



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	骨芽細胞の増殖, 分化と石灰化におけるNa, K-ATPaseの役割
Author(s)	山田, 淳一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11252号
Issue Date	2014-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11252
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58180
Type	doctoral thesis
File Information	Junichi_Yamada.pdf



博 士 論 文

骨芽細胞の増殖，分化と石灰化における
Na,K-ATPase の役割

平成 2 6 年 3 月 申請

北海道大学
大学院歯学研究科口腔医学専攻

山 田 淳 一

骨芽細胞の増殖，分化と石灰化における Na,K-ATPase の役割

山田 淳一

抄録：骨芽細胞による石灰化局所への Ca^{2+} の供給におけるイオントランスポーターの関与が知られているが，Na,K-ATPase の機能については解明されていない．本研究では，Na,K-ATPase の骨芽細胞の増殖，分化および石灰化における役割を明らかにすることを目的として行った．

細胞は MC3T3-E1 (E1) 細胞を用い，Na,K-ATPase 活性の経時的変化を検討した．次に Na,K-ATPase の特異的阻害薬である ouabain を作用させ，細胞増殖能，アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性および石灰化におよぼす影響について検討した．さらに，ouabain あるいは siRNA を用いて Na,K-ATPase を阻害して，BMP-2 による石灰化ならびにマーカー遺伝子 mRNA の発現，Smad1/5/8，MAPK のリン酸化の変化を検討した．

E1 細胞の Na,K-ATPase 活性は，confluence 以前に最も高く，その後減少し，confluence 後 18 日目に一過性に増加した．一方，confluence 以前に ouabain を作用させると細胞増殖は抑制された．また，confluence 後 18 日前後に ouabain を作用させると，ALP 活性ならびに石灰化は抑制された．同様に，Na,K-ATPase を阻害すると BMP-2 による石灰化ならびにマーカー遺伝子 mRNA 発現誘導は抑制された．ouabain を作用させても BMP-2 による Smad1/5/8 の Ser463 ならびに Ser465 残基のリン酸化の誘導にはほとんど変化がみられなかった．一方，ouabain により Smad 1 の Ser206 残基のリン酸化が誘導され，ERK ならびに p38 のリン酸化も誘導されたが，JNK のリン酸化は抑制された．

以上の結果から，骨芽細胞において，Na,K-ATPase は細胞増殖とともに，MAPK を介して石灰化の制御にも関与していることが示唆された．

キーワード：Na,K-ATPase，骨芽細胞，増殖，分化，石灰化

緒 言

動物細胞の細胞内外のイオン環境は異なっており， Na^+ ならびに Ca^{2+} 濃度は細胞内が細胞外より低く， K^+ 濃度は高く維持されている．Na,K-ATPase は動物細胞の形質膜に局在し，ATP 1 分子の加水分解と共役して 3 個の Na^+ を細胞外に，2 個の K^+ を細胞内に能動輸送することによりイオン勾配の形成・維持において重要な役割を演じている^{1,2)}．このようにして作られた Na^+ の電気化学的勾配は，細胞の体積や浸透圧の調節，ATP の加水分解を通じた細胞代謝レートの決定などの普遍的な機能に関与しており，それらに関して

Na,K-ATPase は重要な役割を担っている³⁾．さらに Na,K-ATPase は神経や筋肉細胞における活動電位の産生⁴⁾，臓器では小腸におけるブドウ糖やアミノ酸などの多くの分子の細胞内への輸送，腎臓における水とナトリウムの再吸収⁵⁾，などに関与していることが知られている．

骨組織においては，骨芽細胞ならびに破骨細胞がそれぞれ骨形成，骨吸収を担い，絶えず代謝が行われている．間葉系細胞に由来する骨芽細胞は骨形成に際して，骨基質蛋白合成と基質小胞を介した石灰化を誘導する．骨芽細胞の成熟過程においては，最初に細胞が増殖し，コラーゲンなどの石灰化基質を合成した後に細胞外に分泌して，形

成された基質にカルシウムやリンが蓄積して石灰化が生じる。その過程において、早期にはI型コラーゲン、アルカリ性フォスファターゼ (ALP)、オステオポンチン、後期にはオステオカルシン等のマーカー遺伝子の発現が上昇することが知られている⁶⁾。

Na,K-ATPaseは、骨において破骨細胞の形質細胞膜や透明帯に多く発現しており、細胞間融合や骨吸収に関与しているという報告がある⁷⁾。一方、骨芽細胞においてもNa,K-ATPaseの存在は報告^{8,9)}されているが、その機能についてはほとんど解明されていない。

心臓において、Na,K-ATPaseは $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX) と共役して細胞内の Ca^{2+} 濃度の調節に関与し、心筋の収縮を間接的に制御していることが知られている¹⁰⁻¹²⁾。

最近、骨芽細胞による石灰化局所への Ca^{2+} の供給にNCXやCa-ATPaseなどのイオントランスポーターが関与しているという報告¹³⁻¹⁷⁾がなされ、この機構においても、Na,K-ATPaseが関与している可能性が推測される。本研究では、骨芽細胞の増殖・分化と石灰化におけるNa,K-ATPaseの役割について検討を行った。

材料と方法

1. 試薬

ouabainはSIGMA (St. Louis, MO) より、Dimethyl Sulfoxide (DMSO)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、モリブデン酸アンモニウム、L-アスコルビン酸は和光純薬(大阪)より、Human-BMP-2 Recombinant ProteinはeBioscience (San Diego, CA) より、PhosSTOP[®]はRoche Applied Science

(Mannheim, Germany) より購入した。

2. 細胞培養

細胞はMC3T3-E1 clone 4 (E1) (American Type Culture Collection; ATCC, Manassas, VA) を用いた。細胞は10%牛胎児血清 (FBS) を含有した α -minimum essential medium (α -MEM), 5% CO₂-95% 空気下 (37 °C) にて通法に従い培養した。

3. 細胞増殖試験

細胞増殖試験はWST-8法に基づいたCell Counting Kit 8 (同仁化学研究所, 熊本) を用いて行った。96ウェルプレートに500 cells/wellで播種し、24時間インキュベートしたのちouabain (1-500 μM) を作用させ、0, 24, 48, 72時間後に測定した。

4. タンパク質量の測定

試料中のタンパク質の定量は、牛血清アルブミン (BSA) を標準タンパク質として、Micro BCA[™] Protein Assay Kit (タカラバイオ, 大津) を用いて、吸光マイクロプレートリーダーModel 550 (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) で570 nmの吸光度を測定し算出した。

5. Na,K-ATPase活性の測定

Na,K-ATPaseの活性は、ATP加水分解の結果生成された無機リン量をChiffletらの方法¹⁸⁾に従って定量することにより測定した。Na,K-ATPase活性の測定は、1 mM EDTA-tris, 25 mM Sucrose, 50 mM tris-HCl buffer (pH 7.4), 160 mM NaCl, 16 mM KCl, 5 mM MgCl₂を反応液とし、最終濃度3 mM ATP-trisを加えて反応を開始させ、37 °Cで30分間反応させた後に12% SDSを添加して停止した。酵素反応の結果生じた無機リンを1 N HCl, 1%モリブデン酸アンモニウム、L-アスコルビン酸にて発色させ、さらに、2%w/vクエン酸、

2 %w/v 亜ヒ酸, 2 %v/v 酢酸にて発色を増強させた後, HITACHI U-2000 分光光度計 (日立, 東京) を使用し, 850 nm で測定することにより定量した. Na,K-ATPase 活性の特異的な阻害剤である最終濃度 1 mM ouabain 存在下で検出される値を対照として差し引いた.

6. Western blot 法

細胞をプロテインホスファターゼ阻害剤カクテルである PhosSTOP を添加した Lysis Buffer (10 mM HEPES-KOH pH 7.5, 100 mM KCl, 0.1 % NP-40) で回収した. 10 µg のサンプルを 10 % SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後, polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P ; Merck Millipore, Billerica, MA) に転写した. ブロッキング反応は, Immuno Block[®] (DS Pharma Biomedical Co, 大阪) を用いて室温で 1 時間行った. 一次抗体として, 抗 p38 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) (1:500), 抗 β -Actin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000), 抗 Phospho-ERK1/2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000), 抗 ERK2 抗体 (BD Transduction Laboratories, Bergen County, NJ) (1:1000), 抗 Phospho-Smad1(Ser463/465)/5(Ser463/465)/8(Ser426/428) 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) (1:1000), 抗 Phospho-JNK 抗体 (Active Motif, Carlsbad, CA) (1:1000), 抗 JNK 抗体 (Active Motif) (1:1000), 抗 Phospho-Smad1(Ser206) 抗体 (Cell Signaling Technology) (1 : 1000), 抗 Phospho-c-Src 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000), 抗 c-Src 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000), 抗 Phospho-p38 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) (1:500) を使用し, それぞれ 4° C, オーバーナイトで反応させた後, 二次抗体として, 抗マウス

IgG1 抗体 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) (1:500), 抗マウス IgG2a 抗体 (Life Technologies Corporation) (1:2000), 抗マウス IgG2b 抗体 (Life Technologies Corporation) (1:1000), 抗ウサギ IgG 抗体 (Life Technologies Corporation) (1:3000), 抗マウス IgM 抗体 (Life Technologies Corporation) (1:2500) をそれぞれ室温で 1 時間反応させた. TBS-T (50 mM tris-HCl, PH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % tween) を用いて室温で 15 分間, 3 回洗浄後, Western Lightning[®] CDP-Star (PerkinElmer, Waltham, MA) を用いて検出した.

7. ALP 活性の測定

ALP 活性は, 細胞を 24well プレートで培養し, pNPP を基質としたラボアッセイ[™]ALP (和光純薬) を使用して測定した.

8. 石灰化結節の観察

Alizarin Red 染色は細胞をエタノールで固定後 PBS にて 2 回洗浄し, 1 % Alizarin Red S 水溶液 (和光純薬) にて 10 分間染色後, 精製水にて 3 回洗浄して, 顕微鏡下で観察した. その後, PBS で 15 分間洗浄し, 10 %セチルピリジニウムクロライドで 1 時間反応させ抽出してマイクロプレートリーダー (570 nm) で吸光度を測定して染色量を定量化した. von Kossa 染色は 10 %ホルマリン固定した細胞を 5 %硝酸銀水溶液で処理し, 紫外線を照射した後に, 5 %チオ硫酸ナトリウム水溶液で反応を停止し, 精製水にて洗浄後, 観察した.

9. Real time PCR 法

cDNA は TaqMan[®] Gene Expression Cells-to-CT[™] Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて合成した. mRNA の発現量は 7300 Real time PCR system (Applied Biosystems) を用い定量化した.

プライマーは Runx2 (assay ID, Mm00501580_m1), ALP (assay ID, Mm01187117_m1), オステオカルシン (assay ID, Mm03413826_mH), I 型コラーゲン (assay ID, Mm00483888_ml), GAPDH (part no, 4352339E) を用いた. 各 mRNA の発現量は GAPDH の発現量を用いて標準化し, 相対的発現量 ($\Delta \Delta C_t$ 法) を算出した.

10. small interfering RNA (siRNA) の導入

Na,K-ATPase $\alpha 1$ 遺伝子発現抑制は, HiPerFect (QIAGEN, Hilden, Germany) を用い, Na,K-ATPase $\alpha 1$ siRNA 導入による knockdown を行った. 導入は 48 時間行い, 使用した Na,K-ATPase $\alpha 1$ siRNA の塩基配列は Na,K-ATPase $\alpha 1$ -8 siRNA (5'-AAG ATGGCTATTATAACGGAA-3') , Na,K-ATPase $\alpha 1$ -9 siRNA (5'-TACAGCGTTCTT TGTCAGTAT-3') である.

11. データ処理

結果は平均 $\pm$ SD で表した. データ分析では t 検定を用い, $p < 0.05$ を有意差ありとした.

結 果

1. 骨芽細胞成熟における Na,K-ATPase 活性の変化

E1 細胞の Na,K-ATPase の活性は confluence 時に最も高く, 以降急激に低下したが, confluence 後 6 日目, 18 日目, および 30 日目では一過性に増加した(図 1A). さらに, confluence 前後の Na,K-ATPase 活性の変化を詳細に調べると confluence 以前の活性が最も高く, 経時的に減少することが明らかになった (図 1B).

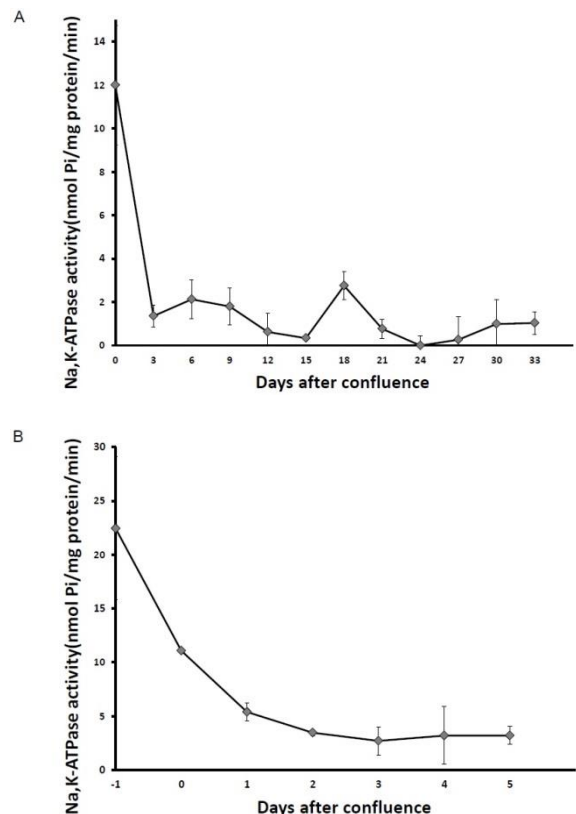


図 1. E1 細胞の Na,K-ATPase 活性の変化

E1 細胞を培養し, confluence 後 3 日毎 (A), さらに confluence 前後においては 1 日毎 (B) に Na,K-ATPase を測定した. (n=3)

2. Na,K-ATPase 阻害による E1 細胞の増殖に対する影響

E1 細胞に ouabain を添加し Na,K-ATPase を阻害すると, 濃度依存的な細胞増殖の抑制が位相差顕微鏡により観察された (図 2A). また, 細胞増殖への影響を WST-8 assay を用いて検討すると, 顕微鏡的観察結果と同様に ouabain 濃度依存的に細胞増殖の抑制が認められたが, 500 μ M ouabain においても細胞数の減少は認められず, 細胞死は生じていないものと推測された (図 2B).

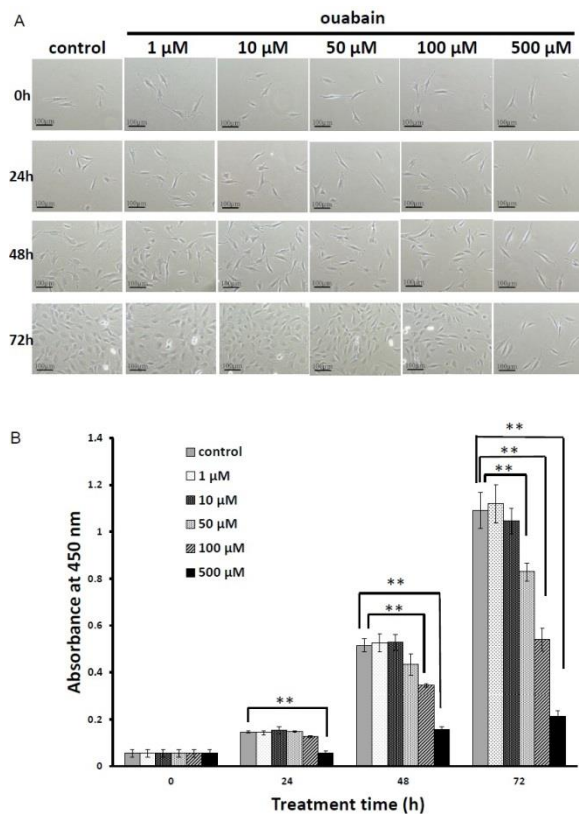


図 2. E1 細胞の増殖における Na,K-ATPase 阻害による影響

E1 細胞に ouabain (1~500 μM) を作用させ、細胞を経時的に位相差顕微鏡で観察 (A) し、WST-8 法により細胞増殖能を検討した (B). (n=3, ** $p < 0.01$)

3. 骨芽細胞分化・石灰化における Na,K-ATPase 阻害 の影響

E1 細胞に confluence 時より ouabain を作用させ、ALP 活性の経時的変化を調べた。その結果、ALP 活性は ouabain 濃度依存的に抑制された (図 3A)。さらに、E1 細胞の石灰化も ouabain 濃度依存的に抑制された (図 3B-3D)。

E1 細胞の Na,K-ATPase 活性は、confluence 後 18 日目に一過性の上昇が認められ (図 1A)、この時期は石灰化へと向けて E1 細胞の ALP 活性が急激に上昇する時期 (図 3A) に対応する。この Na,K-ATPase 活性の増加が ALP 活性の増加に関

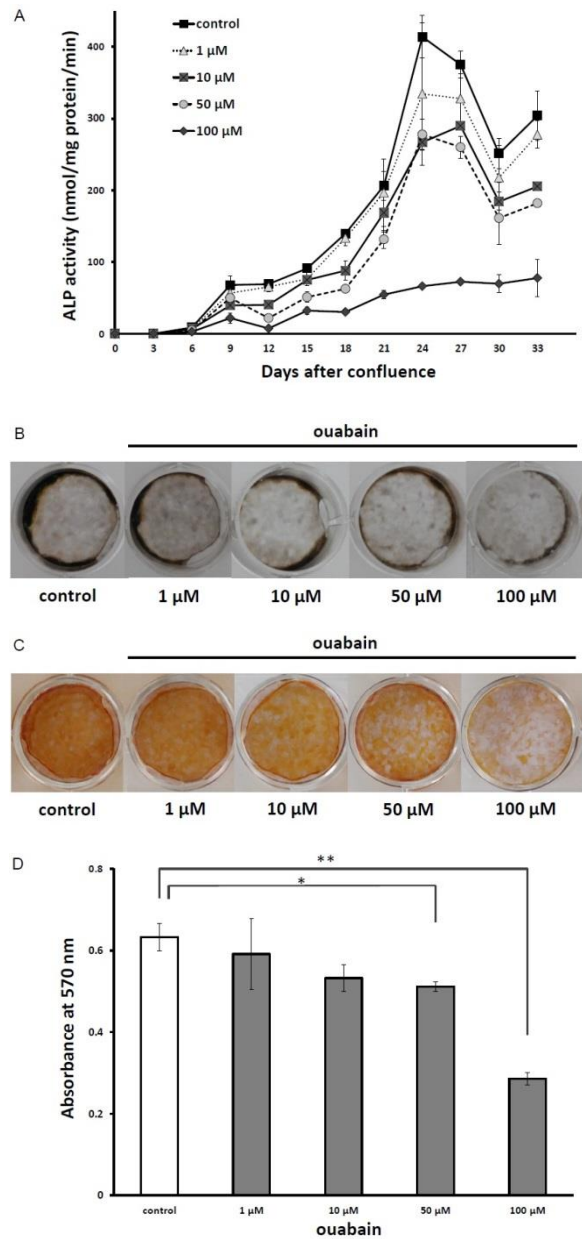


図 3. E1 細胞の石灰化に対する Na,K-ATPase 阻害による影響

E1 細胞を 24well プレートにて confluence まで培養し、ouabain (1~100 μM) を添加してさらに 33 日間培養し、3 日毎に ALP 活性を測定した (A)。confluence 後 33 日目に von Kossa 染色 (B) ならびに Alizarin Red 染色 (C) し、位相差顕微鏡にて観察した。さらに Alizarin Red 染色量について定量化 (D) を行った。(n=3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

連するのではないかと推測し、16 日目から 22 日

目に ouabain を作用させ、ALP 活性の変化を検討した。その結果、ouabain を作用している間は、ALP 活性が濃度依存的に抑制された。一方、ouabain の添加を中止すると ALP 活性の回復が認められた (図 4A)。また、培養 16 日目から 22 日目まで ouabain を作用させると、33 日目において ouabain 濃度依存的な石灰化の抑制が認められた (図 4B-4D)。

4. BMP-2 による骨芽細胞石灰化に対する Na,K-ATPase 阻害の影響

Na,K-ATPase による骨芽細胞石灰化制御機構の一端を明らかにするため、BMP-2 により促進される E1 細胞の石灰化に対応する Na,K-ATPase 阻害の影響を調べた。BMP-2 による E1 細胞の石灰化促進は ouabain の濃度依存的に抑制された (図 5A,5B)。

次に、BMP-2 による骨芽細胞マーカー遺伝子発現に Na,K-ATPase がどのように関わっているか明らかにするため、ouabain 存在下で BMP-2 を E1 細胞に作用させ Runx2, ALP, オステオカルシン, I 型コラーゲンの mRNA の発現を検討した。その結果、BMP-2 刺激によるこれらの mRNA 発現誘導は ouabain 濃度依存的に抑制された (図 6A-6D)。

さらに、E1 細胞の Na,K-ATPase $\alpha 1$ サブユニットをノックダウンして BMP-2 による ALP ならびにオステオカルシンの mRNA 発現に対する影響を確認した。E1 細胞に Na,K-ATPase $\alpha 1$ siRNA を導入すると、BMP-2 によるこれらの mRNA 発現の誘導は、ouabain を作用した場合と同様に抑制された (図 7A,7B)。

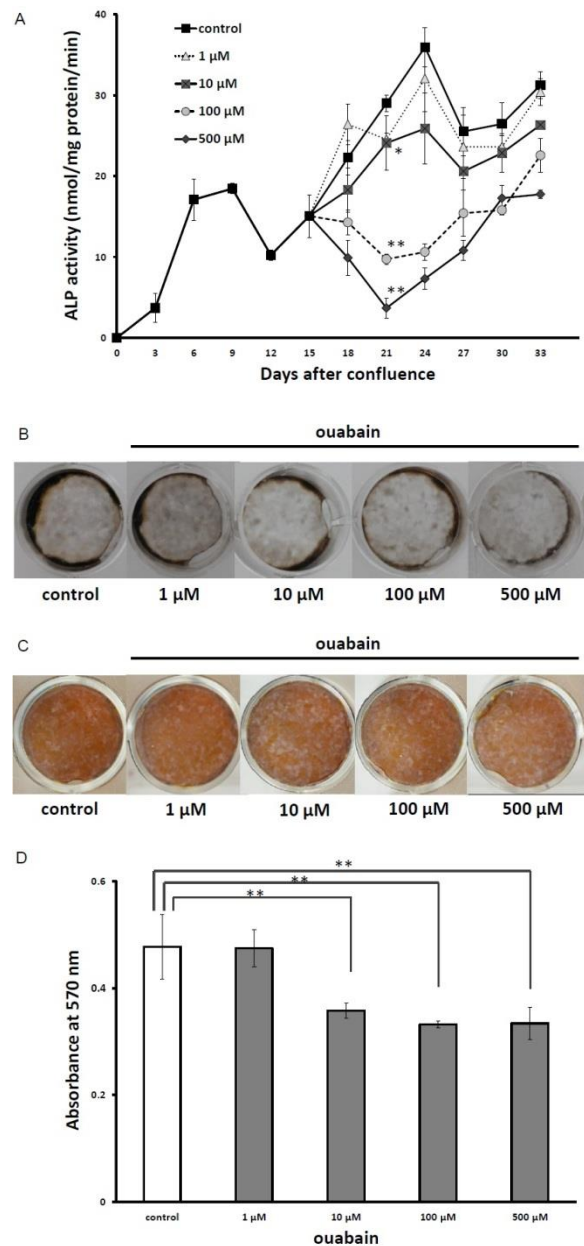


図 4. E1 細胞の分化時の Na,K-ATPase 活性阻害による石灰化に対する影響

E1 細胞を confluence 後 16 日目まで培養し ouabain (1~500 μ M) で 7 日間作用させ、さらに ouabain 無添加の培地に交換して 10 日間培養した。ALP 活性は confluence 時より 3 日毎に測定 (A) し、confluence 後 33 日目に von Kossa 染色 (B) ならびに Alizarin Red 染色 (C) し、位相差顕微鏡にて観察した。さらに Alizarin Red 染色量について定量化 (D) を行った。(n=3, * p <0.05, ** p <0.01)

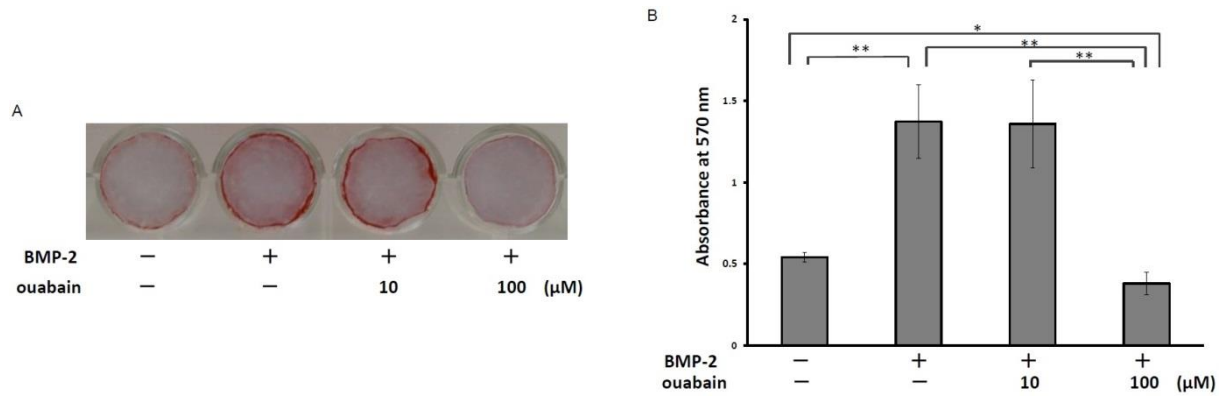


図5. BMP-2 による E1 細胞石灰化促進作用に対する Na,K-ATPase 阻害の影響

E1 細胞を confluence まで培養し BMP-2 (100 ng/ml) を添加し, ouabain (10, 100 μM) 存在下/非存在下でさらに培養開始後 15 日目まで培養して, Alizarin Red 染色を行った (A). さらに染色量を定量化した (B). (n=3, * p <0.05, ** p <0.01)

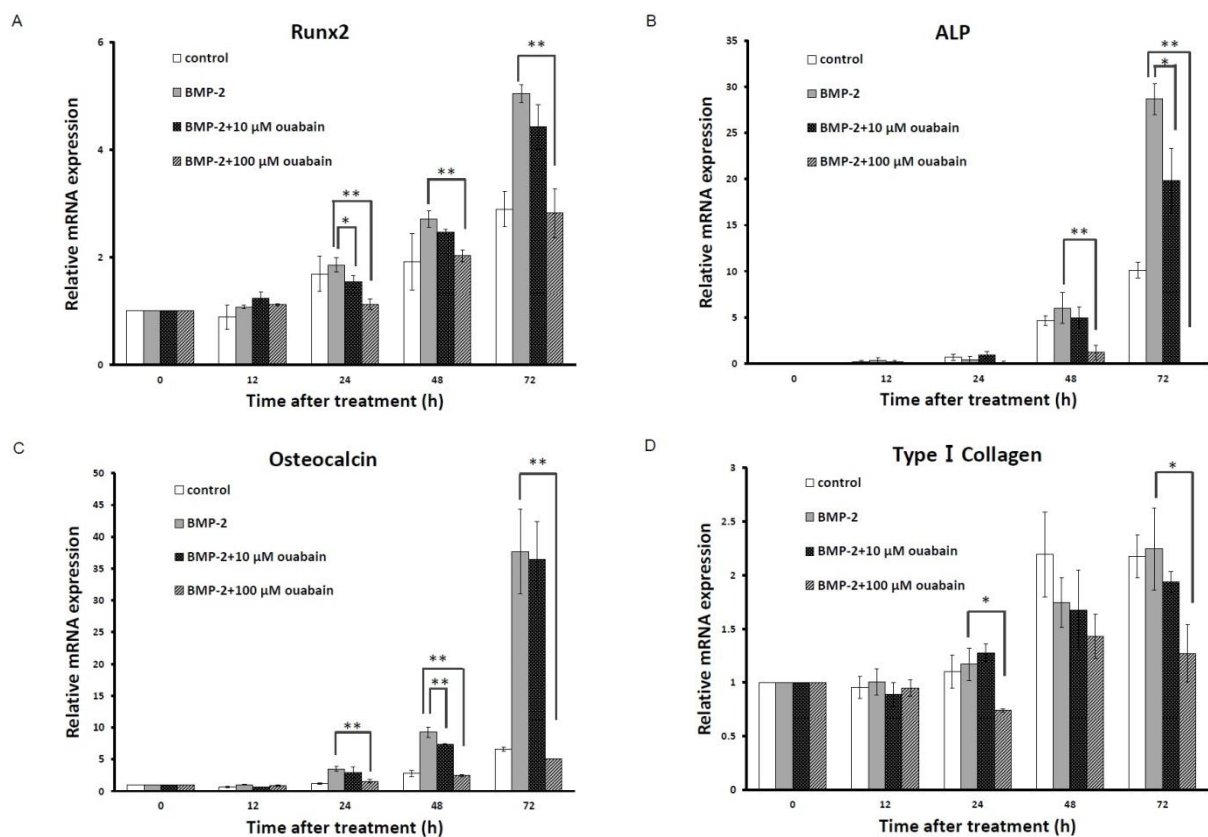


図6. BMP-2 による骨芽細胞分化マーカー遺伝子 mRNA 発現誘導に対する Na,K-ATPase 阻害の影響

E1 細胞に BMP-2 (100 ng/ml) とともに ouabain (10, 100 μM) を併用して, 骨芽細胞マーカーである Runx2 (A), ALP (B), オステオカルシン (C), さらに I 型コラーゲン (D) の mRNA の発現を Real-time PCR 法により経時的に検討した. (n=3, * p <0.05, ** p <0.01)

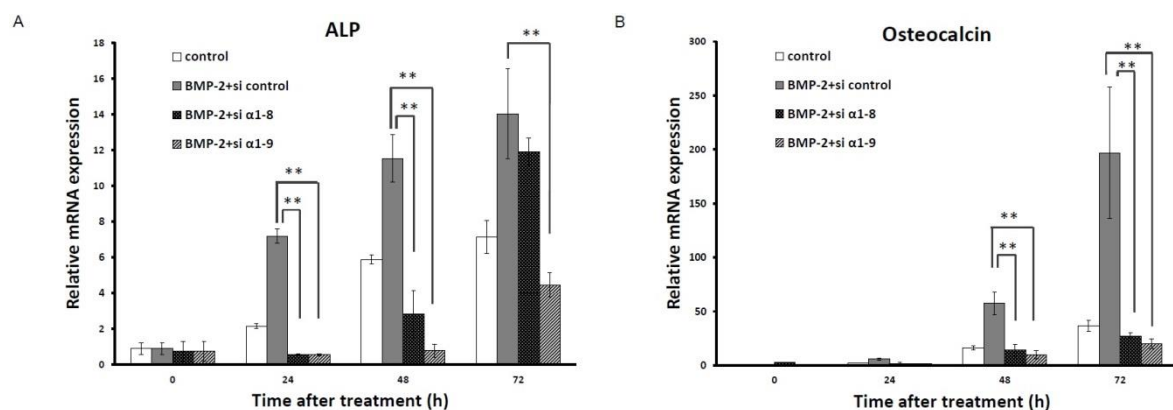


図 7. BMP-2 による骨芽細胞分化マーカー遺伝子 mRNA 発現誘導に対する Na,K-ATPase $\alpha 1$ サブユニットノックダウンの影響
E1 細胞に Na,K-ATPase $\alpha 1$ siRNA を導入し, BMP-2 (100 ng/ml) で刺激して, ALP (A), オステオカルシン (B) の mRNA の発現を Real-time PCR 法を用いて解析した. (n=3, $^{**}p<0.01$) si $\alpha 1-8$; siNa,K-ATPase $\alpha 1$, si $\alpha 1-9$; siNa,K-ATPase $\alpha 1$

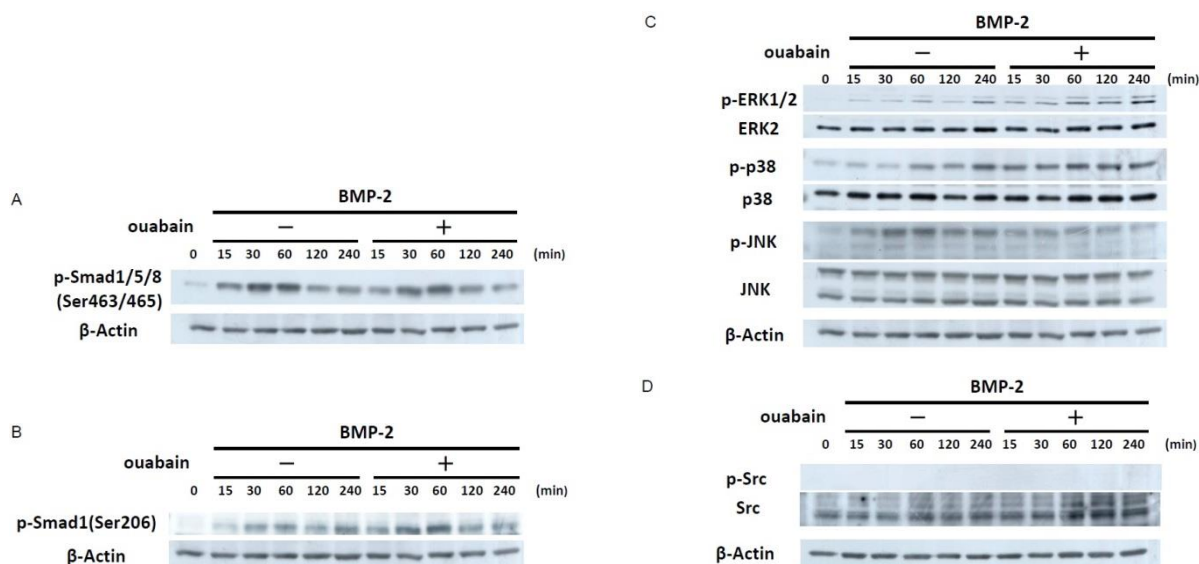


図 8. シグナル伝達経路における Na,K-ATPase 阻害の影響
E1 細胞に 500 μ M ouabain 存在下/非存在下で BMP-2 (100 ng/ml) を作用させて, Smad 1/5/8 (Ser463/Ser465) (A), Smad 1 (Ser206) (B), ERK, p38, JNK (C) および Src (D) のリン酸化への影響についてウエスタンブロット法にて解析した.

5. シグナル伝達経路における Na,K-ATPase 阻害の影響

BMP-2 で刺激すると Smad1/5/8 リン酸化は促進するが, ouabain を作用させても Smad1/5/8 (Ser463/Ser465) リン酸化は変化がみられなかった (図 8A). 一方, Smad 1 リンカー部位に存在する Ser206 のリン酸化は誘導された (図 8B). 次

に, Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) のリン酸化の変化を検討した. ouabain 存在下で E1 細胞に BMP-2 を作用させると, ERK, p38 のリン酸化が誘導されたが, JNK のリン酸化は抑制された (図 8C). 一方, Na,K-ATPase による MAPK の活性化に関与する Src のリン酸化は認められなかった (図 8D).

考 察

E1 細胞における Na,K-ATPase 活性は, confluence 以前の増殖期に最も高く, その後急激に低下した (図 1A,1B). そこで, E1 細胞の confluence 以前に, ouabain を用いて Na,K-ATPase を阻害すると, 細胞増殖の抑制が観察された (図 2A). 一方, 500 μ M ouabain を作用させても細胞数の減少は認められず, 細胞毒性による細胞死を生じていないことが推測された (図 2B). Matsuda は, グリア細胞において Na,K-ATPase 活性が増加すると細胞増殖が亢進し, ouabain により Na,K-ATPase を阻害すると細胞増殖が抑制されると報告している¹⁹⁾. この報告は我々の結果と一致している. これらのことから, Na,K-ATPase は E1 細胞増殖の制御にも関与していることが示唆された.

一方, E1 細胞が confluence 後, 石灰化へと向けて ALP 活性が急激に上昇し始める 18 日目に, Na,K-ATPase 活性が一過性に上昇した (図 1A). 我々は, この時の Na,K-ATPase 活性の増加が ALP 活性の上昇や石灰化に関与しているのではないかと推測した. E1 細胞の confluence 後 16~22 日目までの 7 日間 ouabain を作用させると, その間の ALP 活性が抑制され, 培養開始後 33 日目における石灰化も抑制されたが, ouabain の作用を中止すると ALP 活性は回復した (図 4). このような可逆的な変化を示すことから, 骨芽細胞の分化開始に, Na,K-ATPase が機能していることが示唆された.

Na,K-ATPase は NCX が取り込んだ(順向輸送)Na⁺を排出したり, 反対に Na,K-ATPase が抑制されると細胞内に蓄積した Na⁺を NCX が排出する(逆向

輸送)など, NCX と Na,K-ATPase は密接に関連している. NCX は骨芽細胞による石灰化局所への Ca²⁺の供給に関与しており, E1 細胞では, そのアイソフォームの 1 つである NCX3 の発現が高く, ALP 活性が上昇する 16 日目にその発現が増加し, その後減少するという報告がある¹⁵⁾. この NCX の発現上昇時期は我々が発見した Na,K-ATPase 活性の一過性の増加時期とほぼ一致している. これらを勘案すると, 石灰化に際して局所に Ca²⁺を供給するため, 骨芽細胞の NCX 順向輸送が活性化し, Na⁺と Ca²⁺の交換により, 細胞内 Na⁺濃度が上昇する. その結果, この Na⁺を排出するために Na,K-ATPase が活性化すると推測される.

つぎに, 我々は Na,K-ATPase がどのようなメカニズムで ALP 活性などの骨芽細胞分化マーカーの制御に関与しているかについて検討することにした. BMP-2 は, 骨芽細胞における Runx2, ALP, オステオカルシン, および I 型コラーゲンの発現を強く促進し^{20,21)}, 強力な分化誘導作用や骨誘導能を有している. BMP-2 の細胞内シグナルは, I 型と II 型に分類される膜貫通型セリン/スレオニンキナーゼ受容体によって誘導される. BMP-2 が結合した II 型受容体は I 型受容体を活性化し, 細胞質に存在する Smad1/5/8 の C 末端側にあるセリン残基 (Ser463/Ser465) をリン酸化する^{22,23)}. この部位がリン酸化された Smad1/5/8 はさらに Smad 4 と複合体を形成し, 核内へ移行して標的遺伝子の転写調節領域に結合することで転写を誘導する^{24,25)}. 一方, MAPK などにより Smad 1 リンカー部位のセリンやスレオニン残基 (Ser187/Ser195/Ser206/Ser214/Thr222) がリン酸化を受けると, 核内移行が阻害される²⁶⁾. 今回,

ouabain あるいは Na,K-ATPase $\alpha 1$ サブユニット ノックダウンにより Na,K-ATPase を阻害すると, BMP-2 による骨芽細胞マーカー遺伝子 mRNA の発現誘導は抑制され, 石灰化も抑制された (図 5,6,7). これらの結果から Na,K-ATPase が E1 細胞における BMP-2 シグナルにも関与していることが推測された. BMP-2 で E1 細胞を刺激すると Smad1/5/8 の Ser463 ならびに Ser465 のリン酸化は促進されたが, ouabain 存在下でもリン酸化はほとんど変化しなかった (図 8A). この結果は Na,K-ATPase を阻害すると Smad1/5/8 の標的遺伝子である Runx2 の発現が減少したと矛盾する. 我々は Na,K-ATPase 阻害により Smad 1 のリンカー部位がリン酸化を受けているのではないかと考え, ouabain を作用させると, Smad 1 のリンカー部位に存在する Ser206 のリン酸化が誘導された. 以上の結果から ouabain によるこの部位のリン酸化が Smad1/5/8 と Smad 4 の複合体の核への移行を抑制し, Runx2 mRNA の発現が抑制されることが示唆された.

そこで Na,K-ATPase が MAPK を制御し, Smad 1 の Ser206 のリン酸化を調節しているのではないかと推測した. BMP-2 存在下で, E1 細胞に ouabain を作用させると, ERK, p38 のリン酸化誘導が増強された. 一方, JNK のリン酸化は抑制された (図 8B). これらの結果から, Na,K-ATPase 阻害により活性化した ERK あるいは p38 が Smad 1 の Ser206 のリン酸化に関与している可能性が示唆された.

骨芽細胞の増殖や石灰化において, MAPK シグナルとの関連性を示す報告²⁷⁾がいくつか存在する. Kono²⁸⁾らは E1 細胞や MLO-A5 細胞において ERK の上流 MEK1/2 阻害により石灰化が促進さ

れたと報告した. また, Chaudhary²⁹⁾らによれば, E1 細胞において ERK の活性化が I 型コラーゲン mRNA の発現を抑制し, 石灰化が低下した. さらに, Higuchi³⁰⁾らは BMP を作用させた C2C12 細胞において, ERK を抑制すると ALP mRNA の発現が促進し, E1 細胞においては ALP とオステオカルシン mRNA の発現が促進して石灰化が促進したと報告している. これらの報告は我々の結果と一致している.

一方, Jaiswal らはヒト間葉系幹細胞においてステロイド, アスコルビン酸, あるいは β -glycerophosphate (β -GP) による ERK の活性化を介して, ALP 活性が増加し, 石灰化が促進されたと報告³¹⁾している. さらに, Lai らはヒト初代骨芽細胞において ERK の抑制により ALP 活性が低下し, 石灰化が抑制されたと報告³²⁾している. 骨芽細胞において ERK の役割は, 細胞の種類や分化段階によって異なることが知られており³³⁾, これらの相違点は, 骨芽細胞石灰化に対する ERK の作用が細胞特異的である可能性が考えられる.

E1 細胞において JNK (c-jun N-terminal kinase) 阻害すると, ALP の発現には影響しないが, オステオカルシンの発現が抑制され, 分化が阻害されるという報告がある³³⁾. 本研究における, Na,K-ATPase 阻害による石灰化マーカー遺伝子 mRNA の発現や石灰化の抑制も JNK リン酸化の抑制に関与していることも推測される.

p38 に関しては, Francesc³⁴⁾ は, C2C12 細胞において, p38 の抑制により BMP-2 により誘導される骨分化が促進したと報告している. 本研究においても Na,K-ATPase 阻害により p38 リン酸化が促進され, 骨芽細胞の分化が抑制された.

Na,K-ATPase による MAPK の制御においては、非受容体型チロシンキナーゼである Src が関与しているという報告がある³⁵⁾。さらに、低濃度の ouabain を作用させると、そのホルモン様作用により Src が活性化されることが知られている³⁶⁻³⁹⁾。本研究では ouabain を作用させても Src のリン酸化は誘導されなかった (図 8D)。今回用いた ouabain は 500 μ M と高濃度であり、Na,K-ATPase 阻害による ERK や p38 の活性化は Src を介していないことが示された。

MAPK シグナルの制御には細胞内 Ca^{2+} の変化が関与している。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によるシグナル伝達を介して Ras 下流の MAPK リン酸化が促進されるという報告がある⁴⁰⁻⁴³⁾。本研究において、Na,K-ATPase 阻害による細胞内 Na^+ の蓄積に反応して、NCX 逆向輸送が生じ、細胞内 Ca^{2+} が増加し、 Ca^{2+} セカンドメッセンジャーとして MAPK リン酸化に関与した可能性も考えられた。

今回、Na,K-ATPase が骨芽細胞の増殖、分化および石灰化に関与することが明らかになったが、その詳細なメカニズムに関しては不明な点も多く、今後さらなる研究を進め検討する必要がある。

結 論

Na,K-ATPase は E1 細胞増殖の制御に関与するとともに、MAPK を介して、分化および石灰化の制御にも関与することが示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に数々の御指導、御助言頂きました本学大学院歯学研究科口腔

機能学講座小児・障害者歯科学教室、ならびに口腔病態学講座細胞分子薬理学教室の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Rossier BC, Geering K, Kraehenbuhl JP: Regulation of the sodium pump how and why? Trends Biochem Sci 12: 483-487, 1987.
- 2) Scheiner-Bobis G: The sodium pump. Its molecular properties and mechanics. Eur. J Biochem 269: 2424-2433, 2000.
- 3) Jerry BL, Theresa K: Na^+/K^+ -ATPase. J Biol Chem 269: 19659-19662, 1994.
- 4) Feraille E, Doucet A: Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. Physiol Rev 81: 345-418, 2001.
- 5) Dobretsov M, Stimers JR: Neuronal function and $\alpha 3$ isoform of the Na/K-ATPase. Front Biosci 1: 2373-2396, 2005.
- 6) Stein GS, Lian JB: Molecular mechanisms mediating developmental and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts. Noda M, Cellular and Molecular Biology of Bone, 47-95, Academic Press, Tokyo, 1993.
- 7) Makihira S, Nikawa H, Kajiya M, Kawai T, Mine Y, Kosaka E, Marcelo JB Silva, Tobiume K, Terada Y: Blocking of sodium and potassium ion-dependent adenosine triphosphatase- $\alpha 1$ with ouabain and vanadate suppresses cell - cell fusion during RANKL-mediated osteoclastogenesis. Eur J Pharmacol 670: 409-418, 2011.

- 8) 孔 令群, 出山 義昭, 工藤 智也, 吉村 善隆, 鈴木 邦明: 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の各種 ATPase に対するエストロゲンの作用. 北海道歯誌, 33: 175-184, 2013.
- 9) Francis MJ, Lees RL, Trujillo E, Martín-Vasallo P, Heersche JN, Mobasheri A: ATPase pumps in osteoclasts and osteoblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 459-476, 2002.
- 10) Kita S, Iwamoto T: Mechanisms for linking high salt intake to vascular tone : role of Na⁺ pump and Na⁺/ Ca²⁺ exchanger coupling. *Yakugaku Zasshi* 130: 1399-1405, 2010.
- 11) Aslihan AK: Na⁺,K⁺-ATPASE:A REVIEW. *J Ankara. Med Sch* 24: 73-82, 2002.
- 12) Paul FJ, Ingrid LG, Gunter G, Alison LW, G.Roger A, Michelle LC, Richard AW, Jerry BL: Identification of a specific role for the Na,K-ATPase α 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol Cell* 3: 555-563, 1999.
- 13) Fukushima O, Goshi N, Koda M, and Tokudome M: Localization of Ca-ATPase activity at high alkaline pH in bone cell. *J Bone Miner Metab* 3: 88-92, 1985.
- 14) Nakano Y, Beertsen W, VanDenBos T, Kawamoto T, Oda K, Takano Y: Site-specific localization of two distinct phosphatases along osteoblast plasma membrane: tissue non-specific alkaline phosphatase and plasma membrane calcium ATPase. *Bone* 35: 1077-1085, 2004.
- 15) 森 幸徳, 鈴木邦明, 小畑 真, 出山義昭: 骨芽細胞様細胞のカルシウム依存 ATPase 活性. 北海道歯誌, 24 : 213-220, 2003.
- 16) Hsu HHT, Anderson HC: Evidence of the presence of a specific ATPase responsible for ATP-initiated calcification by matrix vesicles isolated from cartilage and bone. *J Biol Chem* 271: 26383-26388, 1996.
- 17) Sosnoski DM, Gay CV: NCX3 Is a major functional isoform of the sodium - calcium exchanger in osteoblasts. *J Cell Biochem* 103: 1101-1110, 2008.
- 18) Chifflet S, Torriglia A, Chiesa R, Tolosa S: A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein: application to lens ATPases. *Anal Biochem* 168: 1-4, 1988.
- 19) Matsuda T, Murata Y, Tanaka K, Hosoi R, Hayashi M, Tamada K, Takuma K, Baba A: Involvement of Na⁺,K⁺-ATPase in the mitogenic effect of insulin-like growth factor-I on cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 66: 511-516, 1996.
- 20) Nagarajan S, Sukyee K, Anatoliy V, Stephen CJ, Nicola CP: Effects of BMP-2 and pulsed electromagnetic field (PEMF) on rat primary osteoblastic cell proliferation and gene expression. *J Orthop Res* 25: 1213-1220, 2007.
- 21) Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen AJ, Stein JL, Croce CM, Lian JB, Stein GS: A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 13906-13911, 2008
- 22) Kretzschmar M, Doody J, Massague J: Opposing BMP and EGF signaling pathways converge on the TGF-beta family mediator smad1. *Nature* 389: 618-622, 1997.
- 23) Bruce DL, Sapkota GP: Phosphatase in SMAD

regulation. FEBS Lett 586: 1897-1905, 2012.

24) Minamizato T, Sakamoto K, Liu T, Kokubo H, Katsube K, Perbal B, Nakamura S, Yamaguchi A: CCN3/NOV inhibits BMP-2-induced osteoblast differentiation by interacting with BMP and Notch signaling pathways. Biochem Biophys Res Commun 354: 567-573, 2007.

25) Lo YC, Chang YH, Wei BL, Huang YL, Chiou WF: Betulinic acid stimulates the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells: involvement of BMP/Runx2 and beta-catenin signals. J Agric Food Chem 58: 6643-6649, 2010.

26) Massagué J, Seoane J, Wotton D: Smad transcription factors. Genes Dev 19: 2783-2810, 2005.

27) Matsuguchi T: ADVANCES IN PROTEIN KINASES, 313-332, Gabriela Da Silva Xavier, Croatia, 2012.

28) Kono S, Oshima Y, Hoshi K, Lynda F. Bonewald, Oda H, Nakamura K, Kawaguchi H, Tanaka S: Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. Bone 40: 68-74, 2007.

29) Chaudhary LR, Avioli LV: Extracellular-signal regulated kinase signaling pathway mediates downregulation of type I procollagen gene expression by FGF-2, PDGF-BB, and okadaic acid in osteoblastic cells. J Cell Biochem 76: 354-359, 2000.

30) Higuchi C, Myoui A, Hashimoto N, Kuriyama K, Yoshioka K, Yoshikawa H, Itoh K: Continuous inhibition of MAPK signaling promotes the early osteoblastic differentiation and mineralization of the extracellular matrix. J Bone Miner Res 17: 1785-1794, 2002.

31) Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF: Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem 275: 9645-9652, 2000.

32) Lai CF, Chaudhary L, Fausto A, Halstead LR, Ory DS, Avioli LV, Cheng SL: Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. J Biol Chem 276: 14443-14450, 2001.

33) Matsuguchi T, Chiba N, Bandow K, Kakimoto K, Masuda A, and Ohnishi T: JNK activity is essential for Atf4 expression and late-stage osteoblast differentiation. J Bone Miner Res 24: 398-410, 2009.

34) Viñals F, López-Rovira T, Rosa JL, Ventura F: Inhibition of PI3K/p70 S6K and p38 MAPK cascades increases osteoblastic differentiation induced by BMP-2. FEBS Lett 510: 99-104, 2002.

35) Haas M, Wang H, Tian J, Xie Z: Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem 277: 18694-18702, 2002.

36) Haas M, Askari A, Xie Z: Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase. J Biol Chem 275: 27832-27837, 2000.

37) Kometiani P, Li J, Gnudi L, Kahn BB, Askari A, Xie Z: Multiple signal transduction pathways link Na⁺/K⁺-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem 273: 15249-15256,

1998.

38) Xie Z, Kometiani P, Liu J, Li J, Shapiro JI, Askari A: Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na⁺/K⁺-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 274: 19323-19328, 1999.

39) Tian J, Cai T, Yuan Z, Wang H, Liu L, Haas M, Maksimova E, Huang XY, Xie ZJ: Binding of Src to Na⁺/K⁺-ATPase forms a functional signaling complex. *Mol Biol Cell* 17: 317-326, 2006.

40) Laura BR, David DG, Michael JW, Michael EG: Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron* 12: 1207-1221, 1994.

41) Liu J, Tian J, Haas M, Shapiro JI, Askari A, Xie Z: Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. *J Biol Chem* 275: 27838-27844, 2000.

42) Tian J, Gong X, Xie Z: Signal-transducing function of Na⁺-K⁺-ATPase is essential for ouabain's effect on [Ca²⁺]_i in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: 1899-1907, 2001.

43) Xie Z, Askari A: Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem* 269: 2434-2439, 2002.

The role of Na,K-ATPase in proliferation, differentiation and mineralization of osteoblasts

Junichi Yamada

ABSTRACT : Ion transporters such as plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) are involved in delivery of Ca^{2+} into mineralizing osteoid by osteoblast. However, little is known of function of Na,K-ATPase in osteoblasts. This study was designed to elucidate the role of Na,K-ATPase in osteoblast proliferation, differentiation and mineralization.

We investigated Na, K-ATPase activity in developing osteoblastic MC3T3-E1 (E1) cells. Cell proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity and deposition of mineral were assessed under the presence of Na,K-ATPase specific inhibitor, ouabain. Effects of Na,K-ATPase inhibition on BMP-2-induced mineralization, expression of osteoblast phenotype marker gene and phosphorylation of Smad1/5/8 and MAPK in E1 cells were examined using ouabain and small interfering RNA.

Na,K-ATPase activity was highest before confluence, tapered off quickly and then transiently increased at 18 days after confluence. When treated with ouabain around 18 days after confluence, mineralization fell reflecting lower ALP activity in E1 cells. Likewise, inhibition of Na,K-ATPase reduced mineral deposition, and mRNA expression of Runx2, ALP and osteocalcin. Pretreatment with ouabain was only weakly effective on BMP-2-induced Smad1/5/8 phosphorylation at Ser463 and Ser465 in the C-terminal region. On the contrary, ouabain induced the phosphorylation at Ser206 in the linker region on Smad1. Additionally, ouabain increased phosphorylation of ERK and p38 in response to BMP-2, whereas JNK phosphorylation was suppressed.

The results of this study suggest Na,K-ATPase could regulate mineralization via MAPK as well as cell proliferation in osteoblasts.

Key words : Na,K-ATPase, osteoblast, proliferation, differentiation, mineralization