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；出山，義昭；吉村，善隆 他
Citation	北海道歯学雑誌，44，26-36
Issue Date	2023-09-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90489
Type	journal article
File Information	44_06.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道歯誌　44：26−36，2023.

原　著

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[1)]　出山　義昭[2)]　吉村　善隆[2)]　鈴木　邦明[2)]　八若　保孝[1)]

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Na^+/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)]．

[1)] 〒060-8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大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（主任：八若　保孝　教授）
[2)] 〒060-8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究科　口腔病態学講座　細胞分子薬理学教室（主任：鈴木　邦明　教授）

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 %CO_2 - 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 $MgCl_2$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 ℃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1N 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

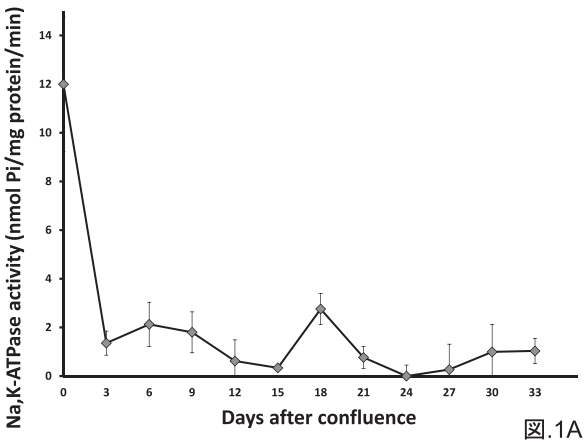
細胞をプロテインホスファターゼ阻害剤カクテルであるPhosSTOPを添加したLysis Buffer（10 mM HEPES-KOH pH 7.5，100 mM KCl，0.1 % NP-40）で回収した．10 μgのサンプルを10 %SDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後に，polyvinylidenne difluororide membrance（Immobilon-P；Merck Millipore, Billerica, MA）に転写した．ブロッキング反応は，Immuno Block®（DS Pharma Biomedical Co，大阪）を用いて室温で1時間行った．一次抗体として，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，*p*NPP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



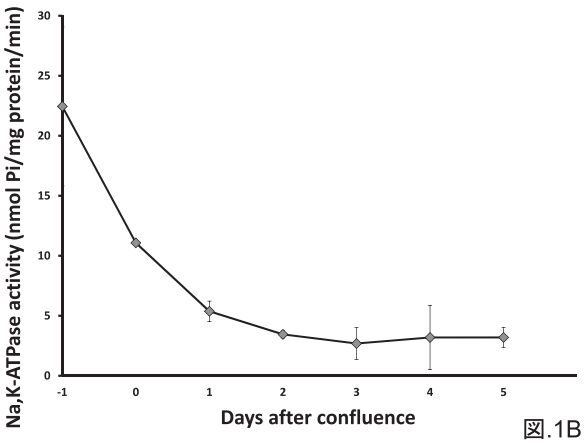


図1 E1細胞のNa,K-ATPase活性の変化
E1細胞を培養し，confluence後3日毎（A），さらにconfluence前後においては1日毎（B）にNa, K-ATPase活性を測定した．（n=3）

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（ΔΔCt法）を算出した．

10．small interfering RNA（siRNA）の導入

Na,K-ATPase α_1遺伝子発現抑制は，HiPerFect（QIAGEN, Hilden, Germany）を用い，Na,K-ATPase α_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 α_1 siRNAの塩基配列はNa,K-ATPase α_1-8 siRNA（5'-AAG ATGGCTATTATAACGGAA-3'），Na,K-ATPase α_1-9 siRNA（5'-TACAGCGTTCTTTG TCAGTAT-3'）である．

11．データ処理

結果は平均±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

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）．

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 μM 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）．

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

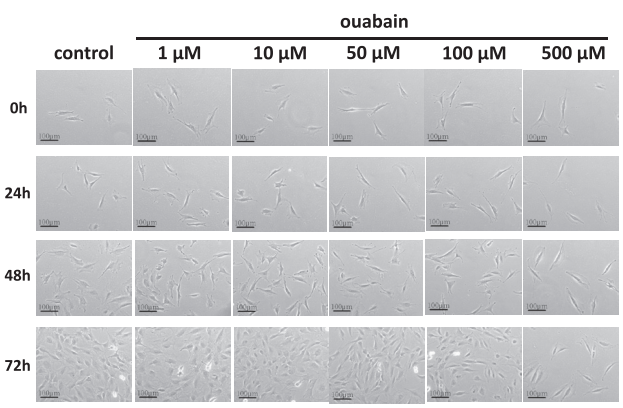


図. 2A

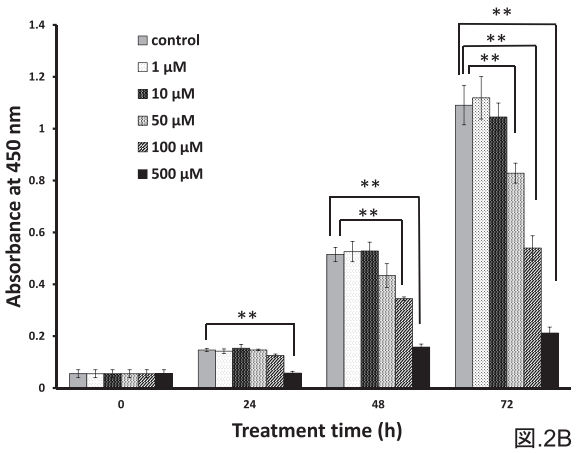


図.2B

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, $^{**}p<0.01$）

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）．

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 α_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 α_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）．

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 μM 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]．この報告は本研究の結果と一致しており, Na,K-ATPaseはE1細胞増殖の制御にも関与することが示唆された．

一方，E1細胞がconfluence後，石灰化前にALP活性が急激に上昇する18日目に，Na,K-ATPase活性が一過性に上昇した（図1A）．Na,K-ATPase活性の増加とALP活性の上昇や石灰化の関連が推測された．そこで、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が機能することが示唆された．

Na,K-ATPaseとNCXはNa^+の輸送で密接に関連しており、その結果NCXは骨芽細胞による石灰化局所へのCa^{2+}の供給に関与している。E1細胞では，そのアイソフォームの1

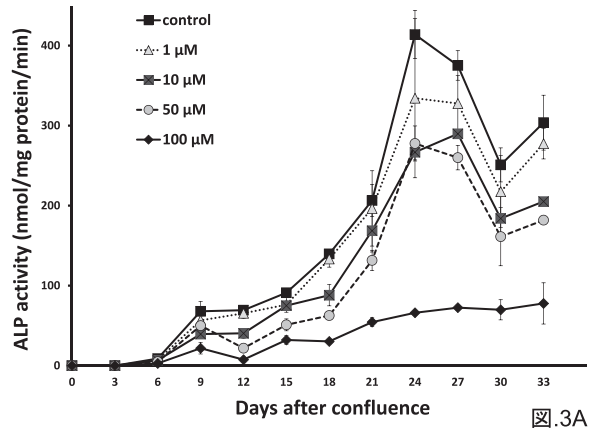


図.3A

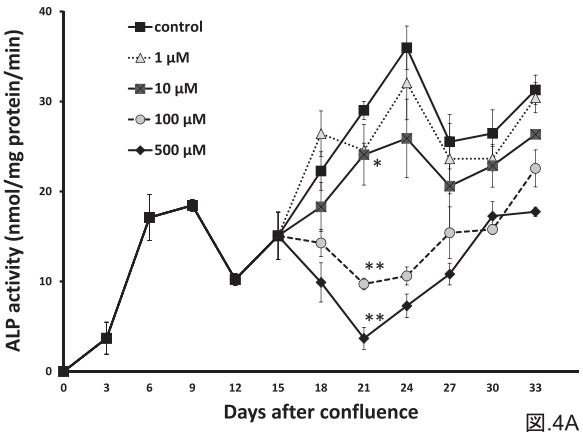


図.4A

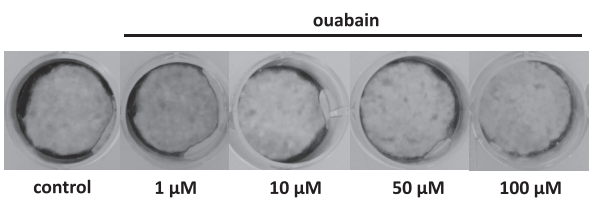


図.3B

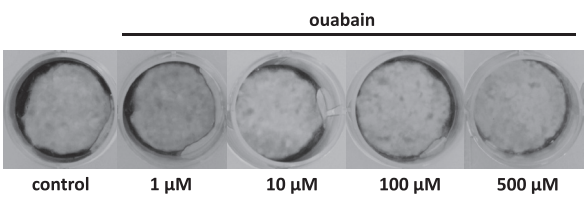


図.4B

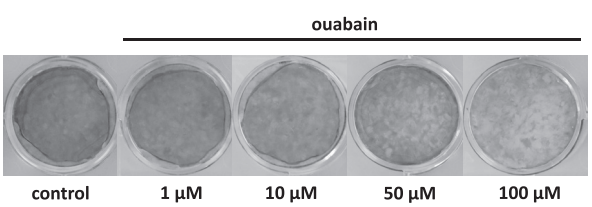


図.3C

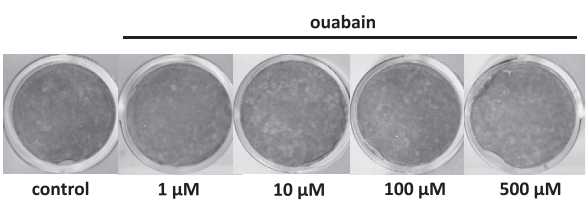


図.4C

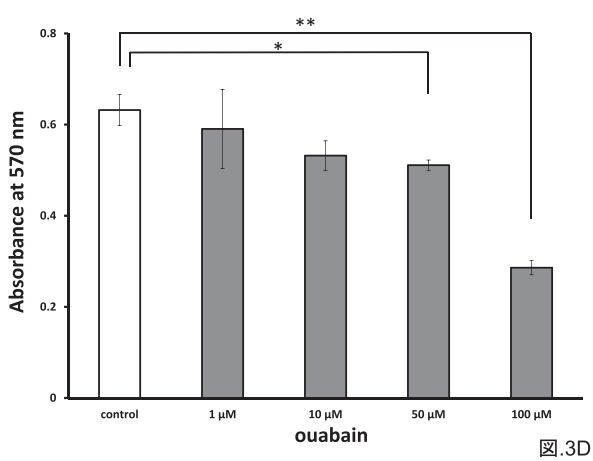


図.3D

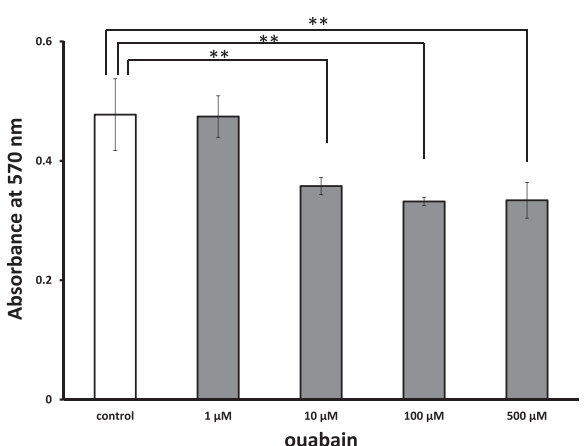


図.4D

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, * $p<0.05$, ** $p<0.01$）

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 μM）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, * $p<0.05$, ** $p<0.01$）

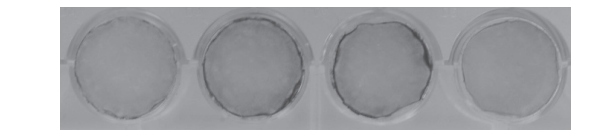


図.5A

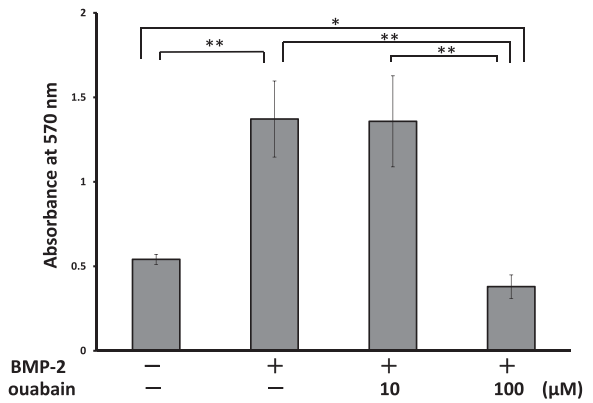


図.5B

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, * $p<0.05$, ** $p<0.01$）

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]．NCXの発現上昇時期はNa,K-ATPase活性の一過性の増加時期とほぼ一致している．石灰化に際して局所にCa^{2+}を供給するため，骨芽細胞のNCXが活性化してNa^+とCa^{2+}の交換を行うと細胞内Na^+濃度が上昇し，このNa^+を排出するためにNa,K-ATPaseが活性化する可能性がある．

つぎに，Na,K-ATPaseがALP活性などの骨芽細胞分化マーカーの制御に関与する機構について検討した．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]．その結果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して転写を誘導する[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 α1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）．これらの結果はNa,K-ATPaseがE1細胞におけるBMP-2シグナルにも関与することを示唆する．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の阻害によりSmad1/5/8の標的遺伝子であるRunx2の発現が減少したことと矛盾する．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ると推測して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．以上の結果はouabainによるSer206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を示唆した．

そこでNa,K-ATPaseがMAPKを制御し，Smad1のSer206のリン酸化を調節する可能性を検討した．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）．これらの結果は，Na,K-ATPase阻害により活性化したERKあるいはp38がSmad 1のSer206のリン酸化に関与することを示唆した．

骨芽細胞の増殖や石灰化において，MAPKシグナルの関連を示す報告[27]がいくつか存在する．Kono[28]らはE1細胞やMLO-A5細胞においてERKの上流であるMEK1/2阻害により石灰化が促進されたと報告した．また，Chaudhary[29]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，Higuchi[30]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の発現が促進すること，E1細胞においてはALPとオステオカルシン mRNAの発現が増加して石灰化が促進すると報告した．これらの報告は本研究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．骨芽細胞における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いる[33]ことから，骨芽細胞石灰化に対するERKの作用は細胞特異的である可能性がある．

E1細胞においてJNK（c-jun N-terminal kinase）を阻害すると，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

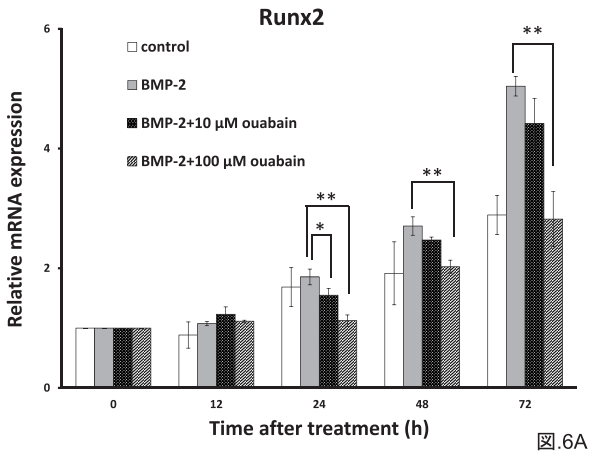


図.6A

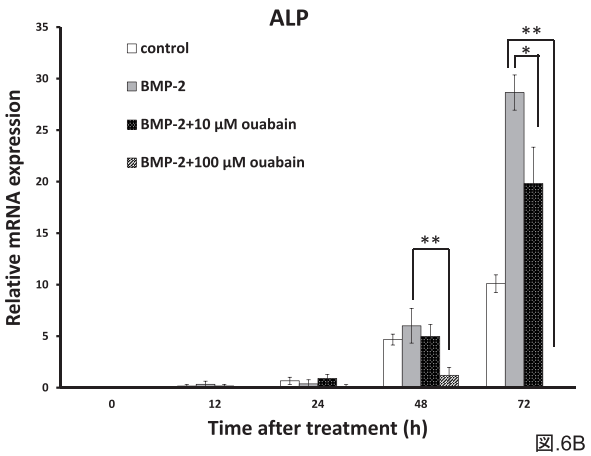


図.6B

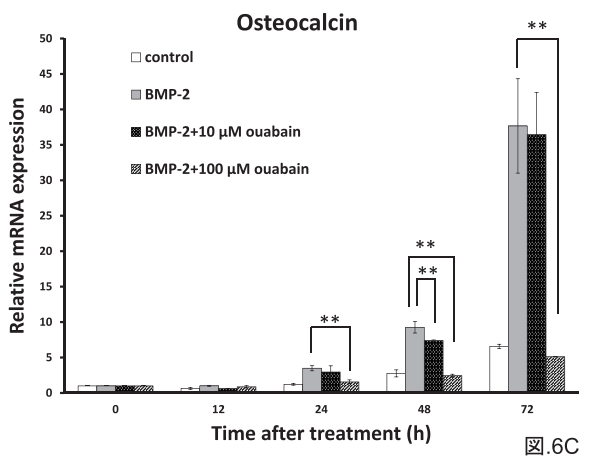


図.6C

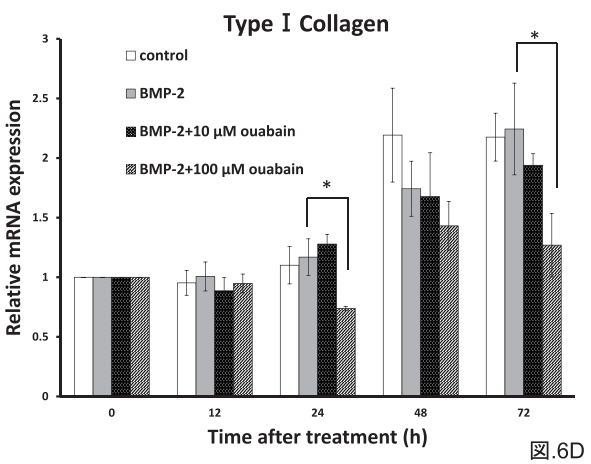


図.6D

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, * $p<0.05$, ** $p<0.01$）

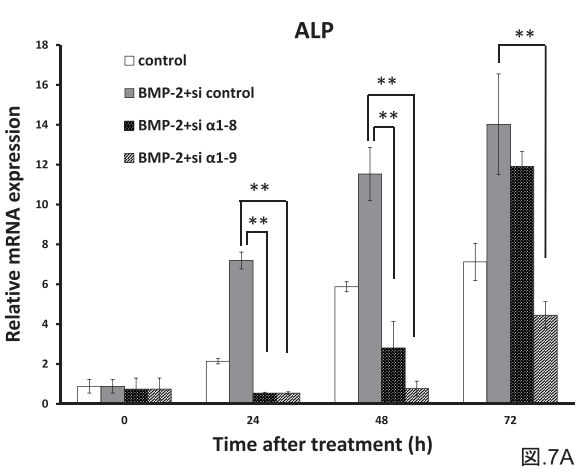


図.7A

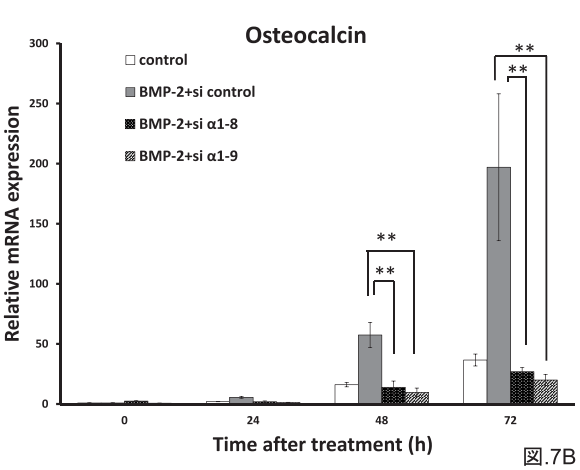


図.7B

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 α_1 サブユニットノックダウンの影響
E1細胞にNa, K-ATPase α_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$\alpha_{1\text{-}8}$; siNa,K-ATPase α_1, si$\alpha_{1\text{-}9}$; siNa,K-ATPase α_1

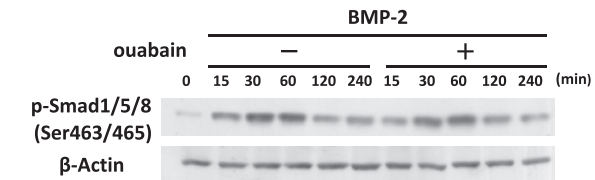


図.8A

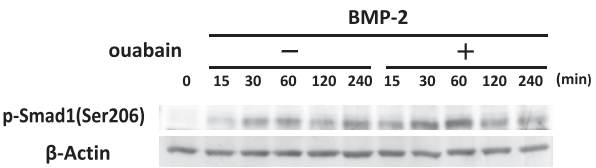


図.8B

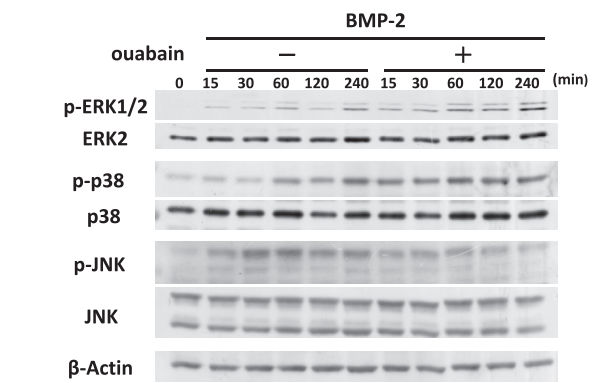


図.8C

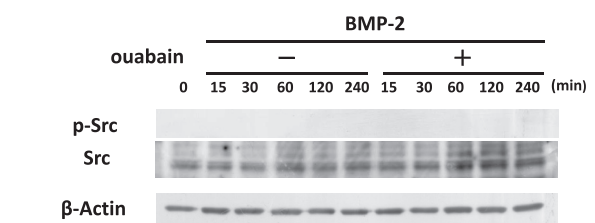


図.8D

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 μM 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．

が関与している可能性がある．

Francesc[34] 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．本研究においてはNa,K-ATPase阻害によりp38リン酸化が促進されると，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のホルモン様作用によるSrcの活性化が知られている[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 μMと高濃度であることから，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唆された．

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]．本研究においては，Na,K-ATPase阻害による細胞内Na^{+}の蓄積に反応して，NCXの逆向輸送が生じ，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 soduium 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 α_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-α1 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^+/Ca^{2+} 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 α2 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 phospatases 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 presense of a specific ATPase responsible for ATP-initiated calsification 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 Ca^{2+} 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 $[Ca^{2+}]$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.

Hokkaido J. Dent. Sci., 44 : 26−36, 2023.

ORIGINAL

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

Junichi Yamada[1)], Yoshiaki Deyama[2)], Yoshitaka Yoshimura[2)]
Kuniaki Suzuki[2)] and Yasutaka Yawaka[1)]

ABSTRACT : Ion transporters such as plasma membrane Ca^{2+}-ATPase (PMCA) and Na^{+}/Ca^{2+} exchanger (NCX) are involved in the delivery of Ca^{2+} into mineralizing osteoid by osteoblast. However, little is known of the 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 the deposition of mineral were assessed under the presence of a Na,K-ATPase specific inhibitor, ouabain. Effects of Na,K-ATPase inhibition on BMP-2-induced mineralization, expression of the osteoblast phenotype marker gene and the 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 the 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 other hand, 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

[1)] Director: Prof.Yasutaka Yawaka. (Department of Dentistry for Children and Disabled Person, Hokkaido University Graduated School of Dental Medicine), Department of Dentistry for Children and Disabled Person, Division of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Nishi 7, Kita 13, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan
[2)] Director: Prof.Kuniaki Suzuki. (Department of Molecular Cell Pharmacology, Hokkaido University Graduated School of Dental Medicine), Department of Molecular Cell Pharmacology, Division of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University , Nishi 7, Kita 13, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan