatment vs. control).



□ 0 (control)
 ■ Ang II 10⁻⁶ M

Fig. 2. Effect of Ang II on MMP expression. ROS17/2.8 cells were cultured in six-well plates with 0 (control) or 10^{-6} M Ang II for up to 7 days. The expression of (a) MMP-2, (b) MMP-3, (c) MMP-9, (d) MMP-13, and (e) MMP-14 mRNA in the cells on days 3, 5, and 7 of culture was determined by real-time PCR. The (f) MMP-2, (g) MMP-3, (h) MMP-9, (i) MMP-13, and (j) MMP-14 protein levels on days 3, 5, and 7 of culture were determined by Western blotting. Three wells were used per treatment. Each bar indicates the mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01 (Ang II treatment vs. control).

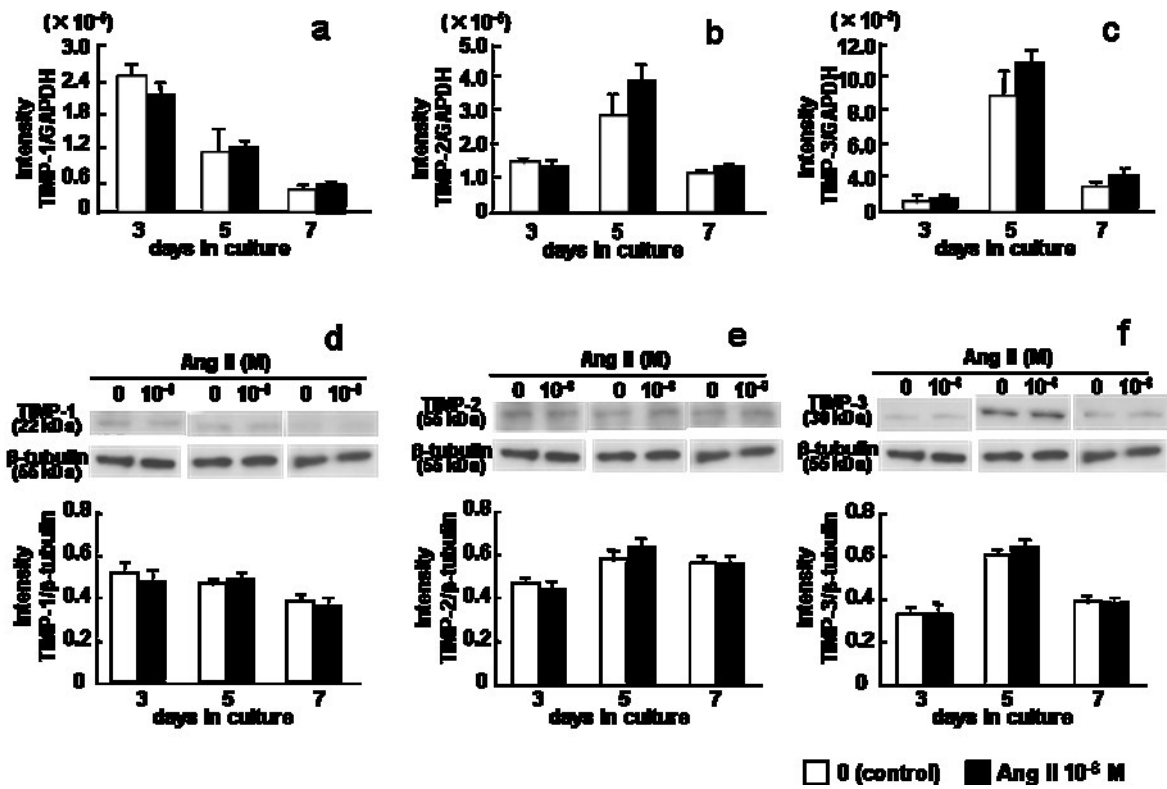


Fig. 3. Effect of Ang II on TIMP expression. ROS17/2.8 cells were cultured in six-well plates with 0 (control) or 10^{-6} M Ang II for up to 7 days, and the (a) TIMP-1, (b) TIMP-2, and (c) TIMP-3 mRNA levels on days 3, 5, and 7 of culture were determined by real-time PCR. The (d) TIMP-1, (e) TIMP-2, and (f) TIMP-3 protein levels were determined by Western blotting. Three wells were used per treatment. Each bar indicates the mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments.

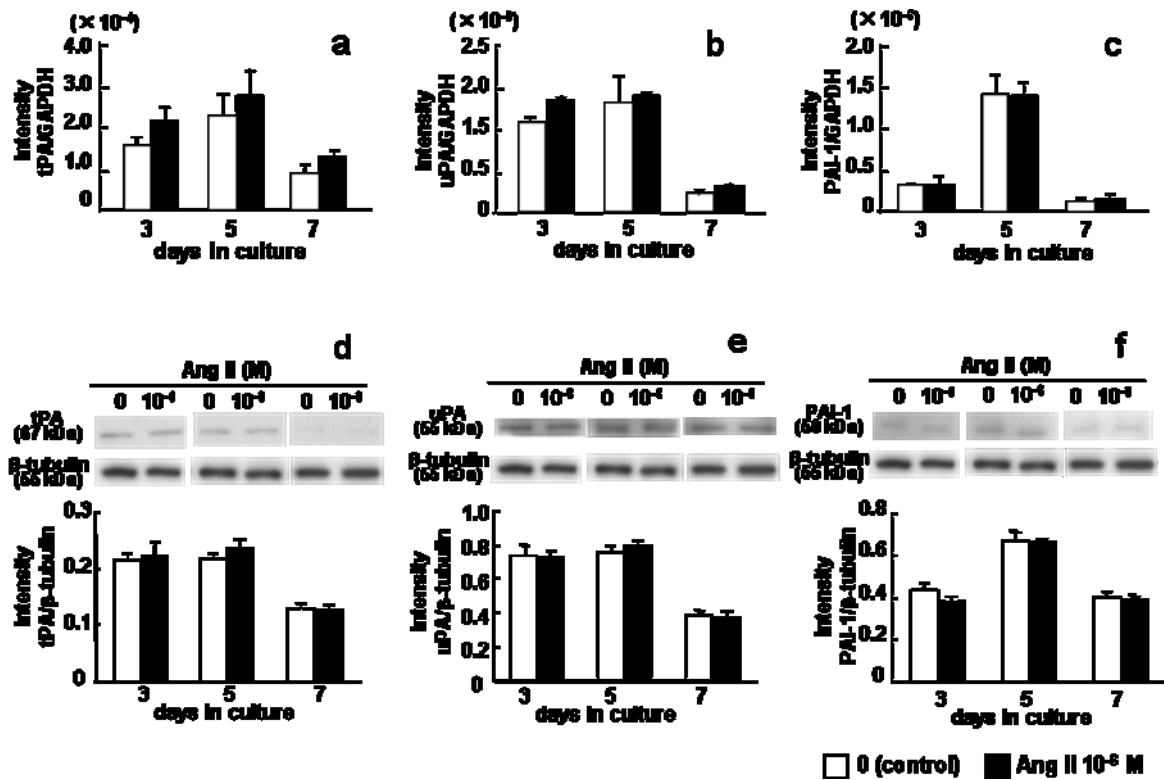


Fig. 4. Effect of Ang II on PAs and PAI-1 expression. ROS17/2.8 cells were cultured in six-well plates with 0 (control) or 10^{-6} M Ang II for up to 7 days, and (a) tPA, (b) uPA, and (c) PAI-1 mRNA levels on days 3, 5, and 7 of culture were determined by real-time PCR. The (d) tPA, (e) uPA, and (f) PAI-1 protein levels in the cells were determined by Western blotting. Three wells were used per treatment. Each bar indicates the mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments.

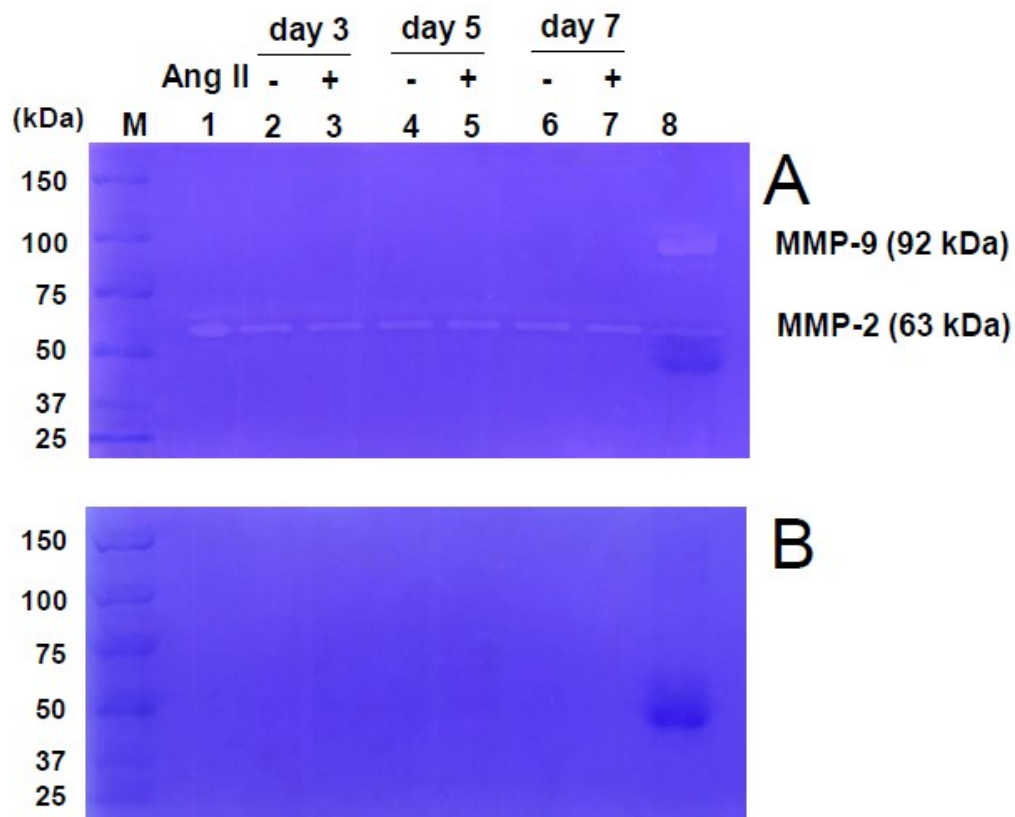


Fig. 5. Gelatin zymograms of ROS17/2.8 cells treated with or without Ang II. Samples (10 μ L aliquots) of each culture medium were subjected to SDS-PAGE without reduction. Gels were processed, as described in the Material and Methods, and then incubated at 37°C in the absence (A) or presence (B) of 10 mM EDTA for 4 h. Lane M, molecular mass marker; lane 1, cell culture media from fibroblasts (as a positive control for MMP-2); lanes 2–7, cell culture media from ROS 17/2.8 cells stimulated with 0 or 10^{-6} M Ang II; lane 8, cell culture media from RAW264.7 cells stimulated with 50 ng/mL RANKL (as a positive control for MMP-2 and -9).

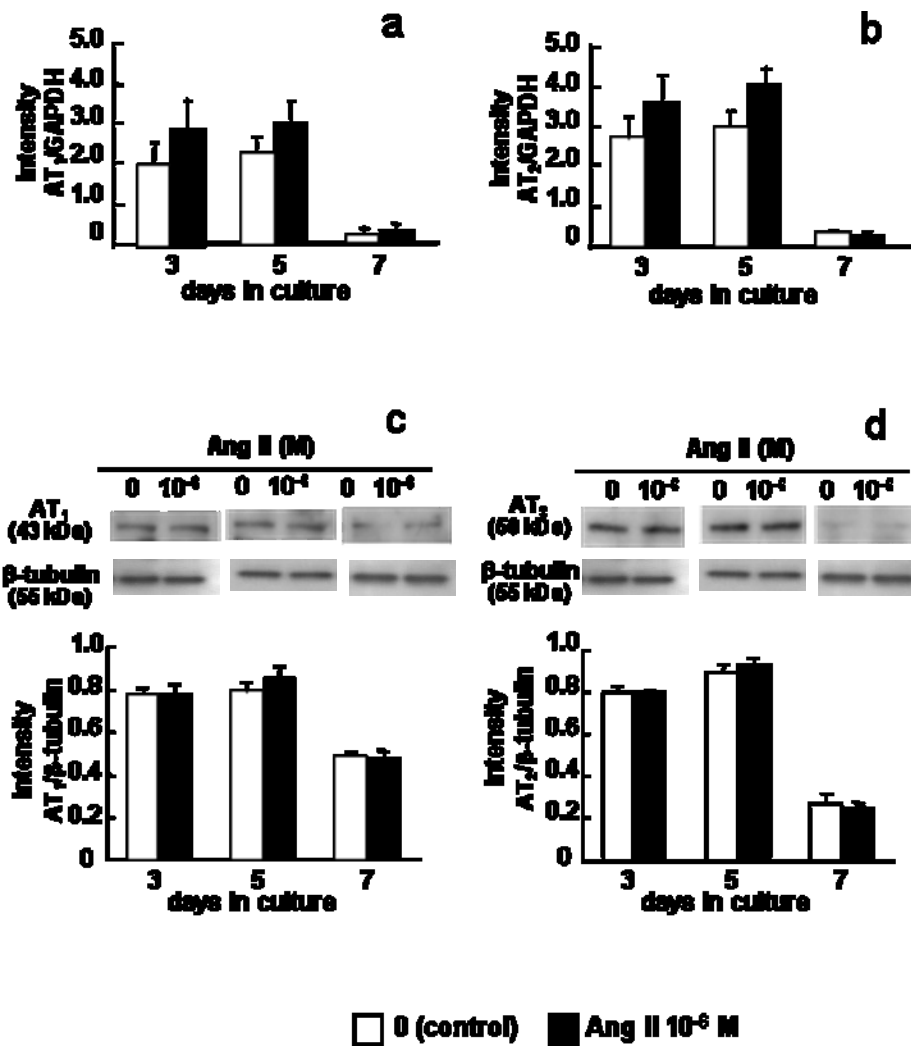


Fig. 6. Effect of Ang II on AT₁ and AT₂ receptor expression. ROS17/2.8 cells were cultured in six-well plates with 0 (control) or 10⁻⁶ M Ang II for up to 7 days. The (a) AT₁ and (b) AT₂ receptor mRNA levels on days 3, 5, and 7 of culture in the cells were determined by real-time PCR. The (c) AT₁ and (d) AT₂ receptor protein levels on days 3, 5, and 7 of culture were determined by Western blotting. Three wells were used per treatment. Each bar indicates the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments.

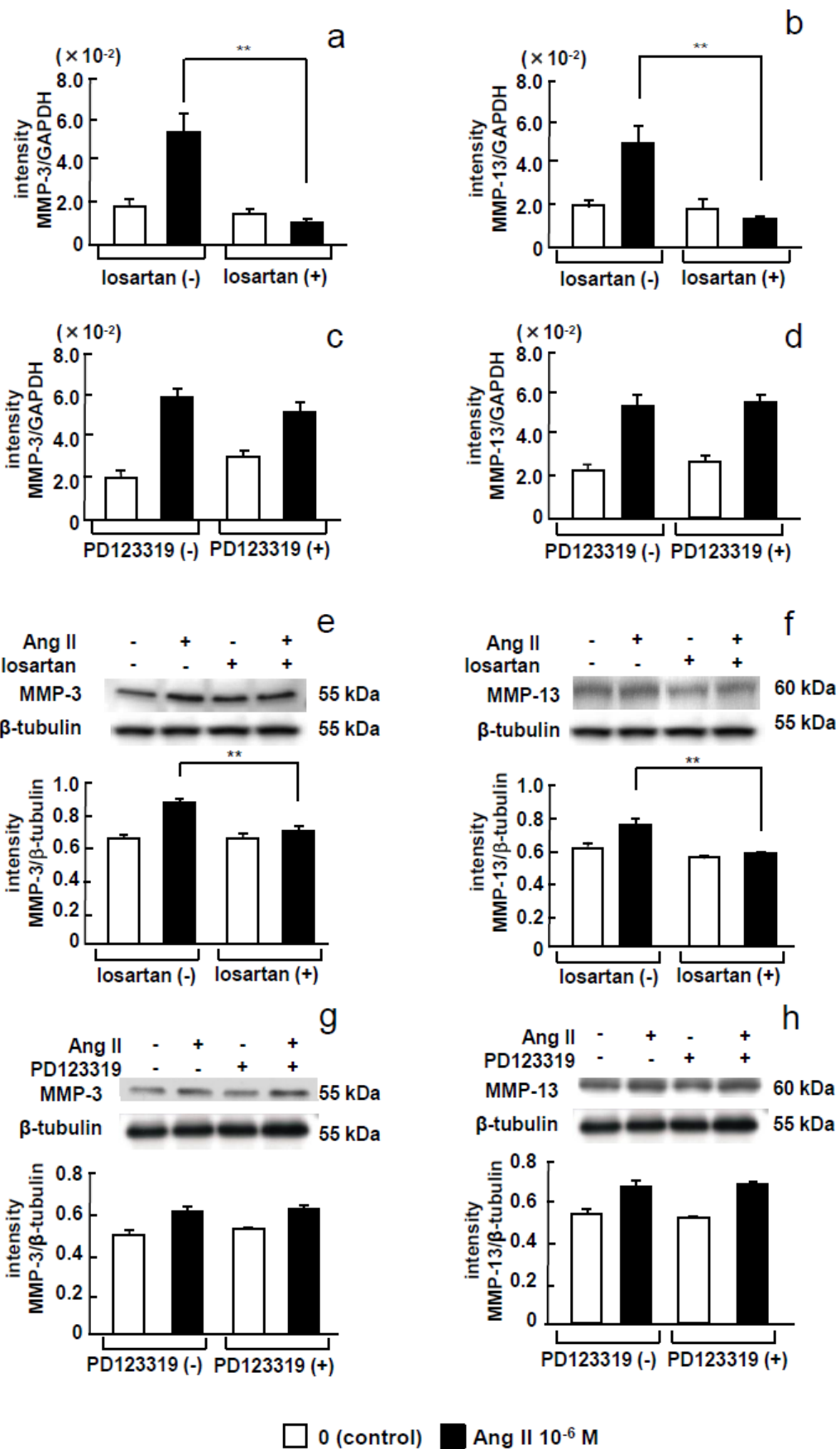


Fig. 7. Effect of losartan or PD123319 on Ang II-induced MMP-3 and -13 expression. ROS17/2.8 cells were cultured in six-well plates with or without 5 μ M losartan (AT_1 receptor blocker) or 5 μ M PD123319 (AT_2 receptor blocker) in the presence or absence of 10^{-6} M Ang II for 5 days, and MMP-3 and -13 mRNA levels in the cells were determined by real-time PCR (a–d). The MMP-3 and MMP-13 protein levels in the cells were determined by Western blotting (e–h). Three wells were used per treatment. Each bar indicates the mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. **** $p < 0.01$.**

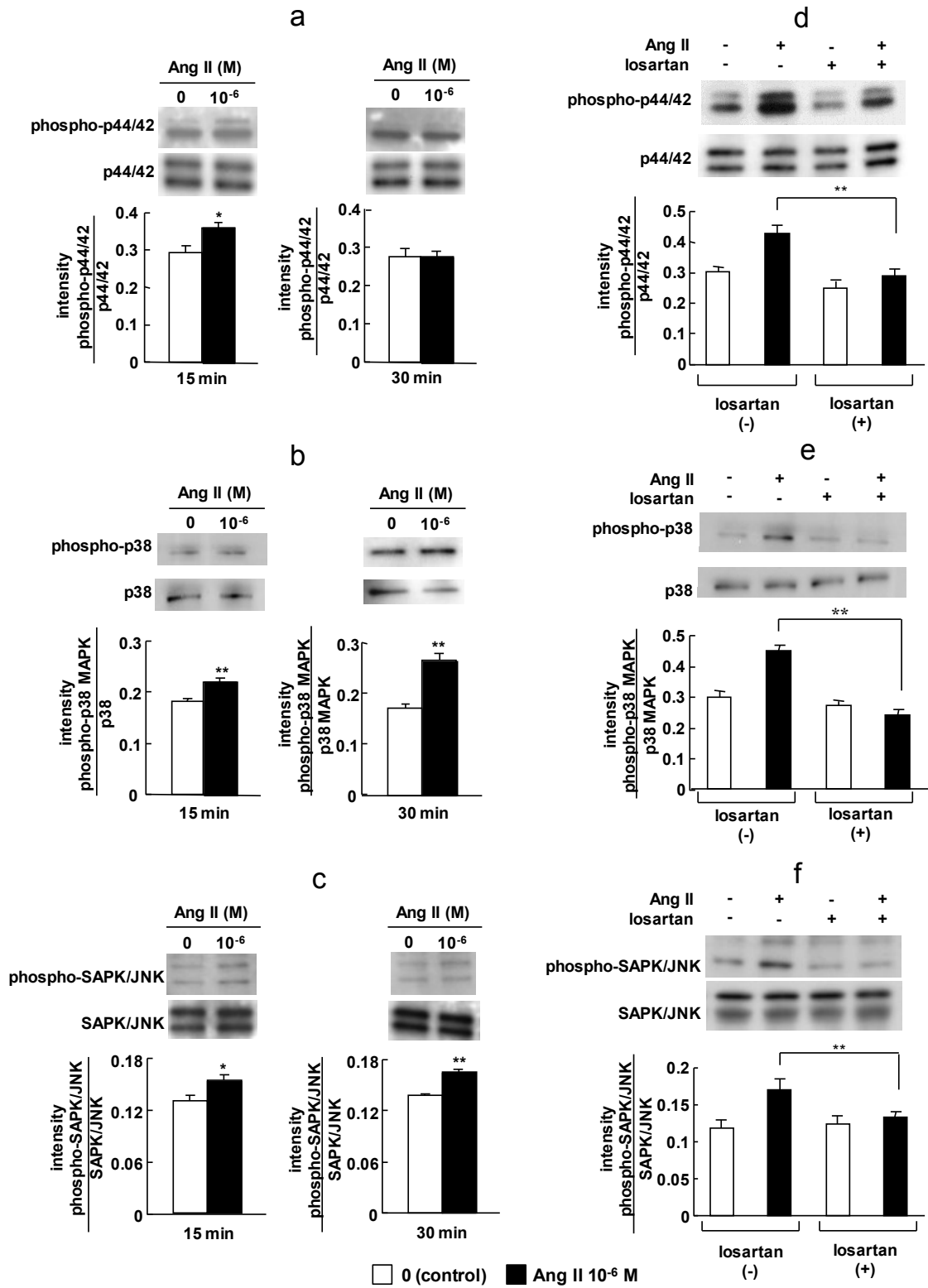


Fig. 8. Effect of Ang II and/or losartan on the phosphorylation of ERK1/2, p38 MAPK, and SAPK/JNK. ROS17/2.8 cells were cultured in six-well plates with 0 (control) or 10^{-6} M Ang II for 15 or 30 min, and the phosphorylation of (a) ERK1/2, (b) p38 MAPK, and (c) SAPK/JNK was examined by Western blotting. Moreover, ROS17/2.8 cells were cultured in six-well plates with or without 5 μ M losartan (AT_1 receptor blocker) in the presence or absence of 10^{-6} M Ang II for 15 min, and the phosphorylation of (d) ERK1/2, (e) p38 MAPK, and (f) SAPK/JNK was examined by Western blotting. Three wells were used per treatment. Each bar indicates the mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

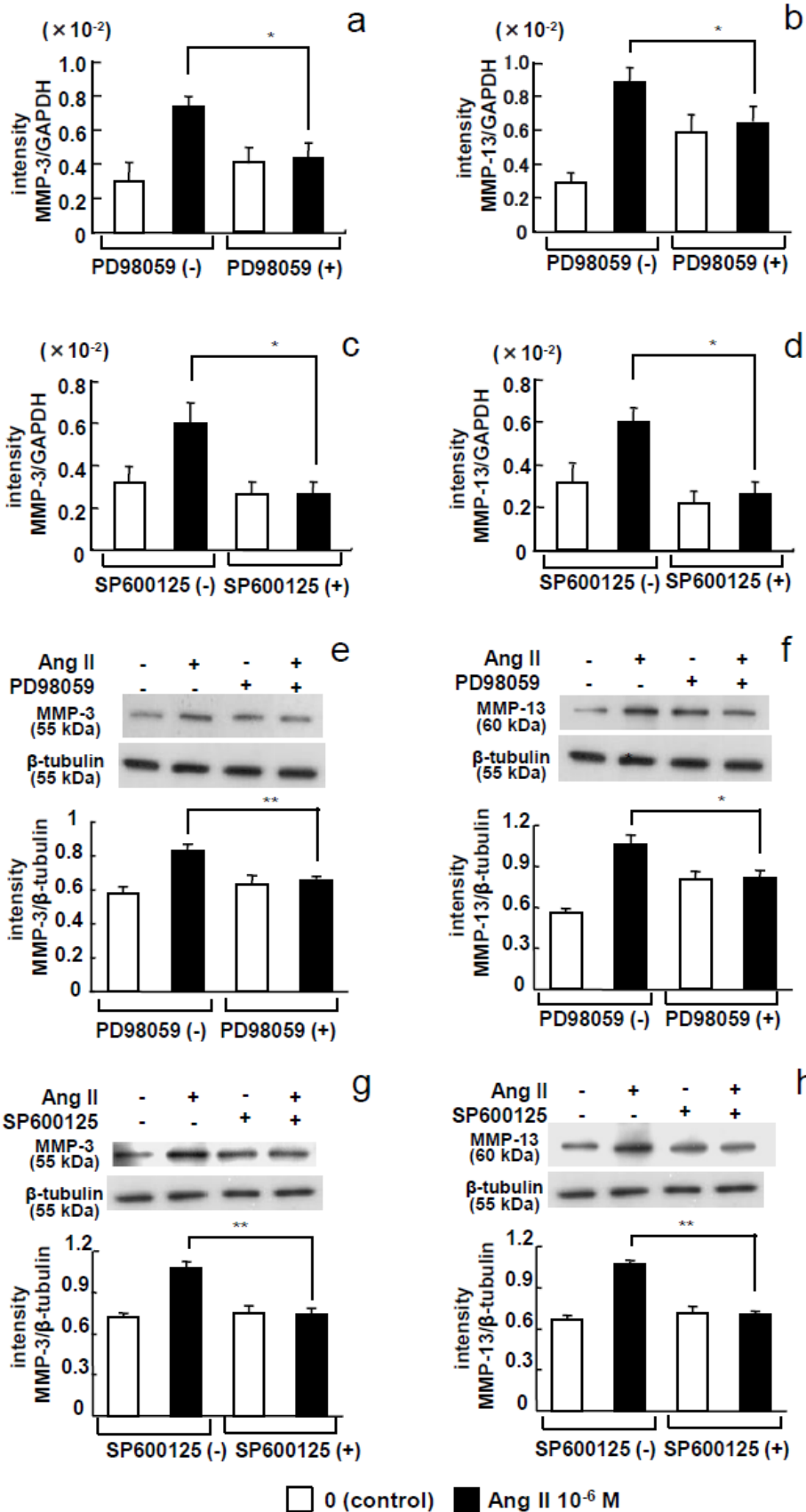


Fig. 9. Effect of PD98059 and SP600125 on Ang II-induced MMP-3 and -13 expression. ROS17/2.8 cells were cultured in six-well plates with or without 10 μ M PD98059 (MEK1/2 inhibitor) or SP600125 (JNK inhibitor) in the presence or absence of 10^{-6} M Ang II for 5 days, and MMP-3 and -13 mRNA levels in the cells were determined by real-time PCR (a–d). MMP-3 and MMP-13 protein levels in the cells were determined by Western blotting (e–h). Three wells were used per treatment. Each bar indicates the mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01.

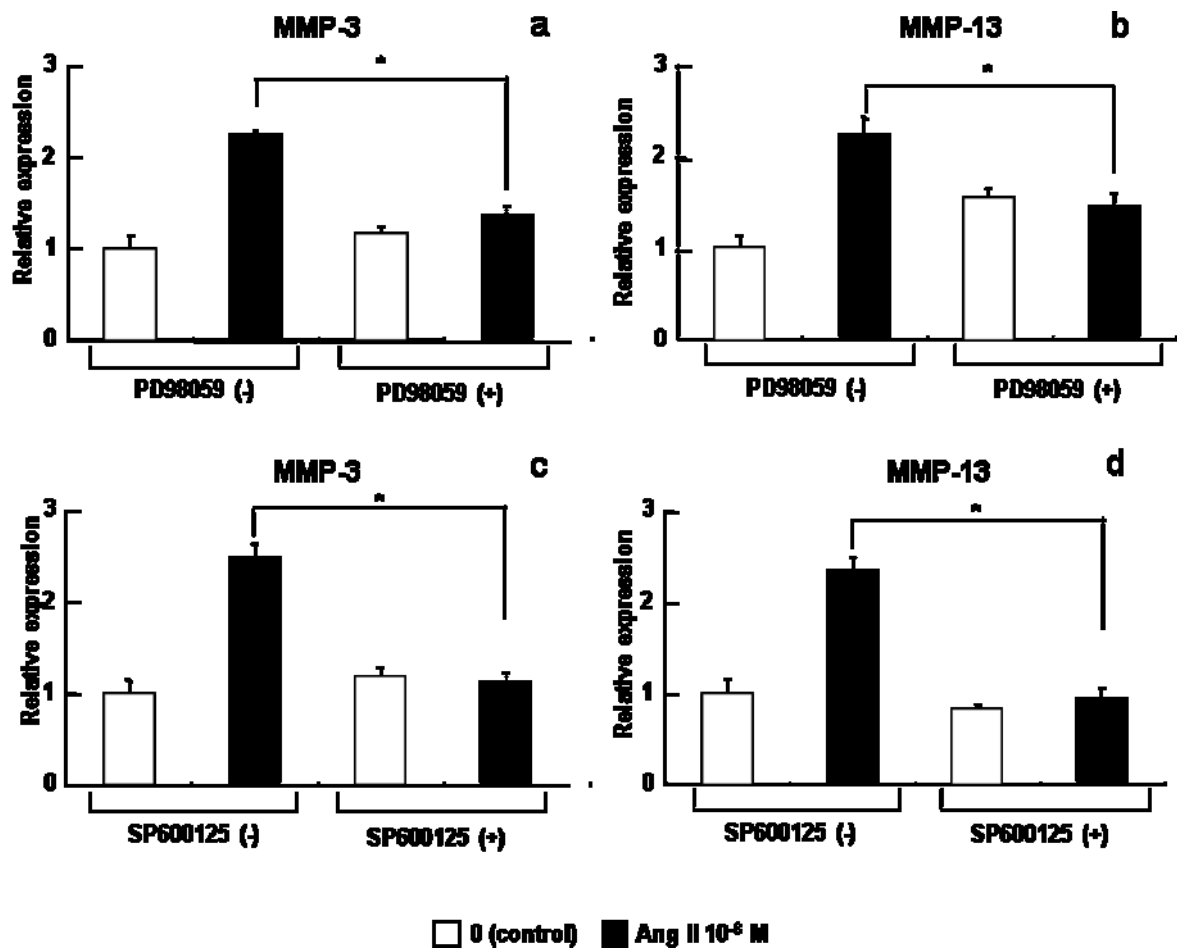


Fig. 10. Effect of PD98059 and SP600125 on Ang II-induced MMP-3 and -13 mRNA expression (validation using TaqMan quantitative RT-PCR method). ROS17/2.8 cells were cultured in six-well plates with or without 10 μ M PD98059 (MEK1/2 inhibitor) or SP600125 (JNK inhibitor) in the presence or absence of 10⁻⁶ M Ang II for 5 days, and MMP-3 and -13 mRNA expression levels determined by TaqMan quantitative RT-PCR (a-d). * p < 0.05, ** p < 0.01.

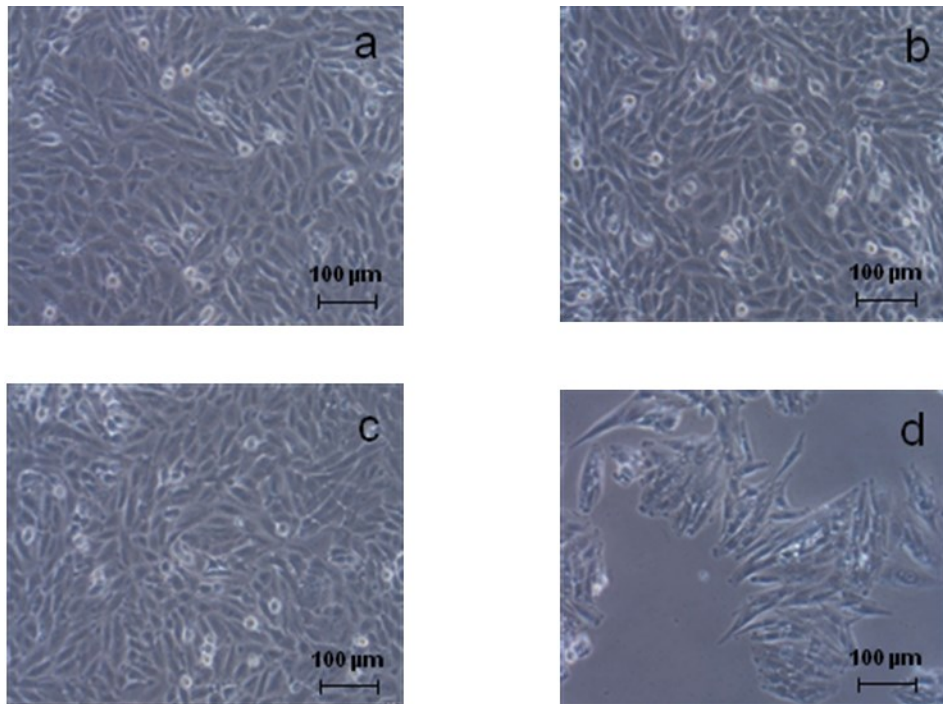


Fig. 11. Effect of MAPK inhibitors on cell morphology and growth. ROS17/2.8 cells were cultured in six-well plates with or without 10 μ M PD98059 (MEK1/2 inhibitor), 1 μ M SP600125 (JNK inhibitor), or 10 μ M SB20358 (p38 MAPK inhibitor) for 5 days. The statuses of (a) untreated cells, (b) PD98059-treated cells, (c) SP600125-treated cells, and (d) SB20358-treated cells were visualized by light microscopy.

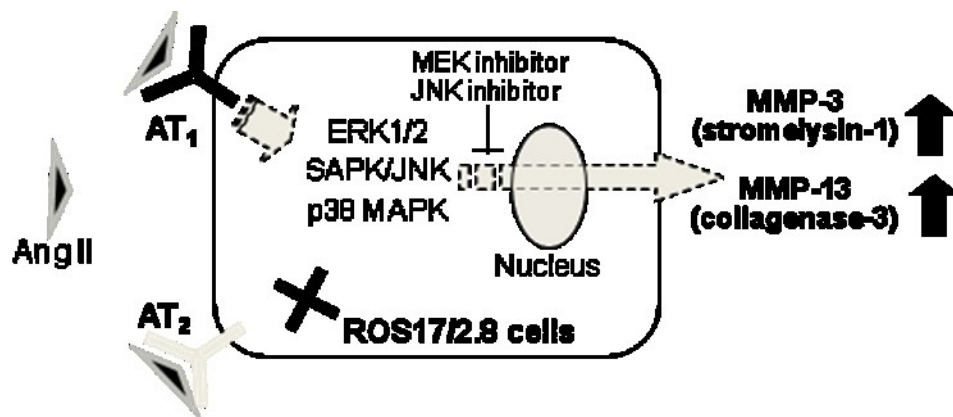


Fig. 12. Schematic diagram of the Ang II-induced upregulation of MMP-3 and -13 expression in ROS17/2.8 cells.

考 察

本研究では、Ang II が骨芽細胞の増殖、ALPase 活性、AT 受容体、MMPs、TIMPs、PAs および PAI-1 の発現に及ぼす影響を検討した。また、Ang II 刺激後の細胞内シグナル伝達経路を検討するために、Ang II 受容体拮抗剤と MAPK シグナル伝達関連因子である ERK1/2、p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化阻害剤が、Ang II 刺激によって誘導される MMP-3 および MMP-13 の発現増加、ならびに ERK1/2、p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化に及ぼす影響についても調べた。なお、骨芽細胞として用いた ROS17/2.8 細胞は高い ALPase 活性を示し *in vitro* において石灰化物を形成するなど、骨芽細胞としての特性を保有している (Tanabe et al., 2004; Iida et al., 2011; Kuwabara et al., 2011)。

まず、ROS17/2.8 細胞の刺激に用いる Ang II の至適濃度を検討するために、 10^{-8} 、 10^{-7} および 10^{-6} M の Ang II が ROS17/2.8 細胞の増殖と ALPase 活性に及ぼす影響を調べた。その結果、 10^{-8} および 10^{-7} M の Ang II 刺激は、ROS17/2.8 細胞の増殖と ALPase 活性に影響しなかったが、 10^{-6} M の Ang II 刺激では、コントロールに比べて有意な細胞数の増加と ALPase 活性の低下が認められた。これらの結果をもとに、その後の実験では、細胞を刺激する際の Ang II 濃度を 10^{-6} M とした。なお、Lamparter ら (1998) は、 $5 \times 10^{-8} \sim 10^{-7}$ M の Ang II が ROS17/2.8 細胞の増殖および ALPase 活性には影響を及ぼさなかったと報告しており、本研究結果は Lamparter ら (1998) の報告と一致した。

次に、osteoid 層の ECM タンパク代謝において重要な役割を担っている MMPs と TIMPs の発現に及ぼす Ang II の影響を調べた。これまでに、ヒトでは少なくとも 26 種類の MMPs が知られている。MMPs は、その基質特異性に基づいて 6 つのサブグループ、すなわちコラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロムライシン、マトリライシン、膜型 MMP (MT-MMP) およびその他の MMP に分類されている (John et al., 2001; Egeblad et al., 2002)。なお、骨芽細胞では、マトリライシンに関する報告はない。本研究では、骨芽細胞での発現が数多く検討されているコラゲナーゼ (MMP-1 と MMP-13)、ゼラチナーゼ (MMP-2 と MMP-9)、ストロムライシン (MMP-3) および膜型 MMP (MMP-14) の 5 つのサブグループの MMPs について調べた (Fujisaki et al., 2006; Katono et al., 2009; Tanigawa et al., 2011; Aida et al., 2012)。MMP-1 および MMP-13 は、それぞれコラゲナーゼ-1 およびコラゲナーゼ-3 として、コラーゲン分子の三重らせん構造を N 末端から 4 分の 3 の位置で 2 つの断片に分解する。MMP-2 および MMP-9 は、それぞれゼラチナーゼ A および B として、主にゼラチン化したコラーゲン断片を分解する。MMP-3 は、ストロムライシン-1 として、プロテオグリカンのコアタンパクおよ

び非コラーゲン性タンパクを分解する。MMP-14はMT1-MMPとも呼ばれ、細胞膜の表面上に発現して幅広い基質特異性を有している。MMPsの多くは不活性型の proMMPs として分泌され、プラスミン、エラスターゼあるいはMT1-MMPによって活性型のMMPsに変換される(Nagase et al., 2006)。さらに、活性型MMPsは、TIMPsによってその酵素活性が阻害される。また、MMPsの過剰発現は、MMPsとTIMPsの不均衡を招いてさまざまな疾患を引き起こす(Venkatesan et al., 2004; Raspollini et al., 2005)。TIMP-1は、複数の活性型MMPsに強く結合してそれらの酵素活性を阻害する。TIMP-2もTIMP-1と同様のメカニズムでさまざまなMMPsを阻害し、特にMMP-2の酵素活性を強く阻害する(Olson et al., 1997)。TIMP-3はECMと結合してMMPsの酵素活性を阻害し(Yu et al., 2000)、TIMP-4は関節炎に伴う軟骨破壊に関与するMMPsの酵素活性を阻害する(Huang et al., 2002)。これまでに、骨芽細胞を用いた研究では、interleukin (IL)-1 α 刺激がROS17/2.8細胞のMMPsとTIMPsの両方の産生を誘導し(Fujisaki et al., 2006)、ニコチンとリポ多糖の同時刺激がヒト骨芽細胞のMMPs産生増加とTIMPs産生低下を誘導した(Katono et al., 2009)と報告されている。しかし、骨芽細胞のMMPsとTIMPsの発現に及ぼすAng IIの影響については調べられていない。

本研究では、10⁻⁶ M Ang II刺激によって、培養5日目のMMP-3(ストロムライシン-1)およびMMP-13(コラゲナーゼ-3)の発現はコントロールと比較して有意に増加したが、MMP-2(ゼラチナーゼA)、MMP-9(ゼラチナーゼB)およびMMP-14(MT1-MMP)の発現にはAng II刺激の影響は認められず、MMP-1(コラゲナーゼ-1)の発現はAng II刺激の有無に関わらず検出されなかった。一方で、TIMP-1、TIMP-2およびTIMP-3の発現にAng II刺激の影響は認められず、TIMP-4の発現は検出されなかった。これらの結果から、Ang IIはosteoid層中のECMタンパク代謝におけるコラーゲンおよび非コラーゲン性タンパク分解の初期段階を促進することが示唆された。骨表面からのコラーゲンおよび非コラーゲン性タンパクの除去は、骨吸収の主役を担う破骨細胞の骨基質への接着に重要である(Holliday et al., 1997; Zhao et al., 1999)。また、Shimizuら(2008)は、卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットにおいて、Ang IIが骨芽細胞のRANKL産生を誘導して破骨細胞を活性化し、骨粗鬆症を悪化させたと報告している。本研究結果とShimizuら(2008)の研究結果から、Ang IIは、骨芽細胞を介して破骨細胞を骨基質に接着させるとともにその機能を発揮させて骨吸収を促進する可能性が考えられた。

本研究では、MMPs発現は、Ang II刺激の有無にかかわらず、培養3および7日目に比べていずれも5日目で高い値を示した。同様の現象は、IL-1 α で

ROS17/2.8 細胞を刺激した Fujisaki ら (2006) およびニコチンとリポ多糖で正常ヒト骨芽細胞を同時刺激した Katono ら (2009) によっても報告されている。したがって、7 日間の培養期間内における非刺激時の MMP 発現の変化は、骨芽細胞の *in vitro* での特徴であると考えられた。

Mizutani ら (2001) は、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞をアスコルビン酸-2-リン酸で骨芽細胞へ分化誘導すると、MMP-2, MMP-13 および MT1-MMP 発現が増加したと報告している。また、MT1-MMP の発現は分化の初期段階では増加したが、その後は徐々に減少したと報告している。一方、ROS17/2.8 細胞では、アスコルビン酸-2-リン酸で分化を誘導しなくても典型的な骨芽細胞としての特徴を示すが (Tanabe et al., 2004; Iida et al., 2011; Kuwabara et al., 2011), Runx2, Osterix, Msx2 および Dlx5 などの骨芽細胞分化関連転写因子の発現は、培養期間内で変化したと報告されている (Morozumi, 2011)。これらの知見から、ROS17/2.8 細胞の分化段階は、刺激の有無と無関係に培養期間中に変化すること、また、ROS17/2.8 細胞と MC3T3-E1 細胞の MMP 発現は、分化の程度と関係する可能性が示唆された。

本研究では、ROS17/2.8 細胞は MMP-2 と MMP-9 の両方のゼラチナーゼを発現していたが、ゼラチン分解活性は MMP-2 のみに認められた。これらの結果から、ROS17/2.8 細胞によるゼラチンの分解は、主に MMP-2 に依存していると考えられた。また、ゼラチンザイモグラフィでは、MMP-2 の酵素活性には Ang II 刺激の影響は認められず、MMP-2 の発現レベルにおける Ang II の影響を調べた結果と一致した。

Ang II 受容体には、AT₁ および AT₂ の 2 つのタイプが存在する (Senbonmatsu et al., 2003)。ROS17/2.8 細胞は AT₁ および AT₂ の両方の受容体を発現していたが、その発現に Ang II 刺激の影響は認められなかった。さらに、Ang II がどちらの受容体に結合して、MMP-3 および MMP-13 発現を誘導しているかを検討するために、AT₁ と AT₂ のそれぞれに特異的な拮抗剤である losartan および PD123319 が、Ang II 刺激による MMP-3 および MMP-13 産生増加に及ぼす影響を検討した。その結果、losartan は、Ang II 刺激による MMP-3 および MMP-13 発現増加を完全に抑制したが、PD123319 はこれらの発現増加を抑制しなかった。この結果から、Ang II は AT₁ 受容体を介して ROS17/2.8 細胞に作用すると考えられた。

Ang II は、細胞内の MAPK を活性化させることが多くの組織で確認されている。Guo ら (2011) は、骨芽細胞において、Ang II が ERK1/2 経路を介して IL-6 の合成を誘導したと報告している。また、Yao ら (2012) は、単球遊走因子が、Ang II によって誘導される SAPK/JNK および ERK1/2 を介した血管平滑筋細胞の増殖を触媒したと報告している。本研究では、Ang II 刺激によって、ERK1/2,

p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化の増加が認められた。さらに, losartan は, Ang II 刺激による ERK1/2, p38 MAPK, SAPK/JNK のリン酸化の増加を完全に阻害した。これらの結果から, Ang II は, ROS17/2.8 細胞の ERK1/2, p38 MAPK あるいは SAPK/JNK のシグナル伝達経路を介して MMP-3 および MMP-13 産生を誘導すると考えられた (Fig. 12)。また, 本研究では, Ang II による ERK1/2 のリン酸化の増加は, 10^{-6} M Ang II 刺激の 30 分後に消失した。一方で, ERK1/2 のリン酸化阻害剤 PD98059 は, Ang II による MMP-3 および MMP-13 の発現増加を完全に抑制した。同様の効果は, JNK の特異的リン酸化阻害剤である SP600125 でも認められた。これらの結果から, ROS17/2.8 細胞における ERK1/2 のリン酸化の増加は一時的であって, Ang II による MMP-3 および MMP-13 の発現増加には, ERK1/2 と SAPK/JNK の両方のシグナル伝達が重要であることが示唆された。なお, 本研究において, 培養期間中の継続的な SB203580 処理が, ROS17/2.8 細胞の増殖を阻害したため, Ang II による MMP-3 および MMP-13 の発現誘導における p38 MAPK シグナル伝達経路の役割を検討することはできなかった。本研究から, p38 MAPK のシグナル伝達経路は, 骨芽細胞の増殖に重要である可能性が示唆された。

IL-1 α は, ROS17/2.8 細胞の tPA および uPA の産生促進と PAI-1 の産生抑制を介して, プラスミノゲン/プラスミン経路を活性化させたという報告や (Fujisaki et al., 2006), IL-17 は, 軟骨細胞の PAI-1 発現を増加させる一方で, uPA 発現を減少させて, プラスミノゲン/プラスミン経路を抑制したという報告がある (Tanigawa et al., 2011)。しかし, Ang II が骨芽細胞における PAs と PAI-1 の発現に及ぼす影響についての報告がなかったため, その詳細は不明であった。本研究では, tPA, uPA および PAI-1 の発現に対する Ang II 刺激の影響は認められなかった。これらの結果から, Ang II は, 骨芽細胞におけるプラスミノゲン/プラスミン経路に影響を及ぼさないことが示唆された。

本研究の結論として, Ang II は骨芽細胞の AT₁ 受容体に結合後, 細胞内の MAPK シグナル伝達経路を介して MMP-3 および MMP-13 の産生を増加させて, osteoid 層における ECM タンパクの分解を促進することが示唆された。また, Ang II は骨芽細胞におけるプラスミノゲン/プラスミン経路には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

第 2 章

アンジオテンシン II は AT₁ 受容体を介して骨芽細胞の分化と石灰化物形成を抑制する

Nakai K, Kawato T, Morita T, Yamazaki Y, Tanaka H, Tonogi M, Oki H, Maeno M (2013) Angiotensin II suppresses osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation via AT₁ receptors in ROS17/2.8 cells. Arch Med Sci, in press

緒 言

骨は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の相反する機能が厳密に調整され、リモデリングのバランスが保たれている (Katagiri et al., 2002)。骨芽細胞は、高い ALPase 活性を有し、I 型コラーゲン、BSP、OPN および OCN などの ECM タンパクを多く産生し、骨形成において中心的な役割を担っている (Anderson, 1989; Young et al., 1992; Robey et al., 1993; Mundlos et al., 1997)。骨芽細胞の分化は、そのプロセスにおけるさまざまな段階において、複数の転写因子によって調節されている (Yang et al., 2002)。Runx2 と Osterix の 2 つの転写因子は、膜性骨化と軟骨内骨化のいずれにおいても不可欠な因子である (Otto et al., 1997; Karsenty, 2000; Nakashima et al., 2002)。また、Msx2 や Dlx5 などの骨に非特異的な転写因子も骨芽細胞の分化に関与することが知られている (Acampora et al., 1999; Liu et al., 1999; Miyama et al., 1999; Satokata et al., 2000)。一方、AJ18 は骨芽細胞の分化を抑制する転写因子として報告されている (Jheon et al., 2001)。

Ang II は、細胞上に発現する AT₁ および AT₂ 受容体を介して細胞外液量の調節と血圧の維持に関与する生理活性物質である (Senbonmatsu et al., 2003)。また、Ang II は、骨密度の低下と骨組織の脆弱化を主徴候とする骨粗鬆症や炎症性骨吸収の発症にも関与することが知られている (Redlich et al., 2011; Guiglia et al., 2013)。Ang II は、破骨細胞に直接作用して (Hatton et al., 1997; Shimizu et al., 2008; Guan et al., 2011; Kaneko et al., 2011)、あるいは骨芽細胞の RANKL 産生増加を介して間接的に破骨細胞による骨吸収を促進する (Shimizu et al., 2008; Bandow et al., 2011; Guan et al., 2011; Kaneko et al., 2011)。著者は第 1 章において、

Ang II が ROS17/2.8 細胞の AT₁ 受容体に結合後、細胞内の MAPK シグナル伝達経路を介して MMP-3 および MMP-13 の産生を増加させることを明らかにし、osteoid 層における ECM タンパクの分解を促進することを示した (Nakai et al., 2013)。これらの知見から、Ang II は、骨芽細胞による RANKL 産生増加を伴う破骨細胞の活性化だけでなく、骨芽細胞による osteoid 層の ECM タンパク分解促進によって破骨細胞の骨基質への付着も促進すると考えられた。しかし、Ang II が、骨芽細胞分化に関連する転写因子の発現および石灰化物形成に及ぼす影響については明らかにされていない。

そこで本研究では、Ang II が、ROS17/2.8 細胞の Runx2, Osterix, Msx2, Dlx5 および AJ18 などの転写因子、ならびに I 型コラーゲン, BSP, OPN および OCN などの ECM タンパクの発現に及ぼす影響を検討した。また、石灰化物形成およびそれらに含まれるカルシウム蓄積量に及ぼす Ang II の影響についても併せて検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

本研究には、第 1 章と同様に骨芽細胞として ROS17/2.8 細胞を用いた。ROS17/2.8 細胞の培養条件および ROS17/2.8 細胞を刺激する際に用いた Ang II と AT₁ 受容体拮抗剤 losartan の濃度は、第 1 章の材料および方法の 1. と 6. に記載した (Nakai et al., 2013)。

2. Real-time PCR

細胞から全 RNA 抽出後の逆転写酵素による mRNA から cDNA への合成, PCR 反応および結果の解析法は、第 1 章の材料および方法の 3. に記載した。Table 2 に本研究に使用したプライマーの配列を示す。

3. SDS-PAGE および Western blotting

SDS-PAGE は 4-20% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動後、ゲル内のタンパクを PVDF 膜に転写した。Western blotting は、1 次抗体として抗 Runx2 抗体, 抗 Msx2 抗体, 抗 OCN 抗体, 抗 AJ18 抗体または抗 β -tubulin 抗体を、2 次抗体としてビオチン標識の各免疫動物に対する抗体を用いて行った。その後の方法は、第 1 章の材料および方法の 4. に記載した。

4. 石灰化物形成およびカルシウム蓄積量の測定

ROS17/2.8 細胞を 24 穴プレートに播種し、 α -MEM に 10 mM の β -グリセロリン酸と 50 μ g/mL のアスコルビン酸を添加した培養液で 7 日間培養した。石灰化物形成は、アリザリンレッド染色で評価した。また、石灰化物中のカルシウム蓄積量は、calcium assay kit を用いて調べ、タンパク量当たりに換算して求めた。

5. 統計学的分析

第 1 章の材料および方法の 7. に記載した。

Table 2

PCR primer used in the experiments

Target	Forward Primer	Reverse Primer	Genbank acc No.
Rumx2	5'-CGCATTCCCTCATCCAGTAT-3'	5'-GCCTGGGGTCTGTAATCTGA-3'	NM_053470
Osterx	5'-AAGGCAGTTGGCAATAGTGG-3'	5'-CCGCTCTAGCTCCTGACAGT-3'	AY_177399.1
Dlx5	5'-GCCTCAACCCATACCAAT-3'	5'-ACTCGGGACTCGGTTGTAGG-3'	NM_005221
Msx2	5'-TCACCACGTCCCAAGCTTCTAG-3'	5'-AGCTTTTCCAGTTGCGCCTCC-3'	NM_012982
AJ18	5'-GTGATTGGCAAGCTGCAGAA-3'	5'-TAGCAGCCCACGAGATGGTC-3'	AJ_833597
Type 1 collagen	5'-GCTGAGGGCAACAGCAGCAGATTG-3'	5'-GATGTCCAGAGGTGCAATGTCAA-3'	NM_053356.1
BSP	5'-TGTGGAATGGTGTACGGTCTC-3'	5'-CCTTCAATGACGCACCTGGA-3'	RA_029413
OPN	5'-TCCTGCGGCAAGCATTCTC-3'	5'-CTGCCAAACTCAGCCACTTTCA-3'	M_14858.1
OCN	5'-GGTGCAGACCTAGCAGACACCA-3'	5'-AGGTAGCGCCGGAGTCTCTATTCA-3'	M_25490
GAPDH	5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'	5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'	NM_017008

成 績

1. 転写因子の遺伝子およびタンパク発現に及ぼす Ang II の影響

10^{-6} M Ang II の有無に関わらず, Runx2, Osterix, Dlx5 および Msx2 の遺伝子発現は培養 3 日目で最も高く, AJ18 の遺伝子発現は 5 日目で最も低かった (Fig. 13)。

培養 5 日目の Runx2 および Msx2 の遺伝子発現は, コントロールに比べて 10^{-6} M Ang II の存在下で有意に減少したが (Fig. 13a and d), AJ18 の遺伝子発現は, Ang II の存在下で有意に増加した (Fig. 13e)。培養 7 日目の Runx2 の遺伝子発現は, Ang II の存在下で有意に増加した (Fig. 13a)。一方, Osterix および Dlx5 の遺伝子発現は, 7 日間の培養期間を通して Ang II 添加の影響は認められなかった (Fig. 13b and c)。

培養 5 日目の Runx2, Msx2 および AJ18 のタンパク発現も, 遺伝子発現と同様の結果を示した。すなわち, コントロールに比べて 10^{-6} M Ang II 存在下で, Runx2 と Msx2 の発現は有意に減少し, AJ18 の発現は有意に増加した (Fig. 14)。

2. 石灰化物形成に及ぼす Ang II の影響

アリザリンレッドに染色される石灰化物は, 10^{-6} M Ang II の有無に関わらず培養 7 日目まで経日的に増加した。なお, Ang II の有無によるアリザリンレッドの染色性は, コントロールに比べて Ang II 存在下でわずかに低下していた (Fig. 15a)。

石灰化物中に含まれるカルシウム含有量は, 培養 3 および 7 日目では Ang II 添加の影響は認められなかったが, 5 日目には, コントロールに比べて Ang II の存在下で有意に減少した (Fig. 15b)。

3. ECM タンパクの遺伝子およびタンパク発現に及ぼす Ang II の影響

10^{-6} M Ang II の有無に関わらず, I型コラーゲンの遺伝子発現は培養 3 日目で, BSP, OPN および OCN の遺伝子発現は培養 5 日目で最も高い値を示した (Fig. 16a-d)。

OCN の遺伝子発現は, 培養 5 日目にコントロールと比べて 10^{-6} M Ang II の存在下で有意に減少したが (Fig. 16d), I型コラーゲン, BSP および OPN の発現には, 7 日間の培養期間を通して Ang II 添加の影響は認められなかった (Fig. 16a-c)。培養 5 日目の OCN のタンパク発現も, 遺伝子発現と同様にコントロールに比べて Ang II 添加で有意に減少した (Fig. 17)。

4. Ang II によって誘導された Runx2, Msx2, AJ18 および OCN の遺伝子発現変化に及ぼす losartan の影響

AT₁ 受容体拮抗剤 losartan は、 10^{-6} M Ang II 存在下で培養 5 日目に減少した Runx2, Msx2 および OCN の遺伝子発現をコントロールレベルまで増加させた (Fig.18a, b and d)。また losartan は、培養 5 日目に 10^{-6} M Ang II 存在下で増加した AJ18 の遺伝子発現をコントロールレベルまで低下させた (Fig. 18c)。

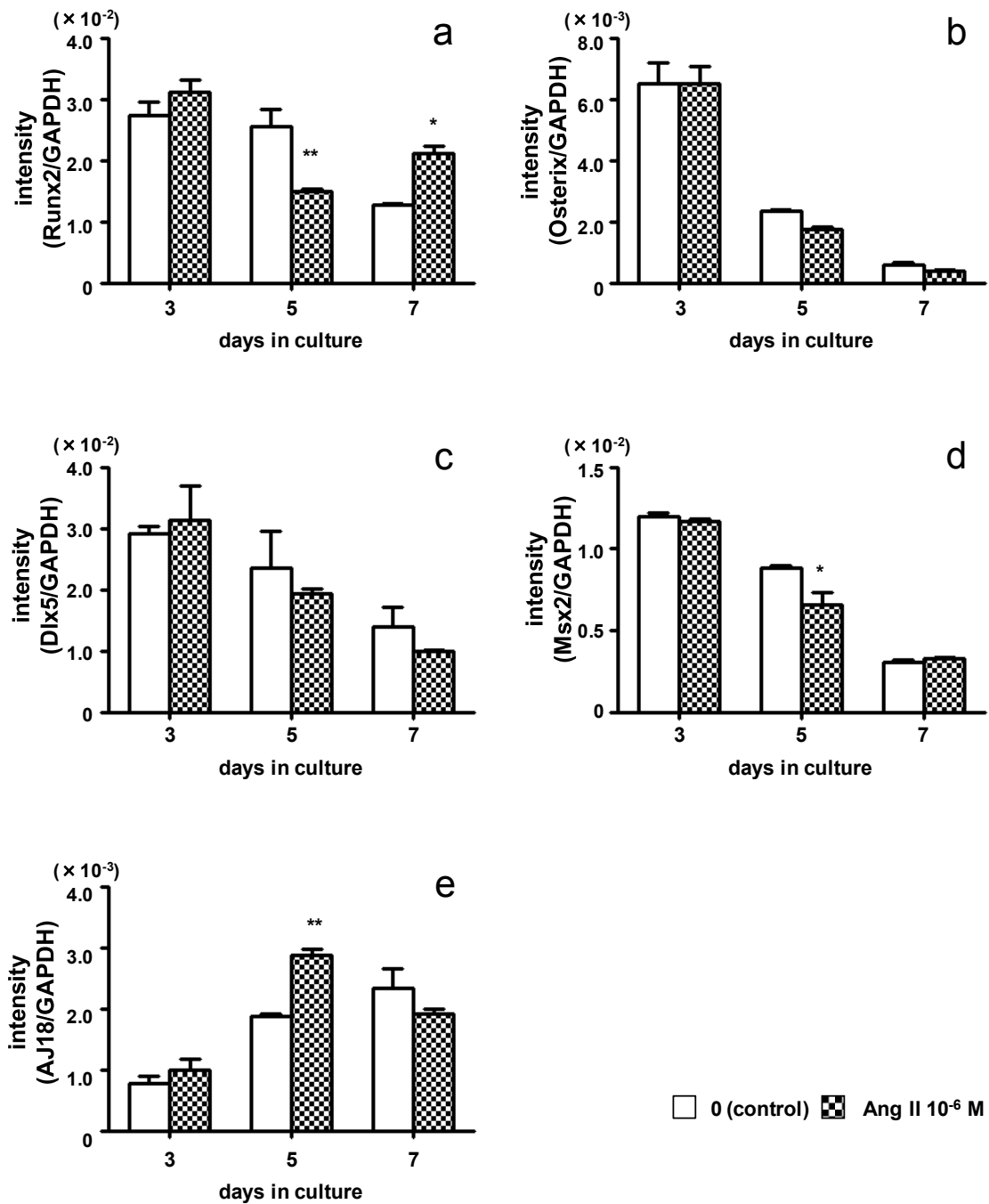


Fig. 13. Effect of Ang II on transcription factor mRNA expression levels. ROS17/2.8 cells were cultured with 0 (control) or 10^{-6} M Ang II for up to 7 days. The mRNA expression levels of Runx2 (a), Osterix (b), Dlx5 (c), Msx2 (d), and AJ18 (e) on days 3, 5, and 7 of culture were determined using real-time PCR. Each bar indicates the mean \pm SD from three independent experiments. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (Ang II treatment vs. control).

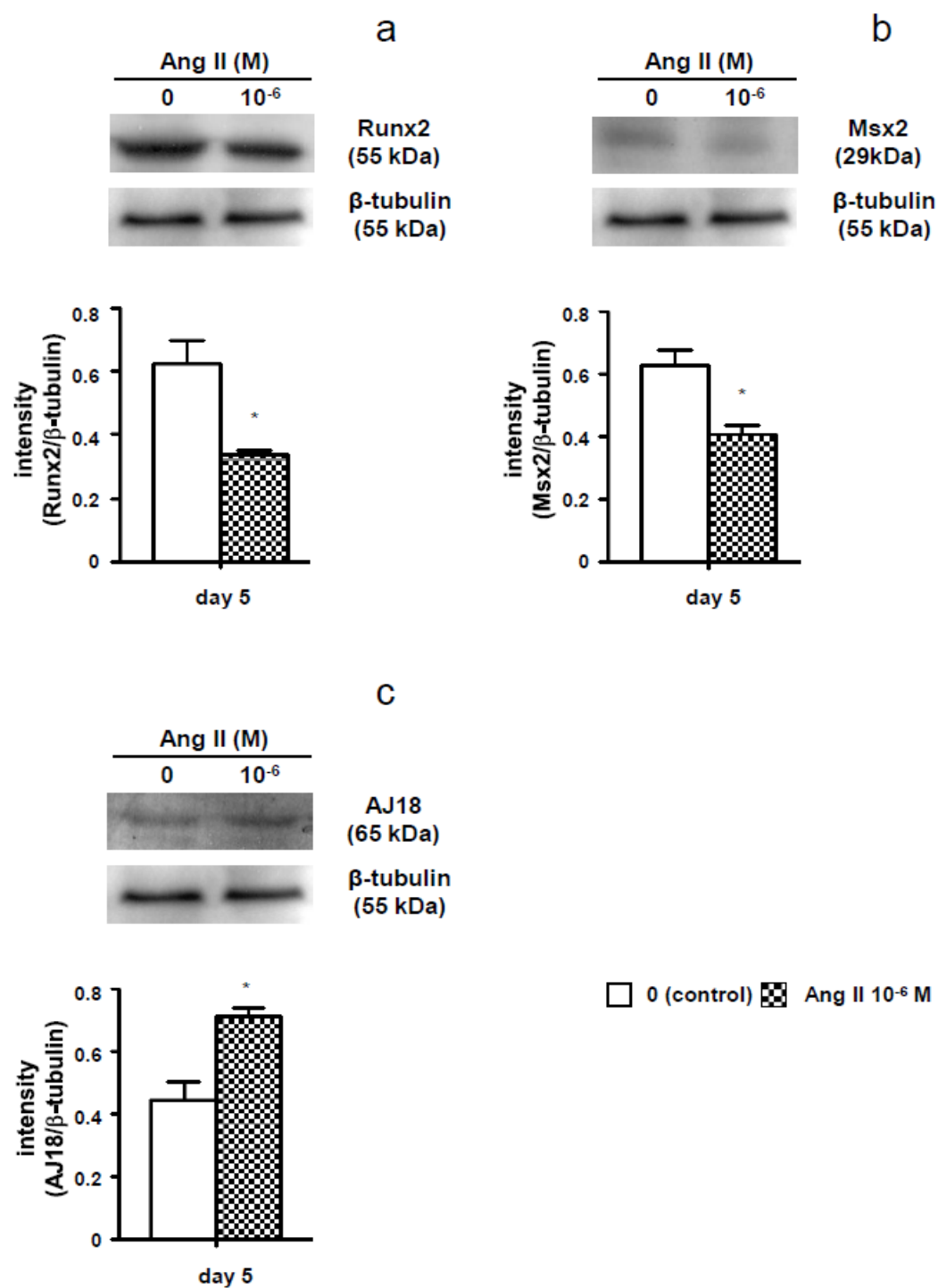


Fig. 14. Effect of Ang II on Runx2, Msx2, and AJ18 protein expression levels. ROS17/2.8 cells were cultured with 0 (control) or 10⁻⁶ M Ang II for 5 days, and the protein expression levels of Runx2 (a), Msx2 (b), AJ18 (c) were examined with Western blotting. Each bar indicates the mean ± SD from three independent experiments. * *p* < 0.05 (Ang II treatment vs. control).

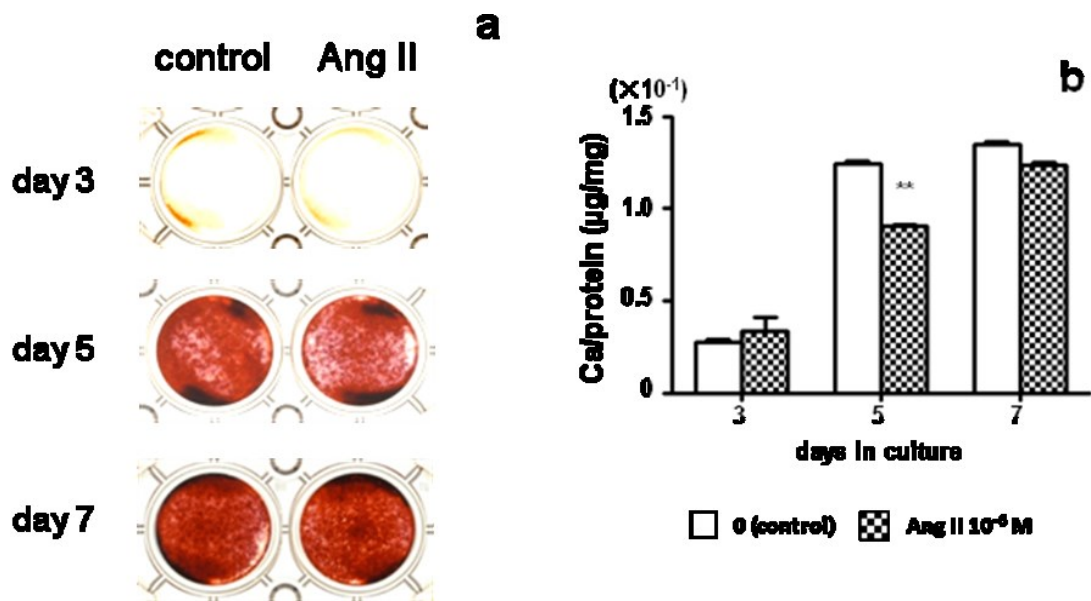


Fig. 15. Effect of Ang II on mineralized nodule formation. ROS17/2.8 cells were cultured with 0 (control) or 10^{-6} M Ang II for up to 7 days. Mineralized nodule formation (a) was examined by Alizarin Red staining on days 3, 5, and 7 of culture, and the calcium content in mineralized nodules (b) was determined using a calcium assay kit. Each bar indicates the mean \pm SD from three independent experiments. ** $p < 0.01$ (Ang II treatment vs. control).

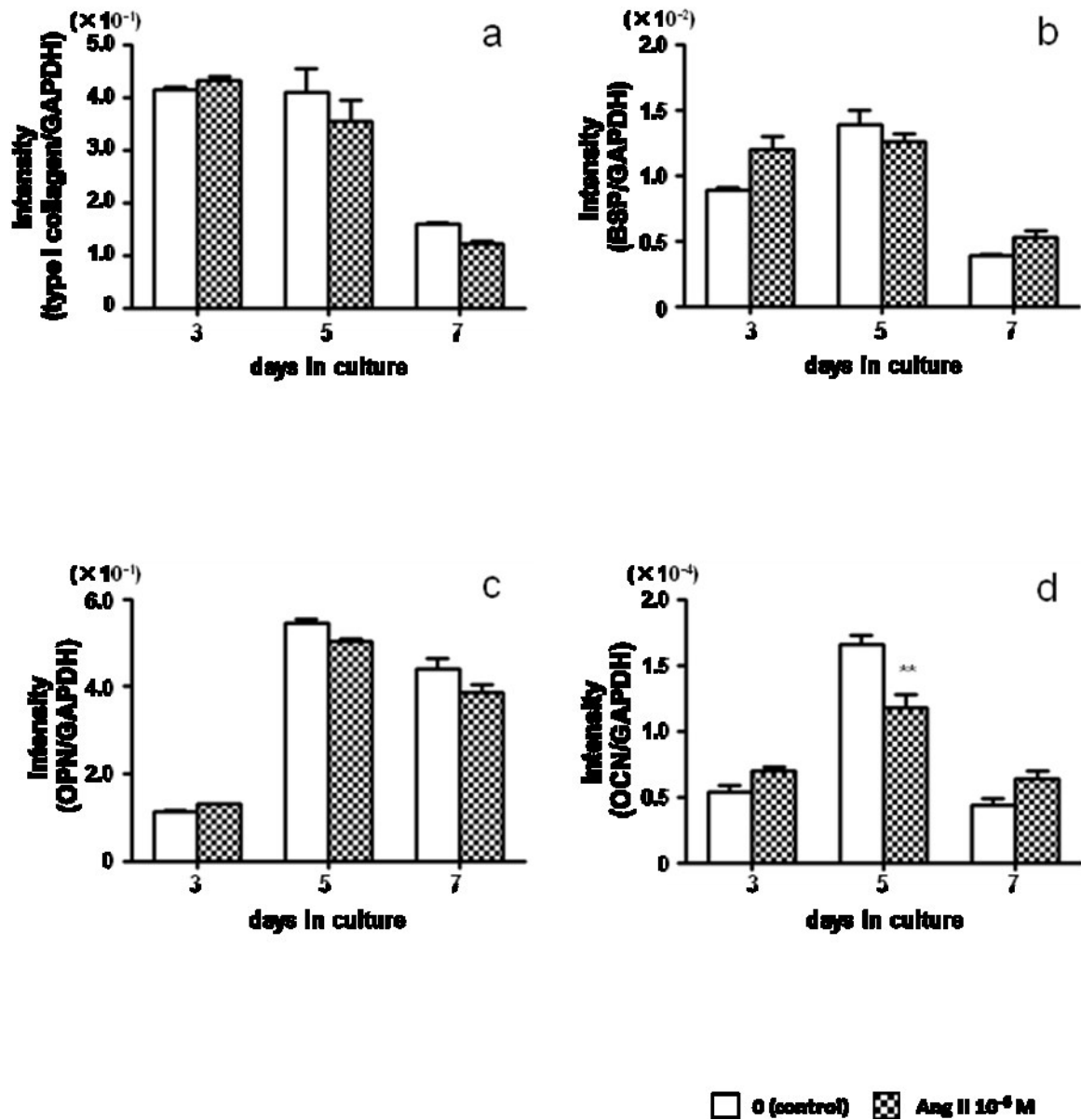


Fig. 16. Effect of Ang II on mRNA expression levels of ECM proteins. ROS17/2.8 cells were cultured with 0 (control) or 10^{-6} M Ang II for up to 7 days, and the mRNA expression levels of type I collagen (a), BSP (b), OPN (c), and OCN (d) on days 3, 5, and 7 of culture were determined using real-time PCR. Each bar indicates the mean \pm SD from three independent experiments. ** $p < 0.01$ (Ang II treatment vs. control).

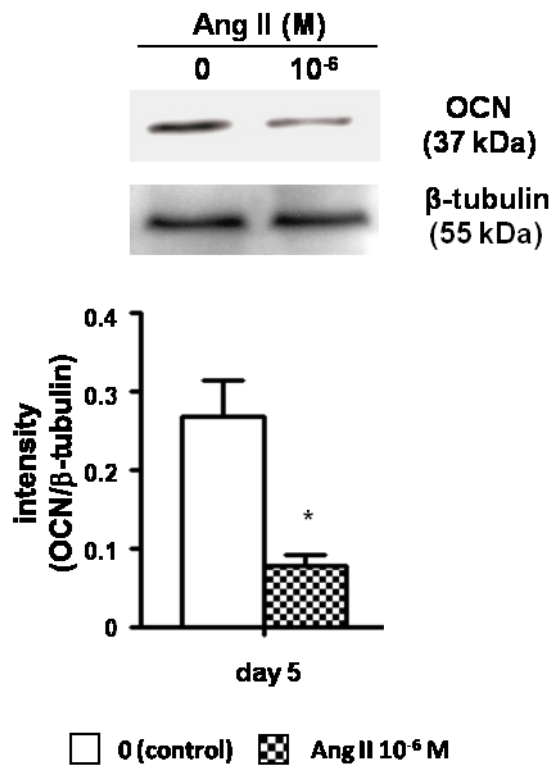


Fig. 17. Effect of Ang II on OCN protein expression levels. ROS17/2.8 cells were cultured with 0 (control) or 10^{-6} M Ang II for 5 days, and protein expression levels of OCN were examined with Western blot analysis. Each bar indicates the mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$ (Ang II treatment vs. control).

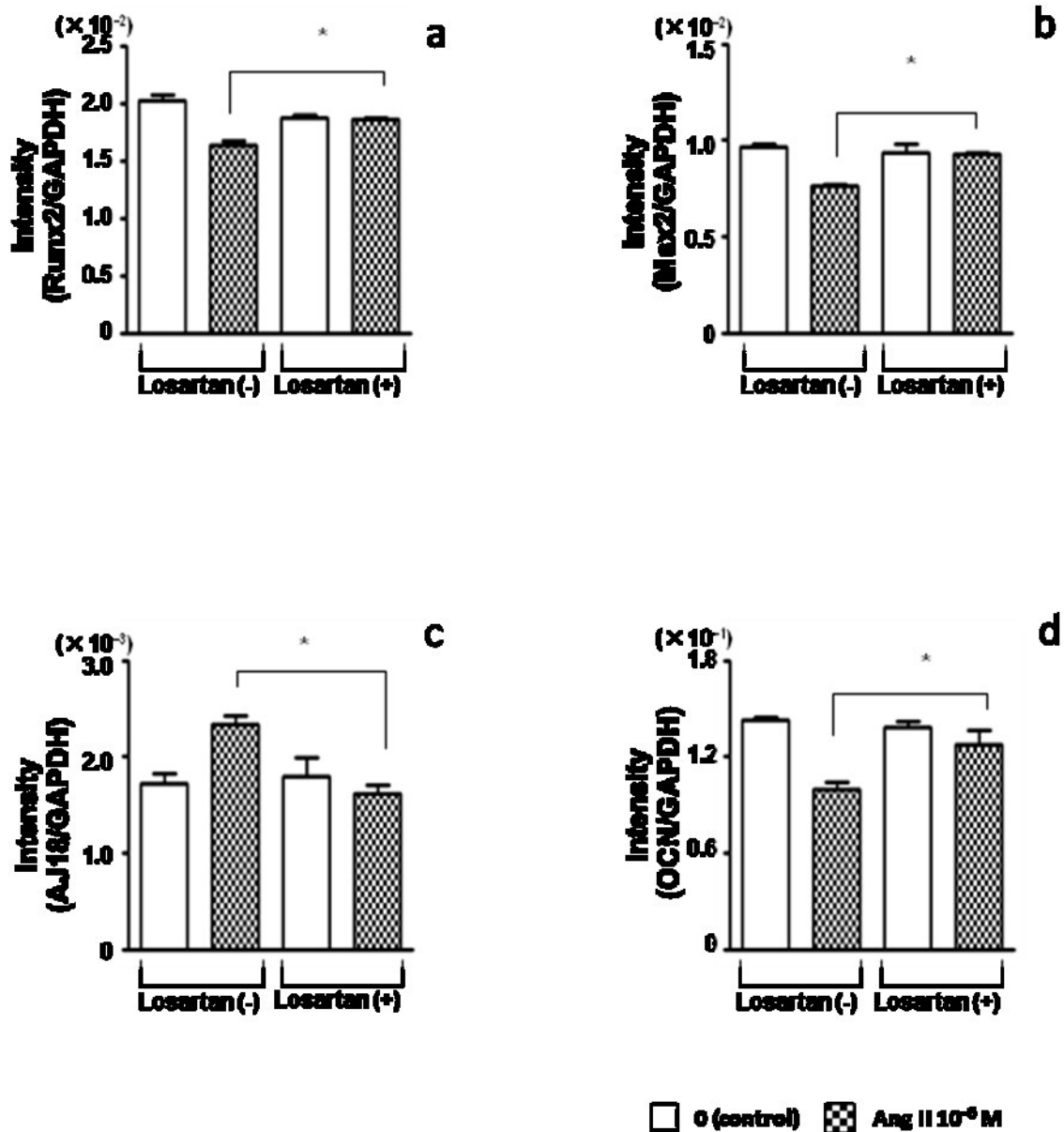


Fig. 18. Effect of losartan on Runx2, Msx2, AJ18, and osteocalcin mRNA expression. ROS17/2.8 cells were cultured with 0 (control) or 10⁻⁶ M Ang II in the presence or absence of the AT₁ receptor blocker (losartan) for 5 days. mRNA expression levels of Runx2 (a), Msx2 (b), AJ18 (c), and OCN (d) were determined using real-time PCR. Each bar indicates the mean ± SD from three independent experiments. * *p* < 0.05.

考 察

Ang II は、ラット胎児頭蓋冠由来骨芽細胞の ALPase 活性と石灰化物形成を抑制し (Hagiwara et al., 1998; Lamparter et al., 1998), 骨芽細胞分化は Ang II によって抑制されると考えられている。しかし、骨芽細胞分化に関連する転写因子の発現に及ぼす Ang II の影響を調べた報告はない。第 1 章で著者は、増殖期からコンフルエントに達する ROS17/2.8 細胞の培養期間に 10^{-6} M Ang II で刺激すると、細胞増殖が促進する一方で、骨芽細胞分化に関連する ALPase 活性は低下することを示した (Nakai et al., 2013)。そこで、本研究では、ROS17/2.8 細胞の分化に関連する転写因子の発現レベルを調べることにより、Ang II が骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した。

本研究では、Runx2 と Msx2 の発現は 10^{-6} M Ang II 刺激で有意に減少し、AJ18 発現は有意に増加した。さらに Ang II は、ROS17/2.8 細胞による石灰化物形成を有意に抑制した。Runx2 は間葉系幹細胞から骨芽細胞への初期分化に必須な転写因子であり、また、成熟した骨芽細胞は高い OCN 発現能を有することが知られている (Komori et al., 2006)。本研究では、Runx2 と同様に OCN の発現もまた、 10^{-6} M Ang II 刺激で有意に減少した。

Msx2 は、骨の発育調節に重要な役割を果たしている。Liu ら (1999) は、Msx2 の過剰発現は一時的に骨芽細胞の分化を抑制するが、最終的には分化を促進して骨の発育を促したと報告している。Msx2 が骨芽細胞の分化や増殖を促進することは、Ishii ら (2003) および Ichida ら (2004) によっても報告されている。Zinc finger motif を含む Osterix も、骨芽細胞分化に重要な転写因子である (Nakashima et al., 2002)。さらに、Dlx5 は骨芽細胞の分化過程と相関し、*in vitro* においては骨芽細胞分化の最終段階でその発現が最大となることから、骨細胞への成熟に関与する可能性が示唆されている (Hassan et al., 2004)。一方、AJ18 は OSE2 に特異的に結合して Runx2 の転写活性を阻害し、骨芽細胞の分化を抑制する転写因子として知られている (Jheon et al., 2001; Yanagisawa et al., 2008)。これらの知見と本研究結果から、Ang II は、Runx2 および Msx2 発現の減少と AJ18 の発現の増加を介して骨芽細胞の分化を抑制すると考えられた。

Hagiwara ら (1998) は、Ang II がラット胎児頭蓋冠由来骨芽細胞の石灰化物形成と OCN の遺伝子発現を抑制し、Ang II による OCN 発現の抑制はその発現が最大となった培養日に顕著に認められたと報告しており、本研究結果は Hagiwara ら (1998) の報告と一致した。一方で、Hagiwara ら (1998) は、Ang II の刺激を受けた骨芽細胞における BSP, OPN および I 型コラーゲンなど OCN 以外の ECM タンパク発現については検討していない。そこで本研究では、Ang II

が ROS17/2.8 細胞の石灰化物形成を抑制するメカニズムを解明するために、OCN を含む非コラーゲン性タンパクおよびコラーゲンの発現に及ぼす Ang II の影響についても検討した。その結果、Ang II 刺激によって OCN の発現は減少したが、I型コラーゲン、BSP および OPN の発現には Ang II 刺激の影響は認められなかった。非コラーゲン性の ECM タンパクは、細胞外におけるコラーゲンの組織化やヒドロキシアパタイト結晶の形成と成長の調節に重要である (Young et al., 1992; Robey et al., 1993; Mundlos et al., 1997; Ganss et al., 1999)。また、ALPase はアルカリ性下で、有機リン酸エステル化合物のエステル結合を加水分解する酵素であり、ピロリン酸や ATP などの石灰化阻害物質を消化するだけでなく、ヒドロキシアパタイト結晶形成に必要な局所のリン酸濃度の押し上げにも深く関与し、骨の石灰化過程において重要な役割を担っている (Anderson et al., 1989)。第 1 章において著者は、Ang II が ROS17/2.8 細胞の ALPase 活性を抑制することを示した (Nakai et al., 2013)。これらの知見から、Ang II は骨芽細胞の ALPase 活性と OCN の発現を減少させることで、石灰化物形成を抑制すると考えられた。動物実験および疫学研究では、高血圧がカルシウム代謝の異常に関連し、カルシウム減少を伴う骨粗鬆症のリスクを増加させたと報告されている (Resnick et al., 1983; Cappuccio et al., 2000)。さらに、Ang II が破骨細胞性骨吸収を促進することや、Ang 変換酵素阻害剤および Ang II 受容体拮抗剤などの血圧降下薬が、骨量を増加させたとの報告もある (Hatton et al., 1997; Lynn et al., 2006; Rejnmark et al., 2006; Shimizu et al., 2008)。これらの知見と本研究結果から、Ang II は、破骨細胞による骨吸収 (Maeno et al., 2013) を促進するだけでなく、骨芽細胞による骨形成を抑制して、骨組織のリモデリングバランスの破綻を誘導する可能性が示唆された。

本研究では、石灰化物中のカルシウム含有量は培養 5 日目に Ang II 刺激で顕著に減少したが、7 日目にはその影響は認められなかった。つまり、Ang II による石灰化物形成の抑制作用は、7 日目には減衰した。しかも、培養 5 日目における Ang II による Msx2 および OCN の遺伝子発現の減少と AJ18 の発現増加が 7 日目には認められず、Ang II による石灰化物形成の抑制は、これらの発現変化と一致して弱まった。一方で、Runx2 の発現は、培養 7 日目においてコントロールと比較して Ang II 刺激で有意に増加した。著者は、ROS17/2.8 細胞の AT₁ および AT₂ 受容体の発現は、培養 3 および 5 日目に比べて 7 日目で著しく低下することを第 1 章で報告している (Nakai et al., 2013)。したがって、培養 7 日目における Ang II による Runx2 の発現増加は、Ang II の直接作用によるものではないと推察された。

Runx2 の発現は、bone morphogenetic protein-2 および fibroblast growth factor-2

(FGF2) などの増殖因子や, IL-1 β および IL-6 などの炎症性サイトカインによって誘導され (Iwasaki et al., 2008; Li et al., 2008; Koch et al., 2012; Nakayama et al., 2012; Sonomoto et al., 2012), また, Ang II は, マウスの頭蓋冠由来骨芽細胞 (Guo et al., 2011) および骨格筋細胞 (Tang et al., 2011) の IL-6 および FGF2 の産生を誘導したと報告されている。本研究では, Ang II が ROS17/2.8 細胞の増殖因子やサイトカインの発現に及ぼす影響は調べてないが, Ang II が ROS17/2.8 細胞の培養初期段階で IL-6 を含むサイトカインや FGF2 などの成長因子の発現を誘導し, これらの autocrine 作用が培養後期に Runx2 の発現を増加させた可能性が考えられた。また, 本研究における石灰化物形成と石灰化物中のカルシウム蓄積量および ECM タンパク発現の結果から, 培養 7 日目における Runx2 の発現増加は, ROS17/2.8 細胞の骨形成機能には影響しないと推察された。

これまでに, Ang II は, 骨芽細胞の AT₁ 受容体を介して RANKL および MMPs の発現を誘導したと報告されている (Shimizu et al., 2008; Nakai et al., 2013)。本研究においても, AT₁ 受容体拮抗剤 losartan が, Ang II 誘導性の Runx2, Msx2 および OCN の発現減少と, AJ18 の発現増加を完全に抑制した。また, ラット胎児頭蓋冠由来骨芽細胞においては, Ang II 刺激による ALPase 活性および OCN 発現の低下が, AT₂ 受容体拮抗剤ではなく AT₁ 受容体拮抗剤で阻害されたと報告されている (Hagiwara et al., 1998)。これらの知見から, Ang II は, AT₁ 受容体を介して骨芽細胞の ALPase 活性と Runx2, Msx2, AJ18 および OCN の発現を低下させると考えられた。

結論として, Ang II は, ROS17/2.8 細胞の AT₁ 受容体に結合し, Runx2 および Msx2 の発現減少と AJ18 の発現増加によって, 骨芽細胞分化を抑制することが示唆された。さらに, Ang II は AT₁ 受容体を介して ALPase 活性と OCN の発現を減少させて, ROS17/2.8 細胞の石灰化物形成を抑制すると考えられた。

総 括

Ang II が, ROS17/2.8 細胞の ECM タンパク代謝調節, 骨芽細胞分化および石灰化物形成に及ぼす影響を細胞および分子生物学的に明らかにするために, 本研究を企画した。

第 1 章では, ROS17/2.8 細胞の ECM タンパク分解酵素とその内因性阻害剤の発現, および MAPK シグナル関連因子の活性化に及ぼす Ang II の影響を調べ, 以下の結果を得た。

1. Ang II 刺激で ALPase 活性は有意に低下し, 細胞増殖は有意に促進された。AT₁ および AT₂ 受容体の発現には, Ang II 刺激の影響は認められなかった。
2. Ang II 刺激で MMP-3 および MMP-13 の発現は増加した。一方, AT₁ および AT₂ 受容体, MMP-2, MMP-9, MMP-14, uPA, tPA, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, PAI-1 の発現には Ang II 刺激の影響は認められず, MMP-1 と TIMP-4 の発現は検出されなかった。
3. Ang II 刺激で ERK1/2, p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化は有意に増加した。
4. Ang II 誘導性の MMP-3 および MMP-13 の発現増加は, AT₁ 受容体拮抗剤, ERK1/2 および SAPK/JNK のリン酸化阻害剤で有意に抑制されたが, AT₂ 受容体拮抗剤の影響は認められなかった。
5. p38 MAPK のリン酸化阻害剤は細胞増殖を著しく抑制した。
6. Ang II 誘導性の ERK1/2, SAPK/JNK および p38 MAPK のリン酸化の増加は, AT₁ 受容体拮抗剤で有意に抑制された。

第 2 章では, 骨芽細胞分化に関連する転写因子と ECM タンパクの発現, および石灰化物形成に及ぼす Ang II の影響を調べ, 以下の結果を得た。

7. Ang II 刺激で AJ18 発現は増加したが, Runx2 および Msx2 の発現は減少し, Osterix および Msx2 の発現には Ang II 刺激の影響は認められなかった。
8. Ang II 刺激で OCN 発現は減少した。一方, I 型コラーゲン, BSP および OPN の発現には Ang II 刺激の影響は認められなかった。
9. Ang II 刺激で石灰化物形成および石灰化物中のカルシウム蓄積量は減少した。
10. AT₁ 受容体拮抗剤は, Ang II 誘導性の Runx2, Msx2 および OCN の発現減少と AJ18 の発現増加を有意に抑制した。

以上の結果から, Ang II は, 骨芽細胞の AT₁ 受容体と MAPK シグナル伝達

経路を介して MMP-3 と MMP-13 の産生を増加させ、ECM タンパク代謝を分解系に傾けることが明らかになった。また、Ang II は、骨芽細胞の分化を促進する転写因子 Runx2 と Msx2 の発現低下および分化を抑制する転写因子 AJ18 発現の増加を介して骨芽細胞分化を抑制し、ALPase 活性と OCN 発現を低下させて石灰化物形成を抑制することが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるに、本研究遂行にあたり、格別たるご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部衛生学講座の前野正夫教授に謹んで心より感謝申し上げます。

また、本研究を通して多大なるご協力とご助言を賜りました衛生学講座の川戸貴行准教授を始め、衛生学講座の皆様深く感謝致します。

本研究は、平成 25 年度古田奨学金（中井久美子）、平成 25 年度大学院歯学研究科研究費（学生分、中井久美子）、平成 24 年度大学院歯学研究科研究費（学生分、中井久美子）、平成 23 年度大学院歯学研究科研究費（学生分、中井久美子）によってなされた。

また、本研究の一部は、平成 25 年度日本大学歯学部上村研究費＜短期研究＞（研究代表者：川戸貴行）、平成 24～26 年度科学研究費補助金基盤研究（C）（研究代表者：前野正夫、課題番号 24592842）、平成 22～26 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（研究代表者：落合邦康、課題番号 S1001024）、平成 23 年度日本大学歯学部上村安男・治子研究費＜短期研究＞（研究代表者：前野正夫）、平成 23 年度日本大学歯学部佐藤研究費（研究代表者：川戸貴行）、平成 21～23 年度科学研究費補助金基盤研究（C）（研究代表者：前野正夫、課題番号 21592401）、平成 22 年度大学院歯学研究科研究費＜共同研究 A＞（研究代表者：前野正夫）および平成 22 年度日本大学歯学部総合歯学研究所研究費＜一般研究 B＞（研究代表者：川戸貴行）によってなされた。

本研究に関連した要旨は、20th IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (2013, Milan, Italy)、第 62 回日本口腔衛生学会・総会 (2013, 松本)、第 22 回日本歯科医学会総会 (2012, 大阪)、PER/IADR congress & Exhibition, Finlandia Hall (2012, Helsinki, Finland)、第 61 回日本口腔衛生学会・総会 (2012, 横須賀)、第 64 回日本大学歯学会総会 (2012, 東京)、ASBMR 2011 Annual Meeting (2011, San Diego, California, USA) および第 20 回硬組織再生生物学会学術大会・総会 (2011, 東京) において発表した。

なお、これらの学会発表において、日本大学歯学会・奨励賞および硬組織再生生物学会・優秀プレゼンテーション (ポスター発表) 賞を受賞した。

引用文献

- Acampora D, Merlo GR, Paleari L, Zerega B, Postiglione MP, Mantero S (1999) Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*. *Development* 126, 3795-809.
- Aida Y, Honda K, Tanigawa S, Nakayama G, Matsumura H, Suzuki N, Shimizu O, Takeichi O, Makimura M, Maeno M (2012) IL-6 and soluble IL-6 receptor stimulate the production of MMPs and their inhibitors via JAK-STAT and ERK-MAPK signalling in human chondrocytes. *Cell Biol Int* 36, 367-76.
- Anderson HC (1989) Mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest* 60, 320-30.
- Bandow K, Nishikawa Y, Ohnishi T, Kakimoto K, Soejima K, Iwabuchi S, Kuroe K, Matsuguchi T (2007) Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) induces RANKL, MCP-1, and MIP-1 β expression in osteoblasts through the angiotensin II type 1 receptor. *J Cell Physiol* 211, 392-8.
- Cappuccio FP, Kalaitzidis R, Duneclift S, Eastwood JB (2000) Unravelling the links between calcium excretion, salt intake, hypertension, kidney stones and bone metabolism. *J Nephrol* 13, 169-77.
- Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-74.
- Fujisaki K, Tanabe N, Suzuki N, Mitsui N, Oka H, Ito K, Maeno M (2006) The effect of IL-1 α on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators, and their inhibitors in osteoblastic ROS 17/2.8 cells. *Life Sci* 78, 1975-82.
- Fujisaki K, Tanabe N, Suzuki N, Kawato T, Takeichi O, Tsuzukibashi O, Makimura M, Ito K, Maeno M (2007) Receptor activator of NF- κ B ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264.7 cells. *Life Sci* 80, 1311-8.
- Ganss B, Kim RH, Sodek J (1999) Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 10, 79-98.
- Guan XX, Zhou Y, Li JY (2011) Reciprocal roles of angiotensin II and angiotensin II receptors blockade (ARB) in regulating *Cbfa1/RANKL* via cAMP signaling pathway: possible mechanism for hypertension-related osteoporosis and antagonistic effect of ARB on hypertension-related osteoporosis. *Int Mol Sci* 12, 4206-13.
- Guiglia R, Di Fede O, Lo Russo L, Sprini D, Rini GB, Campisi G (2013) Osteoporosis,

- jawbones and periodontal disease. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 18, 93-9.
- Guo L, Wang M, Zhang ZY, Hao L, Lou BY, Li XY (2011) Angiotensin II induces interleukin-6 synthesis in osteoblasts through ERK1/2 pathway via AT1 receptor. *Arch Oral Biol* 56, 205-11.
- Hagiwara H, Hiruma Y, Inoue A, Yamaguchi A, Hirose S (1998) Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells. *J Endocrinol* 156, 543-50.
- Hassan MQ, Javed A, Morasso MI, Karlin J, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein GS, Stein JL, Lian JB (2004) Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. *Mol Cell Biol* 24, 9248-61.
- Hatton R, Stimpel M, Chambers TJ (1997) Angiotensin II is generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption *in vitro*. *J Endocrinol* 152, 5-10.
- Holliday LS, Welgus HG, Fliszar CJ, Veith GM, Jeffrey JJ, Gluck SL (1997) Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Biol Chem* 272, 22053-8.
- Huang W, Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M (2002) Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) gene expression is increased in human osteoarthritic femoral head cartilage. *J Cell Biochem* 85, 295-303.
- Ichida F, Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Ikeda F, Hisada K (2004) Reciprocal roles of Msx2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279, 34015-22.
- Iida T, Kawato T, Tanaka H, Tanabe N, Nakai K, Zhao N, Suzuki N, Ochiai K, Maeno M (2011) Sodium butyrate induces the production of cyclooxygenases and prostaglandin E₂ in ROS 17/2.8 osteoblastic cells. *Arch Oral Biol* 56, 678-86.
- Ishii M, Merrill AE, Chan YS, Gitelman I, Rice DP, Sucov HM (2003) Msx2 and Twist cooperatively control the development of the neural crest-derived skeletogenic mesenchyme of the murine skull vault. *Development* 130, 6131-42.
- Iwasaki K, Komaki M, Mimori K, Leon E, Izumi Y, Ishikawa I (2008) IL-6 induces osteoblastic differentiation of periodontal ligament cells. *J Dent Res* 87, 937-42.
- Jheon AH, Ganss B, Cheifetz S, Sodek J (2001) Characterization of a novel KRAB/C2H2 zinc finger transcription factor involved in bone development. *J Biol Chem* 276, 18282-9.
- John A, Tuszynski G (2001) The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol* 7, 14-23.

- Kaneko K, Ito M, Fumoto T, Fukuhara R, Ishida J, Fukamizu A, Ikeda K (2011) Physiological function of the angiotensin AT1a receptor in bone remodeling. *J Bone Miner* 26, 2959-66.
- Karsenty G (2000) Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Semin Cell Dev Biol* 11, 343-6.
- Katagiri T, Takahashi N (2002) Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 8, 147-59.
- Katono T, Kawato T, Tanabe N, Tanaka H, Suzuki N, Kitami S, Morita T, Motohashi M, Maeno M (2009) Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators, and their inhibitors in human osteoblasts. *Arch Oral Biol* 54, 146-55.
- Koch FP, Weinbach C, Hustert E, Al-Nawas B, Wagner W (2012) GDF-5 and BMP-2 regulate bone cell differentiation by gene expression of MSX1, MSX2, Dlx5, and Runx2 and influence OCN gene expression in vitro. *Int J Periodontics Restorative Dent* 32, 285-93.
- Komori T (2006) Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 99, 1233-9.
- Kuwabara A, Tanabe N, Kawato T, Tanaka H, Nakai K, Iinuma T, Oki H, Motohashi M, Maeno M (2011) Interleukin-17A induces extracellular matrix protein expression in osteoblastic ROS17/2.8 cells. *J Hard Tissue Biol* 20, 247-58.
- Lamparter S, Kling L, Schrader M, Ziegler R, Pfeilschifter J (1998) Effects of angiotensin II on bone cells in vitro. *J Cell Physiol* 175, 89-98.
- Li Y, Bäckesjö CM, Haldosén LA, Lindgren U (2008) IL-6 receptor expression and IL-6 effects change during osteoblast differentiation. *Cytokine* 43, 165-73.
- Liu YH, Tang Z, Kundu RK, Wu L, Luo W, Zhu D (1999) Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. *Dev Biol* 205, 260-74.
- Lynn H, Kwok T, Wong SY, Woo J, Leung PC (2006) Angiotensin converting enzyme inhibitor use is associated with higher bone mineral density in elderly Chinese. *Bone* 38, 584-8.
- Maeno M, Tanaka H, Zhang F, Kitami S, Nakai K, Kawato T (2013) Direct and indirect effects of IL-17A on RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Hard Tissue Biol* 22, 287-92.
- Malemud CJ (2006) Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an

- overview. *Front Biosci* 11, 1696-1701.
- Miyama K, Yamada G, Yamamoto TS, Takagi C, Miyado K, Sakai M (1999) A BMP-inducible gene, *Dlx5*, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction. *Dev Biol* 208, 123-33.
- Mizutani A, Sugiyama I, Kuno E, Matsunaga S, Tsukagoshi N (2001) Expression of matrix metalloproteinases during ascorbate-induced differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 16, 2043-49.
- Morozumi A (2011) High concentration of sodium butyrate suppresses osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation in ROS17/2.8 cells. *J Oral Sci* 53, 509-16.
- Mundlos S, Olsen BR (1997) Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. *SEB J* 11, 227-33.
- Nagamine Y, Medcalf RL, Munoz-Canoves P (2005) Transcriptional and posttranscriptional regulation of the plasminogen activator system. *Thromb Haemost* 93, 661-75.
- Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69, 562-73.
- Nakai K, Kawato T, Morita T, Iinuma T, Kamio N, Zhao N, Maeno M (2013) Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT₁ receptor in osteoblasts. *Biochim* 95, 922-33.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17-29.
- Nakayama Y, Yang L, Takai H, Kaneko H, Abiko Y, Ogata Y (2012) Fibroblast growth factor 2 and forskolin induce mineralization-associated genes in two kinds of osteoblast-like cells. *J Oral Sci* 54, 251-89.
- Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S, Fridman R (1997) Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 272, 29975-83.
- Onodera S, Nishihira J, Iwabuchi K, Koyama Y, Yoshida K, Tanaka S, Minami A (2002) Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. *J Biol Chem* 277, 7865-74.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR (1997) *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast

- differentiation and bone development. *Cell* 89, 765-71.
- Pins GD, Collins-Pavao ME, Van De Water L, Yarmush ML, Morgan JR (2000) Plasmin triggers rapid contraction and degradation of fibroblast-populated collagen lattices. *J Invest Dermatol* 114, 647-53.
- Raspollini MR, Castiglione F, Rossi Degl'Innocenti D, Garbini F, Coccia ME, Taddei GL (2005) Difference in expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in patients with persistent ovarian cysts. *Fertil Steril* 84, 1049-52.
- Redlich K, Smolen JS (2012) Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov* 11, 234-50.
- Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L (2006) Treatment with β -blockers, ACE inhibitors, and calcium-channel blockers is associated with a reduced fracture risk: a nationwide case-control study. *J Hypertens* 24, 581-9.
- Resnick LM, Laragh JH, Sealey JE, Alderman MH (1983) Divalent cations in essential hypertension: relations between serum ionized calcium, magnesium, and plasma renin activity. *N Engl J Med* 309, 888-91.
- Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W (1993) Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* 2, 483-7.
- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K (2000) Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 24, 391-5.
- Senbonmatsu T, Saito T, Landon E, Watanabe O, Price EJ, Roberts R, Imboden H, Fitzgerald T, Fitzgerald F, Inagami T (2003) A novel angiotensin type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J* 22, 6471-82.
- Shimizu H, Nakagami H, Osako MK, Hanayama R, Kunugiza T, Kizawa T, Tomita T, Yoshikawa H, Ogihara T, Morishita R (2008) Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *FASEB J* 22, 2465-75.
- Skrzydowska E, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S (2005) Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 11, 1251-66.
- Sonomoto K, Yamaoka K, Oshita K, Fukuyo S, Zhang X, Nakano K (2012) Interleukin-1 β induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt-5a/receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 pathway. *Arthritis Rheum* 64, 3355-63.
- Tanabe N, Ito-Kato E, Suzuki N, Nakayama A, Ogiso B, Maeno M, Ito K (2004) IL-1 α

- affects mineralized nodule formation by rat osteoblasts. *Life Sci* 75, 2317-27.
- Tang W, Wei Y, Le K, Li Z, Bao Y, Gao J (2011) Mitogen-activated protein kinases ERK 1/2- and p38-GATA4 pathways mediate the Ang II-induced activation of FGF2 gene in neonatal rat cardiomyocytes. *Biochem Pharmacol* 81, 518-25.
- Tanigawa S, Aida Y, Kawato T, Honda K, Nakayama G, Motohashi M, Suzuki N, Ochiai K, Matsumura H, Maeno M (2011) Interleukin-17F affects cartilage matrix turnover by increasing the expression of collagenases and stromelysin-1 and by decreasing the expression of their inhibitors and extracellular matrix components in chondrocytes. *Cytokine* 56, 376-86.
- Tanigawa S, Kawato T, Aida Y, Suzuki N, Ochiai K, Matsumura H, Maeno M (2011) Interleukin-17F down-regulates plasminogen/plasmin pathway in chondrocytes. *J Hard Tissue Biol* 20, 193-200.
- Venkatesan AM, Davis JM, Grosu GT, Baker J, Zask A, Levin JI, Ellingboe J, Skotnicki JS, Dijoseph JF, Sung A, Jin G, Xu W, McCarthy DJ, Barone D (2004) Synthesis and structure–activity relationships of 4-alkynyloxy phenyl sulfanyl, sulfinyl, and sulfonyl alkyl hydroxamates as tumor necrosis factor- α converting enzyme and matrix metalloproteinase inhibitors. *J Med Chem* 47, 6255–69.
- Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92, 827-39.
- Yanagisawa M, Suzuki N, Mitsui N, Koyama Y, Otsuka K, Shimizu N (2008) Compressive force stimulates the expression of osteogenesis-related transcription factors in ROS 17/2.8 cells. *Arch Oral Biol* 53, 214-9.
- Yang CM, Chien CS, Yao CC, Hsiao LD, Huang YC, Wu CB (2004) Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Biol Chem* 279, 22158–65.
- Yang X, Karsenty G (2002) Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. *Trends Mol Med*. 8, 340-5.
- Yao HL, Gao FH, Li ZZ, Wu HX, Xu MD, Zhang Z, Dai QY (2012) Monocyte chemoattractant protein-1 mediates angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation via SAPK/JNK and ERK1/2. *Mol Cell Biochem* 366, 355-62.
- Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG (1992) Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res* 281, 275-94.
- Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner Jr. JF (2000) TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 275, 31226-32.

Zhao W, Byrne MH, Boyce BF, Krane SM (1999) Bone resorption induced by parathyroid hormone is strikingly diminished in collagenase-resistant mutant mice. J Clin Invest 103, 517-24.

参考論文

Kumiko Nakai, Takayuki Kawato, Toyoko Morita, Toshimitsu Inuma, Noriaki Kamio, Ning Zhao, Masao Maeno (2013) Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT₁ receptor in osteoblasts. *Biochimie* 95 (4), 922-933.

Kumiko Nakai, Takayuki Kawato, Toyoko Morita, Yoji Yamazaki, Hideki Tanaka, Morio Tonogi, Hidero Oki, Masao Maeno (2013) Angiotensin II suppresses osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation via AT₁ receptors in ROS17/2.8 cells. *Archives of Medical Science*, in press.