

プロポフォールが RAW264.7 細胞における  
破骨細胞様細胞の形成に及ぼす影響

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

武田 ひとみ

(指導：岡 俊一 教授, 川戸貴行 教授)

## 概 要

プロポフォールは、鎮静、催眠、健忘あるいは制吐作用を有する静脈麻酔薬であり、生体内での蓄積性が低く、早い作用発現と短い半減期などの利点を有する。プロポフォールは、顎骨への侵襲を伴う長時間の口腔外科処置など様々な手術時の鎮静や全身麻酔に頻用されており、骨リモデリングに関与する骨芽細胞と破骨細胞もまた、プロポフォールの曝露を受けると考えられる。破骨細胞は、骨吸収で中心的な役割を担う多核の巨細胞であり、破骨細胞前駆細胞が互いに融合して破骨細胞へと分化する。骨芽細胞やリンパ球が産生する receptor activator of NF-kappaB (RANK) ligand (RANKL) が破骨細胞前駆細胞に発現する RANK に結合すると、破骨細胞の分化が強く誘導され、破骨細胞性骨吸収は促進する。dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) と osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP) は、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化の過程で発現が増加し、破骨細胞前駆細胞の融合に関与する。また、破骨細胞と破骨細胞前駆細胞は、RANK と相反する機能を有する受容体、leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4 (LGR4) を発現する。さらに、破骨細胞の細胞上の eph-receptor interacting protein (Ephrin) B2 が骨芽細胞の EphB4 受容体と結合すると、そのシグナルは破骨細胞側にも伝達されて分化が抑制される。

プロポフォールが破骨細胞の分化に及ぼす影響を調べた先行研究では、細胞の培養期間を通じて継続的に破骨細胞や骨芽細胞をプロポフォールで刺激しており、一時的なプロポフォールによる曝露の影響は検討されていない。そこで本研究では、RANKL 誘導性の破骨細胞分化の過程におけるプロポフォールによる一時的あるいは継続的な刺激が、破骨細胞の分化に及ぼす影響について検討した。

本研究では、マウス単球/マクロファージ由来の RAW264.7 細胞を破骨細胞前駆細胞として用いた。RAW264.7 細胞を 24-well または 96-well プレートに播種し、10%ウ

シ胎児血清と 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含有した  $\alpha$ -minimal essential medium で、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で一晩、培養した。その後、50 ng/ml の可溶性 RANKL と 0 (コントロール)、10、20 または 30  $\mu$ M のプロポフォールを含む培地に交換し、5 時間、1.5 日間または 4 日間培養して RAW264.7 細胞を刺激した。培養期間は 4 日間とし、5 時間と 1.5 日間プロポフォールで刺激した後は、プロポフォールを含まない RANKL 添加培地で培養を継続した。培養 4 日目に tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色キットを用いて細胞を染色して破骨細胞様細胞の形成を確認した。また、細胞から全 RNA を抽出した後に cDNA を合成し、これを鋳型として DC-STAMP, OC-STAMP, LGR4, RANK および EphrinB2 の遺伝子発現を real-time PCR 法で調べた。

DC-STAMP と OC-STAMP の発現は、5 時間の刺激では、すべてのプロポフォール濃度で影響は認められなかった。一方、1.5 日間と 4 日間の刺激では、コントロールに比べて 10、20 または 30  $\mu$ M のプロポフォールで DC-STAMP と OC-STAMP の発現が低下した。LGR4 の発現は、5 時間の刺激では、コントロールに比べて 20  $\mu$ M と 30  $\mu$ M のプロポフォールで上昇したが、1.5 日間の刺激では、プロポフォールの影響は認められなかった。また、4 日間の刺激では、すべての濃度のプロポフォールで LGR4 の発現が上昇した。RANK の発現は、コントロールに比べて 20  $\mu$ M のプロポフォールによる 5 時間の刺激で低下し、30  $\mu$ M では僅かに増加した。また、1.5 日間と 4 日間の刺激では、コントロールと比較して 10、20 または 30  $\mu$ M のプロポフォールで RANK の発現が低下した。一方、EphrinB2 の発現は、5 時間、1.5 日間および 4 日間の刺激で、コントロールと比較して 20  $\mu$ M と 30  $\mu$ M のプロポフォールで上昇した。

TRAP の染色性は、5 時間のプロポフォール刺激では、30  $\mu$ M の濃度で僅かに低下したが、10  $\mu$ M と 20  $\mu$ M のプロポフォールでは、コントロールと同程度であった。一方、1.5 日間と 4 日間の継続刺激では、プロポフォールの濃度依存的に TRAP 陽性

の破骨細胞様細胞の形成が抑制された。TRAP 陽性細胞を核数別に 3 から 5 核, 6 から 9 核, 10 核以上に分類して比較した結果, 5 時間の刺激では, いずれの分類の TRAP 陽性細胞の数も 30  $\mu$ M のプロポフォールでわずかに減少し, 10  $\mu$ M と 20  $\mu$ M のプロポフォールによる変化は観察されなかった。一方, 1.5 日間の刺激では, いずれの分類の TRAP 陽性細胞数も, コントロールに比べて 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M および 30  $\mu$ M のプロポフォールで減少した。この減少傾向は, 4 日間の継続的な刺激でも同様に認められた。

本研究では, プロポフォールで 4 日間継続的に刺激された RAW264.7 細胞だけでなく, 一過性 (1.5 日間) のプロポフォール刺激の後に RANKL 存在下での培養を続けた RAW264.7 細胞でも, DC-STAMP と OC-STAMP の発現低下が認められた。さらに, プロポフォールで 4 日間, 継続的に刺激された細胞と 1.5 日刺激された細胞の両方で RANK の発現の低下が認められた。一方, 破骨細胞の分化に抑制的に働く RANKL 受容体である LGR4 の発現は, プロポフォールの 1.5 日刺激では変化せず, 4 日間の継続刺激で増加した。これらの結果から, プロポフォールによる一時的な刺激が 1 日を超えると RANK 発現の低下を介して, また, 刺激がさらに継続するとこれに加えて LGR4 発現が増加して, RANKL 誘導性の破骨細胞分化が抑制されると考えられた。また, 本研究では, EphrinB2 の遺伝子発現は, いずれの刺激時間においてもプロポフォールで増加した。すなわち, プロポフォールは, RANKL/RANK 経路だけでなく, EphrinB2/EphB4 経路にも影響を与え, 破骨細胞分化を抑制する可能性が示唆された。

結論として, 数時間で低濃度のプロポフォール投与は, RANKL 誘導性の破骨細胞分化に顕著な影響を及ぼさないが, 数日間のプロポフォールによる曝露を受けると, その後, 投与を中断しても破骨細胞の分化が抑制されると考えられた。すなわち, プロポフォールの持続投与は, 骨リモデリングのバランスを損なう可能性が示唆された。

本論文は、*Journal of Hard Tissue Biology*, (30: 107-114, 2021) に掲載された論文 (Continuous administration of propofol suppresses osteoclast differentiation of RAW264.7 cells) を基幹論文とし、これにプロポフォールが EphrinB2 発現に及ぼす影響を調べた結果 (Fig. 7) を加えて総括したものである。

## 緒 言

プロポフォールは、鎮静、催眠、健忘あるいは制吐作用を有する静脈麻酔薬であり、 $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) A 受容体のアゴニストと N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体のアンタゴニストとして働き、中枢神経を広く抑制する<sup>1,2)</sup>。プロポフォールは、生体内での蓄積性が低く、早い作用発現と短い半減期などの利点を有する<sup>2,3)</sup>。一方、近年、中枢神経毒性による脳の発達の異常など、全身麻酔薬の繰り返し、あるいは長期間の使用に起因する有害作用も指摘されている (FAD Drug Safety Communication, 2017)。プロポフォールは、顎骨への侵襲を伴う長時間の口腔外科処置など様々な手術時の鎮静や全身麻酔に頻用されている。骨リモデリングに関与する顎骨の骨芽細胞と破骨細胞もまた、プロポフォールの曝露を受けると考えられる。

破骨細胞は、骨吸収で中心的な役割を担う多核の巨細胞であり、造血幹細胞由来の単球・マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞が互いに融合して破骨細胞へと分化する<sup>4,5)</sup>。その分化の過程において、receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) ligand (RANKL) と osteoprotegerin (OPG) の2つのサイトカインが重要な役割を果たす。骨芽細胞やリンパ球が産生する RANKL が破骨細胞前駆細胞に発現する RANK に結合すると、破骨細胞の分化が強く誘導され、破骨細胞性骨吸収は促進する<sup>6)</sup>。dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) と osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP) は、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化の過程で発現が増加し、破骨細胞前駆細胞の融合に関与する<sup>7-10)</sup>。一方、骨芽細胞が産生する RANKL のおとり受容体である OPG は、RANKL/RANK の作用を減弱化させ、破骨細胞性骨吸収を抑制する<sup>7)</sup>。また、破骨細胞と破骨細胞前駆細胞は、RANK と相反する機能を有する受容体、leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4 (LGR4) を発現する。すなわち、破骨細胞の形成は、RANKL と RANK の結合で促進し、RANKL

と LGR4 との結合で抑制される<sup>7,11,12)</sup>。さらに、破骨細胞は、eph-receptor interacting protein (Ephrin) B2 を細胞表面に発現し、Ephrin B2 がリガンドとして骨芽細胞の EphB4 受容体と結合すると、そのシグナルは破骨細胞側にも伝達されて分化が抑制される<sup>13,14)</sup>。

プロポフォールが破骨細胞の分化に及ぼす影響を調べた先行研究では、プロポフォール投与が骨芽細胞による RANKL/OPG 産生比の低下を招き、破骨細胞の形成が減少すること<sup>15)</sup>や、破骨細胞へのプロポフォールの直接刺激で DC-STAMP の発現が増加し、破骨細胞の分化が促進すること<sup>16)</sup>が報告されている。プロポフォールは使用目的によって投与時間が異なるが、前述の先行研究では、細胞の培養期間を通じて継続的に破骨細胞や骨芽細胞をプロポフォールで刺激しており、一時的なプロポフォールによる曝露の影響は検討されていない。そこで本研究では、RANKL 誘導性の破骨細胞分化の過程におけるプロポフォールによる一時的あるいは継続的な刺激が、破骨細胞の分化に及ぼす影響について検討した。

## 材料および方法

### 破骨細胞の培養とプロポフォールによる刺激

本研究では、マウス単球/マクロファージ由来の RAW264.7 細胞 (大日本住友製薬) を破骨細胞前駆細胞として用いた。本細胞は macrophage colony stimulating factor (M-CSF) を必要とすることなく、RANKL の存在下で破骨細胞へ分化することが報告されている<sup>17-19)</sup>。RAW264.7 細胞を 24-well または 96-well プレートに  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種し、10%ウシ胎児血清と 1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) を含有した  $\alpha$ -minimal essential medium (富士フィルム和光純薬) で、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で一晩、培養した。その後、50 ng/ml の可溶性 RANKL (富士フィルム和光純薬) と 0 (コントロール), 10, 20 または 30  $\mu$ M のプロポフォール (丸石製薬) を含む培地に交換し、5 時間、1.5 日間または 4 日間培養して RAW264.7 細胞を刺激した。培養期間は 4 日間とし、5 時間と 1.5 日間プロポフォールで刺激した後は、プロポフォールを含まない RANKL 添加培地で培養を継続した (Fig. 1)。

### Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色

破骨細胞様細胞の形成は、TRAP 染色キット (コスモバイオ) を用いて細胞を染色して確認した。細胞の染色像を倒立顕微鏡 (DIAPHOT; Nikon) を用いて撮影し、画像上で TRAP 活性陽性細胞 (破骨細胞様細胞) の数を計測した。

### 定量 real-time polymerase chain reaction (PCR)

NucleoSpin RNA 抽出キット (タカラバイオ) を用いて、プロポフォールで 5 時間、1.5 日間または 4 日間刺激された細胞から全 RNA を抽出した。PrimeScript™ RT 試薬キット (タカラバイオ) に付属のランダムプライマー、dNTP と逆転写酵素を含む 20



μL の反応液に、1 μg の RNA を加えて cDNA を合成し、定量 real-time PCR に供した。PCR の反応液 25 μL の組成は、1×RPR buffer, 1.5 mM dNTP mixture, 1×TB green I, 15 mM NgCl<sub>2</sub>, 0.25 unit Ex Taq polymerase を含む TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> solution (タカラバイオ), 20 μM の forward と reverse のプライマー, および 2 μl の cDNA 溶液とした。なお、プライマーの塩基配列を Table 1 に示す。先行研究<sup>18,19)</sup>を参考に、熱変性, アニーリング, 伸長反応からなる PCR 反応熱サイクルを 35 回くり返した。Smart Cycler ソフトウェア (Cepheid) を用いて結果を分析し、PCR 産物の特異性は、融解曲線分析を用いて確認した。DC-STAMP, OC-STAMP, LGR4, RANK および EphrinB2 の遺伝子発現レベルは glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) で補正し、コントロールとの相対比を求めた。

### 統計学的分析

結果は、一元配置分散分析後、Tukey の多重比較検定法を用いて検定した。 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 成 績

### DC-STAMP と OC-STAMP の遺伝子発現に及ぼすプロポフォールの影響

RANKL 存在下にて 5 時間, 1.5 日間または 4 日間プロポフォールで刺激された RAW264.7 細胞の培養 4 日目における DC-STAMP と OC-STAMP の遺伝子発現を, real-time PCR で調べた。DC-STAMP の発現は, 5 時間のプロポフォール刺激では, コントロール (0  $\mu\text{M}$ ) と比較してわずかに増加したが, すべてのプロポフォール濃度とコントロールとの間に有意差は認められなかった (Fig. 2A)。一方, 1.5 日間と 4 日間の刺激では, コントロールと比較してすべてのプロポフォール濃度で DC-STAMP の発現が有意に低下した (Fig. 2B, C)。DC-STAMP の発現と同様に OC-STAMP の発現もまた, 5 時間の刺激ではすべてのプロポフォール濃度とコントロールとの間に有意差は認められず (Fig. 3A), 1.5 日間と 4 日間の刺激では, コントロールと比較して 10, 20 または 30  $\mu\text{M}$  のプロポフォールで有意に低下した (Fig. 3B, C)。

### TRAP 陽性多核の破骨細胞様細胞の形成に及ぼすプロポフォールの影響

RANKL 存在下にて 5 時間, 1.5 日間または 4 日間プロポフォールで刺激された RAW264.7 細胞を培養 4 日目に TRAP 染色した。5 時間のプロポフォール刺激では, 30  $\mu\text{M}$  の濃度で僅かに TRAP の染色性が低下したが, 10  $\mu\text{M}$  と 20  $\mu\text{M}$  のプロポフォールでは, コントロール (0  $\mu\text{M}$ ) と同程度の染色性を示した。一方, 1.5 日間の刺激では 4 日間の継続刺激と同程度, プロポフォールの濃度依存的に TRAP 陽性の破骨細胞様細胞の形成の抑制が認められた (Fig. 4A, B)。TRAP 陽性細胞を核数別に small (3 から 5 核), medium (6 から 9 核), large (10 核以上) に分類して比較した結果を Fig. 4C に示す。5 時間の刺激では, いずれの分類の TRAP 陽性細胞の数も 30  $\mu\text{M}$  のプロポフォールでわずかに減少し, コントロール (0  $\mu\text{M}$ ) に比べて有意差を認めたが, 10

$\mu\text{M}$  と  $20 \mu\text{M}$  のプロポフォールによる変化は観察されなかった。さらに、1.5 日間の刺激では、small, medium および large のいずれの分類の TRAP 陽性細胞数も、コントロールに比べて  $10 \mu\text{M}$ ,  $20 \mu\text{M}$  および  $30 \mu\text{M}$  のプロポフォールで有意に減少した。この減少傾向は、4 日間の継続的な刺激でも同様に認められた (Fig. 4C)。

### **LGR4 と RANK の遺伝子発現に及ぼすプロポフォールの影響**

RANKL 存在下にて 5 時間, 1.5 日間または 4 日間プロポフォールで刺激された RAW264.7 細胞の培養 4 日目における LGR4 と RANK の遺伝子発現を, real-time PCR で調べた。LGR4 の発現は, コントロール ( $0 \mu\text{M}$ ) と比較して  $20 \mu\text{M}$  と  $30 \mu\text{M}$  のプロポフォールによる 5 時間の刺激で有意に上昇した (Fig. 5A)。また, 4 日間の刺激では, コントロールと比較してすべての濃度のプロポフォールで LGR4 の発現が有意に上昇した (Fig. 5C)。一方, 1.5 日間の刺激では, すべての濃度のプロポフォールとコントロールとの間で LGR4 の発現に有意差は認められなかった (Fig. 5B)。RANK の発現は, コントロールに比べて  $20 \mu\text{M}$  のプロポフォールによる 5 時間の刺激で有意に低下し,  $30 \mu\text{M}$  では有意に増加した (Fig. 6A)。また, 1.5 日間の刺激では, コントロールと比較して  $20 \mu\text{M}$  と  $30 \mu\text{M}$  のプロポフォールで RANK の発現が有意に低下した (Fig. 6B)。さらに, 4 日間の刺激では, コントロールと比較してすべての濃度のプロポフォールで, RANK の発現は有意に低下した (Fig. 6C)。

### **EphrinB2 の遺伝子発現に及ぼすプロポフォールの影響**

RANKL 存在下にて 5 時間, 1.5 日間または 4 日間プロポフォールの刺激を受けた RAW264.7 細胞の培養 4 日目における EphrinB2 の遺伝子発現を, real-time PCR で調べた。5 時間, 1.5 日間および 4 日間の刺激で, コントロール ( $0 \mu\text{M}$ ) と比較して  $20 \mu\text{M}$  と  $30 \mu\text{M}$  のプロポフォールで EphrinB2 の発現は有意に上昇した (Fig. 7A, B, C)。

## 考 察

本研究では、短時間の鎮静や全身麻酔でプロポフォールが一時的に投与された場合、破骨細胞の分化に与える影響は僅かであることが示唆された。一方、プロポフォールの投与が1日以上継続すると、その後、投与を中断しても継続的な投与と同程度に骨のリモデリングに影響が及ぶ可能性があると考えられた。

これまでに、破骨細胞の分化に及ぼすプロポフォールの影響は、破骨細胞前駆細胞への直接刺激と骨芽細胞を介した間接的な刺激で異なることが報告されている。Kim ら<sup>16)</sup>は、継続的なプロポフォール刺激が、マウス骨髄由来マクロファージ系細胞の破骨細胞への分化を誘導したと報告している。一方、Lee ら<sup>15)</sup>は、マウス頭蓋冠から分離した骨芽細胞をプロポフォールで刺激すると、RANKL/OPG 発現の比率が著しく減少したと報告している。さらに Lee ら<sup>15)</sup>は、プロポフォールで7日間刺激した骨芽細胞の培養上清を含む培地で破骨細胞前駆細胞を培養すると、破骨細胞の分化が抑制されることも報告している。本研究では Kim らの報告<sup>16)</sup>とは異なり、破骨細胞前駆細胞へのプロポフォールの直接的な刺激は、破骨細胞の分化を抑制した。破骨細胞前駆細胞への直接的な刺激と骨芽細胞を介した間接的な刺激の違いはあるものの、本研究結果は、プロポフォールが破骨細胞の分化を抑制する効果を報告した Lee ら<sup>15)</sup>の知見と一致した。

本研究と Kim らの研究<sup>16)</sup>では、使用した細胞などの実験条件にいくつかの違いが認められる。すなわち、Kim らの研究<sup>16)</sup>では M-CSF と RANKL の存在下でマウス骨髄から分離した単球系の細胞をプロポフォールで刺激している。一方、本研究では、RANKL 誘導性の破骨細胞分化のモデルとして多用されている RAW264.7 細胞を使用し、培地に M-CSF を添加していない。また、影響を認めたプロポフォールの濃度にも違いが認められる。Kim らの研究<sup>16)</sup>では、臨床で想定される血中濃度の範囲<sup>20)</sup>で

ある 5~20  $\mu\text{M}$  のプロポフォールでは、DC-STAMP の発現と TRAP 陽性細胞数に影響は認められず、破骨細胞の分化を促進したプロポフォールの濃度は 50  $\mu\text{M}$  であった。一方、われわれは刺激濃度を検討するためのパイロット実験として RAW264.7 細胞を 50  $\mu\text{M}$  のプロポフォールで刺激したところ、細胞増殖が著しく抑制された（データ未提示）。したがって本研究では、細胞増殖に影響を認めなかった 10~30  $\mu\text{M}$  のプロポフォールで RAW264.7 細胞を刺激することとした。

RANKL が RANK に結合すると、破骨細胞の分化に関与する転写因子 nuclear translocation of nuclear factor of activated T cells c1 が、DC-STAMP の発現プロモータに結合する。これにより、細胞の融合と多核化に必須である DC-STAMP の mRNA の転写が開始される<sup>21)</sup>。また、RANKL の存在下での破骨細胞形成は、OC-STAMP によっても促進する<sup>22)</sup>。本研究では、プロポフォールで 4 日間継続的に刺激された RAW264.7 細胞だけでなく、一過性（1.5 日間）のプロポフォール刺激の後に RANKL 存在下での培養を続けた RAW264.7 細胞でも、DC-STAMP と OC-STAMP の発現低下が認められた。さらに、プロポフォールで 4 日間、継続的に刺激された細胞と 1.5 日刺激された細胞の両方で RANK の発現の低下が認められた。一方、破骨細胞の分化に抑制的に働く RANKL 受容体<sup>7,11,12)</sup>である LGR4 の発現は、RANK 発現の結果とは異なりプロポフォールの 1.5 日刺激では変化せず、4 日間の継続刺激で増加した。これらの結果から、プロポフォールによる一時的な刺激が 1 日を超えると RANK 発現の低下を介して、また、刺激がさらに継続するとこれに加えて LGR4 発現が増加して、RANKL 誘導性の破骨細胞分化を抑制すると考えられた。

骨芽細胞に発現する EphB4 受容体に破骨細胞の EphrinB2 が結合すると、破骨細胞の分化が抑制されることが知られている<sup>13,14)</sup>。そこで、本研究では EphrinB2 の遺伝子発現に及ぼすプロポフォール刺激の影響を調べた。その結果、いずれの刺激時間においてもコントロールに比べて 20  $\mu\text{M}$  と 30  $\mu\text{M}$  のプロポフォールで EphrinB2 の発現

は増加した。これらの結果から、プロポフォールは RANKL/RANK 経路だけでなく、EphrinB2/EphB4 経路にも影響を与えて破骨細胞分化を抑制する可能性が示唆された。今後、プロポフォールが骨芽細胞の EphB4 の発現に及ぼす影響を検討する必要がある。

本研究では、プロポフォールの 4 日間の継続的な刺激だけでなく、1 日を超えた後に刺激を中断しても破骨細胞様細胞の形成の抑制が認められた。破骨細胞性骨吸収の抑制は、骨リモデリングのバランスを崩すだけでなく、骨に侵襲性のある治療では創傷治癒への影響も懸念される。すなわち、静脈麻酔薬の長期あるいは頻回の使用は、骨疾患のリスクを有する患者や骨に侵襲を伴う処置では、慎重を要すると考えられる。これまでに、プロポフォールの長時間あるいは繰り返しの投与に起因するプロポフォール症候群<sup>23)</sup>では、その症状に骨代謝の変調は報告されていない。しかし、プロポフォールの長期間の投与例が増えると、骨代謝への影響も明らかとなる可能性がある。

## 結 論

本研究結果から、数時間の低濃度のプロポフォール投与は、RANKL 誘導性の破骨細胞分化に顕著な影響を及ぼさないが、数日間のプロポフォールによる曝露を受けると、その後、投与を中断しても破骨細胞の分化・融合が抑制されると考えられた。すなわち、プロポフォールの持続投与は、骨リモデリングのバランスを損なう可能性が示唆された。

## 文 献

1. Chidambaran V, Costandi A and D'Mello A. Propofol: a review of its role in pediatric anesthesia and sedation. *CNS Drugs* 29: 543-563, 2015
2. Kotani Y, Shimazawa M, Yoshimura S, Iwama T and Hara H. The experimental and clinical pharmacology of propofol, an anesthetic agent with neuroprotective properties. *CNS Neurosci Ther* 14: 95-106, 2008
3. Hughes MA, Glass PS and Jacobs JR. Context-sensitive half-time in multicompartment pharmacokinetic models for intravenous anesthetic drugs. *Anesthesiology* 76: 334-341, 1992
4. Kylmaoja E, Nakamura M and Tuukkanen J. Osteoclasts and remodeling based bone formation. *Curr Stem Cell Res Ther* 11: 626-633, 2016
5. Karsenty G, Kronenberg HM and Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 629-648, 2009
6. Nakashima T and Takayanagi H. New regulation mechanisms of osteoclast differentiation. *Ann NY Acad Sci* 1240: e13-e18, 2011
7. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM and Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res* 59: 99-107, 2018
8. Asagiri M and Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 40: 251-264, 2007
9. Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y and Suda T. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med* 202: 341-351, 2005
10. Witwicka H, Hwang SY, Reyes-Gutierrez P, Jia H, Odgren PE, Donahue LR, Birnbaum MJ and Odgren PR. Studies of OC-STAMP in osteoclast fusion: a new knockout mouse model, rescue of cell fusion, and transmembrane topology. *PLoS One* 10: e0128275, 2015
11. Luo J, Yang Z, Ma Y, Yue Z, Lin H, Qu G, Huang J, Dai W, Li C, Zheng C, Xu L, Chen H, Wang J, Li D, Siwko S, Penninger JM, Ning G, Xiao J and Liu M. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Nat Med* 22: 539-546, 2016
12. Matsuike R, Tanaka H, Nakai K, Kanda M, Nagasaki M, Murakami F, Shibata C, Mayahara K, Nakajima A, Tanabe N, Kawato T, Maeno M and Shimizu N. Continuous application of compressive force induces fusion of osteoclast-like RAW264.7 cells via upregulation of RANK and downregulation of LGR4. *Life Sci* 201: 30-36, 2018
13. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Suda T and Matsuo K. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab* 4: 111-21, 2006
14. Tazaki Y, Sugitani K, Ogai K, Kobayashi I, Kawasaki H, Aoyama T, Suzuki N, Tabuchi Y, Hattori A and Kitamura KI. RANKL, Ephrin-Eph and Wnt10b are key intercellular communication molecules regulating bone remodeling in autologous transplanted goldfish scales. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 225: 46-58, 2018
15. Lee DW, Kwon JY, Kim HK, Lee HJ, Kim ES, Kim HJ, Kim HJ and Lee HB. Propofol attenuates osteoclastogenesis by lowering RANKL/OPG ratio in mouse osteoblasts. *Int J Med Sci* 15: 723-729, 2018
16. Kim EJ, Kim HJ, Baik SW, Kim KH, Ryu SJ, Kim CH and Shin SW. Propofol promotes osteoclastic bone resorption by increasing DC-STAMP expression. *J Dent Anesth Pain*



Med 18: 349-359, 2018

17. Takayanagi H. Osteoimmunology: Shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 7: 292-304, 2007
18. Tanaka H, Tanabe N, Kawato T, Nakai K, Kariya T, Matsumoto S, Zhao N, Motohashi M and Maeno M. Nicotine affects bone resorption and suppresses the expression of cathepsin K, MMP-9 and vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase d2 and actin organization in osteoclasts. *Plos One* 8: e59402, 2013
19. Kitami S, Tanaka H, Kawato T, Tanabe N, Katono-Tani T, Zhang F, Suzuki N, Yonehara Y and Maeno M. IL-17A suppresses the expression of bone resorption-related proteinases and osteoclast differentiation via IL17RA or IL-17RC receptors in RAW264.7 cells. *Biochimie* 92: 398-404, 2010
20. Gepts E, Camu F, Cockshott ID and Douglas EJ. Disposition of propofol administered as constant rate intravenous infusions in humans. *Anesth Analg* 66: 1256-1263, 1987
21. Kim K, Lee SH, Ha Kim J, Choi Y and Kim N. NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). *Mol Endocrinol* 22: 176-185, 2008
22. Yang M, Birnbaum MJ, MacKay CA, Mason-Savas A, Thompson B and Odgren PR. Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), a novel protein induced by RANKL that promotes osteoclast differentiation. *J Cell Physiol* 215: 497-505, 2008
23. Vasile B, Rasulo F, Candiani A and Latronico N. The pathophysiology of propofol infusion syndrome: a simple name for a complex syndrome. *Intensive Care Med* 29: 1417-1425, 2003

## 表および図

Table 1. PCR primer used in the experiments

DC-STAMP

Forward: CTAGCTGGCTGGACTTCATCC  
Reverse: TCATGCTGTCTAGGAGACCT

OC-STAMP

Forward: AGCTGTAGCCTGGGCTCAGAAG,  
Reverse: AGCCTGTGGTAGATGACAGTCGTG

LGR4

Forward: CTGATTGCCACGTGGGTTTAAGTAG  
Reverse: AGGACATTGCCAGTCCAGATGAG

RANK

Forward: TGCAGCTCAACAAGGATACG,  
Reverse: GAGCTGCAGACCACATCTGA

EphrinB2

Forward: ACCTGACTTCGGAGCTTGCA  
Reverse: GTAACACCCGAATCCATAGA

GAPDH

Forward: AAATGGTGAAGGTCGGTGTG  
Reverse: TGAAGGGGTCGTTGATGG

---

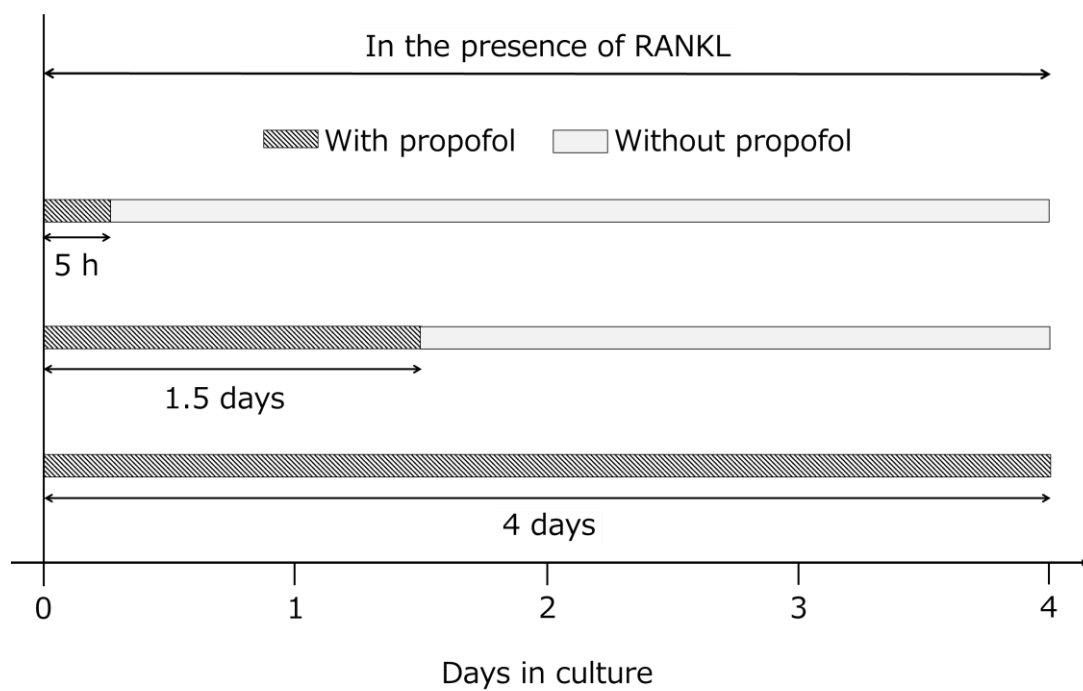


Fig. 1 The schematic diagram of the culture protocol for stimulation of RAW 264.7 cell with propofol.

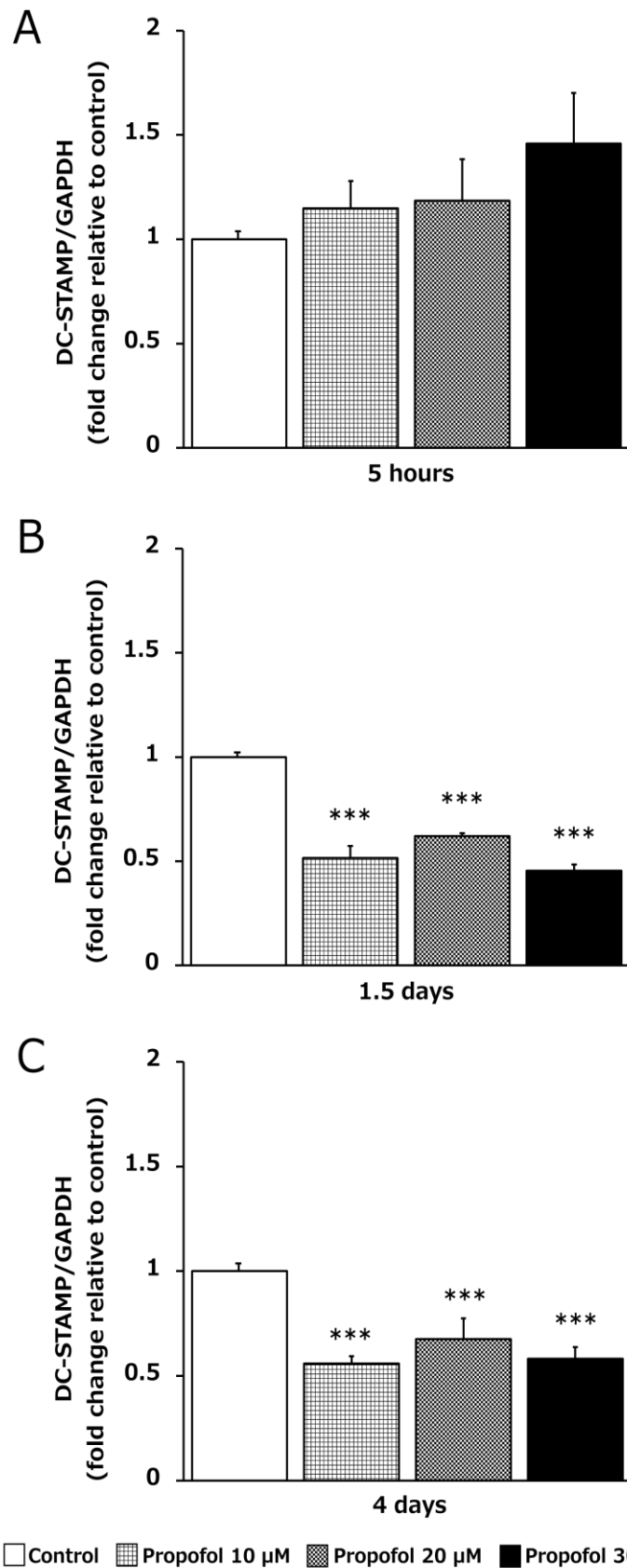


Fig. 2 Effects of propofol on DC-STAMP mRNA expression in RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0 (control), 10, 20, or 30  $\mu$ M propofol in the presence of RANKL for 5 h (A), 1.5 days (B) and 4 days (C), and DC-STAMP mRNA levels were determined on day 4 of culture by real-time PCR. Bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$  (vs. control).

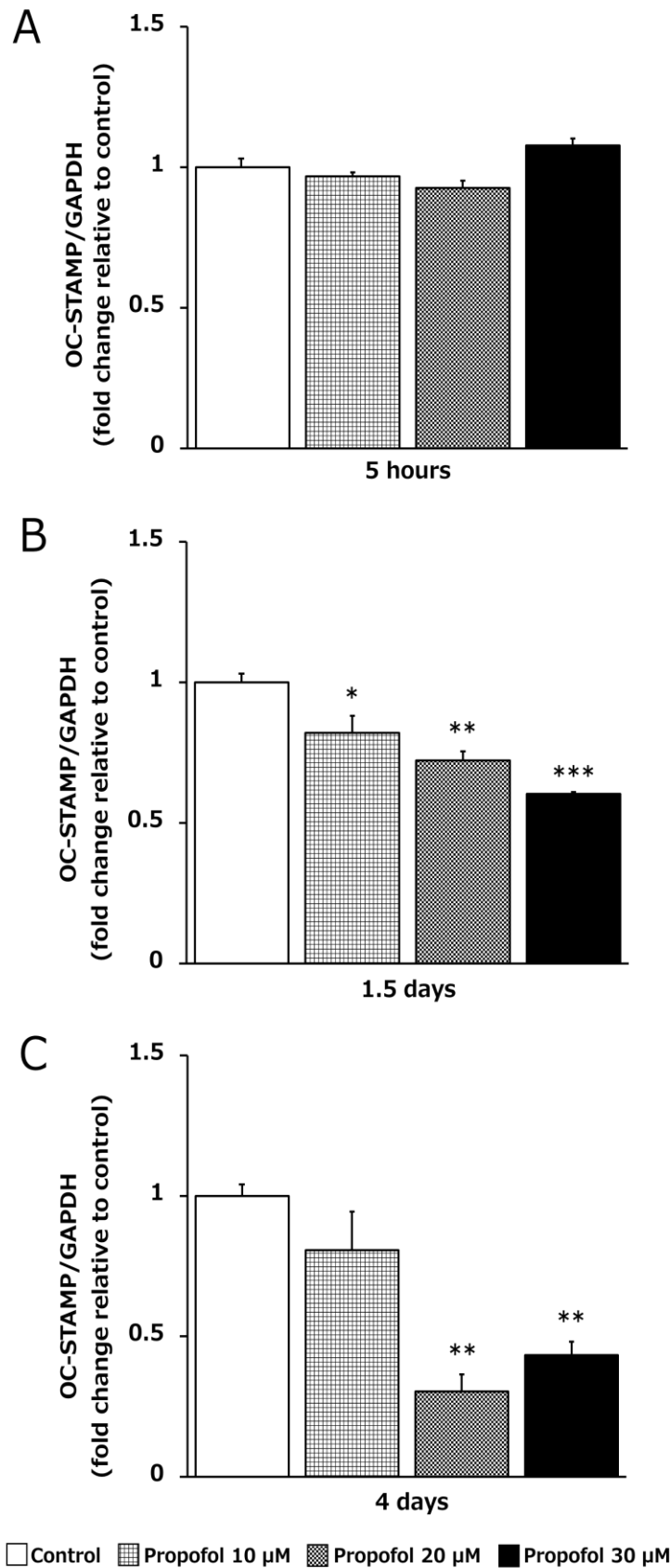


Fig. 3 Effects of propofol on OC-STAMP mRNA expression in RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0 (control), 10, 20, or 30  $\mu$ M propofol in the presence of RANKL for 5 h (A), 1.5 days (B) and 4 days (C), and OC-STAMP mRNA levels were determined on day 4 of culture by real-time PCR. Bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001 (vs. control).

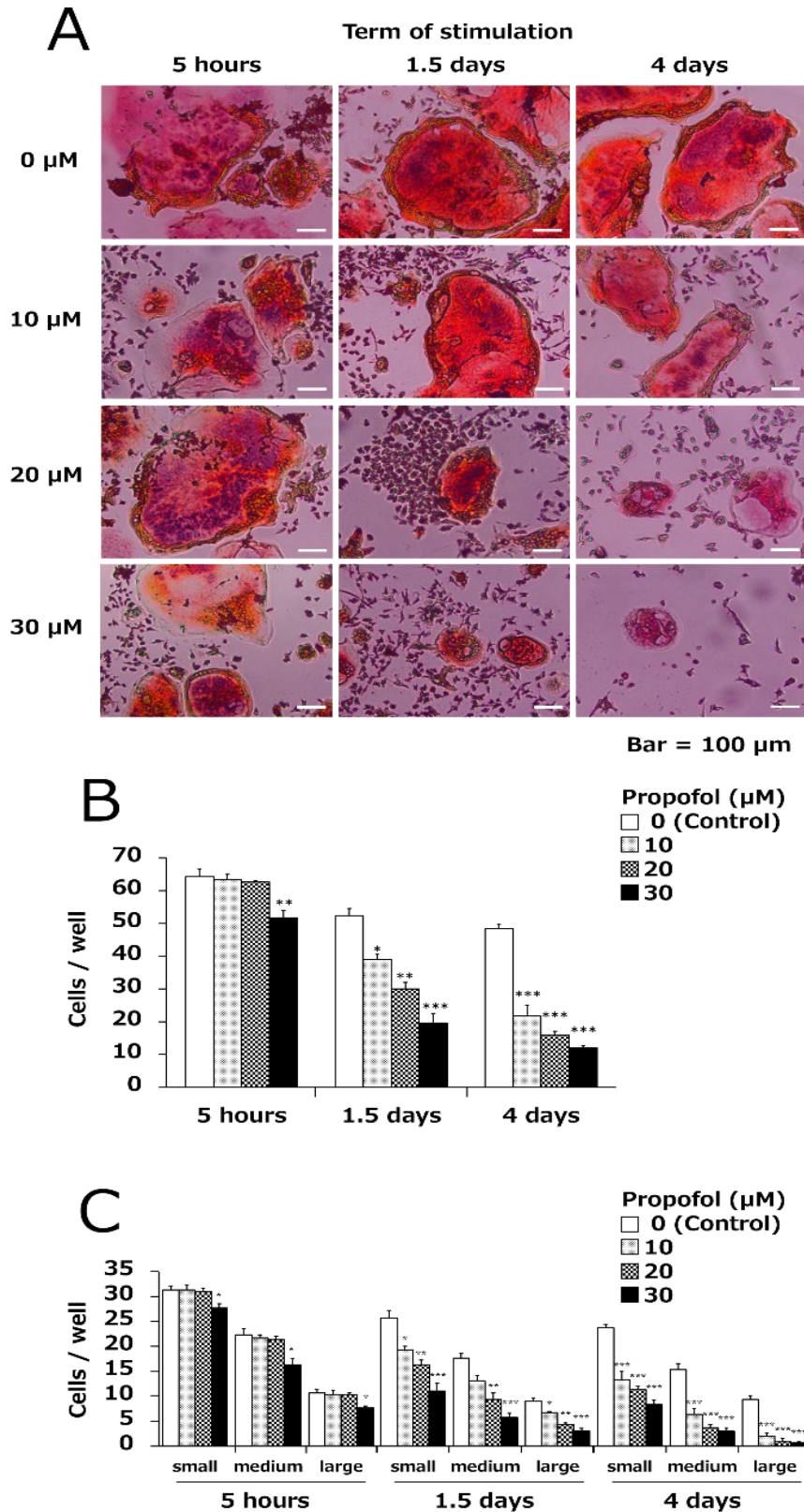


Fig. 4 Effects of propofol on TRAP staining. The cells were stimulated with 0 (control), 10, 20, or 30  $\mu\text{M}$  propofol in the presence of RANKL for 5 h, 1.5 days and 4 days. At the day 4 of culture, cells were stained for TRAP activity (A). TRAP-positive cells with more than three nuclei (B) as well as cells classified according to the number of nuclei (C) were counted on day 4 of culture. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (vs. control).

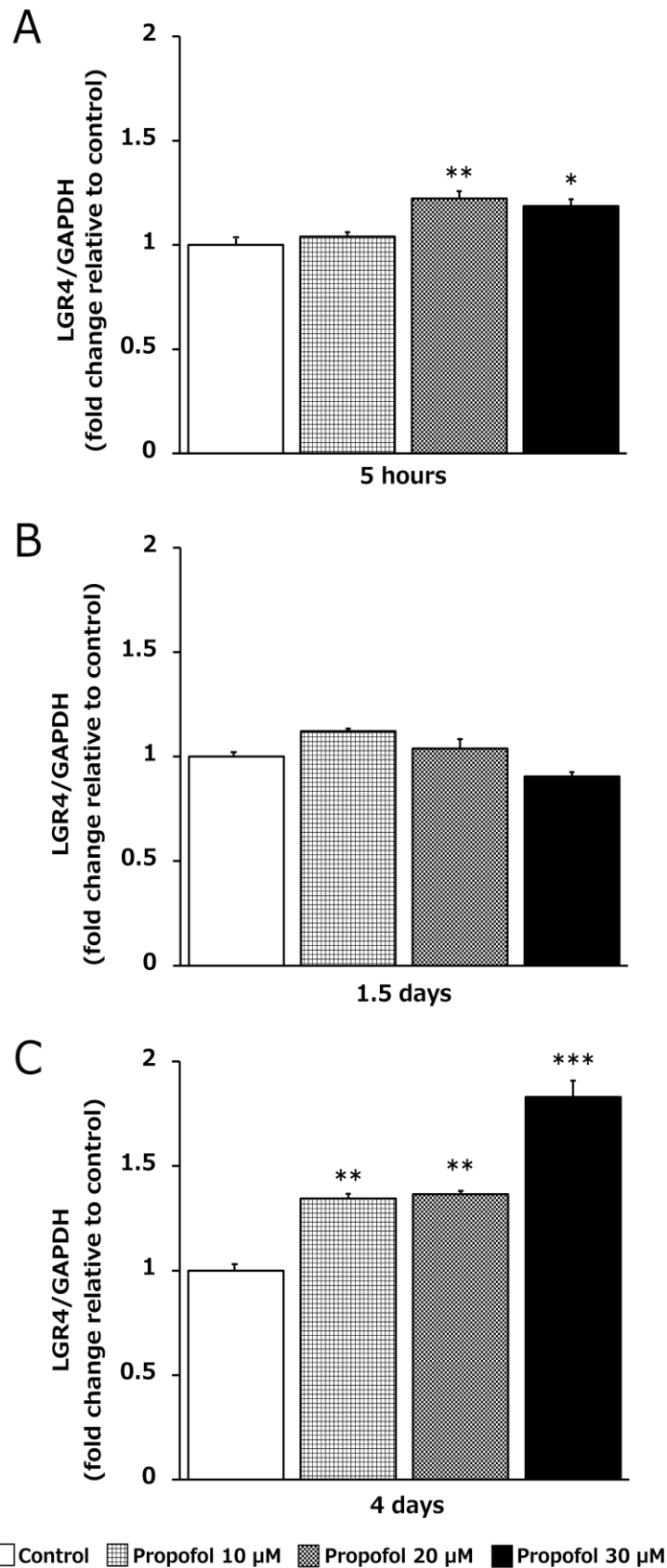


Fig. 5 Effects of propofol on LGR4 mRNA expression in RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0 (control), 10, 20, or 30  $\mu\text{M}$  propofol in the presence of RANKL for 5 h (A), 1.5 days (B) and 4 days (C), and LGR4 mRNA levels were determined on day 4 of culture by real-time PCR. Bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (vs. control).



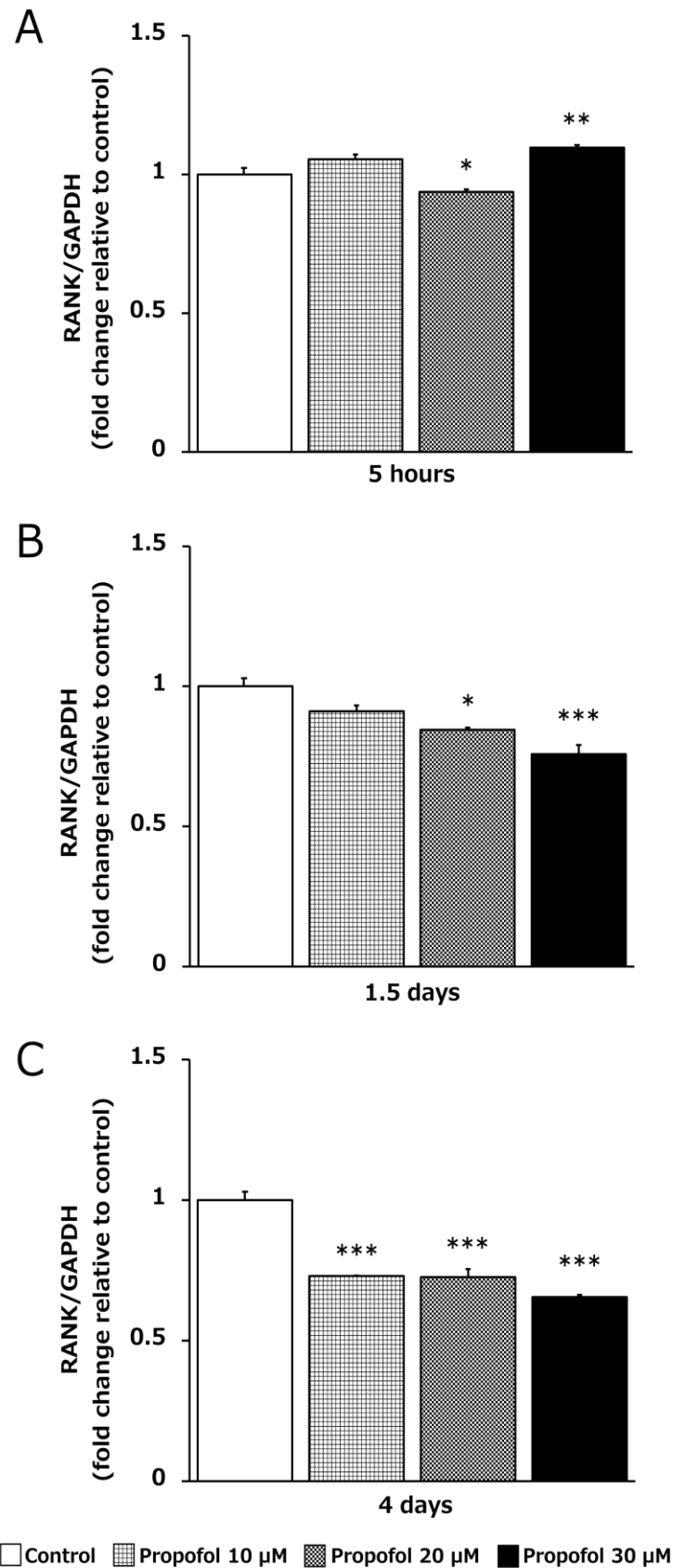


Fig. 6 Effects of propofol on RANK mRNA expression in RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0 (control), 10, 20, or 30 μM propofol in the presence of RANKL for 5 h (A), 1.5 days (B) and 4 days (C), and RANK mRNA levels were determined on day 4 of culture by real-time PCR. Bars indicate the mean ± standard deviation of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (vs. control).

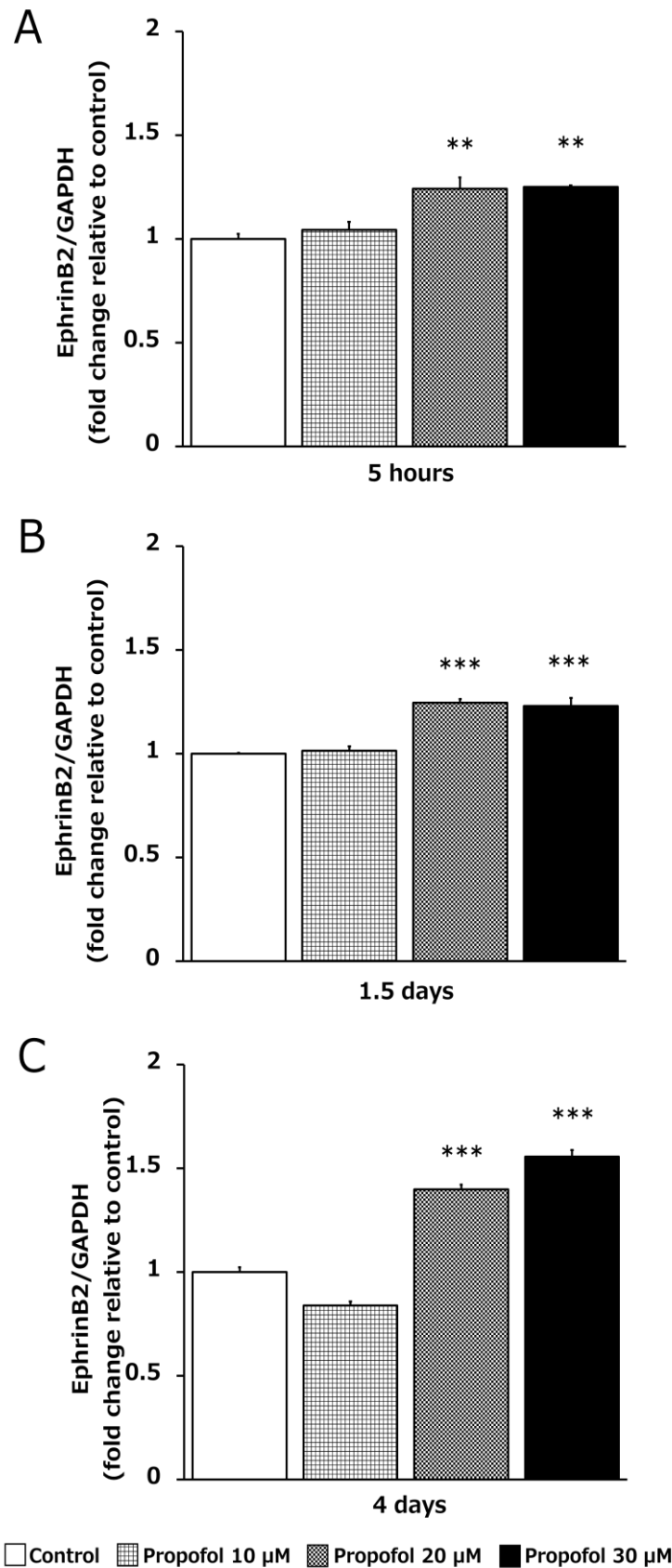


Fig. 7 Effects of propofol on EphrinB2 mRNA expression in RAW264.7 cells. The cells were stimulated with 0 (control), 10, 20, or 30  $\mu\text{M}$  propofol in the presence of RANKL for 5 h (A), 1.5 days (B) and 4 days (C), and EphrinB2 mRNA levels were determined on day 4 of culture by real-time PCR. Bars indicate the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  (vs. control).