

# Analysis of molecular mechanism on the training effects using adrenergic receptor agonists

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-01-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Kitaura, Takashi メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00049896">https://doi.org/10.24517/00049896</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



# トレーニング効果の分子機構をアドレナリン 受容体作動薬で解析する

(研究課題番号: 15500437)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (2))  
研究成果報告書

平成17年3月

研究代表者 北浦 孝

(金沢大学保健管理センター・助教授)

金沢大学附属図書館



0800-04348-0

トレーニング効果の分子機構をアドレナリン受容体作動薬で解析する

(研究課題番号：15500437)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金〔基盤研究(C)(2)〕

研究成果報告書

平成17年3月

研究代表者 北浦 孝

(金沢大学保健管理センター・助教授)

## は し が き

平成16年8月ギリシャで行われた第64回アテネオリンピックにおいて金メダル16個、銀メダル9個、銅メダル12個で合計37個のメダル獲得をした日本人選手の大活躍の感動とともに、ハンマー投げの室伏選手が銀から金にメダル変更になったドーピング事件も記憶に生々しい。正々堂々と戦うことを旨とするスポーツで、なぜドーピング問題が発生するのか？それは常に「成功」の光と影の部分として話題になる。治療目的の薬物が、いつのまにか競技選手の記録向上を目的に闇に流れる。また、ドーピング目的に開発されたデザイナードラッグの普及。更に、食肉改善用の薬物の人への利用と国による規制の違いによる輸入肉に混在する薬物の影響。高齢者用の薬物を子供が摂取することの影響。ドーピング問題がかかえる課題は多い。しかし、これらの薬物の作用が提供する身体トレーニングの効果のメカニズムに関する情報は適正なスポーツ科学の発展にとって貴重なものが多い。従って、本研究ではアテネオリンピックでもその使用によって2名の選手が失格となったドーピング規制指定薬のアドレナリン受容体作動薬等を用いてトレーニングにおいて生じる様々な現象を解析した。特にこの薬物を利用してトレーニングによる骨格筋における解糖系代謝の亢進と筋肥大にアドレナリンを介した cAMP のメカニズムがどのように関わっているのかを遺伝子とタンパク質レベルで明らかにする目的で研究を実施し、脂質代謝を亢進するUCP3のmRNAや核内調節因子であるMyoDのmRNAの顕著な増加を遅筋（ヒラメ筋）で認めた。これはこの薬物の筋の分化におけるマスター遺伝子のMyoDの形成促進作用が特に大きく関与していることを示す重要な知見をもたらした。さらにすでに我々が明らかにしたこの薬物による骨の長軸方向への成長抑制の発生の分子メカニズムを明らかにすることを目的に研究を実施した結果、この薬物は破骨細胞のみならず骨芽細胞にも作用し、骨形成促進作用もあることを認め、この薬物の成長抑制作用が骨芽細胞と破骨細胞間の相互作用を強めながらも、破骨細胞の分化を強力に誘導する一方、骨芽細胞の分化への影響は比較的小さいことが原因であることが示唆され、本研究で得られた成果は薬物作用の複雑さから、安易な薬物使用に警告を発する重要な知見をもたらすものである。以上の結果から、さらなる詳細なメカニズムの探求を必要とする新しい課題の発生は有るものの、当初の目的は十分に達成され、スポーツ界における適切な薬物使用の普及の参考になることが期待される。

### 研究組織

研究代表者 : 北浦 孝 (金沢大学保健管理センター・助教授)

### 交付決定額 (配分額)

(金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	2,700	0	2,700
平成16年度	1,100	0	1,100
総計	3,800	0	3,800

## 研究発表

### (1) 学会誌等

- 1) 佐藤厚志, 北浦 孝, 中川梨恵, 清水崇宏、大形竜也, ツロブテロールのマウスの骨格筋に及ぼす影響. 北陸体育学紀要 39 ; 83-90 (2003)
- 2) 井上夢月, 北浦 孝, 小林大祐, 大久保英哲, 増田和実, L-カルニチンの大学陸上長距離選手への効果の検討. 北陸体育学紀要 39 ; 29-33 (2003)
- 3) 佐藤厚志, 大形竜也、中川梨恵、清水崇宏、北浦 孝, ツロブテロールの雄マウスの骨格筋と心筋におよぼす生化学的影響. 体力科学、52 卷 (5) ; 664, (2003)
- 4) Ohgata, T., Kitaura T., Kraemer W. J., Effects of clenbuterol on bone by increased RANKL for osteoclast. Med. Sci. Sports Exerc. 35(5); S267, (2003)
- 5) 佐藤厚志, 大形竜也, 北浦 孝. 体力科学、MCT1 と CD147 発現へのクレンプテロール影響, 52(6);860, (2003)
- 6) 大形竜也, 佐藤厚志, 北浦 孝. クレンプテロールと乳酸の骨形成に与える影響体力科学、52(6);861, (2003)
- 7) Kitaura T., Effects on osteogenetic system by clenbuterol and lactate. Med. Sci. Sports Exerc. 36(5); S59-60, (2004)
- 8) 松本健太郎, 北浦 孝. クレンプテロール投与のラット骨格筋における MCT1 と UCP3 への影響. 体力科学、 53(6);895, (2004)
- 9) 北浦 孝. 骨格筋肥大と  $\beta 2$ -agonist との関連. 体力科学、 54(1); 57-62, (2005)

### (2) 口頭発表

#### (海外)

- 1) Ohgata Tatsuya, Satoh Atsushi, **Kitaura Takashi**, Kraemer W. J :Effects of clenbuterol on bone by increased RANKL for osteoclast. 50th Annual Meeting of ACSM, 5.30 LosAngels USA (2003)
- 2) **Kitaura Takashi**, Kraemer W. J :Effects on Osteogenetic System by Clenbuterol and Lactate, 51th Annual Meeting of ACSM 6.3, Indianapolis, USA (2004)

#### (国内)

- 1) 佐藤厚志, 大形竜也, 中川梨恵, 清水崇宏, 北浦 孝 : ツロブテロールの雄マウスの骨格筋と心筋におよぼす生化学的影響, 第 15 回日本体力医学会北陸地方会大会、5.11 金沢 (2003)
- 2) 佐藤厚志, 大形竜也, 北浦 孝 : MCT1 と CD147 発現へのクレンプテロール影響, 第 58 回日本体力医学会, 9.20, 静岡 (2003)

- 3) 大形竜也, 佐藤厚志, 北浦 孝: クレンプテロールと乳酸の骨形成に与える影響, 第 58 回日本体力医学会, 9.20, 静岡 (2003)
- 4) 松本健太郎, 北浦 孝: クレンプテロール投与のラット骨格筋における MCT1 と UCP3 への影響, 第 59 回日本体力医学会, 9.16, 埼玉 (2004)
- 5) 北浦 孝: 第 59 回日本体力医学会大会シンポジウム「骨格筋肥大に関わるホルモン・作動薬・生体内情報伝達物質」9 月, 大宮ソニックシティ (2004)
- 6) 北浦 孝: スポーツのドーピング事件から学ぶこと, 金沢大学サテライト・プラザミニ講演 3.19 (2005)

### (3) 出版物

- 1) 北浦 孝, 生化学、生理学からみた骨格筋に対するトレーニング効果 (第 2 版), 福永哲夫、山田 茂編集「11 章 骨格筋とドーピング」の分筆 p166-180. (2003)
- 2) 北浦 孝, 「別冊宝島 日本を元気にする! 基礎科学」の分筆, 風土文化社 第 89 巻, p188-191. (2004).

様式 C-20

ABSTRACTS OF RESEARCH PROJECT, GRANT-IN-AID  
FOR SCIENTIFIC RESEARCH ( 2004 )

1. RESEARCH INSTITUTION NUMBER : 13301
2. RESEARCH INSTITUTION : Kanazawa University
3. CATEGORY : Scientific Research (C) (2)
4. TERM OF PROJECT ( 2003 ~ 2004 )
5. PROJECT NUMBER : 15500437
6. TITLE OF PROJECT :

Analysis of molecular mechanism on the training effects using adrenergic receptor agonists

7. HEAD INVESTIGATOR REGISTERED NUMBER NAME INSTITUTION, DEPARTMENT, TITLE OF POSITION  
00143868 Takashi Kitaura Kanazawa University, Health Service  
Center, Associate Professor
8. INVESTIGATORS (1) REGISTERED NUMBER NAME INSTITUTION, DEPARTMENT, TITLE OF POSITION  
None

9. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

In this study, we tried to examine the longitudinal inhibitory growth effects on bone of clenbuterol (beta-2 adrenergic receptor agonist) using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of the cultured osteoclast cells derived from mouse bone marrow cells with calcitriol (10 nM) and dexamethasone (10 nM). During the differentiation process from preosteoclasts into the matured osteoclasts, the clenbuterol were administered into the culture system. Clenbuterol increased the number of osteoclasts. The both of tulobuterol and isoproterenol also increased the osteoclasts. But the selective beta-2 antagonist (butoxamine) and H89 (protein kinase A inhibitor) inhibited the increased osteoclasts. It suggested the increased osteoclasts might be induced by the increased cAMP.

It is well known that the PGE2 accelerate the forming of osteoclasts. The mRNA expression of COX-2 which is PGE2 synthetase also increased with the treatments of clenbuterol, tulobuterol, and isoproterenol. Furthermore, the mRNA expression of bone resorptive cytokines, IL-1 $\beta$  and IL-6 were increased by clenbuterol, which also accelerated the bone forming by the osteoblasts activation... These results suggested that this clenbuterol affected more strongly on osteoclast forming system but a little on osteoblast. It means that these drugs have the activating action on various cells but the whole effects are complicated. Therefore, the using of these drugs should be careful.

We confirmed that clenbuterol increased the expression of mRNAs of UCP3 which increases lipolysis and MyoD which is nuclear regulatory factor. They suggested that clenbuterol increased the MyoD as the myogenic master regulator and might induce the muscle hypertrophy and the transformation from slow- to fast-twitch muscle.

10. KEY WORDS

- |                              |                 |                   |
|------------------------------|-----------------|-------------------|
| (1) clenbuterol              | (2) osteoclast  | (3) COX-2         |
| (4) bone resorptive cytokine | (5) tulobuterol | (6) isoproterenol |
| (7) UCP3                     | (8) MyoD        |                   |

(CONTINUE TO NEXT PAGE)

## 11. REFERENCES

AUTHORS , TITLE OF ARTICLE	JOURNAL,VOLUME-NUMBER,PAGES CONCERNED, YEAR
• Satoh Atsushi , Ohgata Tatsuya, Kitaura Takashi, Effects of clenbuterol on the expression of MCT1 and CD147	Jap. J. Phys. Fitness Sports Med., 52(6);860 , 2003
• Ohgata Tatsuya, Satoh Atsushi , Kitaura Takashi, Effects of clenbuterol and lactate on osteogenesis	Jap. J. Phys. Fitness Sports Med., 52(6);861 , 2003.
• Inoue Mutsuki , Kitaura Takashi, Kobayashi Daisuke, Okubo Hideaki, Masuda Kazumi, Effects of L-carnitine supplementation on college endurance-trained athletes.	Hokuriku Taiikugaku Kiyou, 39; 29-33, 2003.
• Satoh Atsushi , Kitaura Takashi, Nakagawa Rie, Shimizu Takahiro, Ohgata Tatsuya, Effects of tulobuterol on skeletal muscles of mice.	Hokuriku Taiikugaku Kiyou, 39; 83-90, 2003
• Ohgata Tatsuya, Satoh Atsushi , Kitaura Takashi, Kraemer W. J., Effects of clenbuterol on bone by increased RANKL for osteoclast.	Med. Sci. Sports Exerc. 35(5); S267, (2003)
• Kitaura Takashi, Effects on osteogenetic system by clenbuterol and lactate.	Med. Sci. Sports Exerc. 36(5); S59-60, (2004)



# 研 究 成 果

## 目 次

第 1 章	はじめに	2
第 2 章	心臓と骨格筋組織での検討	3
I	序論	3
II	方法	5
III	結果	11
IV	考察	23
V	引用文献	30
第 3 章	骨組織での検討	38
I	序論	38
II	方法	40
III	結果	47
IV	考察	70
V	引用文献	74
第 4 章	まとめ	84

## 第1章

### はじめに

オリンピックではいつもドーピング問題が話題となり、国際オリンピック委員会（IOC）はドーピング禁止薬物として、興奮薬、麻薬性鎮痛剤、蛋白同化剤などを指定している。近年、ドーピングの世界にも変化が表れている。2000年に行われたシドニーオリンピックなどで見られたように以前は患者の治療用に供されている薬が使用され、それらは骨格筋の肥大を誘発させ、運動のパフォーマンスを増強させることを目的に使用されてきた。しかし、最近話題になっているものはこれまで以上に運動能力を高め、筋肉を急速に増加させる目的で使用されるアナボリックステロイドである。特に米国、カリフォルニア州にあるサプリメント製造会社バルコ社（BALCO）が開発した THG（テトラヒドロゲストリノン）のようなデザイナードラッグ（ステロイド）が出現してきたことである。デザイナードラッグとは、元々持っている筋肥大作用などのドーピング作用を増強させるために薬の構造を変化させて作られたビッグビジネス社会といわれるスポーツ界におけるドーピングのための薬物であり、検査方法の改善と深く関わっている。

さて近年、喘息患者が増加傾向にあるが、ひとえに喘息といっても一般的な喘息の他に、一流運動選手にも見られる運動誘発性喘息もある<sup>41)</sup>。β<sub>2</sub>アゴニストであるクレンブテロールは平滑筋弛緩作用を有していることから気管支喘息治療薬として使用されているが、またドーピング禁止薬物にも指定されている。β<sub>2</sub>アゴニストは骨格筋の肥大以外にマイナスの作用として心筋の肥大や骨の成長抑制への影響も懸念されている。また、スポーツ界だけでなく、より肉付きの良い家畜を得ようとする食肉改善の目的のために使用されたり、ラットにおいてこれら薬物投与により脂肪の減少が起きるということで<sup>64)</sup> ヒトでダイエットを目的として使用される可能性があり<sup>48)</sup>、医薬品の適正使用ならびに薬物に関する作用や副作用に関する正しい情報が求められている。従って、本研究では対象臓器を二つに分け、前半は横紋筋である心筋と骨格筋、後半は骨組織に区分して詳細な検討を行った。

## 第2章

## 心筋と骨格筋組織での検討

### I 序論

$\beta_2$ アゴニストは $\beta_2$ レセプターを介し細胞内 cAMP 濃度を上昇し、A キナーゼ (PKA) を活性化させ、その結果、解糖系の亢進、FFA (遊離脂肪酸) やエピネフリンの動員、核内の転写調節因子である myogenin や MyoD などに影響するなどさまざまな体内動態に関与している<sup>16, 43)</sup>。またこの類の薬物により骨格筋において筋線維タイプ移行が起きるとも示唆されている<sup>19)</sup>。常川らは $\beta_2$ アゴニストのクレンプテロールについて筋肥大や筋の解糖系代謝の亢進や筋線維タイプの速筋化や骨組織への成長抑制の影響などについて報告した<sup>58, 60)</sup>。

骨格筋は収縮運動を担うために特殊に分化した器官であり、多数の筋芽細胞が集合した多核細胞であるが、それらは分化する能力を持たない。筋肉の発生は、多能性中胚葉細胞が筋形成体へと決定づけられ筋芽細胞になり、一定の細胞数に達すると互いに融合して多核の筋管細胞になり、成熟後筋線維になる。これらの過程を制御する因子として MyoD ファミリーがある。MyoD ファミリーには、筋肉内で特異的に発現する MyoD、myogenin、Myf-5、MRF 4 があり、MyoD は速筋に、myogenin は遅筋に多く発現している事が知られている<sup>43)</sup>。また、MyoD は筋発達過程に関与しているだけではなく、線維芽細胞や脂肪細胞などで発現すると、それらの細胞を筋肉細胞へと分化させる機能を持っていると言われている<sup>16, 43)</sup>。さらに骨格筋は、多種類の機能的に様々な線維タイプから構成されており様々な条件下で筋線維タイプを変化させる。常川は筋線維の収縮特性の決定因子としてミオシン重鎖 (Myosin heavy chain ; MHC) を用いて、蛋白レベルでクレンプテロールによる速筋化を報告した<sup>58)</sup>。その過程における遺伝子レベルでの MyoD の関与は否めないが、詳細は不明であり早急に解析が求められている。

代謝特性に関しては何年もの間乳酸の動態は拡散によって細胞膜を通過していると考えられてきた。この仮説では、乳酸の低い  $K_m$  値から考えると乳酸は生理的条件下では乳酸イオンに解離して存在しゆっくりと細胞膜を通過することになり、細胞外からの拡散による乳酸の動態では多量な乳酸をエネルギー源とする場合の骨格筋においてはエネルギー不足状

態になってしまい筋は正常に機能できないことになる。一般に乳酸の代謝には LDH（乳酸脱水素酵素）と MCTs (mono carboxylate transporter ;モノカルボン酸輸送体)が関与している。LDH には心筋と骨格筋において5つのアイソザイムがあり、遅筋には LDH-H（心臓型）が多く、速筋には LDH-M（筋肉型）が多く発現していて、主として LDH-H は乳酸の酸化に、LDH-M は細胞内のプロトンを減少させ乳酸への還元に関与している。また、乳酸は pH に依存したモノカルボン酸輸送体 (MCTs) 経由で、プロトンと共に心筋や骨格筋を含めた多くの組織の細胞膜を通過することが知られている<sup>8, 38, 39)</sup>。MCTs は今までに MCT1~8 までのアイソフォームの存在が明らかにされている<sup>24, 49, 66)</sup> が、そのうちの MCT1 は速筋に比べて酸化系代謝の発達した遅筋などに豊富で、特に心臓において多く発現し、乳酸の細胞内への取り込みに関与していると言われている。また MCT4 は速筋に多く発現しており細胞内からの乳酸の排泄に関与していると言われている<sup>63)</sup>。MCT1 は 494 個のアミノ酸によって構成されており細胞膜を 1 2 回貫通し N 末端、C 末端部分ともに膜の内側にある。このような特徴はグルコース輸送担体 (GLUT) をはじめ多くの輸送担体に見られる特徴であるが MCT1 では特に C 末端部分のアミノ酸配列に特異性が高い。北浦らは雄ラットにおいてドーピング禁止薬物に指定されている  $\beta_2$  アゴニストのクレンプテロールの 4 週間投与によりヒラメ筋 (SOL) と長指伸筋 (EDL) とともに MCT1 蛋白発現が有意に減少すること<sup>59)</sup> や、雌ラットでは SOL においては減少傾向を、EDL においては有意に減少することを報告した<sup>60)</sup>。また近年、MCT1 は細胞膜に存在しているが、その膜移行に関与していると示唆されている CD147 (別称 EMMPRIN) と呼ばれる膜蛋白質が発見されている<sup>32)</sup>。CD147 は MCT1 と組織局在性が類似することが示唆され、ラットの心臓において MCT1 と同じ局在を示していると報告されており<sup>32)</sup>、MCT1 の動態と同じ挙動を示す可能性がある。小林らはクレンプテロール投与で、MCT1 と CD147 が共に減少することを報告した<sup>34)</sup> がそれらの発現制御機構は不明である。

クレンプテロールのような  $\beta$  アゴニストは脂質代謝亢進作用があり、脂質代謝亢進時に熱産生を伴うことが知られている。体内の熱産生に関与する脱共役蛋白質 (Uncoupling

protein:UCP) はミトコンドリア内膜に存在する蛋白質である<sup>33)</sup>。UCPにはいくつかのアイソフォームがあり UCP1 は褐色脂肪細胞に特異的に発現<sup>10)</sup> し、UCP2 は幅広くさまざまな組織で発現していて糖尿病や肥満に関与し<sup>22)</sup>、UCP3 は骨格筋特異的<sup>9)</sup> に UCP4 は脳特異的<sup>36)</sup> に発現し、熱調整に関わっている。UCPs は呼吸によって生じた内膜のプロトン濃度勾配を ATP を合成することなく解消し、熱を発生させる。人においては新生児期に多く発現し、成長するに従い減少していくが、水泳選手などは一般的に多く発現していると言われている<sup>33)</sup>。UCP3 は絶食や長期間における後肢の無負荷により SOL において有意に上昇するという報告もある<sup>17, 52)</sup>。また、 $\beta_2$ アゴニストによる UCP3 への変化は報告されていないが、 $\beta_3$ アゴニストによって、ラットの腓腹筋において UCP3 の有意な上昇が起こるという報告<sup>44)</sup> もあり、 $\beta_2$ アゴニストであるクレンブテロールの影響も否めない。さらに、クレンブテロール投与によって引き起こされた MCT1 の減少により細胞内に蓄積したプロトンの処理に UCP3 が関与することも考えられるが詳細は不明である。

## II 方法

### 投与条件

実験動物として7週齢の Sprague Dawley 系雌ラット (日本 SLC, Hamamatsu) を用いた。入手後、約1週間は予備飼育を行い、その後無作為に对照群 (CONT: n = 8)、クレンブテロール投与群 (CLEB: n = 8) の2群にグループ化し、二匹ごとに金属ゲージ (25 × 40 × 20 cm) にて飼育した (室温 26 ± 1 °C)。CLEB にはクレンブテロール (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) を皮下注射により連続4週間投与 (2mg/kg/day) し、CONT には同量の生理食塩水を同等量皮下注射した。投与量は通常喘息治療に用いる濃度の1500倍であるが、LD50の1/150であり、他の先行研究<sup>34, 59)</sup> を元に設定した。また飼料 (CRF-1, Charles River Japan, Yokohama) と飲水は、自由摂取とした。体重は毎日12時から13時に計測した。なお本実験は金沢大学宝町地区動物実験指針に従って行った。

## 臓器摘出及び重量測定

4週間投与後、ペントバルビタールナトリウム麻酔薬（ネンブタール、ダイナボット株式会社）の腹腔内注射（50mg/kg）により麻酔し、頸椎脱臼により安楽死させた後、即座に筋肉を摘出し、湿重量を測定した。

使用した筋肉は、心臓と遅筋タイプのヒラメ筋（SOL）と速筋タイプの長指伸筋（EDL）である。SOLとEDLは両肢それぞれを天秤（Hansen Co Ltd., Gebruder Bosch）で測定した後その平均値を採用した。

## LDH活性値測定及びアイソザイム分析

湿重量測定後、右肢の筋と5～6分割した心室筋は液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結し、使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。左肢と心筋の一部は50倍量の試料処理液（0.3 M Sucrose, 0.1 M KCl, 1 m M EDTA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM PMSF, 50mM Tris-HCl, pH 7.4）中、ポリロンホモジナイザー（ULTRA-TURRAX, JANK & Kunkel）で均質化し、オートバランス遠心機（KA-1000, KUBOTA）で遠心分離（ $600\times g$ , 10分）を行った。上清の一部は、Wroblewski-La Dueの方法<sup>65)</sup>に基づいてLDH活性値の測定に使用し、またその一部はアイソザイム分析のためDietzの方法<sup>19)</sup>に従いLDHの電気泳動（ $T=6.5\%$ ,  $C=2.6\%$ ）を行い、泳動終了後乳酸を基質としてPMSを用いる活性染色を行った。

## ウェスタンブロッティング法

### 膜画分の調整

先に凍結しておいた心臓、SOL及びEDLにおいてウェスタンブロッティング解析用のサンプル調整をMcCullaghらの方法<sup>38)</sup>に従っておこなった。各組織を膜画分抽出用処理液（210 mM Sucrose, 2 mM EGTA, 40 mM NaCl, 30 mM HEPES, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7.4）中、ホモジナイザー（ULTRA-TURRAX, JANK & Kunkel）で均質化した。その後高イオン強

度溶液 (1.17 M KCl, 58.3 mM tetrasodium pyrophosphate) を加え、再びホモジナイザー (ULTRA-TURRAX, JANK & Kunkel) で均質化した。この試料を遠心分離 (230,000×g, 75min, 4°C) を行った後、沈殿に洗浄溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) を加え超音波で洗浄した。その後、16% SDS を加えて可溶化し、オートバランス遠心機 (KA-1000, KUBOTA) で遠心分離 (1,100×g, 10min) を行い、その上清をウェスタンブロッティングによる解析に用いた。

#### ウェスタンブロッティング法による MCT1, CD147 蛋白質量の測定

ウェスタンブロッティングは Tamai らの方法<sup>57)</sup> に従って行った。蛋白質試料を電気泳動用バッファー (25 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 192 mM Glycine, 0.1 % SDS) を用い SDS-PAGE (T=12%, C=2.6%) で泳動分画した後、60mA (定電流) 1 時間で、PVDF 膜 (Immobilon-P, Millepore, Bedford, MA) に転写した。転写した膜はブロッキング溶液 (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween20, 10% skim milk, pH 7.5) に浸し、一次抗体をブロッキング溶液で希釈し、37°C で 1 時間反応させた。その後、膜を洗浄用バッファー (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween20, pH 7.5) で 3~4 回洗浄した後、希釈した二次抗体で、室温で 1 時間反応させた。再び、洗浄用バッファーで、3~4 回洗浄した後、検出を ECL Plus Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech UK limited, Buckinghamshire) を用いて行った。

MCT1 に用いたポリクロナール抗体は hamuster MCT1 の 478-494 番目のアミノ酸配列に対応する合成ペプチド (CPQQNSSGDPAEESPV) をニュージーランド白色種ウサギに免疫して作成したもの<sup>56)</sup> を精製して用いた。抗体の生成は、合成ペプチドを用いたアフィニティーカラムで行った。二次抗体には HRP 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Buckinghamshire) を洗浄用バッファーで 5,000 倍希釈して使用した。また、CD147 の検出には、一次抗体に抗 EMMPRIN ヤギポリクロナール抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.,

Delaware Ave, CA)をブロッキング溶液で 100 倍希釈して用い、二次抗体に HRP 標識ロバ抗ヤギ IgG 抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Delaware Ave, CA)をブロッキング溶液で 3,000 倍希釈して使用した。

### MHC の解析

MHC 解析用に、MCT1 と同様に凍結した右肢の一部を Talmadge&Roy の方法<sup>55)</sup>に従い試料調整液(2 % SDS, 5 % 2-ME, 10 % Glycerol, 0.001 % BPB, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8)で処理を行った後、100°Cの湯浴中で 3 分間の加熱処理をし、SDS 電気泳動分析(T=8.0%, C=2.0%)にかけた。泳動終了後、銀染色法により可視化した。

### RT-PCR 法

#### 各組織からの total RNA の抽出

ラットから採取した心臓、SOL と EDL の total RNA 抽出には ISOGEN(ニッポンジーン社)を用いた。それぞれの組織片約 30mg に ISOGEN 1mL を加えホモジナイズ用ペッスルを用いてホモジナイズし、室温で 5 分間放置した。その後、0.2mL のクロロホルムを加え、15 秒間ボルテックスし、さらに室温で 3 分間放置後、15 分間遠心(4°C, 12,000×g)した。水相を採取し、0.5mL のイソプロパノールを加え、転倒混和後、室温で 7 分間放置した。その後、5 分間遠心(4°C, 12,000×g)し、上清を取り除いた。RNA のペレットを 70%エタノール 1mL で洗浄した後、5 分間遠心(4°C, 7500×g)し、上清は捨てた。

#### Complementary deoxyribonucleic acid(cDNA)の作製

RNA のペレットを室温にて風乾し、0.1%DEPC 水処理水に溶解した。逆転写反応は抽出した RNA に逆転写反応液(75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, 1.0 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 20 unit Rnase inhibitor, 50 pmol random



primer, 200 unit M-MLV reverse transcriptase)を加え 30℃、10 分間プレインキュベートした後、42℃、20 分間インキュベートし cDNA を合成した。

#### PCR による mRNA の検出

PCR は 2  $\mu$  L の逆転写反応溶液に、50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP Mixture, 1 mM 特異的 sense および anti sense プライマー, 1.25 unit KOD Dash (DNA polymerase) を含む 20  $\mu$  L の系にミネラルオイルを重層して thermal cycler (PCR System 9700, Applied Biosystems 社) で増幅した。

ラット G3PDH [Gene code:G65758] に対するプライマー配列は、

sense            5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'

anti sense        5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 452bp である。

PCR の条件は熱変性 98℃ 10 秒、アニーリング 55℃ 10 秒、増幅反応 74℃ 30 秒、30 サイクルで行った。

ラット MCT1 [Gene code:RH132318] に対するプライマー配列は、

sense            5'-AGTGAGCATTCAGAAAGAGGTG-3'

anti sense        5'-TCAGACAGACATTGTTACCGGA-3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 219bp である。

PCR の条件は熱変性 98℃ 10 秒、アニーリング 65.0℃ 10 秒、増幅反応 74℃ 30 秒、32 サイクルで行った。

ラット EMMPRIN [Gene code:RH80808] に対するプライマー配列は、

sense 5'-CGGAGTCCACTCCCAGTGC-3'

anti sense 5'-CCATGACTCAGACCCAGAGG-3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 397bp である。

PCR の条件は熱変性 98°C 10 秒、アニーリング 48.0°C 10 秒、増幅反応 74°C30 秒、35 サイクルで行った。

ラット MyoD[Gene code:RH131048]に対するプライマー配列は、

sense 5'-GATTTCCAGGAAGCAGCTCAGT-3'

anti sense 5'- CATTTCAGGCTGTGTGTGTCAA -3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 189bp である。

PCR の条件は熱変性 98°C 10 秒、アニーリング 65.2°C 10 秒、増幅反応 74°C30 秒、35 サイクルで行った。

ラット UCP3[Gene code:RH94827]に対するプライマー配列は、

sense 5'-CAGAACAAAGCTTCTCTGCC-3'

anti sense 5'- ATTTCCCATCTGGTCAGTGC-3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 163bp である。

PCR の条件は熱変性 98°C 10 秒、アニーリング 63.2°C 10 秒、増幅反応 74°C30 秒、35 サイクルで行った。

#### 蛋白濃度測定

蛋白濃度測定は BCA Assay Kit (PIERCE, Rock ford, IL) を用いて測定し、牛血清アルブミン (BSA) を標準として用いた。

## 統計処理

すべての統計値は平均値±SD で示した。統計処理は重量と LDH 比活性値に関するデータについてはF-検定の後 unpaired t-検定を行い、その他のデータについてはANOVAで検定の後、群間の差は Scheff's 法にて有意差検定を行った。有意水準は  $p < 0.05$  または  $p < 0.01$  とした。

## III 結果

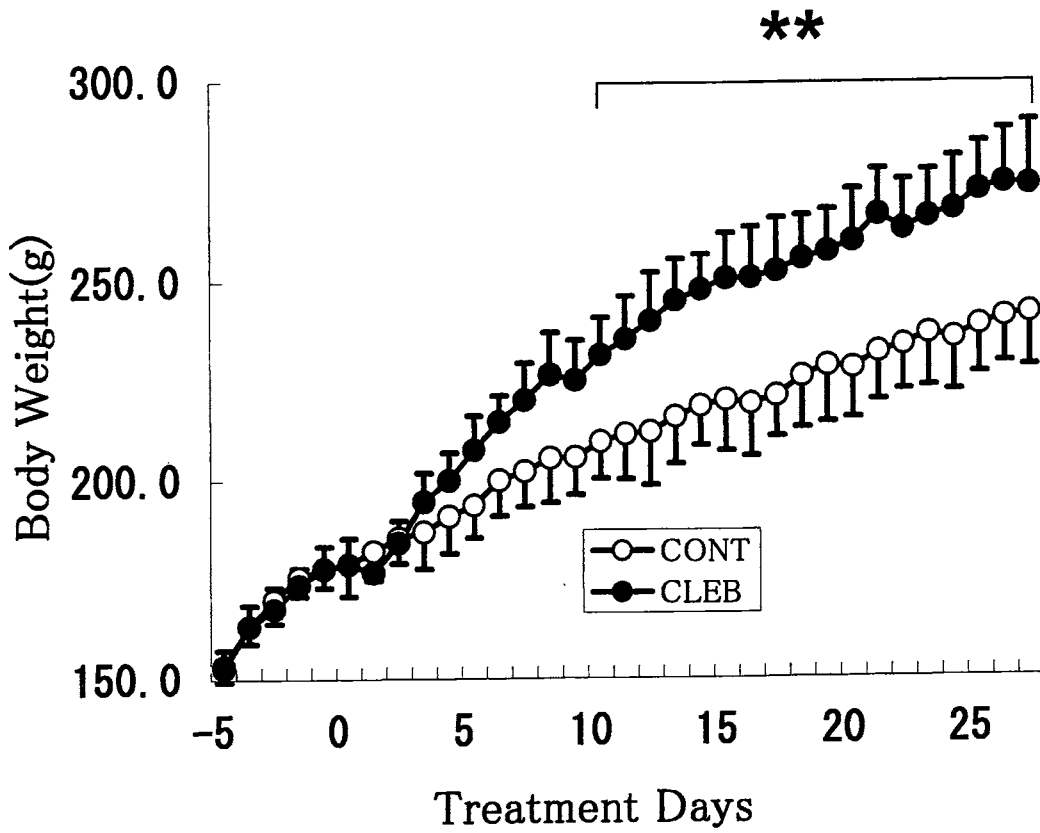
### ラットの体重および筋湿重量変化

ラットの CLEB, CONT の体重変化を Fig 1 に示した。

投与開始時、CLEB (178±7g)、CONT (178±8g) であった。投与一日後、投与群において一過性の減少を示したが、投与三日後には CONT を上回った。その後、CLEB において体重増加が顕著に見られ、投与 10 日後には CONT のを有意に上回った (CLEB : 231±9g, CONT : 210±9g ;  $P < 0.01$ )。その後、投与 4 週間後まで有意な増加傾向を維持した (CLEB : 273±16g, CONT : 241±13g ;  $P < 0.01$ )。

筋湿重量については Table 1 に示した。

心臓 (CLEB : 974±34mg, CONT : 863±59mg)、SOL (CLEB : 146±10mg, CONT : 118±6mg) 及び EDL (CLEB : 170±24mg, CONT : 118±21mg) すべてにおいて有意な増加 ( $P < 0.01$ ) を示した。それぞれの体重の差異を考慮して算出した体重比では心臓 (CLEB : 3.58±0.30mg/g, CONT : 3.59±0.33 mg/g) においては有意な増加は見られなかったものの、SOL (CLEB : 0.54±0.04 mg/g, CONT : 0.49±0.05 mg/g) および EDL (CLEB : 0.62±0.08 mg/g, CONT : 0.49±0.09 mg/g) において有意な増加を示し (SOL ;  $P < 0.05$ , EDL ;  $P < 0.01$ )、心肥大と骨格筋の筋肥大が認められた。



**Fig 1 The effect of Clenbuterol Treatment on Body Weight of Female Rat**

Body weight of CONT rats(n=8)and CLEB rats(n=8) are shown in Means  $\pm$  S.D. Significant defference between CONT and CLEB, \*\*P<0.01

Table 1  
 The effect of 4 weeks Clenbuterol Treatment  
 In Female Rat Body weight and muscle wet weight

	CONT(n=8)	CLEB(n=8)
Body weight (g)	241±13	273±16 **
Heart wet weight (mg)	863±59	974±34 **
ratio	3.59±0.33	3.58±0.30
SOL wet weight (mg)	118±6	146±10 **
ratio	0.49±0.05	0.54±0.04 *
EDL wet weight (mg)	118±21	170±24 **
ratio	0.49±0.09	0.62±0.08 **

Values are means±S.D.

Significant difference between CONT and CLEB, \*\*P<0.01, \*P<0.05

#### MHC の解析

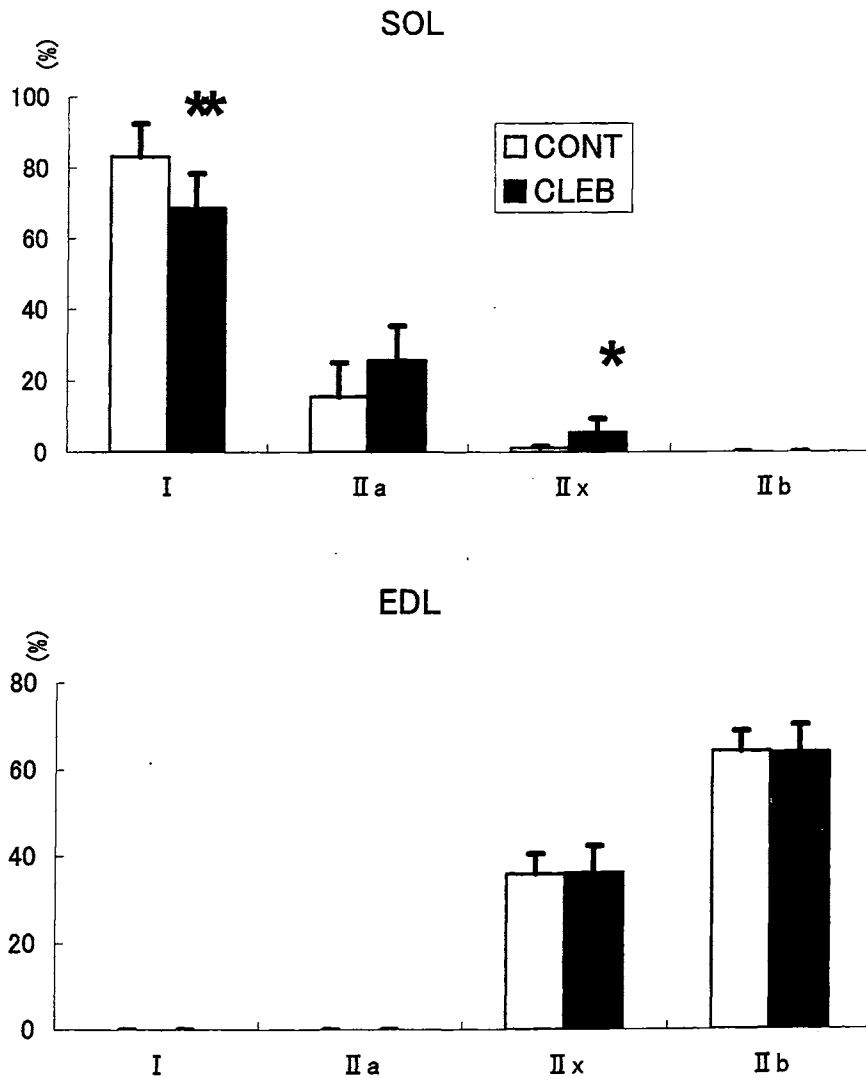
収縮特性に関して MHC アイソフォームの解析結果を Fig 2 に示した。

SOL においては MHC アイソフォームの各タイプ (Type I, Type II a, Type II x, Type II b) の割合 (%) は CLEB (69.6±12.1, 24.9±11.8, 5.5±4.1, 0) が CONT (80.9±11.5, 17.2±11.2, 1.8±1.6, 0) に比べて Type I での有意な減少 (P<0.01) とそれに連動した Type II x の有意な増加 (P<0.01) を示した。一方、EDL においてその割合 (%) は CLEB (0, 0, 37.2±5.8, 62.8±5.8) と CONT (0, 0, 35.8±4.7, 64.2±4.7) で差は小さく SOL のような有意な変化は見られなかった。

RT-PCR 法による MyoD の mRNA 発現量に及ぼすクレンプテロールの影響

筋分化過程に関与している MyoD の mRNA 発現量の解析結果を Fig 3 に示した。

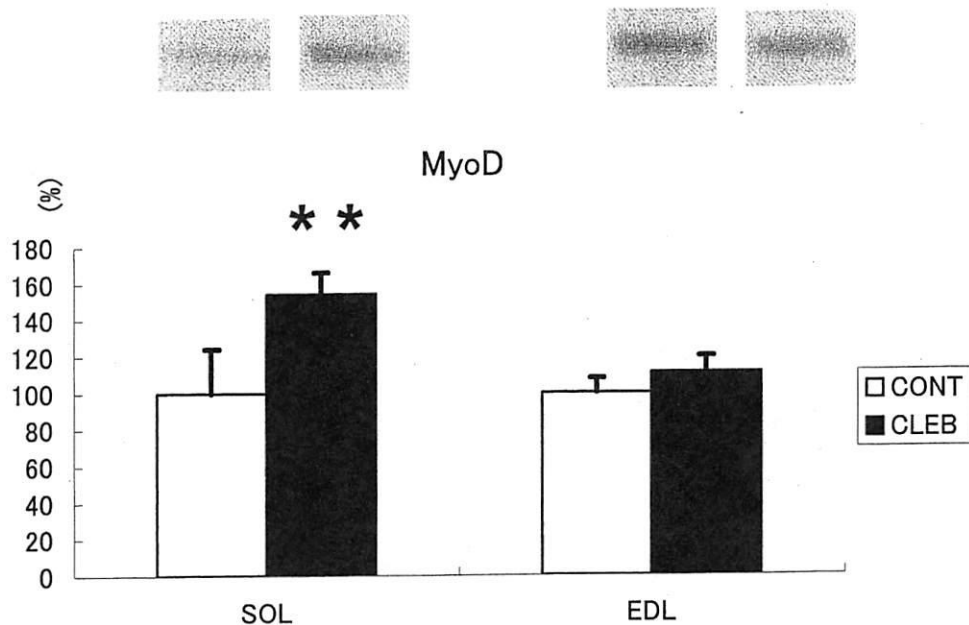
SOL においては CLEB が CONT に比べて有意な増加が認められた (CLEB:  $154.2 \pm 12.0\%$ , CONT:  $100.0 \pm 24.1\%$ ;  $P < 0.01$ )。一方、EDL においてその割合は CLEB と CONT で差は小さく SOL のような有意な変化は見られなかった (CLEB:  $111.2 \pm 8.9\%$ , CONT:  $100.0 \pm 7.8\%$ )。



**Fig 2 The effect of 4 weeks Clenbuterol Treatment in Female Rat MHC composition in SOL and EDL**

Values are means  $\pm$  S.D.

Significant difference between CONT and CLEB, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$



**Fig 3 The effect of 4 weeks Clenbuterol Treatment in Female Rat MyoD mRNA Expression in SOL and EDL**  
 Values are means  $\pm$  S.D.

Significant difference between CONT and CLEB,  $**P < 0.01$

#### LDH の解析

#### LDH 活性に及ぼすクレブテロールの影響

Table 2 に LDH 比活性値を湿重量当たり (IU/g w. wt.) で示した。心筋では、湿重量当たりの比活性値は CLEB が  $335.4 \pm 70.4$ , CONT が  $223.9 \pm 46.5$  であり有意な比活性の上昇 ( $P < 0.05$ ) が見られた。SOL においては有意な変化は見られなかったものの減少傾向が見られた (CLEB ;  $94.9 \pm 4.0$ , CONT ;  $108.6 \pm 7.2$ )。EDL においても、湿重量当たりの比活性値に有意な変化は見られなかった (CLEB ;  $306.3 \pm 24.8$ , CONT ;  $297.4 \pm 17.2$ )。

#### LDH アイソザイムに及ぼすクレブテロールの影響

有酸素的性質の強い心臓型の 4 量体から順に H4 型、H3M 型、H2M2 型、HM3 型、M4 型へ

と筋肉型の無酸素的性質の強くなる5つのアイソザイムに分けられるDiets法による電気泳動法により分析したそれらの構成比をFig 4に示した。SOLにおいて、移動度の大きい方からH4、MH3、M2H2、M3H、M4の5本のバンドが認められた。SOLにおいては、CLEB群においてM4型で有意な増加 (CLEB: 10.5±4.0%, CONT: 4.2±0.9%; P<0.01) と、H2M2型の有意な減少 (CLEB: 19.5±6.2%, CONT: 35.2±7.2%; P<0.01) が見られ、SOLのアイソザイム分布はクレンプテロール投与によって有酸素的な分布から無酸素的な速筋タイプの分布への移行が認められた。同様にHeart、EDLにおいても5本のバンドが認められたが、アイソザイム分布についてはいずれも有意な変化は認められなかった。

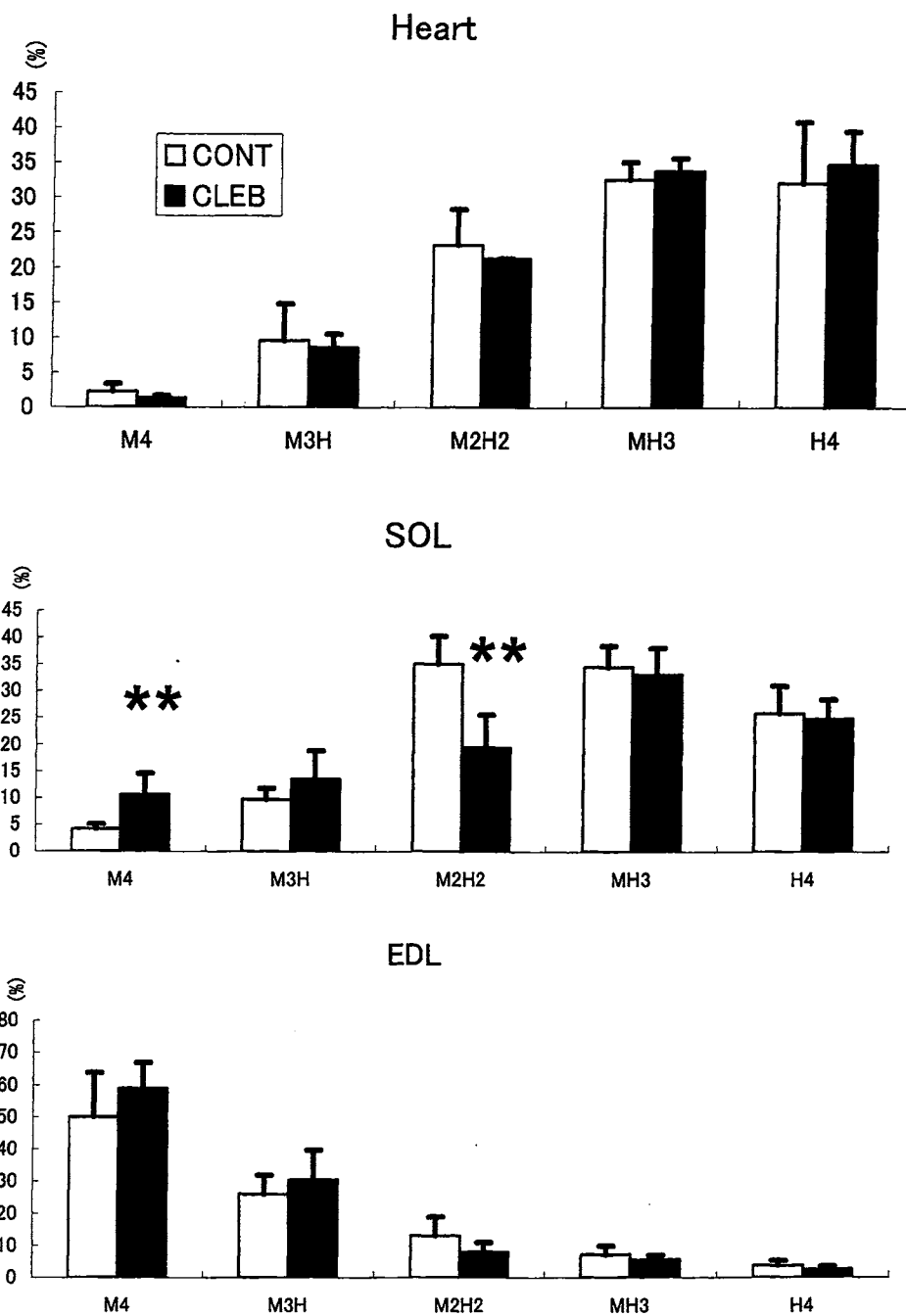
**Table 2**  
**The effect of 4 weeks Clenbuterol Treatment**  
**In Female Rat Muscle LDH Specific Activity**

		CONT(n=8)	CLEB(n=8)
Heart	(IU/g w.wt)	223.9±46.5	335.4±70.4 *
SOL	(IU/g w.wt)	108.6±7.2	94.9±4.0
EDL	(IU/g w.wt)	297.4±17.2	306.3±24.8

Values are means±S.D.

Significant difference between CONT and CLEB, \*P<0.05





**Fig 4 The effect of 4 weeks Clenbuterol Treatment in Female Rat LDH Isozyme Distribution**

Values are means  $\pm$  S.D.

Significant difference between CONT and CLEB, \*\*P < 0.01

#### RT-PCR 法による MCT1 の mRNA 発現量に及ぼすクレンプテロールの影響

心筋、SOL 及び EDL における MCT1 の mRNA 発現量の分析結果をそれぞれ CONT の平均値に対する割合 (%) で Fig 5 に示した。心筋 (CLEB:98.8±9.7, CONT:100.0±8.6) ではほとんど変化が見られなかったものの SOL (CLEB:88.4±9.5, CONT:100.0±13.0) においては有意な差は見られなかったが減少傾向が見られた。また、EDL (CLEB:58.0±7.4, CONT:100.0±8.4) においては有意な減少 ( $P<0.01$ ) が認められた。

#### MCT1 蛋白質発現量に及ぼすクレンプテロールの影響

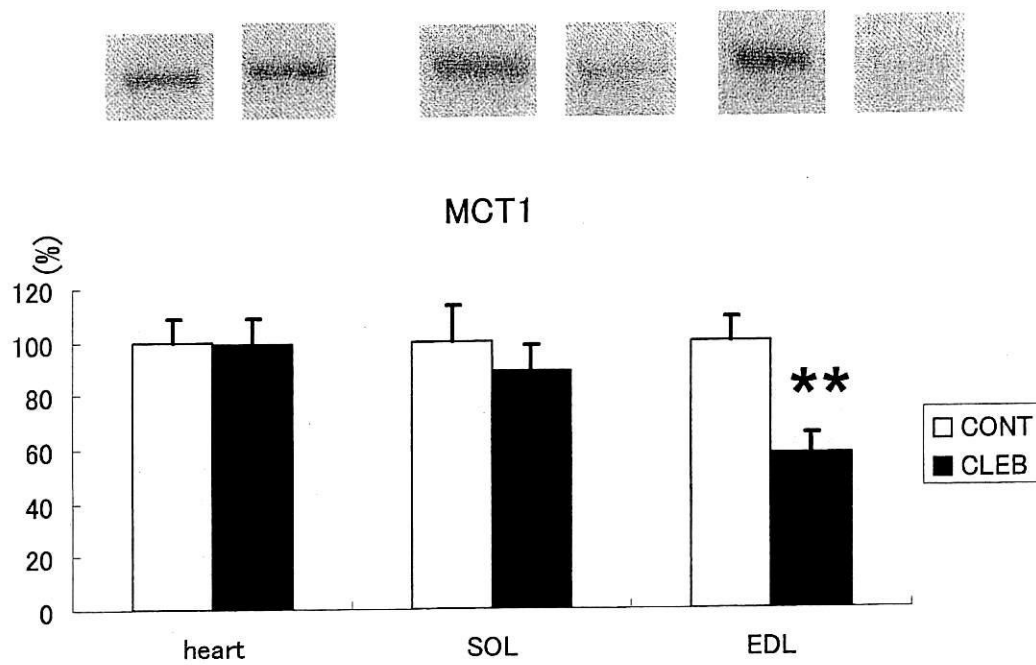
ウェスタンブロットティング法による心筋、SOL 及び EDL における MCT1 蛋白質発現量の分析結果をそれぞれ CONT の平均値に対する割合 (%) で Fig 6 に示した。MCT1 の mRNA レベルから見た結果と同様に心筋 (CLEB:93.9±15.0%, CONT:100.0±27.6%) では変化が無かったものの SOL (CLEB:76.8±31.3%, CONT:100.0±41.2%) で有意な差では無いものの減少傾向を示し、EDL (CLEB:18.6±9.0%, CONT:100.0±32.2%;  $P<0.01$ ) においては有意な減少が認められた。

#### RT-PCR 法による CD147 の mRNA 発現量に及ぼすクレンプテロールの影響

心筋、SOL 及び EDL における CD147 の mRNA 発現量の分析結果をそれぞれ CONT の平均値に対する割合 (%) で Fig 7 に示した。心筋 (CLEB:100.5±6.0, CONT:100.0±7.4)、SOL (CLEB:95.9±5.3, CONT:100.0±5.2) や EDL (CLEB:96.6±4.2, CONT:100.0±7.2) すべてにおいて有意な変化は見られなかった。

#### CD147 蛋白質発現量に及ぼすクレンプテロールの影響

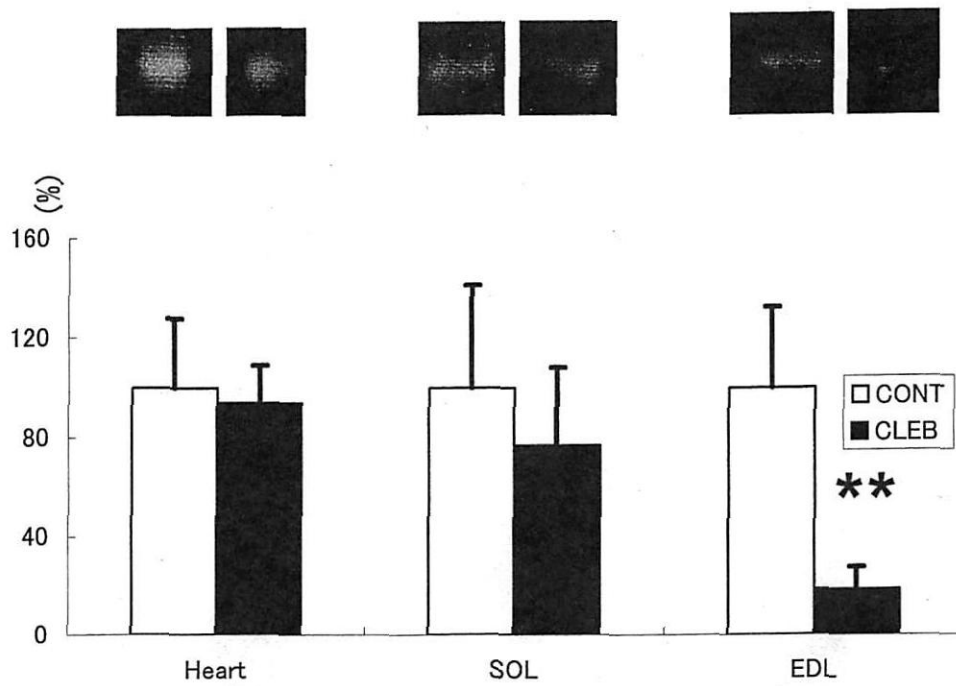
心筋、SOL 及び EDL における CD147 蛋白質発現量の分析結果をそれぞれ CONT の平均値に対する割合 (%) で Fig 8 に示した。心筋 (CLEB:93.5±33.0, CONT:100.0±26.5) では変化が見られなかったものの SOL (CLEB:80.1±25.3, CONT:100.0±25.1) において減少傾向が見られた。また、EDL (CLEB:61.4±18.4, CONT:100.0±21.3) においては有意な減少 ( $P<0.01$ ) が認められた。



**Fig 5 The effect of 4 weeks Clenbuterol Treatment  
in Female Rat MCT1 mRNA Expression**

Values are means  $\pm$  S.D.

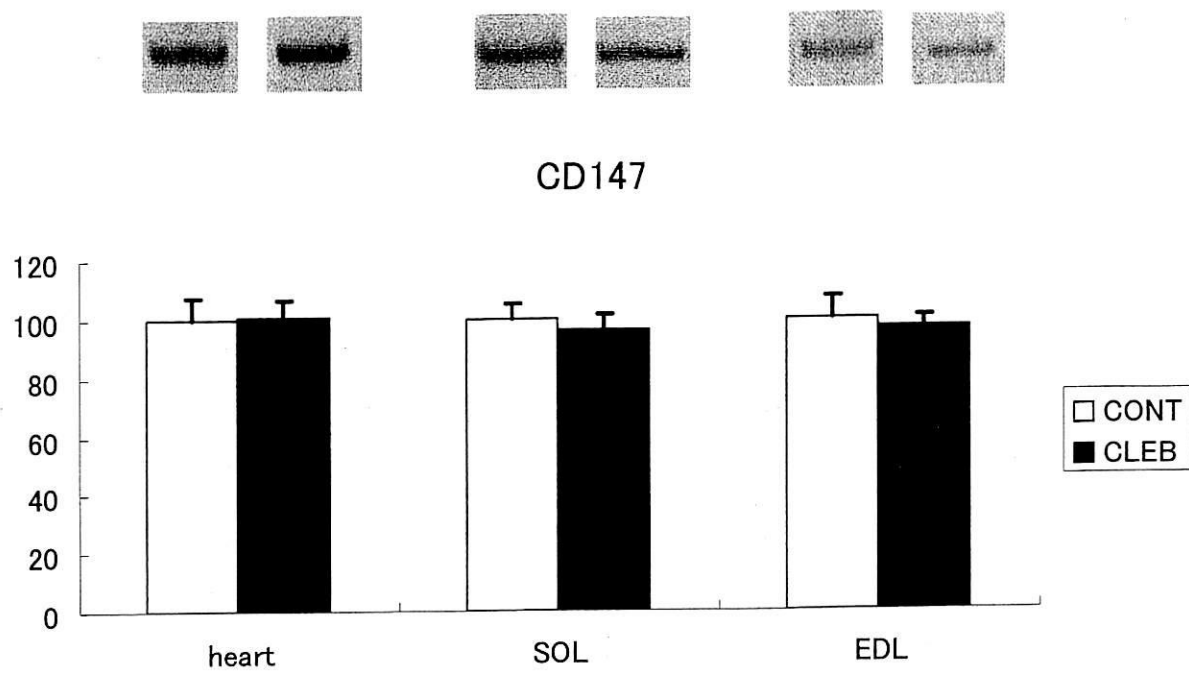
Significant difference between CONT and CLEB, \*\*P < 0.01



**Fig 6 The effect of 4 weeks Clenbuterol Treatment  
in Female Rat MCT1 Protein Expression**

Values are means  $\pm$  S.D.

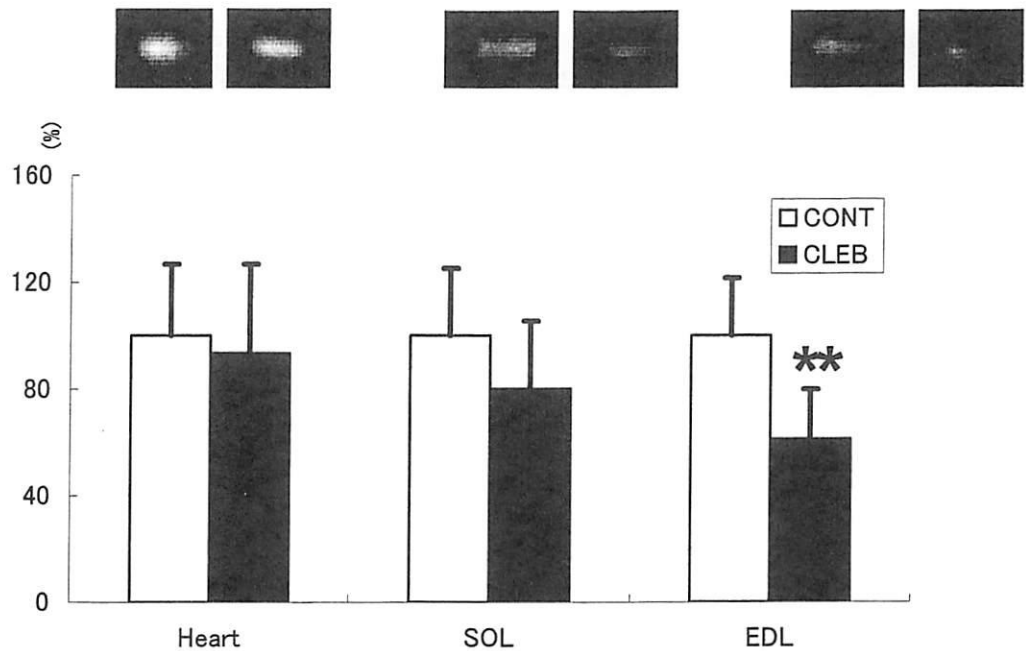
Significant difference between CONT and CLEB, \*\*P<0.01



**Fig 7 The effect of 4 weeks Clenbuterol Treatment  
in Female Rat CD147 mRNA Expression**

Values are means ± S.D.

Significant difference between CONT and CLEB



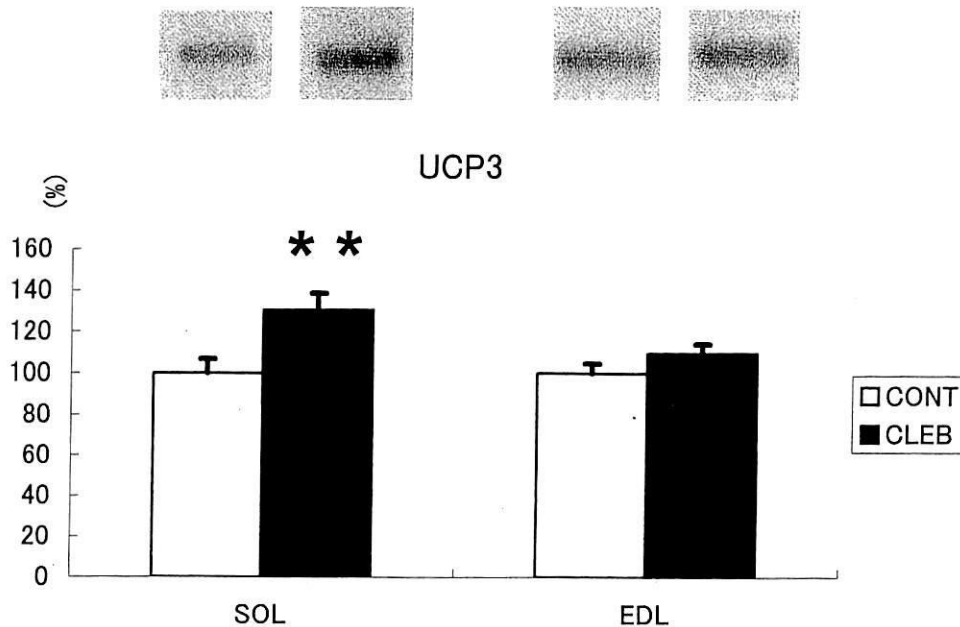
**Fig 8 The effect of 4 weeks Clenbuterol Treatment  
in Female Rat CD147 Protein Expression**

Values are means  $\pm$  S.D.

Significant difference between CONT and CLEB, \*\*P<0.01

RT-PCR 法による UCP3 の mRNA 発現量に及ぼすクレンブテロールの影響

RT-PCR 法による SOL 及び EDL における UCP3 の mRNA 発現量における分析結果をそれぞれ CONT の平均値に対する割合 (%) で Fig 9 に示した。SOL (CLEB:130.6 $\pm$ 8.0, CONT:100.0 $\pm$ 6.9) において CLEB の有意な増加 (P<0.01) が見られた。EDL (CLEB:109.8 $\pm$ 4.6, CONT:100.0 $\pm$ 4.9) においては SOL とは異なり有意な変化は認められなかった。



**Fig 9 The effect of 4 weeks Clenbuterol Treatment in Female Rat UCP3 mRNA Expression in SOL and EDL**

Values are means ± S.D.

Significant difference between CONT and CLEB, \*\*P < 0.01

#### IV 考察

体重に及ぼす影響は、クレンプテロール投与1日後にCLEB群において一過性の減少を示したが、その後は体重の顕著な増加が見られた (Fig. 1)。雄ラットでは、投与2週間まで体重の増加が起こり、投与2週間後CLEB群において成長抑制が見られた<sup>5)9)</sup>が、本実験で用いた雌ラットにおいてはその傾向は見られず、投与4週間まで体重増加が見られた。この事はクレンプテロール (2 mg/kg/day) を17週齢のS.D.系雌ラットに6週間連続投与した際に12日目に差が一番大きく見られ、その後CLEBの体重が多のまま推移したCriswellらの報告<sup>1)5)</sup>とほぼ同様の結果であった。クレンプテロール投与において、常川の報告<sup>5)9)</sup>と今回の実験とは性差が認められた。この原因は明らかではないが、性ホルモンなどの関与により、 $\beta_2$ レセプターの Down regulation の発生や、薬物代謝や排泄速度での性差の関与<sup>6)7)</sup>が考えられるが詳細は不明である。

また、この CLEB 群における体重の有意な増加には、クレンプテロール投与による GH<sup>1 2)</sup>や IGF-1<sup>6)</sup> などの関与、またエピネフリン動員増加による蛋白合成系の亢進や蛋白分解系の抑制<sup>4 3)</sup> などの関与も考えられる。投与後に見られた体重の一過性の減少については、皮下注投与の際におけるラットに対してのストレスの影響や中枢神経系への影響も考えられるが詳細は不明である。

筋湿重量において、Table 1 に示したように SOL 及び EDL において共に有意な増加 ( $P < 0.01$ ) が見られた。特に EDL においては体重比にも有意な増加 ( $P < 0.01$ ) が認められた。筋肥大に関しては雌での報告<sup>5 9)</sup> とほぼ同じ結果を示し、遅筋よりも速筋において強く影響しているという Kim らの報告<sup>3 1, 4 7, 5 4)</sup> を支持するものであった。しかしながら、遅筋のほうが速筋よりも  $\beta_2$  レセプターが多く発現していること<sup>3 7, 6 2)</sup> を考慮すると  $\beta_2$  アゴニストであるクレンプテロールの直接作用よりも IGF-1<sup>6)</sup> など成長因子等の間接的作用を考えざるをえない。本研究では実施できなかったが最近報告されたクレンプテロール飲水投与により SOL において IGF-1 の mRNA 発現量が増加しそれに伴い IGF-1 量も増加するという報告が<sup>3)</sup> そのことを支持している。また、 $\beta_2$  レセプターを介した筋肥大の機序については蛋白合成促進作用によるものとカテプシン B などの蛋白分解抑制作用によるもの<sup>3 4, 3 5)</sup> とそれら両方によるものなどが考えられるが原因の詳細は不明であり、今後の検討課題である。

筋湿重量に関して CLEB 群では Table 1 で示したように心筋においても有意な増加 ( $P < 0.01$ ) が見られ、心肥大が観察された。この結果は、Wong らをはじめとする報告<sup>4 2, 4 5, 6 4)</sup> と一致するものであった。しかし、体重比では差が認められないことから全身的なバランスを維持した上での成長促進とも考えることができる。本研究では詳細な検討ができなかったが、これまで心肥大に関しては IGF-1 やカルシニューリンやレニン-アンギオテンシン系の関与が示唆されている。IGF-1 はラットの培養心筋細胞に対して細胞容積の増大、ミオシン軽鎖、トロポニン I などの mRNA 発現量の増加をもたらす<sup>2 8)</sup> こと、圧負荷によって心筋の IGF-1 の mRNA 発現量の増加をきたす<sup>6 1)</sup> ことなど心肥大形成における IGF-1 の役割を示唆する報告は多い。また、心筋



組織内にカルシニューリンやレニン-アンギオテンシン系の存在も証明され、ラットの圧負荷モデル<sup>5)</sup>や大動脈-大静脈シャントによって作った容量負荷による心肥大<sup>2,9)</sup>においては、特に心筋内アンギオテンシン変換酵素(ACE)のmRNA含量が増加するという報告もあり、IGF-1同様に局所のレニン-アンギオテンシン系が心肥大形成に関与することが示唆された。心筋細胞膜にはアンギオテンシンII受容体が存在し、培養心筋細胞においては、アンギオテンシンII刺激によってRNA含量や蛋白合成が亢進する<sup>4)</sup>ことから、その直接的作用によって心筋細胞の肥大をきたすものと考えられる。さらにアンギオテンシンIIには交感神経末端や副腎髄質よりのノルアドレナリン分泌促進作用があり、カテコラミンを介した間接的な心筋肥大作用を有することも考えられる。従ってβアゴニストによる心肥大の原因には交感神経の亢進<sup>3,7)</sup>やレニン-アンギオテンシン系の関与<sup>1,1)</sup>によるものなど、種々考えられ、現時点では結論は得られていない。またβ<sub>2</sub>アゴニスト投与による心肥大に伴った細胞増殖と関わりのあるポリアミンの濃度変化も報告<sup>1,6)</sup>されているがそれらについても明らかにされておらず今後の興味深い検討課題である。

骨格筋の収縮特性に及ぼす影響に関して、MHCアイソフォームタイプの解析で、SOLにおいてCLEBがCONTに比べてType Iでの有意な減少(P<0.01)とそれに伴ったType IIxの有意な増加(P<0.05)が認められた(Fig 2)。この結果からMHCの組成から考えて遅筋であるSOLのMHCが遅筋型から速筋型のアイソフォームへと推移したことで速筋化が起こっていることが考えられる。一方、速筋であるEDLではMHCには、変化が認められず、クレンブテロールの影響はほとんど無いと考えられる。この結果は11週齢のWistar系ラットにクレンブテロールを8週間投与した際に、速筋である腓腹筋では変化は見られず、遅筋のSOLにおいて速筋化現象が見られたというRajabらの報告<sup>15, 20, 43, 50)</sup>と一致するものであった。また、Adamsらは、甲状腺ホルモンによって、遅筋でMHC IのmRNA発現量の減少とMHC IIa、MHC IIx蛋白発現量の増加が起こり、速筋ではMHC IIb蛋白の増加、MHC IIa、MHC IIx蛋白発現量が減少することを報告<sup>1)</sup>している。以上のように、骨格筋の筋線維はいろいろな状況下で連続的にタイプ移行することが知ら

れている。また、骨格筋の MHC アイソフォームは除神経、機械的負荷や無負荷、T4 や T3 や加齢により、Pette の報告<sup>46)</sup> のように nearest-neighbor の規則に従って、速筋型から遅筋型、遅筋型から速筋型へと連続的に移行すると考えられる。しかし、頻度としては少ないが機械的無負荷、甲状腺機能亢進症やそれら両方の作用によって不連続的に筋線維タイプが移行するという Caiozzo らの報告<sup>13)</sup> もあり、変化の仕方の詳細は不明である。そこで、本研究では MHC アイソフォーム変化をさらに詳しく解析するために筋分化過程に関与しているといわれる MyoD を mRNA レベルでの解析を試みた。

myogenic 制御因子である MyoD の mRNA 発現レベルを Fig 3 に示した。SOL において CONT に比べ CLEB において有意な増加 ( $P < 0.01$ ) が観察されたが、一方 EDL においては影響が見られなかった。これはクレンプテロール投与によって SOL において MyoD の mRNA 発現が増加するという Mozdik らの報告<sup>43)</sup> と一致するものであった。また、MyoD は筋湿重量よりも MHC のタイプ移行、特に MHC II x や MHC II b の発現に関与しているという Mozdik らの報告を考慮すると、MyoD 発現の上昇は筋の速筋化とリンクしていることが考えられる。これらの結果から、クレンプテロール投与により  $\beta_2$  レセプターが豊富にある SOL において影響が強く表われ、MyoD の mRNA 発現レベルの上昇が引き起こされ、MyoD の関与が示唆されている MHC II x や MHC II b の蛋白発現の増加が起こり、速筋化が引き起こされたものと考えられる。

クレンプテロールの代謝特性への影響に関しては Fig 4 に示した LDH アイソザイムの解析結果より、SOL において特異的に有意な LDH-H 型から LDH-M 型への移行 ( $P < 0.01$ ) が認められ無酸素的解糖系の代謝が亢進していると考えられ、常川らの結果<sup>59)</sup> を支持するものであった。

LDH 活性値に関しては、有意な変化が認められなかったものの SOL において減少傾向が見られた。この測定には基質としてピルビン酸を用いており、SOL における活性値の減少は、そのアイソザイムが速筋化しているにもかかわらず乳酸蓄積が減少していることに由来すると思われる。このことは MCT1 の減少によることが予想され、Fig 4 に示した MCT1 蛋白発現の減少もこのことを支持するものである。Dodd らはクレンプテロール投与によって PFK の総活性値が遅

筋の SOL で有意に増加したが ( $P < 0.05$ )、速筋の足底筋では有意差が見られず遅筋での解糖系の亢進が起こると報告<sup>20)</sup>している。その結果は今回の結果を支持するものであった。しかしながら、 $\beta_2$ レセプターが多く存在する SOL においてクレンプテロール投与により LDH の比活性の減少がおきたことは、筋肥大と同じように蛋白分解酵素の活性化が起こったものと推察されるが、詳細は不明であり今後の検討課題である。また、EDL や心臓ではアイソザイム分布に変化は見られなかったものの LDH 活性値の上昇が見られた。この事は、嫌氣的代謝が亢進している臓器ではメカニズムは不明であるが乳酸は十分に処理されていることが考察される。

LDH に加えて、クレンプテロール投与による乳酸代謝への影響を乳酸トランスポーター MCT1 の mRNA 発現レベルから検討した。まず、MCT1 の蛋白発現レベルを Fig 6 に示した。SOL において MCT1 蛋白発現量の減少傾向を、EDL においては MCT1 蛋白発現量の有意な減少 ( $P < 0.01$ ) が見られたが、心臓において変化は見られなかった。次に Fig 5 に MCT1 の mRNA 発現レベルを示した。この結果から、MCT1 蛋白発現と同様に心臓には変化が無く SOL、EDL において mRNA 発現の有意な減少 ( $P < 0.01$ ) が認められた。特に EDL における MCT1 の減少は急速な筋肥大に伴ったものと推察される。筋肥大の際には IGF-1 の関与が示唆されているが、IGF-1 による MCT1 の mRNA 転写抑制または蛋白分解活性化への関与が考えられるが、このことに関しての報告は無く、今後の検討課題である。

また、膜蛋白質である MCT1 の細胞膜移行に関与している、イムノグロブリンスーパーファミリーの CD147 についても検討した。CD147 の蛋白発現について Fig 8 に示した。この結果から MCT1 の蛋白発現と同じ変化をしていることが認められた。このことは、McCullagh らの報告<sup>7, 30, 39)</sup>にもあるように、骨格筋において、MCT1 の増加、減少に伴い乳酸輸送活性が変化すること、また、MCT1 蛋白発現と平行して CD147 蛋白発現量も減少したことから、乳酸輸送活性の低下が示唆される。次に、CD147 の mRNA 発現レベルを Fig 7 に示した。この結果から、心臓、SOL と EDL すべてにおいて、CD147 蛋白発現の結果とは異なり CD147mRNA 発現レベルでは変化は見られなかった。MCT1 と CD147 蛋白発現量が SOL や EDL において共に減少し

たことから、MCT1 と CD147 蛋白発現制御には何らかの相関性があるものと考えられる。しかし、mRNA レベルから考えると、MCT1 の mRNA 発現レベルは MCT1 蛋白発現と類似した変化が見られたのに対し CD147 の mRNA 発現レベルでは変化が見られなかったことから、CD147 は MCT1 の膜移行に影響を与えるがそれ自体の蛋白発現には MCT1 とは異なる制御を受けている可能性が考えられる。最近、Fanelli らは *in vitro* のラット甲状腺細胞で MCT1 蛋白発現の増加を誘導する因子である甲状腺刺激ホルモン (TSH) を細胞に投与した際に、CD147 の mRNA 発現レベルは変化することなく一定であったのに対し MCT1 の mRNA 発現レベルは時間が進むにつれ徐々に増加するという報告<sup>22)</sup> をした。この甲状腺細胞では、嫌氣的解糖系が亢進した状態の速筋化とは違ってはいるが、Fanelli らの報告のように MCT1 の mRNA 発現レベルよりも CD147 mRNA 発現レベルに変化が見られなかったことから、先述したように CD147 が MCT1 の膜移行を制御しているにもかかわらず CD147 自体の発現は MCT1 と異なる制御が関係している可能性が示唆される。また、この甲状腺細胞は約 70% 好気性解糖系によってエネルギーを得ており、TSH によりグルコースの取り込みが増加することも知られている<sup>21, 27, 30, 51)</sup>。この取り込みには GLUT1 が関与していると言われているが通常ヒトの甲状腺細胞では不思議にも GLUT1 は検出されない<sup>26)</sup> ことから、その他の GLUT s の変化も検討してみる必要があると思われる。以上のことから、MCT1 や CD147 の変動に伴ったグルコース取り込みに関わる GLUT s の関与の解析も今後の重要な検討課題である。

さて、脱共役蛋白質 (UCP) はミトコンドリア内膜に存在する膜蛋白であり、呼吸によって生じる内膜のプロトン濃度勾配を ATP 合成することなく解消し、熱を発生するといわれている<sup>33)</sup>。UCPs は冬眠動物や小型のげっ歯類の非ふるえ熱産生部位である褐色脂肪細胞の蛋白質として知られ、ヒトにおいても、新生児期に多く存在しているが成長するにつれて褐色脂肪細胞は無くなる<sup>33)</sup>。これまでに UCPs には 4 つのアイソフォームが知られている。UCP1 は体温調節に関与し<sup>10)</sup>、UCP2 は幅広く様々な組織に存在し糖尿病や肥満に関与し<sup>23)</sup>、また、UCP ホモログの UCP3 は骨格筋に特異的に発現し、脂質代謝制御に関与し<sup>9)</sup>、UCP4 は脳特異的<sup>36)</sup> に発現し、

それぞれ熱産生に関与していると考えられている。このように、UCPsは脂質代謝に関与していることが示唆されていて、ダイエット目的に安易にUCP類を活性化させる薬物を使用する可能性があり、薬物の適正使用のために早急に情報が求められている。本実験では、クレンプテロール投与による骨格筋におけるUCP3のmRNA発現レベルをFig 9に示した。ここで、SOLにおいてUCP3のmRNAの有意な増加( $P < 0.01$ )が見られたが、EDLにおいては変化が見られなかった。このことから、速筋化が生じているSOLでは、解糖系の亢進が起こり、プロトンを共輸送するはずのMCT1の減少により細胞内プロトンの処理が出来ず細胞内pHが下がって筋の機能低下が発生しまう。そこで、ATPを必要とせずプロトンを処理できるUCP3が増加している可能性が推察される。UCP3は、ラットにおいて長期間後肢無負荷により速筋であるEDLにおいては変化が無く、遅筋であるSOLにおいて有意に増加したという報告<sup>18)</sup>もあり、本研究と同様の傾向を示している。また、UCP3は $\beta_3$ 刺激薬で増加する報告<sup>25)</sup>もある。 $\beta_3$ レセプターは、脂肪組織、消化管、肝臓や骨格筋に存在する他<sup>2)</sup>、アドレナリン作動性神経のシナプス後膜にも存在が想定されている。また、Collinsらの報告<sup>14)</sup>で、脂肪細胞には $\beta_2$ レセプターも存在していることが示唆されている。本実験で使用したクレンプテロールは選択的 $\beta_2$ 刺激薬ではあるが、 $\beta_3$ 受容体を刺激することも否めない。クレンプテロール投与により筋組織に混在する脂肪細胞にある $\beta_2$ 受容体を刺激したことによってUCP3が増加したことも考えられるが、そのような報告は現在まで無く、詳細は今後の検討課題である。さらに、UCP3は脂質代謝への関与が示唆されている<sup>69)</sup>ことからそこに関与しているペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$

(PPAR $\gamma$ )の関与も考えられる。また燃料基質としてグルコースから脂質へとシフトする際にUCP3が関与している可能性がありグルコース輸送に関わるGLUTs、特に骨格筋ではGLUT4の関与の解析も今後の興味深い検討課題である。以上のようにクレンプテロールの作用は多岐に渡っており、その喘息治療薬としての効用もさることながら不明な点も多く残されており、骨組織<sup>60)</sup>をはじめとして、その他の臓器におよぼす副作用も無視できないところから薬物の適正使用のため、他の類似した $\beta_2$ アゴニストを含めて更なる検討が必要と思われる。

## V 引用文献

- 1) Adams, G. R., Haddad, F., McCue, S. A., Bodell, P. W., Zeng, M., Qin, L., Qin, A. X., and Baldwin, K. M. (2000) Effects of spaceflight and thyroid deficiency on rat hindlimb development. II. Expression of MHC isoforms. *J. Appl. Physiol.* 88 : 904-916.
- 2) Arch, J. R., Ainsworth, A. T., Cawthorne, M. A., Piercy, V., Sennitt, M. V., Thody, V. E., Wilson, C., and Wilson, S. (1984) Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature.* 309 (5964) : 163-165.
- 3) Aweda, B. L., Thissen, J. P., and Lebacqz, J. (2002) Role of IGF-1 and IGF-BPs in the changes of mass and phenotype induced in rat soleus muscle by clenbuterol. *Am. J. Physiol.* 282 : E31-E37.
- 4) Baker, K. M., Aceto, J. F. (1990) Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am. J. Physiol.* 259 : H610-H618.
- 5) Baker, K. M., et al. (1990) Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am. J. Physiol.* 259 : H324-H332.
- 6) Bates, P. C., and Pell, J. M. (1991) Actin and interaction of growth hormone and the  $\beta$ -agonist, clenbuterol, on growth, body composition and protein turnover in dwarf mice. *Br. J. Nutr.* 65 : 115-129
- 7) Bonen, A., McCullagh, K. J. A., Putnam, C. T., Hultman, E., Jones, N. L., and Heigenhauser, G. J. F. (1998) Short-term training increases human muscle MCT1 and femoral venous lactate in relation to muscle lactate. *Am. J. Physiol.* 274 : E102-E107.
- 8) Bonen, A. (2001) The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* 86 : 6-11.
- 9) Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., and Giacobino, J. P. (1997) Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS. Lett.* 408 (1) : 39-42.

- 10) Bouillaud, F., Ricquier, D., Thibault, J., and Weissenbach, J. (1985) Molecular approach to thermogenesis in brown adipose tissue: cDNA cloning of the mitochondrial uncoupling protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82 (2) : 445-8.
- 11) Busatto, V. C., Chuha, V., Cicilini, M. A., and Mill, J. G. (1999) Differential effects of isoproterenol on the activity of angiotensin -converting enzyme in the rat heart and aorta. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 : 355-360.
- 12) Buyse, J., Decuypere, E., Huyghebaert, G., and Herremans, M. (1990) The effect of clenbuterol supplementation on growth performance and on plasma hormone and metabolite levels of broilers. *Poultry. Science.* 70 : 993-1002.
- 13) Caiozzo, V. J., Baker, M. J., Baldwin, K. M. (1998) Novel transitions in MHC isoforms : separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J. Appl. Physiol.* 85 : 2237-2248.
- 14) Collins, S., Daniel, K. W., Rohlf, E. M., Ramkumar, V., Taylor, I. L., and Gettys, T. W. (1994) Impaired expression and functional activity of the beta 3- and beta 1-adrenergic receptors in adipose tissue of congenitally obese (C57BL/6J ob/ob) mice. *Mol. Endocrinol.* 8 (4) : 518-27.
- 15) Criswell, D. S., Powers, S. K., and Herb, R. A. (1996) Clenbuterol-induced fiber type transition in soleus of adult rat. *Eur. J. Physiol.* 74 : 391-396.
- 16) Cubria, J. C., Reguera, R., Balana-Force, R., Ordonez, C., and Ordonez, D. (1998) Polyamine-mediated heart hypertrophy induced by clenbuterol in the mouse. *J. Pharm. Pharmacol.* 50 : 91-96.
- 17) Delday, M. I., and Maltin, C.A. (1997) Clenbuterol increases the expression of myogenin but not MyoD in immobilized rat muscles. *Am. J. Physiol.* 272 : E941-E944.
- 18) Denjean, F., Desplanches, D., Lachuer, J., Cohen-Adad, F., Mayet, M. H., and Duchamp, C. (1999) Muscle-specific Up-regulation of Rat UCP3 mRNA Expression by Long-Term Hindlimb Unloading. *Biochem and Biophys.* 266 : 518-522.

- 19) Diets, A. A., and Lubrano, T. (1967) Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc electrophoresis. *Anal. Biochem.* 20 : 246-257.
- 20) Dodd, S. L., Powers S. K., Vrabas, I. S., Criswell. D., Stetson, S., and Hussain R. (1996) Effects of clenbuterol on contractile and biochemical properties on skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.* 28 (6) : 669-676.
- 21) Dumont, J.E. (1971) The action of thyrotropin on thyroid metabolism. *Vitam. Horm.* 29 : 287-412.
- 22) Fanelli, Albertina., Evenly, F. G., Dian W., and Nancy, J. P. (2003) MCT1 and its accessory protein CD147 are differentially regulated by TSH in rat thyroid cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285 : E1223-E1229.
- 23) Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., Ricquier, D., and Warden, C. H. (1997) Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.* Mar. 15 (3) : 269-272.
- 24) Garcia, C. K., Li, X., Luna, J., and Francke, U. (1994) cDNA cloning of the human monocarboxylate transporter 1 and chromosomal localization of the SLC16A1 locus to 1p13.2-p12. *Genomics.* 23 : 500-503.
- 25) Gong, D. W., He, Y., Karas, M., and Reitman, M. (1997) Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta3-adrenergic agonists, and leptin. *J. Biol. Chem.* 272 (39) : 24129 -24132.
- 26) Hosaka, Y., Tawaka, M., Kurihara, A., Ohtaka, M., Endo, T., and Onaya, T. (1992) The regulation of two distinct glucose transporter (GLUT1 and GLUT4) gene expression in cultured rat thyroid cells by thyrotropin. *Endocrinology.* 131 : 159-165.
- 27) Irie, M., and Slingerland, D. W. (1963) Effects of thyrotrophin in vivo on the metabolism of glucose by thyroid tissue. *Endocrinology.* 73 : 265-266.



- 28) Ito, H., Hiroe, M., Hirata, Y., Tsujino, M., Adach, S., Shichiri, M., Koike, A., Nogami, A., and Marumo, F. (1993) Insulin like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation*. 87 : 1715-1721.
- 29) Iwai, N., Shimoike, H., and Kinoshita, M. (1995) Cardiac renin-angiotensin system in the hypertrophied heart. *Circulation*. 92 : 2690-2696.
- 30) Juel, C., and Halestrap, A. P. (1999) Lactate transport in skeletal muscle role of regulation of the monocarboxylate transporter. *J. Physiol*. 517 : 633-642.
- 31) Kim, Y. S. and Sainz R. D. (1992)  $\beta$ -adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. *Life Sci*. 50 : 397-407.
- 32) Kirk, P., Wilson, M. C., Brown, M. H., Barclay, A. N., and Halestrap, A. P. (2000) CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 their cell surface expression. *ENBO. Journal*. 19 (15) : 3896-3904.
- 33) Klaus, S., Casteilla, L., Bouillaud, F., and Ricquier, D. (1991) The uncoupling protein UCP: a membraneous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *Int. J. Biochem*. 23 (9) : 791-801.
- 34) Kobayashi, D., Kitaura, T., Kraemer W. J. (2002) Effects of clenbuterol on LDH and MCT1 in heart and skeletal muscles of male rats. *Med. Sci. Sports Exerc*. 34(5) : S255.
- 35) Mantle, D., Delday, M. I., and Maltin, C. A. (1992) Effect of clenbuterol on protease activities and protein levels in rat muscle. *Muscle. Nerve*. 15 : 471-478.
- 36) Mao, W., Yu, XX., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H., and Pan, G. (1999) UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS. Lett*. 443 (3) : 326-330.
- 37) Martin III, W. H., Murphree, S. S., and Saffitz, J. E. (1998) Beta-adrenergic receptor distribution among muscle fiber types and resistance arterioles of white, red, and intermediate skeletal muscle. *Circul. Res.*, 64 : 1096-1105.

- 38) McCullagh, K., J. A., Pool, R. C., Halestrap, A. P., O' Brien, M., and Bonen A. (1996) Role of the lactate transporter (MCT1) in skeletal muscles. *Am. J. Physiol.* 271 : E143-E150.
- 39) McCullagh, K. J. A., Poole, R. C., Halestrap, A. P., Tipton, K. J., O' Brien, M., and Bonen, A. (1997) Chronic electrical stimulation increases MCT1 and lactate uptake in red and white skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 273 : E239-E246.
- 40) McElligott, M. A., Mulder, J. E., Chaung, L. Y., and Barreto, A. Jr. (1987) Clenbuterol-induced muscle growth : investigation of possible mediation by insulin. *Am. J. Physiol.* 253 : E370-E375.
- 41) McFadden, E.R., and Gilbert, I. A. (1994) Exercise-induced asthma. *N. Engl. J. Med.* 330 : 1362-1367.
- 42) Moore, N. G., Pegg, G. G., and Sillence, M. N. (1994) Anabolic effects of the  $\beta$  2-adrenoceptor agonist salmeterol are dependent on route of administration. *Am. J. Physiol.* 267 :E475-E484.
- 43) Mozdziak, P. E., Greaser, M. L., and Schultz, E. (1998) Myogenin, MyoD, and myosin expression after pharmacologically and surgically induced hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* 84 (4) : 1359-1364
- 44) Nakamura, Y., Nagase, I., Asano, A., Sasaki, N., Yoshida, T., Umekawa, T., Sakane, N., and Saito, M. (2001) Beta 3-adrenergic agonist up-regulates uncoupling proteins 2 and 3 in skeletal muscle of the mouse. *J. Vet. Med. Sci.* 63 (3) : 309-314.
- 45) Petrou, M., Wynne, D. G., Boheler, K. R., and Yacoub, M. H. (1995) Clenbuterol induces hypertrophy of the latissimus dorsi muscle and heart in the rat with molecular and phenotypic changes. *Circulation.* 92 : II483-II489.
- 46) Pette, D., and Staron, R. S. (2001) Transition of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem. Cell. Biol.* 115 : 359-372.

- 47) Polla, B., Cappelli, V., Morello, F., Pellegrino, M. A., Boschhi, F., Pastoris, O., and Reggiani, C. (2001) Effect of the  $\beta$  2-clenbuterol on respiratory and limb muscles of weaning rat. *Am. J. Physiol.* 280 : R862-R869.
- 48) Prather, I. D., Brown, D. E., North, P., and Wilson, J. R. (1995) Clenbuterol : a substitute for anabolic steroids? *Med. Sci. Sports Exerc.* 27 (8) :1118-1121.
- 49) Price, N. T., Jacson, V. N., and Halestrap, A. P. (1998) Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem. J.* 329 : 321-328.
- 50) Rajab. P., Fox. J., Riaz. S., Tomlinson. D., Ball. D., and Greenhaff. P.L. (2000) Skeletal muscle myosin heavy chain isoforms and energy metabolism after clenbuterol treatment in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279 (3) : R1076-R1081.
- 51) Russo, D., Damante, G., Foti, D., Costante, G., and Filetti, S. (1994) Different molecular mechanisms are involved in the multihormonal control of glucose transport in FRTL5 rat thyroid cells. *J. Endocrinol. Invest.* 17 : 323-327.
- 52) Samec, S., Seydoux, J., Russell, A. P., Montani, J. P., and Dulloo, A. G. (2002) Skeletal muscle heterogeneity in fasting-induced upregulation of genes encoding UCP2, UCP3, PPAR $\gamma$ , and key enzymes of lipid oxidation. *Pflügers. Arch. Eur. J. Physiol.* 445 : 80-86.
- 53) Scarpace, P. J., Kumar, M. V., Li, H., and Tumer, N. (2000) Uncoupling proteins 2 and 3 with age: regulation by fasting and beta3-adrenergic agonist treatment. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 55 (12) : B588-B592.
- 54) Stevens, L., Firinga, C., Gohlsch, B., Bastide, B., Mounier, Y., and Pette, D. (2000) Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat. *Am. J. Physiol.* 279 : 317-326.
- 55) Talmdge, R. J., and Roy, R. R. (1993) Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoform. *J. Appl. Physiol.* 75 (5) : 2337-2340.

- 56) Tamai, I., Sai, Y., Ono, A., Kido, Y., Yabuuchi, H., Takanaga, H., Satoh, E., Ogihara, T., Amano, O., Iseki, A., and Tsuji, A. (1999) Immunohistochemical and functional characterization of pH-dependent intestinal absorption of weak organic acids by the monocarboxylic acid transporter MCT1. *J. Pharm. Pharmacol.* 51 : 1113-1121.
- 57) Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Sai, Y., Kobayashi, D., Oku, A., Shimane, M., and Tsuji, A. (2000) Molecular and functional characterization of organic cation / carnitine transporter family in mice. *J. Biol. Chem.* 275 : 40064-40072.
- 58) Tsunekawa, N., Kitaura, T. (2000) Effect of drinking administration of clenbuterol on SOL and EDL of mice. *Jpn. J. Fitness Sports. Med.* 49 (1) : 149-156.
- 59) 常川直子 (2000) ラット骨格筋および心筋における乳酸代謝と MyoHC isoform に対する クレブテロールの影響 (平成12年度 金沢大学大学院自然科学研究科生命薬学専攻 修士論文)
- 60) Tsunekawa, N., Kitaura T., and Kremer, W. J. (2002) Inhibited longitudinal growth of bones in young male rats by clenbuterol. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 34 (2) : 267-273.
- 61) Wahlander, H. M., Isgaard, J., Jennische, E., and Friberg, P. (1992) Left ventricular insulin-like growth factor I increases in early renal hypertension. *Hypertension.* 19 : 25-32.
- 62) Williams, R. S., Caron, M. G., and Daniel, K. (1984) Skeletal muscle beta-adrenergic receptors : variations due to fiber type and training. *Am. J. Physiol.* 246 : E160-E167.
- 63) Willson, M. C., Jacson, V. N., Henddle, C., Prise, N. T., Pilegaard, H., Juel, C., Bonen, A., Montgomery, I., Hutter, O. F., and Halestrap, A. P. (1998) Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. *J. Biol. Chem.* 273 : 115-122.
- 64) Wong, K., Boheler, K. R., Bishop, J., Petrou, M., and Yacoub, M. H. (1998) Clenbuterol induces cardiac hypertrophy with normal functional, morphological and molecular features. *Cardiovasc. Res.* 37 : 115-122.

- 65) Wroblewski, F., and LaDue, J. S. (1995) Lactic dehydrogenase activity in blood. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90 : 210-213.
- 66) Yoon, H., Fanelli, A., Grollman, E. F., and Philp, N. J. (1997) Identification of a unique monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 234 : 90-94.
- 67) Zalko, D., Debrauwer, L., Bories, G., and Tulliez, J. (1998) Metabolism of Clenbuterol in rats. Drug. Metab. Dispos. 26 (9) : 891-899.

### 第3章

### 骨組織での検討

#### I 序論

骨組織は、常に吸収と形成を繰り返すことにより、モデリングを営んでいるダイナミックな組織である。モデリングは、幼年期に最も活発であり、モデリングによって骨が成長していく。モデリングは成人になってもずっと続くが、成人においては、この過程はリモデリングとよばれる。健全な成人では、骨芽細胞による骨形成と、海綿骨とハバース管表面上での破骨細胞による骨吸収との間に平衡状態が保たれ、骨量は一定に保たれる。骨はリン酸カルシウムなどのミネラルとコラーゲンを主成分とする基質から構成され、適度の硬度と弾性が保たれている。しかし、骨形成と骨吸収の平衡状態が崩れ、骨塩量の減少及び微細構造の変化が起こると、骨の強度は低下し、骨折を起こしやすくなり骨の粗鬆化が起こる。このような状態が骨粗鬆症とよばれる。

近年、運動不足や寝たきりになどによる骨粗鬆症の発症が急速な高齢化社会の到来とともに社会問題になっている。骨粗鬆症は人類の罹患する疾患の中で最も多いと言われており<sup>68)</sup>、現在わが国の骨粗鬆症患者は1100万人にもものぼるといわれている。

骨粗鬆症は、単一の病態を示す疾患ではなく、基礎疾患の存在しない原発性骨粗鬆症と、過度のアルコール摂取、ステロイドの過剰投与、副腎皮質ステロイド分泌亢進を示すクッシング症候群、甲状腺機能亢進症などにより様々な程度で発症する続発性骨粗鬆症に大別される<sup>69)</sup>。更に原発性骨粗鬆症には、加齢に伴う退行期骨粗鬆症と若年性骨粗鬆症が含まれ、これらのうち退行期骨粗鬆症は、最も罹患頻度が高く深刻なものである。Riggsらは、退行期骨粗鬆症を発症年齢、病因、臨床症状から閉経後骨粗鬆症（I型）と老人性骨粗鬆症（II型）の二つに分類している<sup>70)</sup>。閉経後骨粗鬆症は、閉経後の女性のエストロゲンの分泌が低下することにより、骨吸収性のサイトカインが優位に働き、骨吸収が亢進することで引き起こされると考えられている。老人性骨粗鬆症は、加齢に伴い、腸管でのカルシウム吸収能の低下、カルシウム吸収を増加させるビタミンDの低下、骨吸収を抑制し骨形成を促進する calcitonin の分泌低下などにより、骨量が減少し起こるものなので、性別を問わず発症する。

いずれにしても骨粗鬆症は、リモデリングにおける骨形成と骨吸収の機能的な平衡関係（カップリング）が崩れた状態である。このことから、リモデリングにおける骨形成を担う骨芽細胞、骨吸収を担う破骨細胞の分化、成熟及び生存のメカニズムを明らかにすることが骨粗鬆症の研究において重要であると思われる。

骨芽細胞は軟骨細胞、筋肉、骨髄間質細胞、脂肪細胞、腱細胞、繊維芽細胞などと共通の間葉系幹細胞から分化する。間葉系幹細胞から組織特異的な骨格系の細胞への分化は、それぞれ組織特異的な転写調節因子によって制御されている。軟骨細胞への分化は Sox9、筋細胞への分化は MyoD ファミリー、脂肪細胞への分化は PPAR $\gamma$  と呼ばれる転写調節因子が重要な役目を果たしている。骨芽細胞への分化を決定する転写因子としては Runx2/Cbfa1 が重要であるが、最近骨芽細胞への分化を決定するもう一つの重要な転写因子として Osterix が中島ら

によって発見された<sup>71)</sup>。I型コラーゲン、アルカリホスファターゼ、オステオネクチンを産生する骨芽細胞前駆体は、オステオポンチンを産生する前骨芽細胞に分化する。この細胞は引き続いて、骨シアロタンパク、オステオカルシンを産生する成熟骨芽細胞に分化していく。

一方、破骨細胞は複数の分化段階を経て形成される2~10の核を持つ多核巨細胞であり、生体における生理的、病的骨吸収のほとんど全ては破骨細胞によって営まれている。破骨細胞は造血幹細胞に由来し、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)、活性型ビタミンDなどの作用により monocyte-macrophage 系の細胞から分化すると考えられている<sup>72)</sup>。このようにして分化した破骨細胞前駆細胞は、単核の前破骨細胞となり骨表面に引き寄せられて定着し、多核化し成熟破骨細胞へと分化する。この前破骨細胞の分化や骨表面への誘導には、その周囲を取り囲んでいる骨髄間質系、骨芽細胞系の細胞との直接的な接触を介する相互作用が重要であり、その相互作用は TNF ligand family に属する分子の osteoclast differentiation factor (ODF) (または receptor activator nuclear factor kappa B ligand (RANKL)ともいう) によって調節されている<sup>73-75)</sup>。

ODF の receptor である receptor activator nuclear factor kappa B (RANK) を発現する破骨細胞前駆細胞は、骨芽細胞との細胞間接触を介して骨芽細胞膜上の ODF を認識し前破骨細胞に分化する。また、分化した前破骨細胞も RANK を発現しており、ODF からの刺激によって成熟破骨細胞となり骨吸収活性が誘導されるようになる<sup>76)</sup>。

これら骨芽細胞と破骨細胞によるリモデリングは、種々のホルモン、サイトカインなどによって制御されていることで成り立っているが、骨リモデリングにおける重要なホルモンとして、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone, PTH) と calcitonin (CT) が挙げられる。PTH は血中  $Ca^{2+}$ 濃度を正確に保つために働いているホルモンであり、 $Ca^{2+}$ 濃度が低くなると、副甲状腺から分泌され骨吸収を活性化することで血中  $Ca^{2+}$ 濃度を保つことが知られており、間欠的に作用させると骨形成に働き、持続的な投与では骨吸収を促進することが知られている<sup>77-79)</sup>。一方の CT は、血中  $Ca^{2+}$ 濃度が高くなると分泌されるが、破骨細胞の活性を直接抑制することで強力な骨吸収抑制作用を示すことが知られている<sup>80)</sup>。そして、これらの作用機序として、cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) を介した経路が知られている<sup>81-84)</sup>。cAMP は骨芽細胞と破骨細胞の両方に関与するシグナルであり、これまでに骨代謝と cAMP に関して多くの報告がなされている。

Miyamoto らは、cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) 4 isozyme の阻害剤が標的細胞の cAMP 濃度を上昇させることで、骨芽細胞形成を促進し、破骨細胞形成を抑制することを報告している<sup>85,86)</sup>。また、prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) receptor のサブタイプの一つである EP4 の agonist が、 $PGE_2$  様作用を示すことで骨代謝を改善させることが報告されており、椎体骨折の治療薬として現在治験段階にあるが、この作用機序にも cAMP の関与が報告されている<sup>87-89)</sup>。これら PDE4 阻害剤や、EP4 agonist と同様に cAMP 濃度を上昇させる薬物として  $\beta$ -agonist が挙げられる。

$\beta_2$ -agonist の clenbuterol は、気管支拡張作用を有するため喘息の治療に用いられてい

るが、 $\beta_2$ -adrenergic receptor ( $\beta_2$ -AR) に作用することで Gs タンパクを活性化し、adenylate cyclase を活性化させ、標的細胞の cAMP 濃度を上昇させるので、骨代謝疾患の治療薬としての可能性が考えられる。しかし、この薬物は骨格筋に作用し筋肥大をおこすこと<sup>90-92)</sup> や、fat burner としての作用が報告されている<sup>93)</sup>。ことから、多くのスポーツ競技においてドーピング規制薬物となっているにもかかわらず、副作用が他のタンパク同化ステロイドほどが報告されていないことから、その濫用が憂慮されている。薬物濫用を防止する対策の一つとしては、薬物の副次的な作用を明らかにすることであると思われる。Clenbuterol の骨に対する作用として、Zeman らは、除神経させた閉経後の雌ラットを用いた実験で、clenbuterol が骨密度の低下を防止することを報告している<sup>94)</sup>。しかし、その一方で北浦らは成長期の雄ラットを用いた実験で、clenbuterol が骨組織の成長を抑制することを示唆している<sup>95)</sup>。これらのことから、clenbuterol は骨代謝疾患の治療薬としての可能性を持つ反面、若年者が安易に使用することで、骨の成長を止めてしまう可能性も考える。現時点では clenbuterol の骨に及ぼす影響は、骨格筋の肥大作用ほど調べられておらず、詳細はあまり明らかにされていない。

そこで、clenbuterol の骨に及ぼす影響の詳細を解明する一端として、

- 1) 成長期の雌ラットの骨組織に及ぼす clenbuterol の影響を明らかにする。
- 2) 骨芽細胞に及ぼす clenbuterol の影響を明らかにする。
- 3) 破骨細胞に及ぼす clenbuterol の影響を明らかにする。
- 4) 骨代謝関連因子の mRNA 発現に及ぼす clenbuterol の影響を明らかにする。

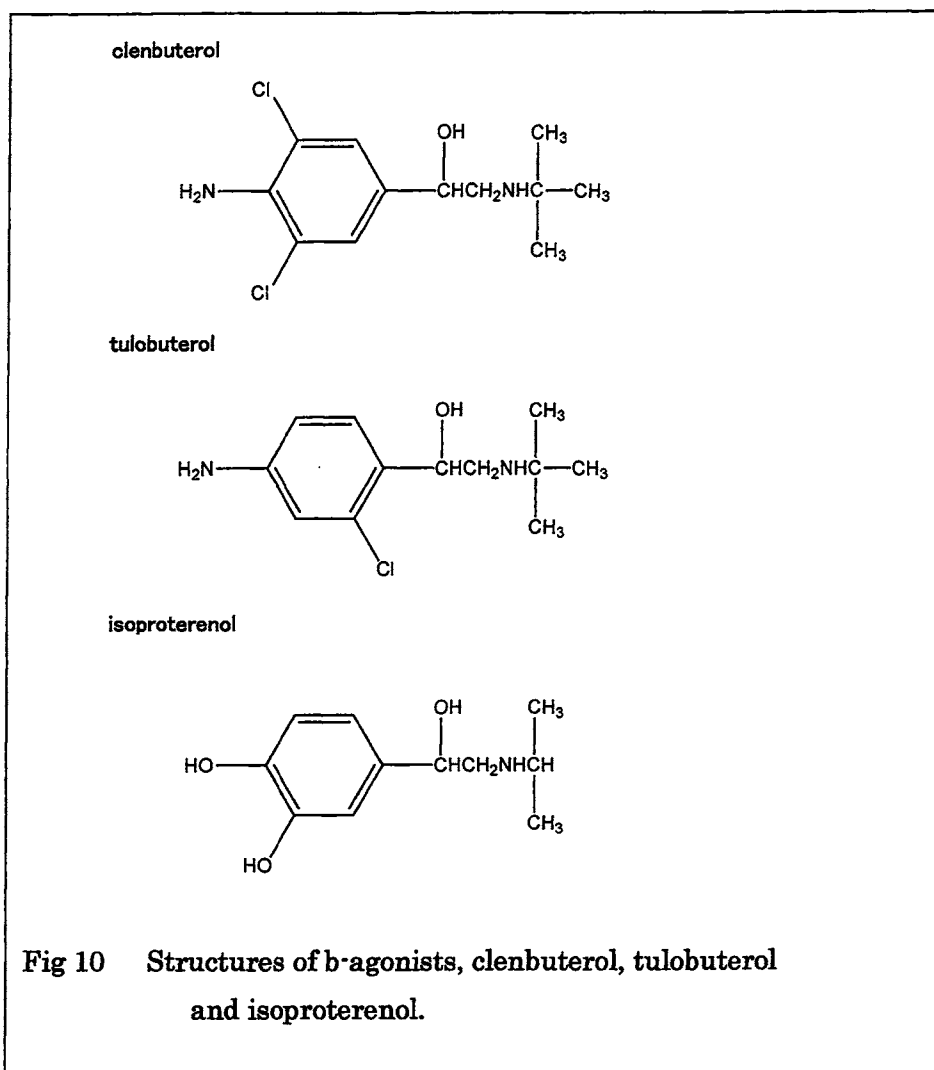
以上を本研究の目的とした。

## II 方法

組織培養系の *in vitro* 実験には、7~9 週齢の ddY 系雄マウス (Nippon SLC, Hamamatsu) を用いた。Clenbuterol 4 週間投与後における骨密度、骨長への影響を見る *in vivo* 実験は、前述の心筋と骨格筋で用いた Sprague Dawley 系雌ラット (Nippon SLC) である。

実験には以下の試薬を用いた。ペントバルビタールナトリウム (Abbott laboratories, IL)、dexamethasone、 $\beta$ -glycerophosphate、naphthol AS-MX phosphate sodium salt、fast red violet L B salt、fast blue R R salt、clenbuterol、isoproterenol、propranolol、butoxamine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U. S. A.)、*N*-[2-(*p*-bromocinnamyl amino) ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H 89) (生化学工業, Tokyo)、L-ascorbic acid、calcitriol (和光純薬工業, Osaka)、Recombinant human M-CSF、Recombinant human sRANKL (Pepro Tech EC LTD, New Jersey, Princeton U. S. A.)。tulobuterol は、福寿製薬株式会社より供与された。なお、本研究で使用した  $\beta$ -agonist の構造式を Fig 10 に示す。





Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 用試薬として 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  random primer (Takara, Ohtsu)、5 $\times$ first strand buffer、0.1 M dithiothreitol (DTT)、50 mM magnesium chloride、200 unit/ $\mu\text{l}$  Moloney murine leukemia virus (M-mlV) reverse transcriptase、10 $\times$ PCR buffer、Taq DNA polymerase (invitrogen Co., Carlsbad, CA, U.S.A.)、10 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP)、ribonuclease inhibitor (Promega, Madison, U.S.A.)、ミネラルオイル (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)、サイズマーカーとして 100 bp DNA Ladder (Takara Biomedicals, Shiga) を用いた。PCR プライマーは宝酒造カスタムセンターまたは Oligo Express (Amersham Pharmacia Biotech, UK Limited, England) に合成を依頼した。

心筋と骨格筋の摘出に引き続き、骨の摘出を行った。骨は左右の大腿骨と脛骨を摘出した。付着している結合組織および軟組織をメス (Surgical Blades No. 24, FEATHER) で除去し、骨塩量測定装置 (小形動物用 DCS-600 型、アロカ社) を用い、二重エネルギー X 線吸収法 (DXA 法) により骨密度を測定した。また、長軸方向の先端間の距離 (骨長) をノギス (ミツ

トヨ社) で測定した。

#### (細胞培養法)

##### ① マウス骨髄細胞初代培養 (骨芽細胞形成系)

7~9 週齢 ddY 系雄性マウスを頸椎脱臼させ、大腿骨および脛骨を無菌的に摘出した。骨の周囲の結合組織および軟組織をメス (Surgical Blades No. 24, FEATHER) で取り除いたを剥離し、両端を切断した後、培地 ( $\alpha$ -MEM; 10% FBS) を入れた注射筒 (1 ml, 25 G needle, Terumo, Tokyo) を用いて骨髄細胞を押し出し、回収した細胞を 1,000 rpm で 5 分遠心し、上清を除去した後、培地に再懸濁させ、細胞を 350 万/ml となるように調製し、24 well plate (MS-80120, 住友ベークライト, Tokyo) に 1 well 当たり 0.5 ml ずつ播いた。37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中にて 1 日培養後、dexamethasone (10 nM)、L-ascorbic acid (0.2 mM)、 $\beta$ -glycerophosphate (1 mM) を添加した培地に交換し、plate に付着している細胞を 3 日毎に培地交換を行いながら培養した。

##### ② マウス骨髄細胞初代培養 (破骨細胞形成系)

①と同様に骨髄細胞細胞を 350 万/mL で播き、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中にて 1 日培養後、dexamethasone (10 nM)、calcitriol (10 nM) を添加した培地に交換し、plate に付着している細胞を 3 日毎に培地交換を行いながら培養した。

##### ③ ST2 細胞単独培養

###### 1) ST2 細胞の性質

ST2 細胞は、わが国で開発されたマウス骨髄由来の間質細胞株で脂肪細胞前駆細胞としても知られている<sup>97)</sup>。この ST2 細胞単独培養系に、ascorbic acid を添加すると骨芽細胞の分化を促進するという報告がされており<sup>97)</sup>、本研究室においても骨芽細胞の指標となる ALP 活性陽性細胞が培養 7 日前後に多数発現していることが認められた。そのため ST2 細胞に ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate をいれて培養し、骨芽細胞培養系として用いた。

###### 2) 培養

ST2 細胞を培養した 10 cm シャーレ (FALCON) の培地を細胞がはがれないように取り除き、滅菌した phosphate buffered saline (PBS) を 5 mL 加えて残った培地を洗った。PBS を取り除き、0.02% ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) を含む滅菌トリプシンを 3 mL 加えて 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 5 分間インキュベートし、シャーレに付着した細胞をはがした。その後、10% 牛胎児血清 (FBS) (JRH biosciences, Inc. U.S.A.)、60  $\mu$ g/ml カナマイシン (明治製菓, Tokyo) を含む alpha modification of Eagle's medium ( $\alpha$ -MEM pH 7.4 ; 大日本製薬, Osaka) を 1 mL 加え、回収した細胞を 1,000 rpm で 5 分遠心 (Hitachi CR5DL ; 日立工機株式会社, Tokyo) し、上清を除去した後、培地に再懸濁させ、

細胞を2万/mlとなるように調製し、24 well plate (MS-80120, 住友ベークライト, Tokyo) に1 well 当たり0.5 ml ずつ播いた。37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中にて1日培養後、L-ascorbic acid (0.2 mM)、β-glycerophosphate (1 mM) を添加した培地に交換し、plate に付着している細胞を3日毎に培地交換を行いながら培養した。

#### ④ マウス非付着性骨髄細胞初代培養

##### 1) 培養用プレートの作成

クリーンベンチ内で培養プレートにM-CSF 62.5 ng/100 μL、sODF 250 ng/100 μLの濃度の牛胎児血清溶液としたものを培養する培地の2%量を各wellの底に塗り、約1時間クリーンベンチ内で風乾した。

##### 2) カラムの作成

Sephadex G-10 粉末 (Amersham Pharmacia Biotech) 20 g と超純水 100 mL を 200 mL メディウム瓶にいれ 20 分以上放置し十分膨潤させ、上清を吸引し、G-10 担体とほぼ等量の超純水を加え軽く振盪後、10 分放置し、沈殿させた。これを2回繰り返す、担体を洗った。同様に PBS 50 mL に置き換え担体を洗った。G-10 担体の2倍量に当たる 50 mL の PBS に再懸濁し、オートクレーブにて滅菌した。

カラム1本につき10 mLの50% G-10 スラリーを50 mL 遠心管にとり、静置後、上清を吸引し、37°Cに保温した培地 (α-MEM;10% FBS) に置き換え振盪した。

オートクレーブ滅菌した 20 mL クロマトグラフィーカラム (エコノパックカラム, BIO-RAD) の先端に三方活栓とカラムカバーを取り付け、カラム台に設置し、カラムの中に37°Cで保存した20 mLのG-10 (50%スラリー) を流し込み、三方活栓を開いて培地を流し、培地が枯れないうちに10 mLの新しい培地をカラムに加えG-10 担体を洗った後、三方活栓を閉じた。

##### 3) 骨髄細胞の調製

前述の①と同様に骨髄細胞懸濁液を得てから、細胞を遠沈 (1000 rpm, 5分) して2 mLの培地に再懸濁した。間質細胞、マクロファージの除去のために、ここで得られた2 mLの細胞懸濁液を前述の④の2)で作成したカラムの上に静かに重層し、カラムの三方活栓を開き、細胞がカラムに入るまで流し、更に2 mLの培地をカラムに流した。培地が担体の最上部まで下降したら三方活栓を閉じ、37°Cで保温した培地8 mLを重層して45分間、37°Cでインキュベートした。その後、37°Cで保温した培地10 mLを加え三方活栓を開き初めに流れ出る15 mLの細胞懸濁液を得た。ここで得た細胞懸濁液は recombinant human M-CSF (12.5 ng/100 μL)、recombinant human sODF (10.0 ng/100 μL) を含む培地 (α-MEM;10% FBS) に100万個/mLとなるように調整し、48 well plate (FALCON) に125 μL/wellで播いて培養した。37°C、飽湿、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養し48時間後に培地を交換し、以降M-CSF (2.5 ng/

100 $\mu$ L), sODF (10.0 ng/ 100 $\mu$ L) を含む培地 ( $\alpha$ -MEM; 10% FBS) で plate に付着している細胞を 2 日毎に培地交換を行いながら培養した

#### ⑤ ST2 と非付着性骨髄細胞初代培養

ST2 は前述の③の 2) と同様に 48 well plate に 2 万個/mL となるように播き、calcitriol ( $10^{-8}$  M)、dexamethasone ( $10^{-8}$  M) を含む培地 ( $\alpha$ -MEM; 10% FBS) で培養した。72 時間培養した後、4. 4. 4 に従って得られた細胞を上記 ST2 が付着している plate に 100 万個/mL の細胞懸濁液として加え、共存培養した。播いた細胞は 37 $^{\circ}$ C、飽湿、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養し、以降 calcitriol ( $10^{-8}$  M)、dexamethasone ( $10^{-8}$  M) を含む培地 ( $\alpha$ -MEM; 10% FBS) で plate に付着している細胞を 2 日毎に培地交換を行いながら培養した

#### (細胞染色法)

骨芽細胞の指標を得るため Alkaline phosphatase (ALP) 染色を以下の通り行った。細胞を乾燥させないように培地を取り除き、4 $^{\circ}$ C に冷やした固定液 [組成: 10% formaldehyde/PBS (pH 7.4)] を注ぎ、4 $^{\circ}$ C で 30 分以上放置し、細胞を固定した。放置後、PBS にて 2~3 回洗浄し、再賦活液 [組成: 50 mM MgCl<sub>2</sub>/100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)] にて室温で 20~30 分間処理し、染色液 [組成: 0.1 mg/mL naphthol AS-MX phosphate sodium, 0.6 mg/mL fast blue RR Salt/0.2 M Tris-HCl (pH 8.5)] を注いで室温で 20~30 分間処理し、細胞が染色された後、蒸留水で洗浄した。光学顕微鏡下にて ALP 活性陽性細胞は青色に観察された。ALP 活性陽性細胞を骨芽細胞として Desk Scan (Macintosh) にて取り込み、染色部位を NIH image (Macintosh) で画像解析し定量した。

次に、破骨細胞の指標を得るため Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を以下の通り行った。ALP 染色と同様に細胞を固定した後、PBS にて 2~3 回洗浄し、エタノール: アセトン (50:50) で室温にて 1 分間処置し、TRAP 染色液 [組成: 0.1 mg/mL naphthol AS-MX phosphate sodium, 0.6 mg/mL Fast red violet LB Salt, 50 mM sodium tartrate /0.1 M sodium acetate (pH 5.0)] を注いで室温で 20~30 分間処理し、細胞が染色された後、蒸留水で洗浄した。光学顕微鏡下にて TRAP 活性陽性細胞は赤色に観察された。TRAP 活性陽性の多核細胞を成熟破骨細胞としてカウントし、定量した。

#### (RT-PCR 法)

細胞からの total RNA 抽出のため、各細胞培養系から細胞をセルスクレイパーで細胞をかき集め、1.5 mL プラスチックチューブの中に入れ PBS で細胞を洗浄し、ペレット状にした細胞に ISOGEN (Nippon Gene) を 1 mL 加えた。15~20 回ピペッティングすることで細胞を溶解し、0.2 mL クロロホルム (WAKO) を加え、15 秒間ボルテクスし、室温で 3 分間静置し、15,000  $\times$  g, 4 $^{\circ}$ C, 15 分間遠心した。水層部を新しい 1.5 mL プラスチックチューブにとり、イソプロパノールを 0.5 mL 加え、軽く転倒混和し、室温で 7 分間静置した。これを 15,000  $\times$

g, 4°C, 10 分間遠心し、上清を取り除き、70%エタノールを 1 mL で洗浄後、10,000 × g, 4°C, 5 分間遠心し、上清を取り除いた。

cDNA への逆転写反応(RT)のため、total RNA のペレットを自然乾燥後、適量の 0.1% (v/v) diethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理滅菌精製水に溶解させた。逆転写反応は 22 μL の total RNA, 75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol (DTT), 0.6 mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 10 unit RNase inhibitor, 100 pmol random primer, 600 unit M-MLV reverse transcriptase を含む 50 μL の系で行った。

まず、total RNA 溶液と random primer をプラスチックチューブに入れ 95°C で 5 分間熱変性した後、氷上で急冷した。これに他の試薬を加え、穏やかに攪拌した後、37°C で 2 時間インキュベートし、cDNA を合成した。ここで得られた cDNA 1 μL に 10×PCR buffer 2 μl、50 mM MgCl<sub>2</sub> 1 μl、10 mM dNTP 混液 2 μl、20 μM primer (forward 1 μl, reverse 1 μl)、Taq DNA polymerase 0.3 μl を加え、滅菌水で全量を 20 μl にし、チューブにミネラルオイルを重層して thermal cycler (PTC-200, MJ Research, Tokyo, Japan) で PCR 反応を行った。

増幅された cDNA 産物は、2% アガロースゲルで電気泳動し、0.5 μg/μl ethidium bromide により染色し、UV Transilluminator (AB-1500, ATTO, Tokyo) によりフラグメントの位置とサイズを確認した。

ヒト β-actin に対する primer の配列は、

forward; 5' -TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG GC-3'

reverse; 5' -CTC (A/G) TA GCT CTT CTC CAG GGA GGA-3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 456 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 45 秒、アニーリング反応 58°C 1 分、増幅反応 72°C 1 分 15 秒、20 サイクルで行った<sup>98)</sup>。

マウス β<sub>1</sub>-adrenergic receptor (β<sub>1</sub>-AR) に対する primer の配列は、

forward; 5' -CGC TCA CCA ACC TCT TCA TCA TGT CC-3'

reverse; 5' -CAG CAC TTG GGG TCG TTG TAG CAG C-3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 375 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 45 秒、アニーリング反応 62°C 1 分、増幅反応 72°C 1 分 15 秒、29 サイクルで行った<sup>99)</sup>。

マウス β<sub>2</sub>-adrenergic receptor (β<sub>2</sub>-AR) に対する primer の配列は、

forward; 5' -GCC TGC TGA CCA AGA ATA AGG CC-3'

reverse; 5' -CCC ATC CTG CTC CAC CT-3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 328 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 45 秒、アニーリング反応 62°C 1 分、増幅反応 72°C 1 分 15 秒、26 サイクルで行った<sup>100)</sup>。

マウス cyclooxygenase-2 (COX-2) に対する primer の配列は、  
forward; 5'-ACT TGC TCA CTT TGT TGA GTC ATT C-3'  
reverse; 5'-TTT GAT TAG TAC TGT AGG GTT AAT G-3'  
を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 581 bp である。

PCR の条件は、COX-1、COX-2 ともに、熱変性反応 94°C 45 秒、アニーリング反応 58°C 1 分、増幅反応 72°C 1 分 15 秒、30 サイクルで行った<sup>101)</sup>。

マウス RANKL に対する primer の配列は、  
forward; 5'-GAC ACA CTA CCT GAC TCC TGC-3'  
reverse; 5'-CCA GTT TTC GTG CTC CCT CC-3'  
を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 465 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 20 秒、アニーリング反応 60°C 45 秒、増幅反応 72°C 1 分、25 サイクルで行った<sup>102)</sup>。

マウス osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) に対する primer の配列は、  
forward; 5'-ATG CCG GAG TGT AGA GAG GAT-3'  
reverse; 5'-AAA CAG CCC AGT GAC CAT TCC T-3'  
を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 533 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 20 秒、アニーリング反応 62°C 45 秒、増幅反応 72°C 1 分、28 サイクルで行った<sup>102)</sup>。

マウス interleukin-6 (IL-6) に対する primer の配列は、  
forward; 5'-CTG GTG ACA ACC ACG GCC TTC CCT A-3'  
reverse; 5'-ATG CTT AGG CAT AAC GCA CTA GGT T-3'  
を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 600 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 45 秒、アニーリング反応 62°C 1 分、増幅反応 72°C 1 分 15 秒、38 サイクルで行った<sup>103)</sup>。

マウス IL-1 $\beta$  に対する primer の配列は、  
forward; 5'-ATG GCA ACT GTT CCT GAA CTC AAC T-3'  
reverse; 5'-CAG GAC AGG TAT AGA TTC TTT CCT TT-3'  
を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 563 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 30 秒、アニーリング反応 62°C 45 秒、増幅反応 72°C 1 分、

35 サイクルで行った<sup>104)</sup>。

マウス RANK に対する primer の配列は、

forward; 5' -GCT TGC TGC ATA AAG TCT GT-3'

reverse; 5' -ACG TCC TAG AAT CTC TGA CT-3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 708 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 30 秒、アニーリング反応 56°C 45 秒、増幅反応 72°C 1 分、27 サイクルで行った<sup>105)</sup>。

マウス calcitonin receptor (CT-R) に対する primer の配列は、

forward; 5' -AGA ATT CCT GCA TCC ACC TA-3'

reverse; 5' -TGA AAG CGT TGC ACA GAG TA-3'

を使用した。増幅されるフラグメントのサイズは 558 bp である。

PCR の条件は、熱変性反応 94°C 30 秒、アニーリング反応 58°C 45 秒、増幅反応 72°C 1 分、28 サイクルで行った<sup>105)</sup>。

## 7. 統計処理

実験は少なくとも 3 回以上行い、得られた結果は Student's *t*-test および Welch's *t*-test により推計学的処理を行い、有意水準を 5% または 1% とした。

## III 結果

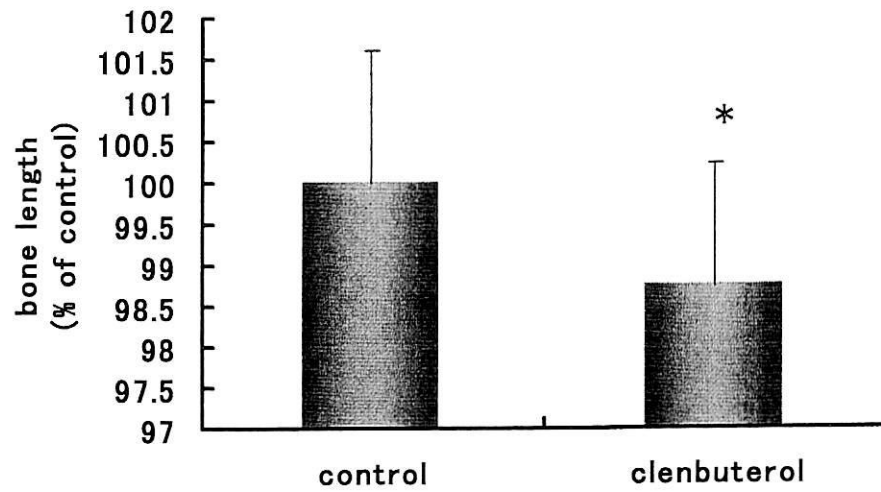
### 大腿骨、脛骨の骨長に及ぼす clenbuterol の影響

成長期のラットの骨長に及ぼす clenbuterol の作用を検討するために、7 週齢の Sprague-Dawley 系ラットに clenbuterol を 4 週間連続投与した後の大腿骨と脛骨の骨長をコントロール群と比較したものを Fig 11 に示した。Clenbuterol 投与群の大腿骨、脛骨の骨長は、対照群に比べ有意に低下した。

### 大腿骨、脛骨の骨密度に及ぼす clenbuterol の影響

Fig 12 に clenbuterol を 4 週間連続投与した後の大腿骨と脛骨の骨密度をコントロール群と比較したものを示した。Clenbuterol 投与群の大腿骨、脛骨の骨密度は、対照群に比べ有意に低下した。

## femur



## tibia

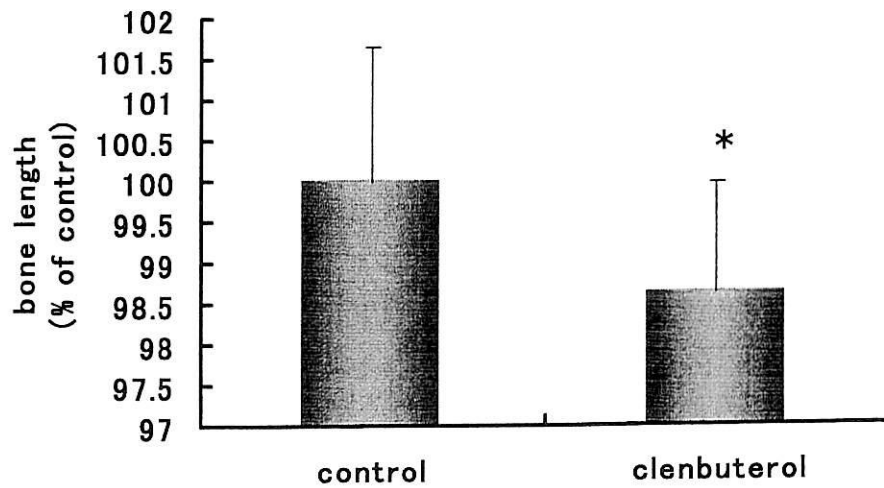
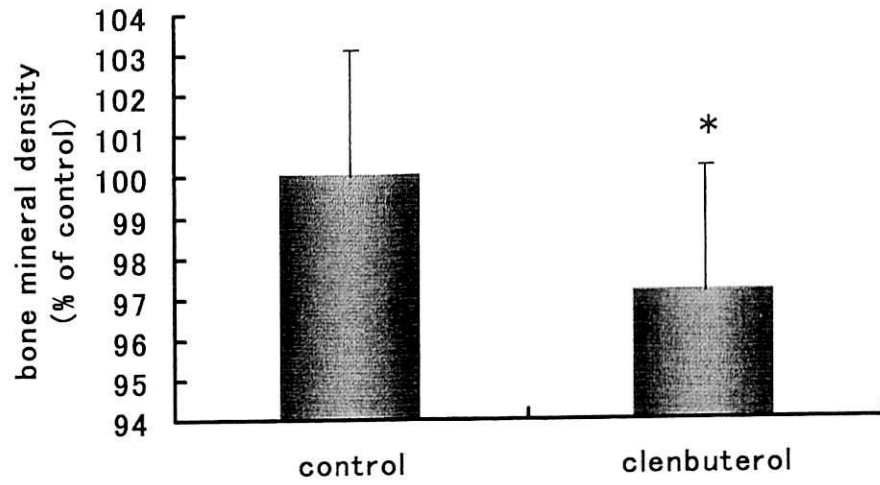


Fig 11

Data are represented the means  $\pm$  S.D. (n=8)  
\* ; Significantly different from the control at  $P < 0.05$ .



## femur



## tibia

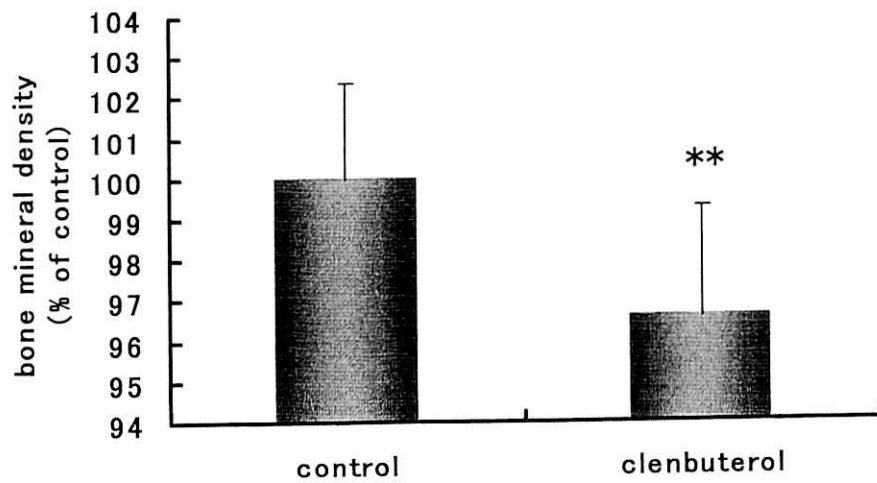
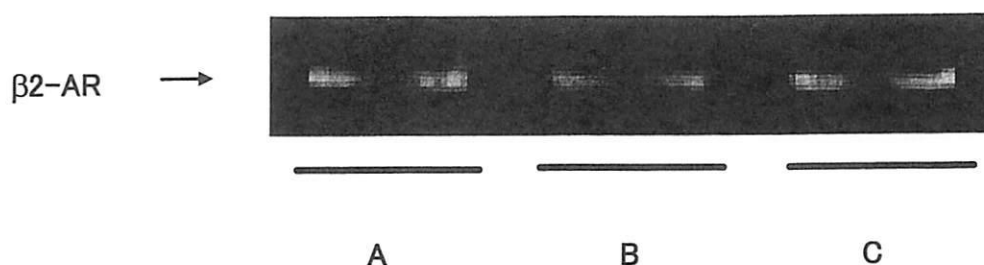


Fig 12

Data are represented the means  $\pm$  S.D. (n=8)  
\* ; Significantly different from the control at P<0.05.

### RT-PCR 法による各種細胞に発現する $\beta$ -adrenergic receptor の確認

各種細胞に clenbuterol 及び他の  $\beta$ -agonist を作用させるに当たり、各種細胞に  $\beta_1$  及び  $\beta_2$ -AR の mRNA が発現しているか否かを調べた結果を Fig 13 に示す。ST2 細胞では  $\beta_2$ -AR の mRNA 発現はみられたが、 $\beta_1$ -AR の mRNA 発現は認められなかった。骨髓細胞培養系、非附着性骨髓細胞培養系では両 receptor とも発現が認められた。



**Fig 13 Expression of b1-adrenergic receptor (b1-AR) and b2-adrenergic receptor (b2-AR) in ST2 cells (A), bone marrow cell culture (B), adherent cell-depleted bone marrow cell culture (C).**

骨髓細胞培養（骨芽細胞形成系）における clenbuterol 及び他の  $\beta$ -agonist の作用  
マウスの骨髓細胞培養系に dexamethasone、ascorbic acid、 $\beta$ -glycerophosphate を入れて培養し、骨芽細胞培養系としたものに clenbuterol 及び他の  $\beta$ -agonist を添加することで、骨芽細胞分化に及ぼす各薬物の影響を検討した。

#### ① Clenbuterol の作用

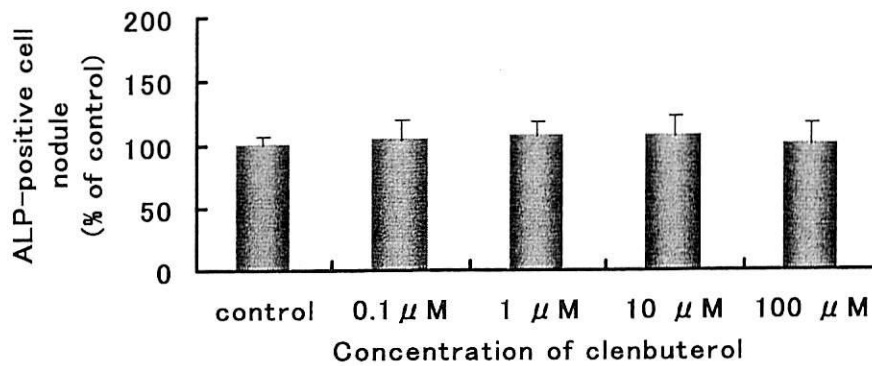
骨髓細胞培養系における骨芽細胞分化に及ぼす clenbuterol の作用を検討するために、clenbuterol (0.1~100  $\mu$ M) を培養 1 日目から 7 日目まで培地中に添加し、培養 7 日目に骨芽細胞の分化マーカーである ALP に染色を施し、ALP 活性陽性細胞集団の面積の変化を画像解析し、定量した結果を Fig 14A に示した。

Clenbuterol 処置による ALP 活性陽性細胞形成の増加はみられなかった。

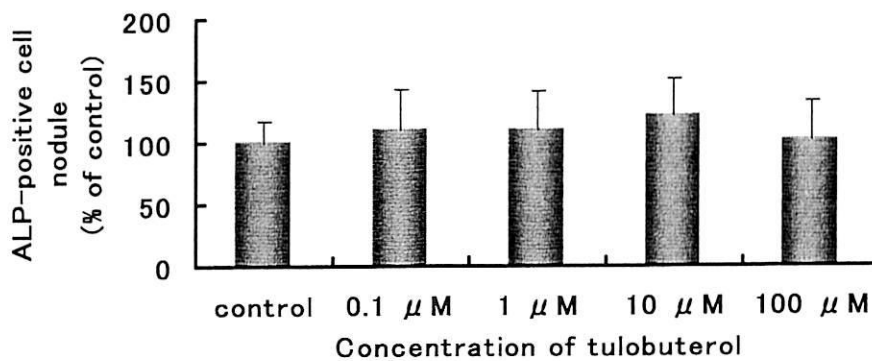
#### ② Tulobuterol、isoproterenol の作用

Clenbuterol の作用を他の同種薬物と比較する為に、clenbuterol と同じく強い  $\beta_2$ -AR 選択性を有する tulobuterol と、非選択的  $\beta$ -agonist である isoproterenol を用いて検討を行った。

A.



B.



C.

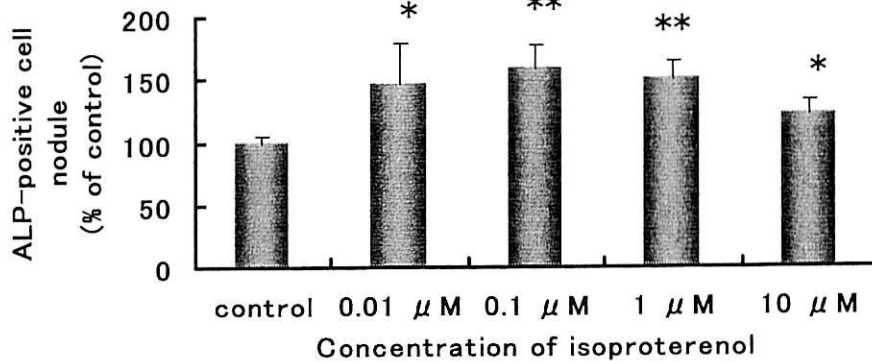


Fig 14 Effect of clenbuterol (A), tulobuterol (B) and isoproterenol (C) on the formation of ALP-positive cell nodule in bone marrow cell culture.

Data are represented the means  $\pm$  S.D. (n=4)

\*,\*\* ; Significantly different from the control culture at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

Clenbuterol の作用を tulobuterol と isoproterenol と比較した結果を Fig 14B, 14C に示した。

Tulobuterol 処置による ALP 活性陽性細胞形成の増加はみられなかったが、isoproterenol (0.01~10  $\mu$ M) 処置により ALP 活性陽性細胞形成は有意に増加した。

骨髄細胞培養（破骨細胞様細胞形成系）における clenbuterol と他の  $\beta$ -agonist の作用  
マウスの骨髄細胞培養系に dexamethasone、calcitriol をいれて培養し、破骨細胞培養系としたものに clenbuterol 及び他の  $\beta$ -agonist を添加することで、破骨細胞分化に及ぼす各薬物の影響を検討した。

#### 1) Clenbuterol 及び他の $\beta$ -agonist の作用

骨髄細胞培養系における破骨細胞形成に及ぼす clenbuterol 及び tulobuterol、isoproterenol の作用を検討するために、各種濃度の薬物を培養 1 日目から 7 日目まで培地中に添加し、培養 7 日目に破骨細胞の分化マーカーである TRAP に染色を施し、光学顕微鏡下にて TRAP 活性陽性の多核細胞を成熟破骨細胞としてカウントし、定量した結果を Fig 15 に示した。Clenbuterol (0.1~10  $\mu$ M) 処置により TRAP 活性陽性細胞形成が有意に増加し、その効果は濃度依存的であった。また、Tulobuterol (0.1~1  $\mu$ M) は弱い TRAP 活性陽性細胞形成の増加傾向を示し、tulobuterol 10  $\mu$ M において TRAP 活性陽性細胞形成が有意に増加した。また、isoproterenol (0.01~10  $\mu$ M) 処置により TRAP 活性陽性細胞形成が有意に増加した。

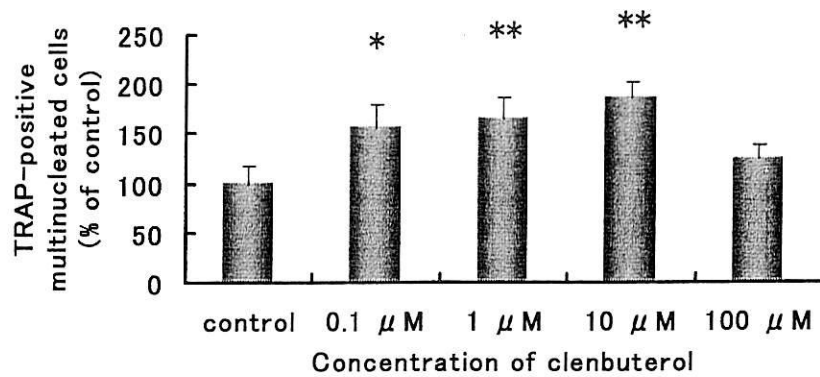
#### 2) $\beta$ -Agonist による破骨細胞形成に及ぼす各種阻害剤の作用

骨髄細胞培養系における各種  $\beta$ -agonist の破骨細胞形成作用に及ぼす各種阻害剤の作用を検討した。

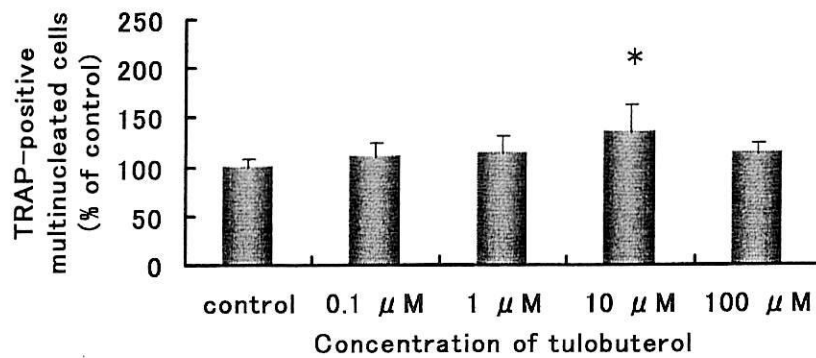
##### (Propranolol の作用)

非特異的  $\beta$ -antagonist である propranolol (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) を、各種  $\beta$ -agonist を処置する一時間前に処置した。Clenbuterol (10  $\mu$ M)、tulobuterol (10  $\mu$ M)、isoproterenol (1  $\mu$ M) を培養 1 日目から 7 日目まで培地中に添加し、培養 7 日目に TRAP 染色を施し、定量した結果を Fig 16 に示した。Propranolol 1  $\mu$ M を前処置した場合に、isoproterenol による破骨細胞形成の増加が有意に抑制された。Propranolol 10  $\mu$ M を前処置した場合に、各種  $\beta$ -agonist の破骨細胞形成の増加作用は有意に抑制された。

A.



B.



C.

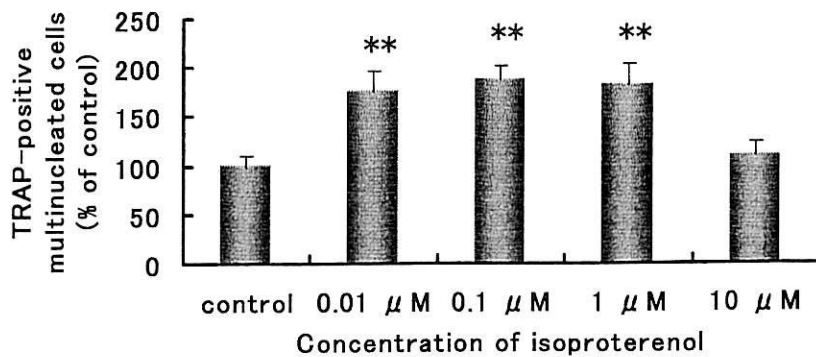
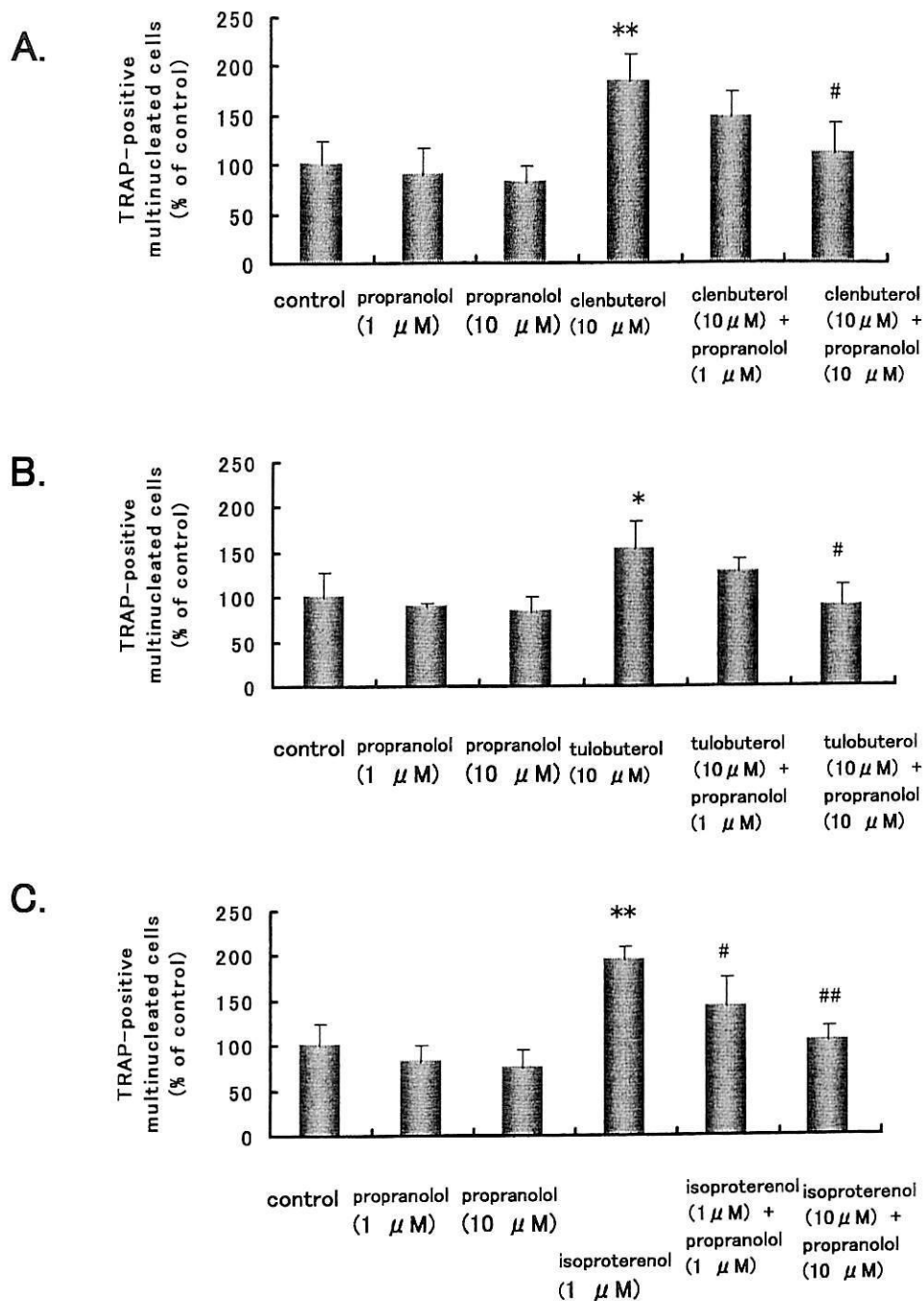


Fig 15 Effect of clenbuterol (A), tulobuterol (B) and isoproterenol (C) on the formation of TRAP-positive multinucleated cells in bone marrow cell culture.

Data are represented the means  $\pm$  S.D. (n=4)

\*,\*\* ; Significantly different from the control culture at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.



**Fig 16** Effect of clenbuterol (A), tulobuterol (B) and isoproterenol (C) and propranolol on the formation of TRAP-positive multinucleated cells in mouse bone marrow cell culture.

Data are represented the means  $\pm$  S.D. (n=4)

\*, \*\* ; Significantly different from the control culture at P<0.05 and 0.01, respectively. #, ## ; Significantly different from the control culture at P<0.05 and 0.01, respectively.

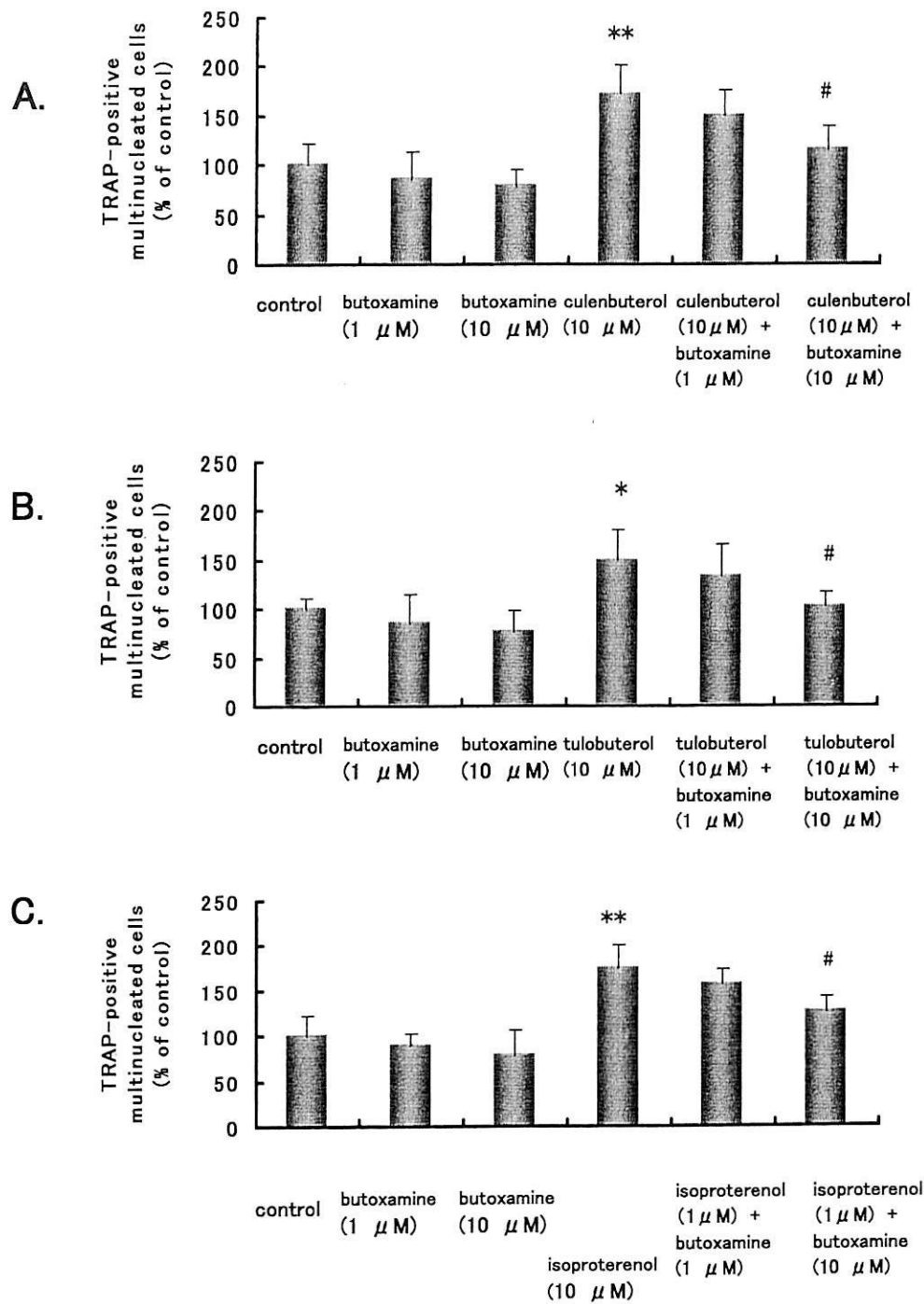


Fig 17 Effect of clenbuterol (A), tulobuterol (B) and isoproterenol (C) and butoxamine on the formation of TRAP-positive multinucleated cells in mouse bone marrow cell culture. Data are represented the means  $\pm$  S.D. (n=4). \*,\*\* ; Significantly different from the control culture at P<0.05 and 0.01, respectively. # ; Significantly different from the control culture at P<0.05.

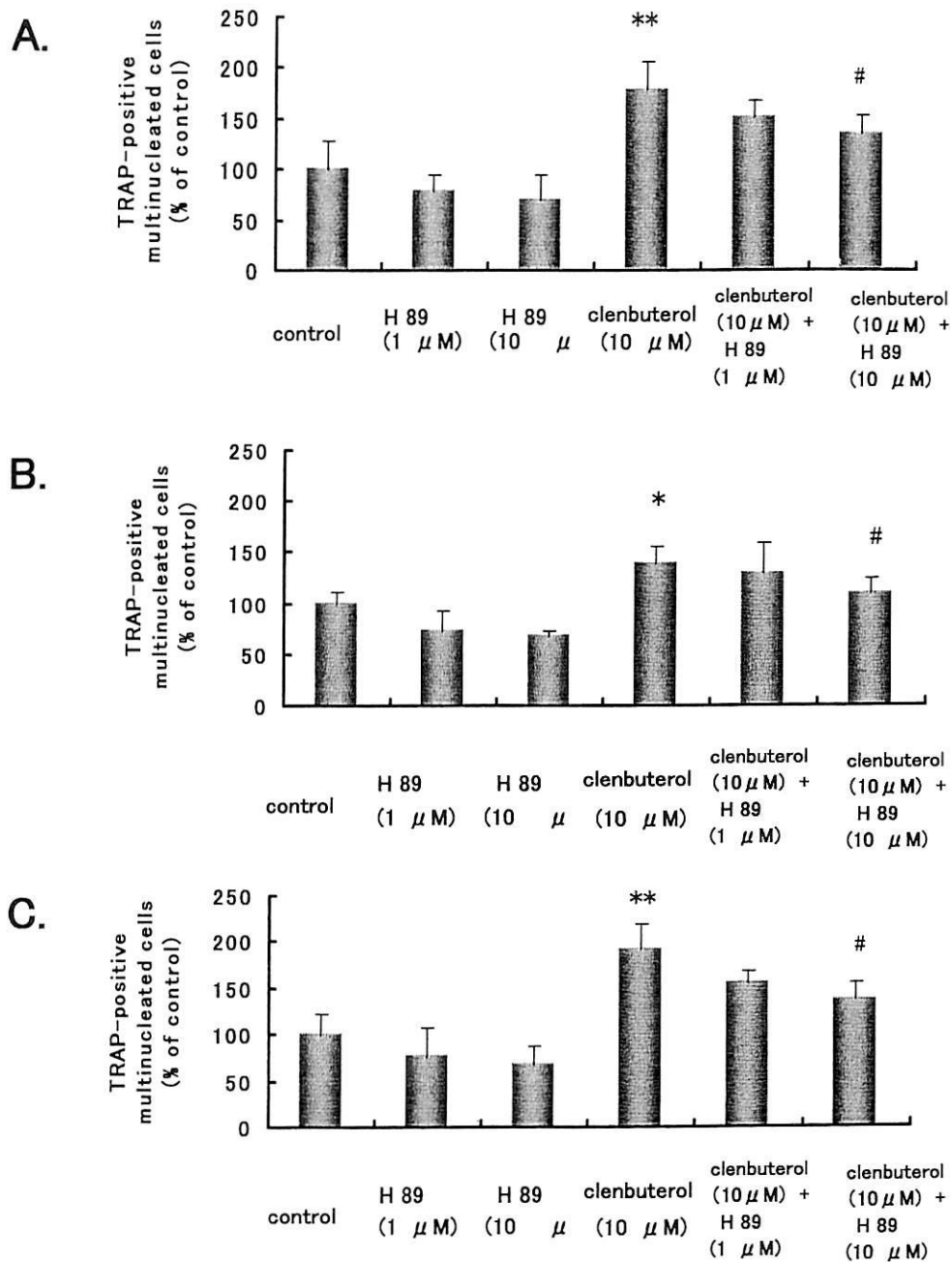


Fig 18 Effect of clenbuterol (A), tulobuterol (B) and isoproterenol (C) and H 89 on the formation of TRAP-positive multinucleated cells in mouse bone marrow cell culture.

Data are represented the means  $\pm$  S.D. (n=4). \*,\*\* ; Significantly different from the control culture at P<0.05 and 0.01, respectively.

# ; Significantly different from the control culture at P<0.05.



#### (Butoxamine の作用)

$\beta_2$  選択的 antagonist である butoxamine (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) を、各種  $\beta$ -agonist を処置する一時間前に処置した。Clenbuterol (10  $\mu$ M)、tulobuterol (10  $\mu$ M)、isoproterenol (1  $\mu$ M) を培養 1 日目から 7 日目まで培地中に添加し、培養 7 日目に TRAP 染色を施し、定量した結果を Fig 17 に示した。Butoxamine 10  $\mu$ M を前処置した場合に、各種  $\beta$ -agonist の破骨細胞形成の増加作用は有意に抑制された。

#### (H 89 の作用)

Protein kinase A (PKA) の阻害剤である H 89 (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) を、各種  $\beta$ -agonist を処置する一時間前に処置した。Clenbuterol (10  $\mu$ M)、tulobuterol (10  $\mu$ M)、isoproterenol (1  $\mu$ M) を培養 1 日目から 7 日目まで培地中に添加し、培養 7 日目に TRAP 染色を施し、定量した結果を Fig 18 に示した。H 89 10  $\mu$ M を前処置した場合に、各種  $\beta$ -agonist の破骨細胞形成の増加作用は有意に抑制された。

#### RT-PCR 法による検討

各種  $\beta$ -agonist 処置による骨髄細胞培養系 (破骨細胞形成系) での ODF、OCIF、CT-R、RANK、COX-2、IL-6、IL-1 $\beta$  の mRNA 発現量への影響を調べた。Clenbuterol (10  $\mu$ M)、tulobuterol (10  $\mu$ M)、isoproterenol (1  $\mu$ M) をそれぞれ培養 3 日目に培地中に添加し作用させた。薬物を処置して 1、3、6、12、24 時間後に細胞を採取して、RT-PCR 法にて各種 mRNA 量の発現量を検討した。

##### 1) ODF、OCIF mRNA 発現への影響

骨芽細胞・間質細胞表面に発現し、破骨細胞の分化に必須の因子である ODF、さらに ODF の decoy receptor として知られ、破骨細胞分化を抑制する OCIF の mRNA の発現への影響を検討した結果を Fig 19 に示した。ODF の mRNA 発現は clenbuterol 処置の 1 時間後において顕著に増加し、その後減少していった。そしてこの傾向は tulobuterol、isoproterenol においても同様であった。一方、OCIF の mRNA 発現は clenbuterol 処置の 1 時間後に減少し、その後も時間と共に減少した。そしてこの傾向は tulobuterol、isoproterenol においても同様であった。

##### 2) RANK、CT-R mRNA 発現への影響

破骨細胞やその前駆細胞で発現する遺伝子として RANK、CT-R を選択し、これらの mRNA の発現への影響を検討した結果を Fig 20 に示した。RANK、CT-R の両 mRNA 発現は培養経過と共に増加したが、clenbuterol 処置における変化は認められなかった。そしてこの傾向は tulobuterol、isoproterenol においても同様であった。

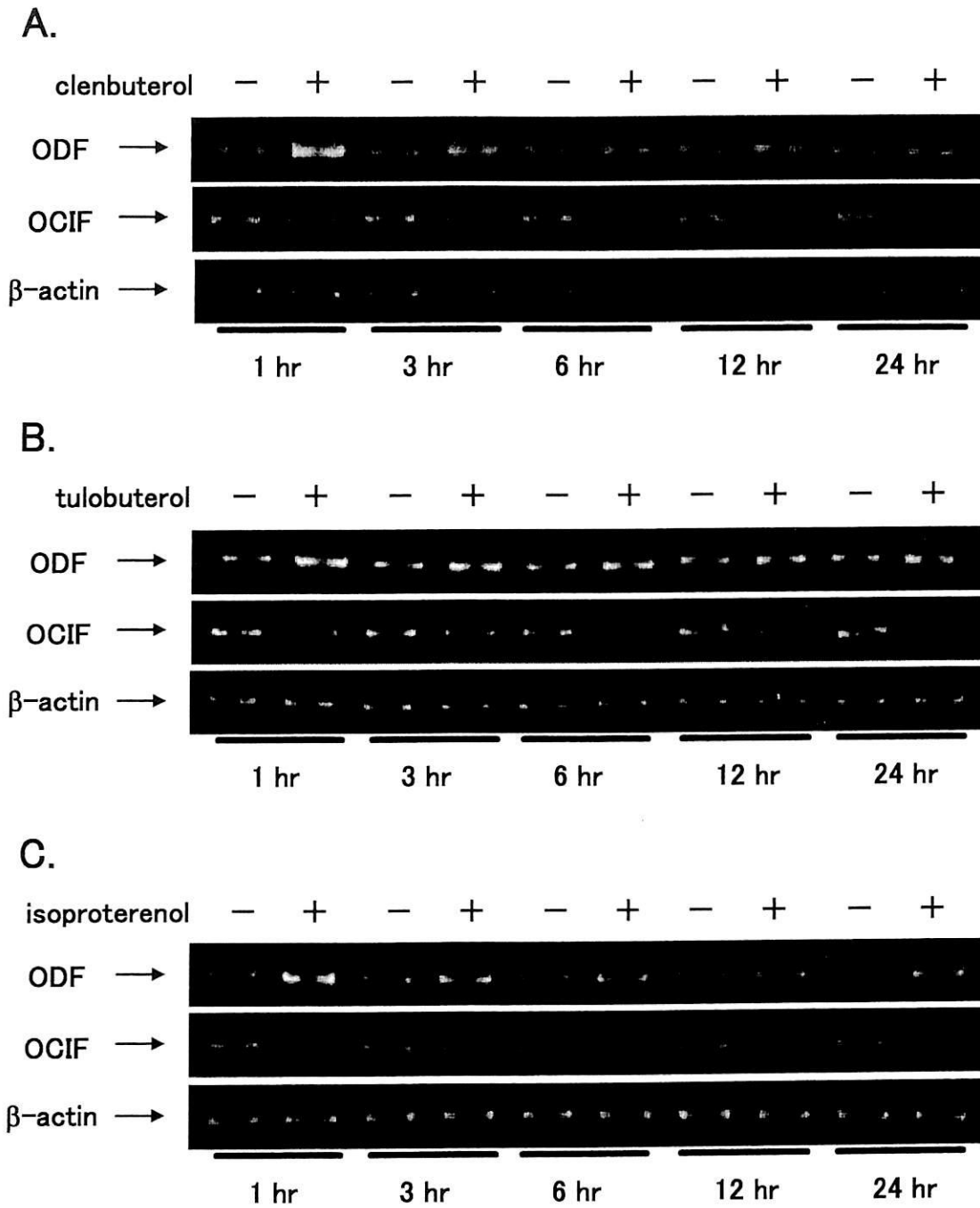


Fig 19 Time-course of effect of clenbuterol (10  $\mu$ M) (A), tulobuterol (10  $\mu$ M) (B) and isoproterenol (1  $\mu$ M) (C) on expression of ODF and OCIF mRNA in bone marrow cell culture after 3 days culture with carcitril and dexamethasone.

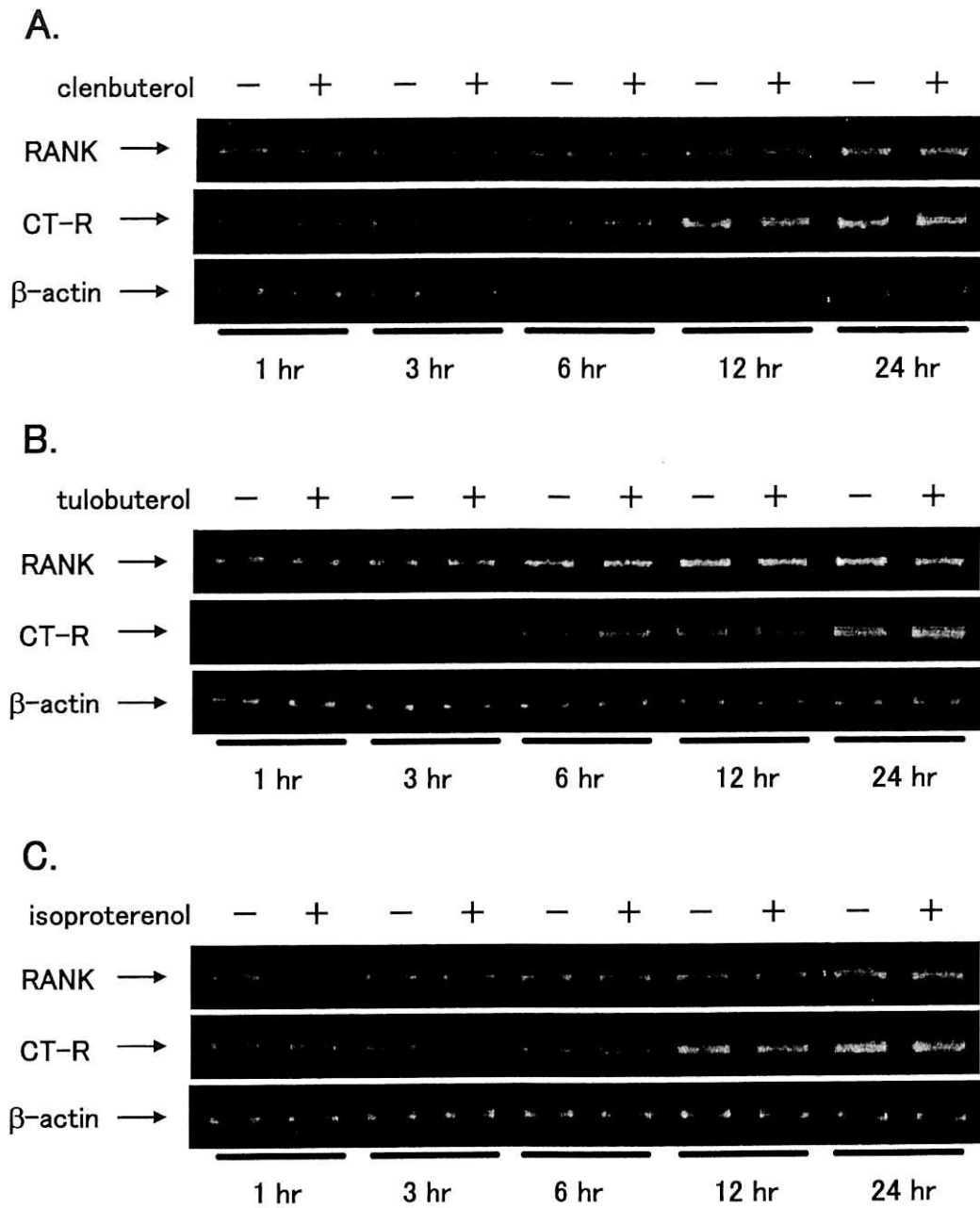


Fig 20 Time-course of effect of clenbuterol (10  $\mu$ M) (A), tulobuterol (10  $\mu$ M) (B) and isoproterenol (1  $\mu$ M) (C) on expression of RANK and CT-R mRNA in bone marrow cell culture after 3 days culture with carcitriol and dexamethasone.

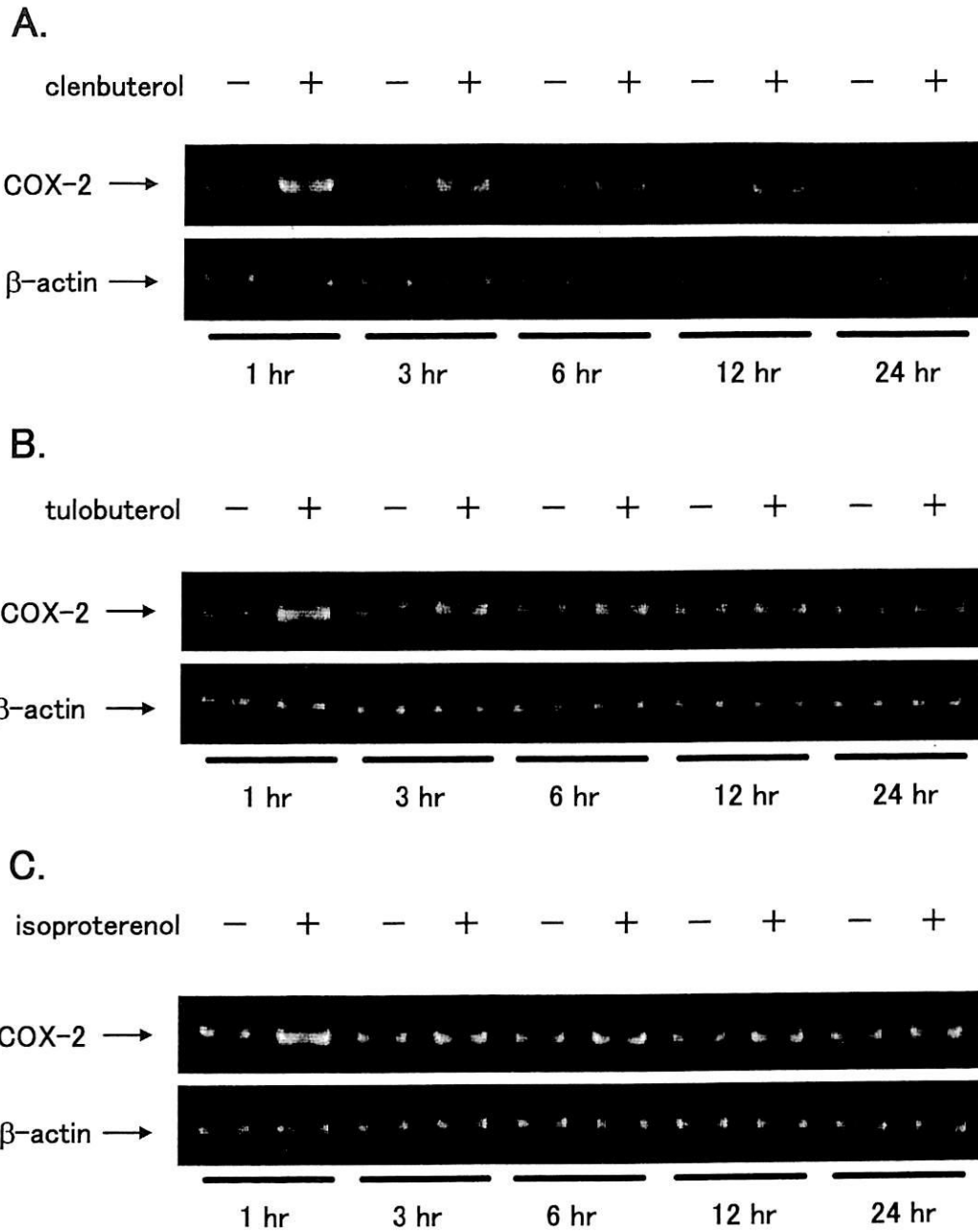


Fig 21 Time-course of effect of clenbuterol (10  $\mu$ M) (A), tulobuterol (10  $\mu$ M) (B) and isoproterenol (1  $\mu$ M) (C) on expression of COX-2 mRNA in bone marrow cell culture after 3 days culture with carcitriol and dexamethasone.

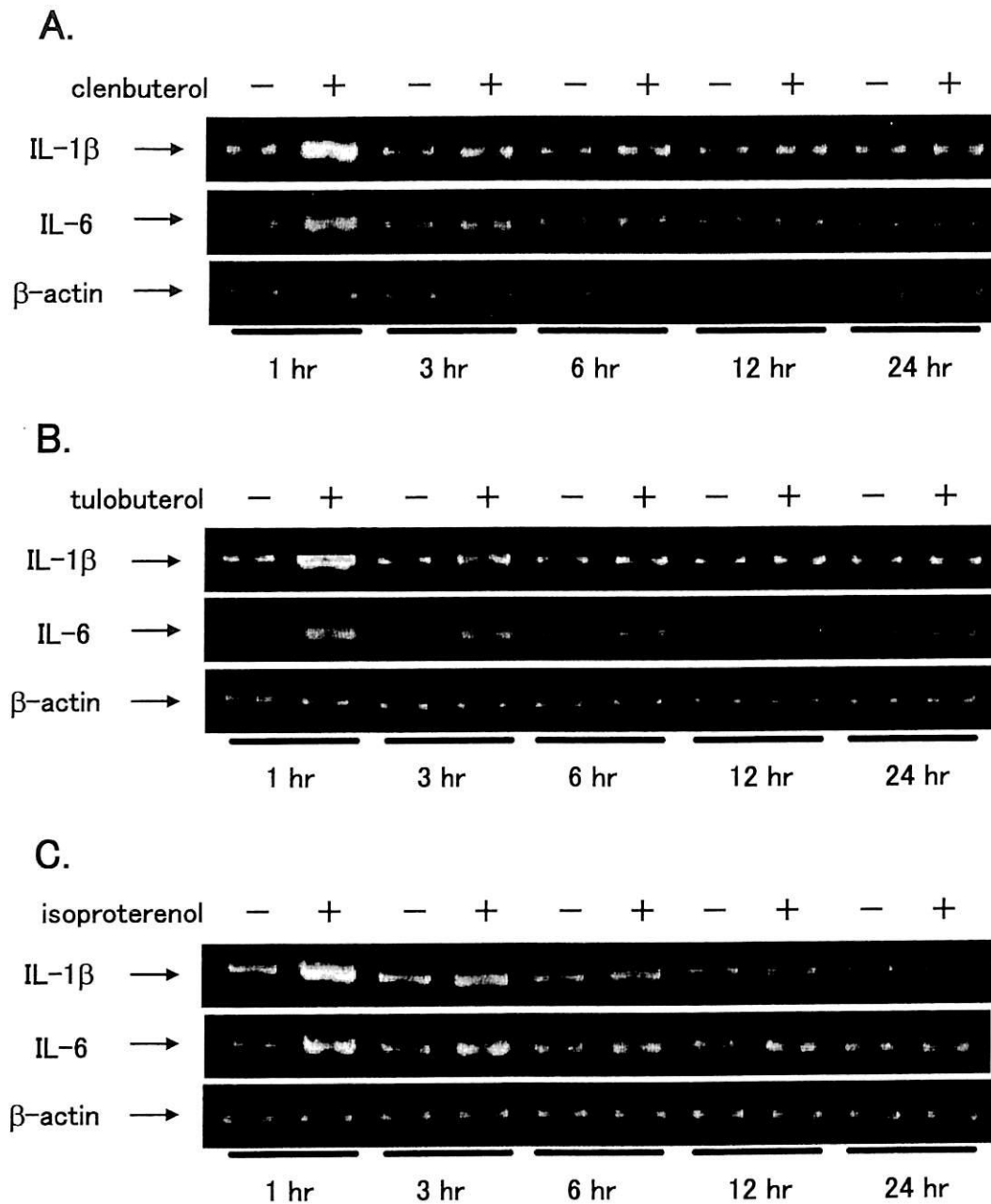


Fig 22 Time-course of effect of clenbuterol (10  $\mu$ M) (A), tulobuterol (10  $\mu$ M) (B) and isoproterenol (1  $\mu$ M) (C) on expression of IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA in bone marrow cell culture after 3 days culture with carcitriol and dexamethasone.

### 3) COX-2 mRNA 発現への影響

PGE<sub>2</sub> は破骨細胞の分化に促進的に働くことから、その合成酵素である COX-2 の mRNA の発現を検討した結果を Fig 21 に示した。COX-2 の mRNA 発現は clenbuterol 処置の 1 時間後において顕著に増加し、その後減少していった。そしてこの傾向は tulobuterol、isoproterenol においても同様であった。

### 4) IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA 発現への影響

骨吸収性のサイトカインとして知られる IL-1 $\beta$  及び IL-6 の mRNA 発現の変化を検討した結果を Fig 22 に示した。IL-1 $\beta$  及び IL-6 いずれの mRNA 発現も clenbuterol 処置の 1 時間後において顕著に増加し、その後減少していった。そしてこの傾向は tulobuterol、isoproterenol においても同様であった。

### ST2 細胞単独培養系における骨芽細胞分化に及ぼす clenbuterol 及び他の $\beta$ -agonist の影響

マウス骨髄由来の間質細胞株である ST2 細胞に ascorbic acid、 $\beta$ -glycerophosphate を入れて培養し、骨芽細胞培養系としたものに clenbuterol 及び他の  $\beta$ -agonist を添加することで、骨芽細胞分化に及ぼす各薬物の影響を検討した。

#### Clenbuterol 及び他の $\beta$ -agonist の作用

ST2 細胞単独培養系における骨芽細胞分化に及ぼす clenbuterol 及び tulobuterol、isoproterenol の作用を検討するために、各種濃度の薬物を培養 1 日目から 7 日まで培地中に添加し、培養 7 日目に ALP 染色を施し、定量した結果を Fig 23 に示した。

Clenbuterol 処置により濃度依存的に ALP 活性陽性細胞形成の増加傾向が確認され、clenbuterol 100  $\mu$ M において ALP 活性陽性細胞形成が有意に増加した。

Tulobuterol 処置により濃度依存的に ALP 活性陽性細胞形成の増加傾向が確認され、tulobuterol 100  $\mu$ M において ALP 活性陽性細胞形成が有意に増加した。また、isoproterenol 処置により各濃度で ALP 活性陽性細胞形成が有意に増加し、その効果は濃度依存的であった。

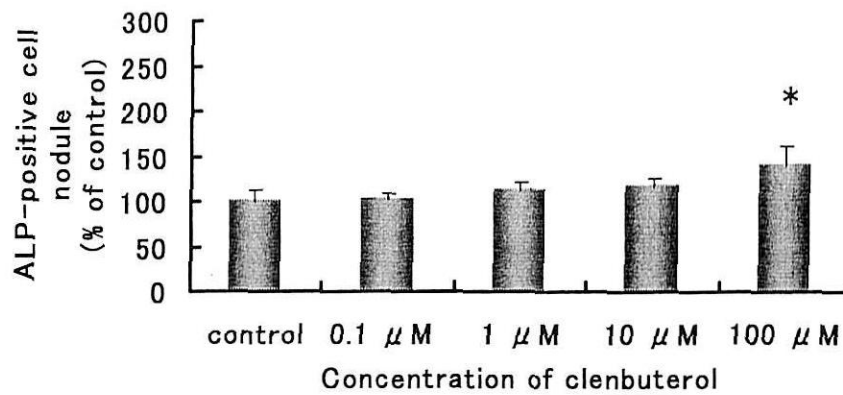
#### $\beta$ -Agonist による骨芽細胞形成に及ぼす各種阻害剤の作用

ST2 細胞単独培養系における各種  $\beta$ -agonist の骨芽細胞形成作用に及ぼす各種阻害剤の作用を検討した。

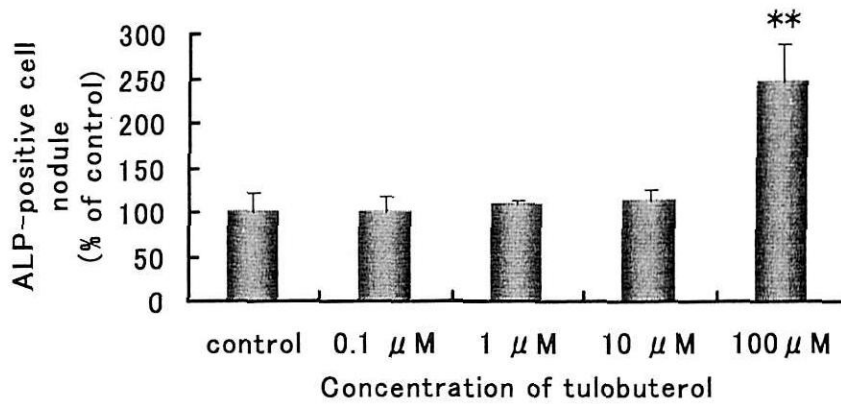
##### 1) Butoxamine の作用

$\beta_2$  選択的 antagonist である butoxamine (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) を、各種  $\beta$ -agonist を処置する 30 分前に処置した。Clenbuterol (100  $\mu$ M)、tulobuterol (100  $\mu$ M)、isoproterenol (1  $\mu$ M) を培養 1 日目から 7 日まで培地中に添加し、培養 7 日目に ALP 染色を施し、定量した結果を Fig 24 に示した。

A.



B.



C.

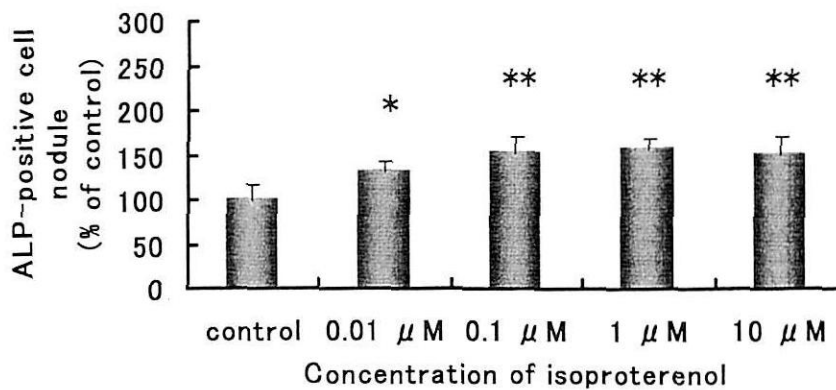


Fig 23 Effect of clenbuterol (A), tulobuterol (B) and isoproterenol (C) on the formation of ALP-positive cell nodule in ST2 cells.

Data are represented the means  $\pm$  S.D. (n=4)

\*,\*\* ; Significantly different from the control culture at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

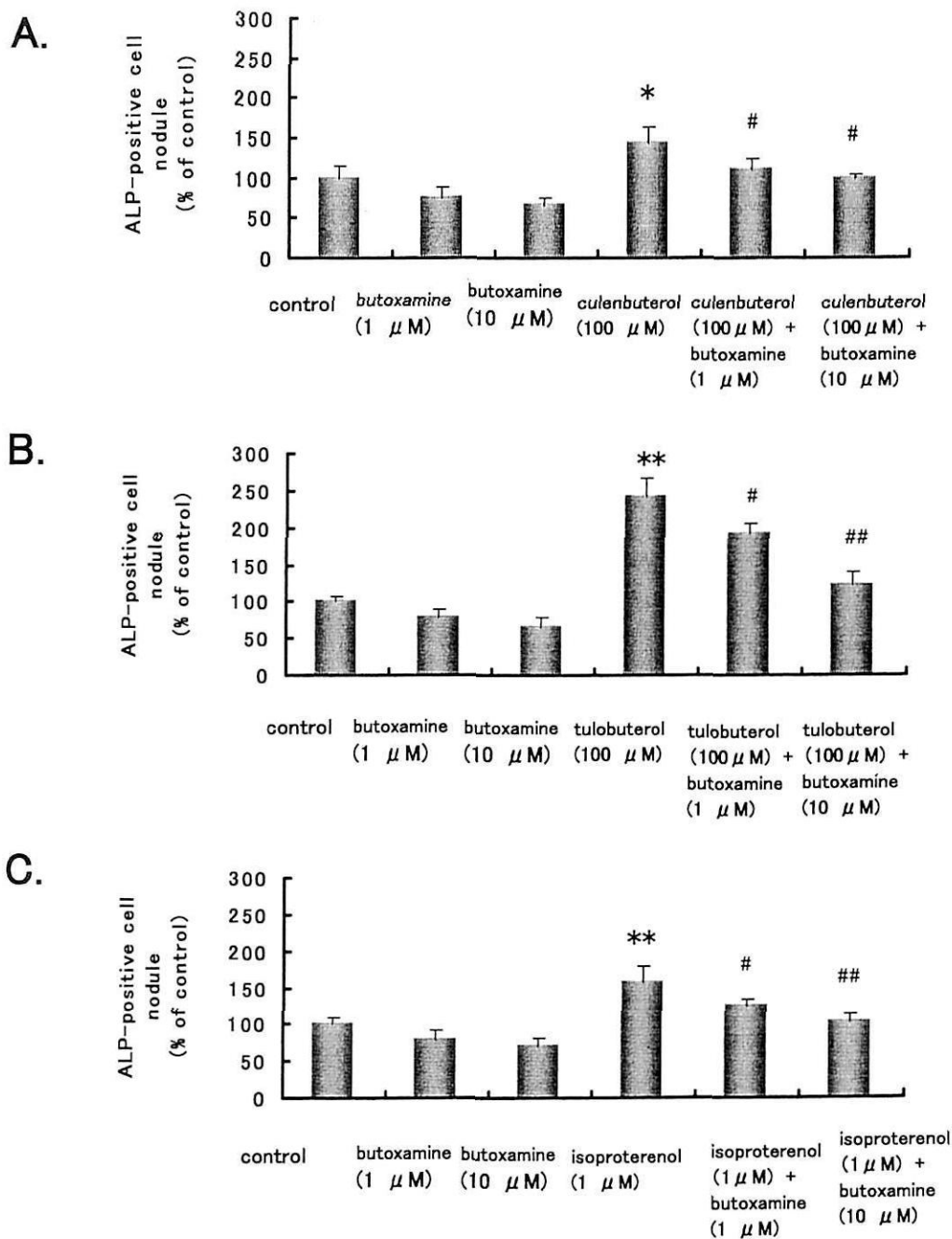


Fig 24. Effect of clenbuterol (A), tulobuterol (B) and isoproterenol (C) and butoxamine on the formation of ALP-positive cell nodule in ST2 cells.

Data are represented the means  $\pm$  S.D. (n=4)

\*, \*\* ; Significantly different from the control culture at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively. #, ## ; Significantly different from the control culture at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.



## 2) H 89 の作用

Protein kinase A の阻害剤である H 89 (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) を、各種  $\beta$ -agonist を処置する 1 時間前に処置した。Clenbuterol (100  $\mu$ M)、tulobuterol (100  $\mu$ M)、isoproterenol (1  $\mu$ M) を培養 1 日目から 7 日目まで培地中に添加し、培養 7 日目に ALP 染色を施し、定量した結果を Fig 25 に示した。

### ST2 細胞と非付着性骨髄細胞の共存培養系における clenbuterol の作用

以上の結果より、clenbuterol によって破骨細胞の分化が促進することが明らかとなった。そこで、破骨細胞と骨芽細胞・間質細胞の相互作用における薬物の作用をより浮き彫りにするために、付着性である骨芽細胞・間質細胞や様々なサイトカインを放出するマクロファージを取り除いた骨髄細胞と、その細胞の分化を支持する細胞である ST2 細胞のみが存在する共存培養系にて、clenbuterol の作用を検討した。

### 破骨細胞形成に及ぼす clenbuterol の作用

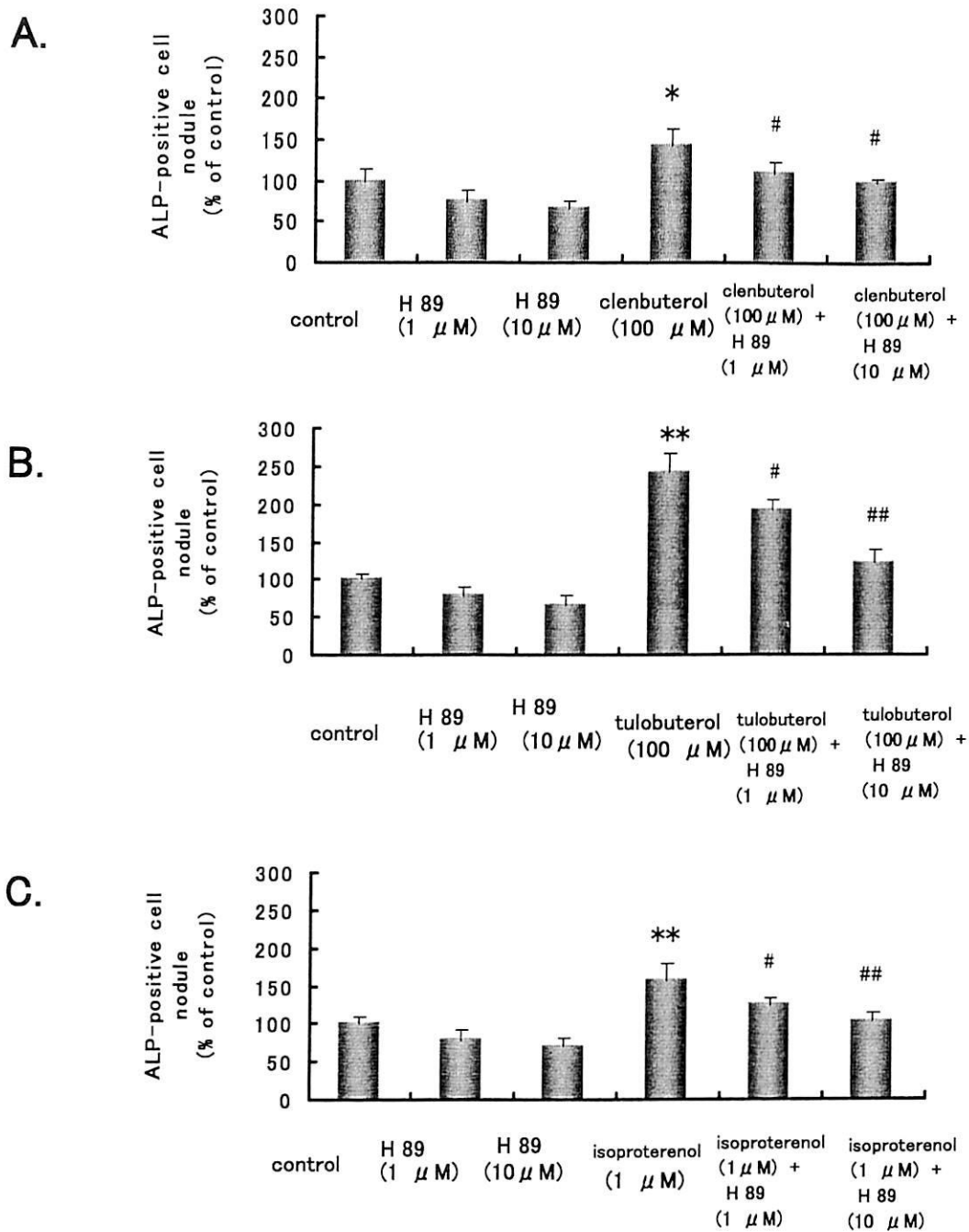
共存培養系における破骨細胞形成に及ぼす clenbuterol の作用を検討するために、clenbuterol (0.1~100  $\mu$ M) を共存培養開始 1 日目に培地中に添加し作用させた。その後 14 日間培養した後 TRAP 染色を施し、定量した結果を Fig 26 に示した。Clenbuterol (0.1~100  $\mu$ M) 処置により TRAP 活性陽性細胞形成が有意に増加し、その効果は濃度依存的であった。また、比較のため、ST2 細胞単独培養系に clenbuterol を作用させた時の ALP 活性陽性細胞の変化のグラフも Fig 26 に示した。

共培養系における TRAP 活性陽性細胞の形成増加率 (% of control) は ST2 細胞単独培養系における clenbuterol の ALP 活性陽性細胞の形成増加率に比べ著しく大きいものであった。

### ST2 細胞を用いた RT-PCR 法による検討

#### 1) ODF、OCIF mRNA 発現への影響

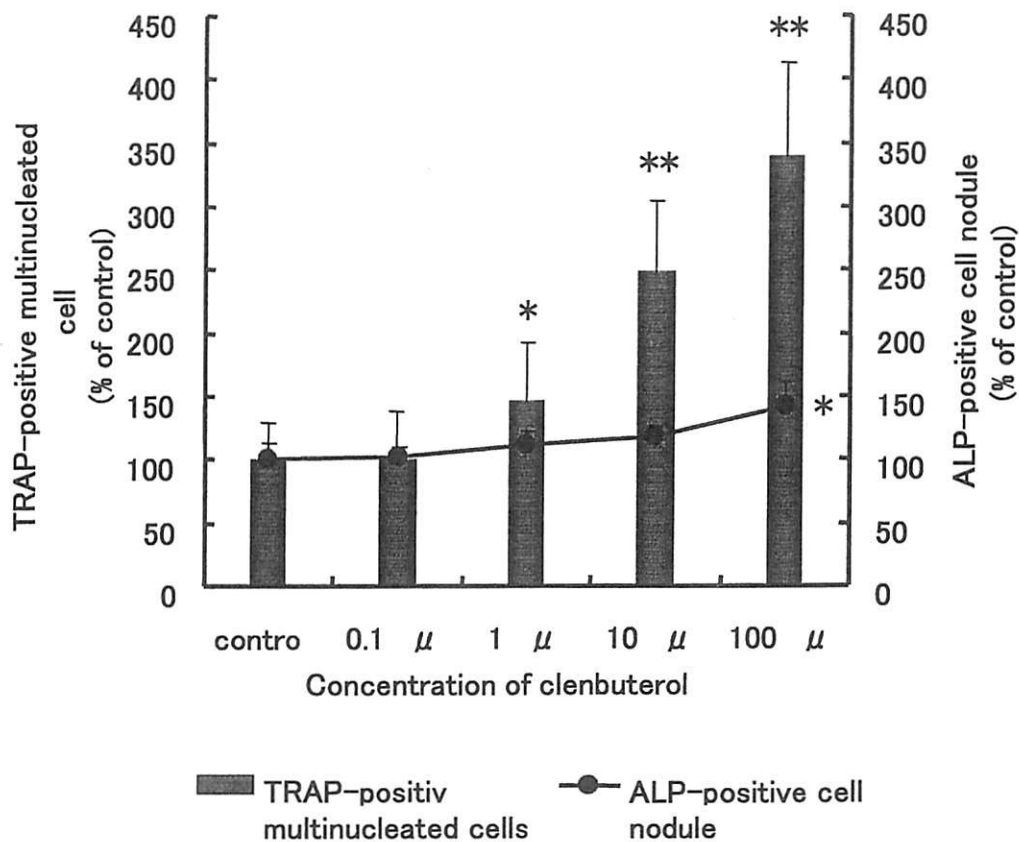
Clenbuterol の共存培養系における破骨細胞分化を支持するフィーダーである ST2 細胞単独培養系において発現する ODF、OCIF の mRNA 発現量への影響を調べた。Clenbuterol (100  $\mu$ M) を培養 3 日目に培地中に添加し作用させた。薬物を処置して 1、3、6、12、24 時間後に細胞を採取し、RT-PCR 法にて ODF、OCIF の mRNA 量の発現量を検討した結果を Fig 27 に示した。ODF の mRNA 発現は clenbuterol 処置の 1 時間後において顕著に増加し、その後減少していった。一方、OCIF の mRNA 発現は clenbuterol 処置における変化は認められなかった。



**Fig 25** Effect of clenbuterol (A), tulobuterol (B) and isoproterenol (C) and H 89 on the formation of ALP-positive cell nodule in ST2 cells.

Data are represented the means  $\pm$  S.D. (n=4)

\*,\*\* ; Significantly different from the control culture at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively. #,## ; Significantly different from the control culture at  $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.



**Fig 26 Effect of clenbuterol on the formation of TRAP-positive multinucleated cells formation in coculture of ST2 cells and adherent cell-depleted mouse bone marrow cell culture and ALP-positive cell nodule in ST2 cells.**

Data are represented the means ± S.D. (n=4)

\*,\*\* ; Significantly different from the control culture at P<0.05 and 0.01, respectively.

2) COX-2 mRNA 発現への影響

PGE<sub>2</sub>の合成酵素であるCOX-2のmRNAの発現を検討した結果をFig 27に示した。COX-2のmRNA発現はclenbuterol処置の1時間後において顕著に増加し、その後減少していった。

3) IL-1β、IL-6 mRNA 発現への影響

骨吸収性のサイトカインのIL-6のmRNA発現の変化を検討した結果をFig 27に示した。IL-6のmRNA発現はclenbuterol処置の1時間後において顕著に増加し、その後減少していった。一方、IL-1βのmRNAの発現は認められなかった。

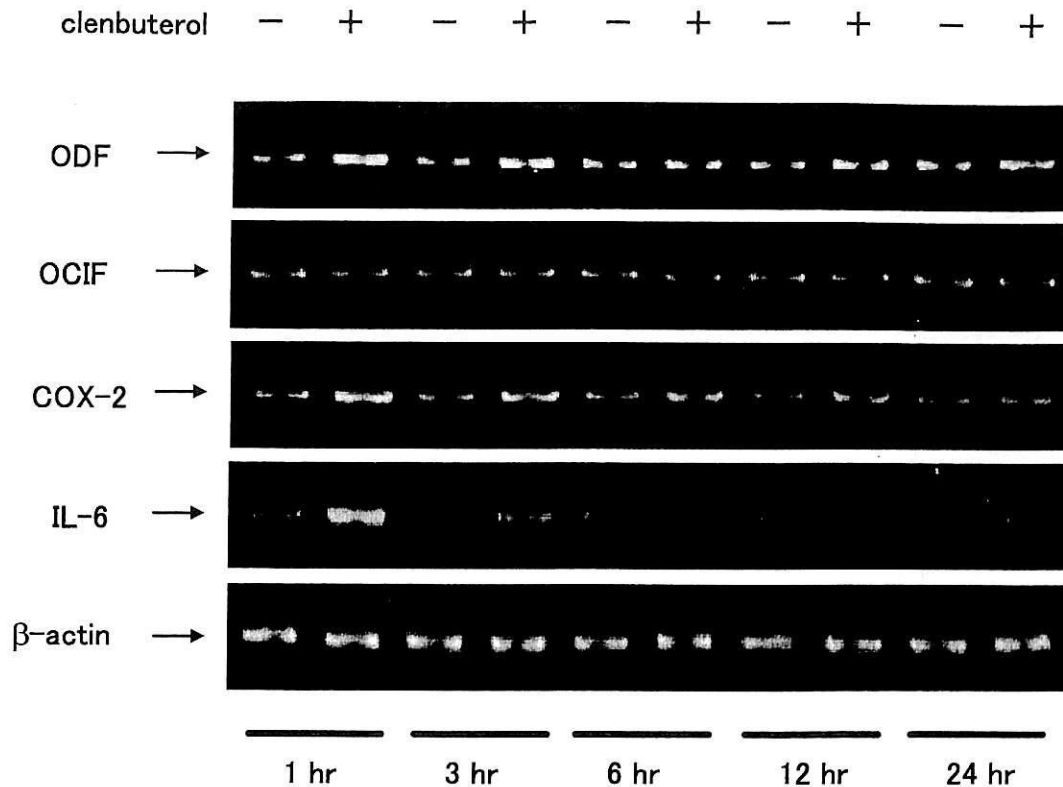
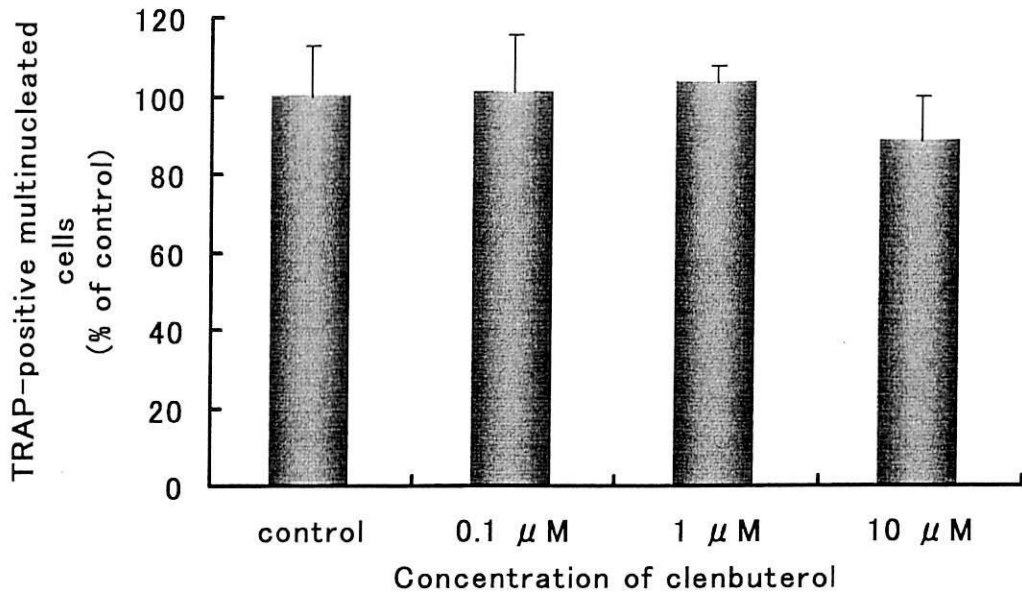


Fig 27 Time-course of effect of clenbuterol (100  $\mu$ M) on expression of ODF, OCIF, COX-2 and IL-6 mRNA in ST2 cells after 3 days culture with carcitriol and dexamethasone.

#### 非付着性骨髄細胞培養系における clenbuterol の作用

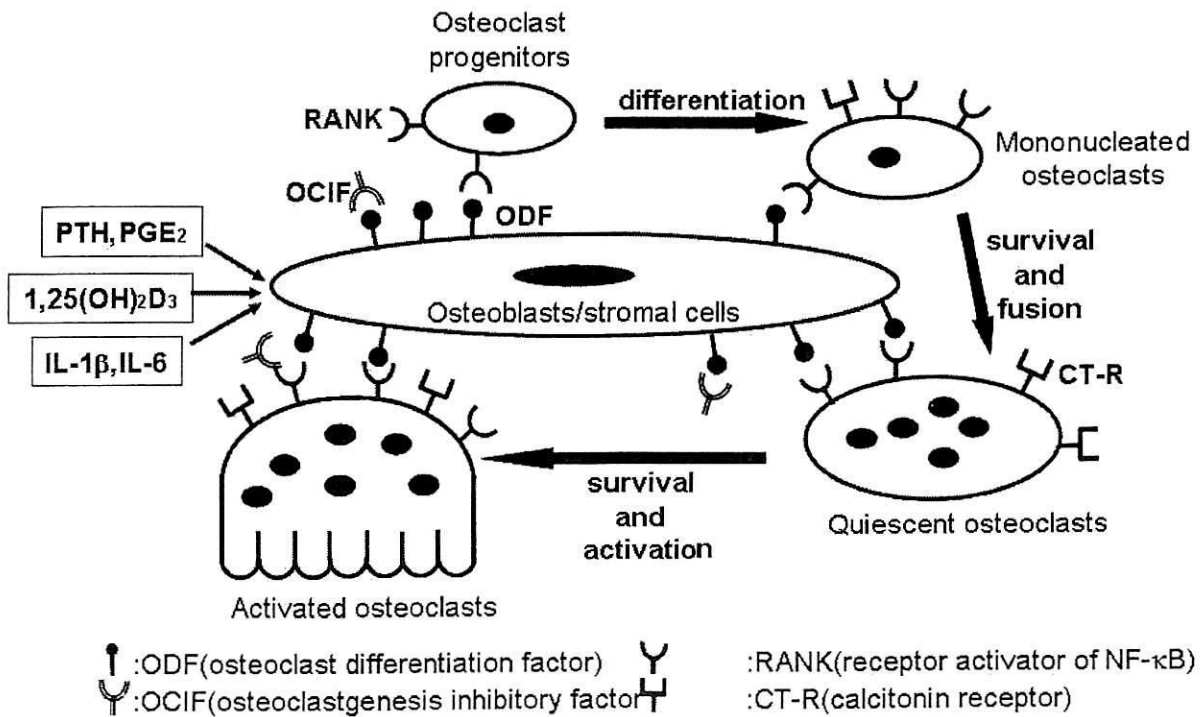
ここまでで、破骨細胞と骨芽細胞・間質細胞の相互作用における clenbuterol の作用を検討した。ここでは培養系をさらに単純化して ST2 細胞も含まず、骨芽細胞・間質細胞を取り除いた培養系で破骨細胞及びその前駆体のみならず clenbuterol の作用を検討した。

Clenbuterol (0.1~10  $\mu$ M) を培養2日目から5日目まで作用させた後、TRAP染色を施し、定量した結果を Fig 28 に示した。Clenbuterol 10  $\mu$ M 処置した場合に、僅かであるが破骨細胞形成の減少傾向がみられた。



**Fig 28** Effect of clenbuterol on the formation of TRAP-positive multinucleated cells formation in adherent cell-depleted mouse bone marrow cell culture.

Data are represented the means  $\pm$  S.D. (n=4)



**Fig 29** A model illustrating a mechanism by which osteoblast/stromal cells regulate osteoclast differentiation and function.

#### IV 考察

ラットの骨組織に及ぼす影響では、骨長、骨密度とも有意な低下 ( $P < 0.05$ ) が認められた。この結果は、北浦ら<sup>95)</sup>の報告と一致した。また、ラットの骨折モデルで  $\beta$ -antagonist の propranolol が予防的に働くことが報告されている<sup>118)</sup>。さらに最近、脂肪細胞から分泌され視床下部の摂食中枢に作用して食欲を調節するホルモンである<sup>119)</sup> leptin が中枢性に骨形成を抑制することが報告された<sup>120)</sup>が、この leptin の作用に交感神経系の関与が報告されており<sup>121, 122)</sup>、leptin を  $\beta$ -antagonist の propranolol 投与下で投与すると、骨形成の減少が防止されることや<sup>123)</sup>、leptin を欠損させた ob/ob マウスでみられる骨量の増加を  $\beta$ -agonist である isoproterenol が阻害することが報告<sup>123)</sup>されている。本研究における結果はこれらの報告を支持するものであると思われる。しかし、一方で、Zeman ら<sup>94)</sup>は、clenbuterol が除神経したラットの骨量の低下を防止することを報告しているが、これは clenbuterol が除神経による筋力の低下を防止することで、骨への負荷の低下を防止し、その結果骨量の低下を防ぐという報告であり、clenbuterol が直接骨量を増加させるのではないことも報告している。よって今回の結果に反するものではないと考えられる。

ラットでの検討により、clenbuterol 投与により骨組織への悪影響が示唆された。そこで、clenbuterol の骨に対する作用の詳細を調べる為に、様々な培養系を用いて骨形成を担う骨芽細胞と、骨吸収を担う破骨細胞に及ぼす影響を以下に検討した。

骨芽細胞に及ぼす clenbuterol の影響を調べるために、マウス骨髄細胞初代培養系に ascorbic acid 等を加えることで骨芽細胞培養系としたものに clenbuterol を処置したところ、 $10 \mu\text{M}$  までの濃度でわずかに骨芽細胞形成の増加傾向がみられたものの、有意な変化ではなかった。また、clenbuterol の作用を他の同種薬物と比較する為に、clenbuterol と同じく強い  $\beta_2$ -receptor 選択性を有する tulobuterol と、非選択的  $\beta$ -agonist である isoproterenol を用いて検討を行ったところ、tulobuterol でも  $10 \mu\text{M}$  までの濃度で骨芽細胞形成の増加傾向が得られたものの、有意な変化ではなかった。Isoproterenol では濃度依存的に骨芽細胞の形成を促進した。

一方、破骨細胞に及ぼす影響を調べるために、マウス骨髄細胞初代培養系に calcitriol 等を加えることで破骨細胞培養系としたものを用いた。骨髄細胞中には多種多様な細胞が存在するが、この中の単球・マクロファージ系の血液幹細胞である破骨細胞前駆細胞が、間葉系幹細胞の支持を受けて破骨細胞に分化する。この過程で clenbuterol がこれらの細胞の働きに影響を与えるか否かを検討した結果、clenbuterol 処置により破骨細胞形成の増加が観察された。また、tulobuterol、isoproterenol でも同様に破骨細胞の増加が観察された。そして、この作用は、 $\beta$  非特異的 antagonist の propranolol、 $\beta_2$ -antagonist の butoxamine、PKA の阻害剤である H 89 で抑えられた。このことから、 $\beta$ -agonist の破骨細胞形成の増加作用は、cAMP の上昇を介していることが示唆された。この作用の詳細を検討するべく、骨髄細胞培養の破骨細胞形成系において各種骨代謝関連因子の mRNA 発現の変化を調べた。

骨芽細胞・間質細胞表面に発現し、破骨細胞の分化に必須の因子である ODF の mRNA 発現

を調べたところ、clenbuterol 処置により ODF の mRNA 発現の増加が観察された。Tulobuterol、isoproterenol を処置した場合にも同様の結果が得られた。ODF を誘導するシグナルとしては、IL-6、IL-11 などによる gp 130 系、活性型ビタミン D とその receptor を介する系、PTH、PGE<sub>2</sub> などによる PKA を介する系の 3 つが知られている<sup>124)</sup>。更に最近、ionomycin 処理や細胞外カルシウム濃度の上昇により細胞内カルシウム濃度が上昇すると protein kinase C (PKC) が活性化され、それによっても ODF の発現が促進されることが報告されている<sup>125)</sup>。今回の ODF の mRNA 発現増加の結果は、clenbuterol により PKA が活性化されたことで生じたものであると思われる。

一方、ODF の decoy receptor として真の ODF receptor である RANK と競合し、RANK よりはるかに高い親和性で ODF に結合することにより ODF の活性を抑制し、破骨細胞の分化を抑制する OCIF の mRNA 発現を調べたところ、clenbuterol 処置により OCIF の mRNA 発現は減少していた。Tulobuterol、isoproterenol を処置した場合にも同様の結果が得られた。OCIF は様々なホルモンやサイトカインなどにより調節を受けている<sup>126-130)</sup> が、その中で PTH は OCIF の発現を抑制することが報告されており<sup>131-133)</sup>、その抑制メカニズムとして cAMP の上昇の関与が報告されている<sup>133)</sup>。また、cAMP analogue である dibutyryl cAMP によっても OCIF mRNA 発現が抑制されること<sup>133)</sup>から、今回 clenbuterol により OCIF mRNA の発現が減少したのは cAMP の上昇を介するものであると考えられる。

次いで、破骨細胞やその前駆細胞で発現する遺伝子である RANK、CT-R の mRNA 発現を調べたところ、両 mRNA とも培養時間の経過とともに発現の上昇がみられたが、clenbuterol 処置による発現の増加は観察されなかった。Tulobuterol、isoproterenol を処置した場合にも同様の結果が得られた。Clenbuterol が破骨細胞形成を増加させることを考えると、破骨細胞表面に発現する RANK、CT-R mRNA 量は増加すると予想されたが、今回の結果は予想に反するものであった。この理由としては、細胞を採取した時期が培養 3~4 日目と破骨細胞の分化初期であるため、薬物による分化の差が表れなかったものと思われる。このことについては、細胞の採取時期を遅らせるなど今後の検討が必要であると思われる。

一方、破骨細胞の分化を促進するものとして、PGE<sub>2</sub> が挙げられるが、clenbuterol による cAMP の上昇により PGE<sub>2</sub> の上昇が予想されるため、その合成酵素である COX-2 の mRNA 発現を調べたところ、clenbuterol 処置により COX-2 の mRNA 発現の増加が観察された。Tulobuterol、isoproterenol を処置した場合にも同様の結果が得られた。

さらに、骨吸収性サイトカインとして知られる IL-1 $\beta$ 、IL-6 の発現を調べたところ、clenbuterol 処置により両 mRNA とも発現の増加が観察された。IL-1 $\beta$  は PGE<sub>2</sub> や forskolin、dibutyryl cAMP によって mRNA 発現が増加することが報告されており<sup>134)</sup>、IL-6 も epinephrine で mRNA 発現が増加する<sup>135-137)</sup> ことや、forskolin、dibutyryl cAMP によって mRNA 発現が増加する<sup>138)</sup> ことが報告されており、今回の結果はこれらを支持するものであると思われる。IL-1 $\beta$ 、IL-6 は破骨細胞の分化を促進し、かつ成熟破骨細胞の生存を促進することが知られており<sup>139-142)</sup>、ヒト骨芽細胞において ODF 発現を増加させることが報告されていることから、

今回の clenbuterol による ODF mRNA の発現の増加は IL-1 $\beta$  及び IL-6 の mRNA 発現の増加による寄与も考えうる。

RT-PCR 法での検討によって、clenbuterol は骨芽細胞に作用し、ODF の発現と活性化を促し、さらに可溶性のタンパクである OCIF に作用しその発現を抑制することで、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用を介して、間接的に破骨細胞の分化を促進することが示唆された。また、PGE<sub>2</sub> や IL-1 $\beta$  及び IL-6 などの因子も破骨細胞の分化促進に関与している可能性が示唆された。なお、骨芽細胞との相互作用により破骨細胞が分化・成熟していく様子を Fig 29 に示す。

以上の骨髄細胞培養系における検討から、クレンプテロールは骨芽細胞の分化にはあまり影響せず、骨芽細胞と破骨細胞との相互作用を強めることで破骨細胞の分化を促進することが示唆された。そこで、さらにクレンプテロールの作用を詳しく調べるために、骨髄細胞のように、骨芽、破骨細胞の分化に関与する細胞以外の多種の細胞を含まない、より簡潔な培養系を用いて検討した。

マウス骨髄由来の間質細胞株で、ascorbic acid 等を加えることで骨芽細胞へと分化する ST2 細胞単独培養系に clenbuterol を処置したところ、高濃度の処置で骨芽細胞形成の有意な増加がみられた。また、tulobuterol と isoproterenol を用いて検討を行ったところ、tulobuterol でも高濃度で骨芽細胞形成の有意な増加がみられた。isoproterenol では低い濃度でも骨芽細胞形成の有意な増加がみられた。そして、これら  $\beta$ -agonist の骨芽細胞形成の増加作用は、 $\beta_2$ -antagonist の butoxamine 及び PKA の阻害剤である H 89 で抑えられた。このことから、 $\beta$ -agonist の骨芽細胞形成の増加作用は、cAMP の上昇を介していることが示唆された。この結果は、PTH、PGE<sub>2</sub>、PDE4 などの  $\beta$ -agonist と同じく cAMP を上昇させる薬物での報告と一致するものであった。そして、ST2 細胞での検討により、骨髄細胞では僅かであった clenbuterol の骨芽細胞の分化に及ぼす作用が、明白に観察された。

次いで、骨髄細胞培養系でみられた Clenbuterol の破骨細胞形成の増加作用をさらに浮き彫りにするために、骨髄細胞の中から成熟マクロファージや骨芽細胞に分化する可能性を持つ間質細胞・骨芽細胞といった付着性の細胞を取り除き、非付着性の骨髄細胞を破骨細胞前駆体として用い、その細胞の分化を支持する細胞である ST2 細胞との共存培養系にて検討を行った。この培養系により、破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞・間質細胞との相互作用に及ぼす薬物の影響を詳しく検討することができる。Clenbuterol 処置により破骨細胞形成の増加が観察された。そしてこの作用は骨髄培養における作用より顕著なものであった。この原因としては、骨髄細胞は破骨細胞分化に関与する細胞以外にも多種多様な細胞が混在しているため、それらの細胞が骨芽細胞・間質細胞からのシグナルを破骨細胞及びその前駆細胞が認識するのを何らかの形で妨害しているのではないかと思われる。共存培養系では破骨細胞分化に関与する 2 種の細胞がさらに選択されているので、骨芽細胞からのシグナルをより鮮明に受け取ったのではないかと思われる。また、clenbuterol 処置による共存培養系における破骨細胞の形成増加率 (% of control) は ST2 細胞単独培養系における clenbuterol の骨芽細胞



の形成増加率に比べ著しく大きいものであった。このことから、clenbuterol は骨芽細胞に作用することで、骨芽細胞と破骨細胞間の相互作用を強め、破骨細胞の分化を強力に誘導するが、骨芽細胞の分化への影響は比較的小さいものであることが示唆された。

共存培養系における破骨細胞の支持細胞として用いている ST2 細胞を用いた RT-PCR 法による検討では、clenbuterol 処置により予測されたように ODF の mRNA 発現の増加がみられた。しかし、骨髄培養系における場合とは異なり OCIF の mRNA 発現の減少は観察されなかった。これは、Lee ら<sup>131)</sup>によって OCIF mRNA 発現の細胞種による感受性の相違が報告されているように、今回は ST2 というクローン化した細胞株における検討のため、骨髄細胞という多種多様な細胞が混在した系との違いと思われる。

一方、骨吸収性の因子である COX-2、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の mRNA 発現を調べたところ、骨髄細胞での結果と同様に clenbuterol 処置により COX-2、IL-6 の mRNA 発現の増加がみられたが、IL-1 $\beta$  の mRNA 発現は今回の条件においては認められなかった。

共存培養系における検討より、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用に及ぼす clenbuterol の作用は明らかにされた。そこで、破骨細胞単独に及ぼす作用を調べるために、非付着性骨髄細胞培養系にて検討を行った。この培養系は、骨芽細胞・間質細胞をすべて取り除いた系であり、破骨細胞の生存を支持するために recombinant の可溶性 ODF と M-CSF を培地に添加することで破骨細胞単独の培養を可能にしたものである。この培養系は 1998 年に OCIF、ODF が発見された後、可能になった培養法である。M-CSF は骨芽細胞・間質細胞から分泌されることが知られており、ODF が機能するために必要であることが報告されている<sup>143)</sup>。従って、ODF と M-CSF の両サイトカインの添加が必要となる。この培養系を用いることで clenbuterol の骨芽細胞・間質細胞を介さない破骨細胞への直接的な作用を検討した。Clenbuterol 処置により僅かではあったが、破骨細胞形成の減少傾向が観察された。これは共存培養での結果と併せて考えると、矛盾しているように思える。しかし、glucocorticoid、endothelin、Hepatocyte Growth Factor (HGF) などの骨芽細胞を介して間接的に破骨細胞の分化を促進する因子も、破骨細胞単独に直接的に作用する場合はその活性を抑制することが報告されている<sup>144-146)</sup>。さらに、calcitonin は破骨細胞の細胞内 cAMP を上昇させることで、破骨細胞の分化を抑制することが知られている。これらのことから、clenbuterol は破骨細胞のみが存在する系においては、その細胞内 cAMP を上昇させることで僅かに破骨細胞の分化を抑制することが示唆された。

本研究における結果より、clenbuterol は成長期のラットにおいて骨への悪影響が示唆された。そしてそれは、clenbuterol が骨芽細胞と破骨細胞の相互作用を強めることで破骨細胞の形成を強力に促進することに起因することが示唆された。

## V 引用文献

- 68) 藤田拓男, 副甲状腺, 日本内科学会雑誌 79, 1125-1133 (1990)
- 69) D.L. Glaser, F.S. Kaplan, Osteoporosis. Definition and clinical presentation, *Spine*, 22, 12S-16S (1997)
- 70) B.L. Riggs, L.J. Melton, 3rd, Involutional osteoporosis, *N. Engl. J. Med.*, 314, 1676-1686 (1986)
- 71) K. Nakashima, X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J.M. Deng, R.R. Behringer, B de Crombrughe, The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation, *Cell*, 108, 17-29 (2002)
- 72) E.H. Burger, J.W.M van der Meer, P.J. Nijweide, Osteoclast from mononuclear phagocytes role of bone-forming cells, *J. Cell Biol.*, 99, 1901-1906 (1984)
- 73) S.L. Teitelbaum, Osteoclasts, integrins, and osteoporosis, *J. Bone Miner. Metab.*, 18, 344-349 (2000)
- 74) G.A. Rodan, Control of bone formation and resorption biological and clinical perspective, *J. Cell Biochem. Suppl.*, 31, 55-61 (1998)
- 75) T. Miyamoto, F. Arai, O. Ohneda, K. Takagi, D.M. Anderson, T. Suda, An adherent condition is required for formation of multinuclear osteoclasts in the presence of macrophage colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, *Blood*, 96, 4335-4343 (2000)
- 76) P. Saftig, E. Hunziker, O. Wehmeyer, S. Jones, A. Boyde, W. Rommerskirch, J.D. Moritz, P. Schu, K. von Figura, Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95 13453-13458 (1998)
- 77) C.C. Liu, D.N. Kalu, Human parathyroid hormone-(1-34) prevents bone loss and augments bone formation in sexually mature ovariectomized rats, *J. Bone Miner. Res.*, 5, 973-982 (1990)
- 78) A.E. Adams, M. Rosenblatt, L.J. Suva, Identification of a novel parathyroid hormone-responsive gene in human osteoblastic cells, *Bone*, 24, 305-313 (1999)

- 79) M. Kanzawa, T. Sugimoto, M. Kanatani, K. Chihara, Involvement of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor in the stimulation of osteoclast formation by parathyroid hormone in mouse bone cells, *Eur. J. Endocrinol.*, **142**, 661-664 (2000)
- 80) S. Yumita, G.C. Nicholson, D.J. Rowe, G.N. Kent, T.J. Martin, Biphasic effect of calcitonin on tartrate-resistant acid phosphatase activity in isolated rat osteoclasts, *J. Bone Miner. Res.*, **6**, 591-597 (1999)
- 81) M. Zaidi, V.S. Shankar, O.A. Adebajo, F.A. Lai, M. Pazianas, G. Sunavala, A. I. Spielman, B.R. Rifkin, Regulation of extracellular calcium sensing in rat osteoclasts by femtomolar calcitonin concentrations, *Am. J. Physiol.*, **271**, F637-44 (1996)
- 82) A.B. Abou-Samra, H. Juppner, T. Force, M.W. Freeman, X.F. Kong, E. Schipani, P. Urena, J. Richards, J.V. Bonventre, J.T. Potts Jr, Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 2732-2736 (1992)
- 83) M.A. Fang, D.A. Kujubu, T.J. Hahn, The effects of prostaglandin E2, parathyroid hormone, and epidermal growth factor on mitogenesis, signaling, and primary response genes in UMR 106-01 osteoblast-like cells, *Endocrinology*, **131**, 2113-2119 (1992)
- 84) E. Blind, F. Raue, V. Knappe, J. Schroth, R. Ziegler, Cyclic AMP formation in rat bone and kidney cells is stimulated equally by parathyroid hormone-related protein (PTHrP) 1-34 and PTH 1-34, *Exp. Clin. Endocrinol.*, **101**, 150-155 (1993)
- 85) K. Miyamoto, Y. Waki, T. Horita, S. Kasugai, K. Ohya, Reduction of bone loss by denbufylline, an inhibitor of phosphodiesterase 4, *Biochem. Pharmacol.*, **54**, 613-617 (1997)
- 86) K. Miyamoto, H. Suzuki, S. Yamamoto, Y. Saitoh, E. Ochiai, S. Moritani, K. Yokogawa, Y. Waki, S. Kasugai, H. Sawanishi, H. Yamagami, Prostaglandin E2-mediated anabolic effect of a novel inhibitor of phosphodiesterase 4, XT-611, in the in vitro bone marrow culture, *J. Bone Miner. Res.*, **218**, 1471-1477 (2003)

- 87) T. Suzawa, C. Miyaura, M. Inada, T. Maruyama, Y. Sugimoto, F. Ushikubi, A. Ichikawa, S. Narumiya, T. Suda, The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs, *Endocrinology*, **141**, 1554-1559 (2000)
- 88) K. Yoshida, H. Oida, T. Kobayashi, T. Maruyama, M. Tanaka, T. Katayama, K. Yamaguchi, E. Segi, T. Tsuboyama, M. Matsushita, K. Ito, Y. Ito, Y. Sugimoto, F. Ushikubi, S. Ohuchida, K. Kondo, T. Nakamura, S. Narumiya, Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 4580-4585 (2002)
- 89) M. Machwate, S. Harada, C.T. Leu, G. Seedor, M. Labelle, M. Gallant, S. Hutchins, N. Lachance, N. Sawyer, D. Slipetz, K.M. Metters, S.B. Rodan, R. Young, G.A. Rodan, Prostaglandin receptor EP(4) mediates the bone anabolic effects of PGE(2), *Mol. Pharmacol.*, **60**, 36-41 (2001)
- 90) I.D. Prather, D.E. Brown, P. North, J.R. Wilson, Clenbuterol: a substitute for anabolic steroids ? *Med. Sci. Sports Exerc.*, **27**, 1118-1121 (1995)
- 91) J. Cartana, T. Segues, M. Yebras, N.J. Rothwell, M.J. Stock, Anabolic effects of clenbuterol after long-term treatment and withdrawal in the rat, *Metabolism*, **43**, 1086-1092 (1994)
- 92) J.J. Choo, M.A. Horan, R.A. Little, N.J. Rothwell, Anabolic effects of clenbuterol on skeletal muscle are mediated by beta 2-adrenoceptor activation, *Am. J. Physiol.*, **263**, E50-56 (1992)
- 93) M. Katsumata, H. Yano, A. Miyazaki, Effect of beta agonist clenbuterol on the body composition of rats with hypothyroidism induced by oral administration of propylthiouracil, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **37**, 411-417 (1991)
- 94) R.J. Zeman, A. Hirschman, M.L. Hirschman, G. Guo, J.D. Etlinger, Clenbuterol, a beta 2-receptor agonist, reduces net bone loss in denervated hindlimbs, *Am. J. Physiol.*, **261**, E285-289 (1991)

- 95) 北浦孝, 常川直子, 喘息治療薬の clenbuterol の骨格筋と骨成長への影響, *臨床スポーツ医学*, 17, 1133-1136 (2000)
- 96) S.L. Dodd, S.K. Powers, I.S. Vrabas, D. Criswell, S. Stetson, R. Hussain, Effects of clenbuterol on contractile and biochemical properties of skeletal muscle, *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 28, 669-676 (1996)
- 97) A. Koyama, E. Otsuka, A. Inoue, S. Hirose, H. Hagiwara, Nitric oxide accelerates the ascorbic acid-induced osteoblastic differentiation of mouse stromal ST2 cells by stimulating the production of prostaglandin E(2), *Eur. J. Pharmacol.*, 391, 225-231 (2000)
- 98) Y. Waki, K. Miyamoto, S. Kasugai, K. Ohya. Osteoporosis-like changes in Walker carcinoma 256-bearing rats, not accompanied with hypercalcemia or parathyroid hormone-related protein production, *Jpn. J. Cancer Res.*, 86, 470-476 (1995)
- 99) R.P. Searles, V.J. Nipper, C.A. Machida, The rhesus macaque beta 1-adrenergic receptor gene: structure of the gene and comparison of the flanking sequences with the rat beta 1-adrenergic receptor gene, *DNA Seq.*, 4, 231-241 (1994)
- 100) R.L. Strausberg, E.A. Feingold, L.H. Grouse, J.G. Derge, R.D. Klausner, F.S. Collins, L. Wagner, C.M. Shenmen, G.D. Schuler, S.F. Altschul, B. Zeeberg, K.H. Buetow, C.F. Schaefer, N.K. Bhat, R.F. Hopkins, H. Jordan, T. Moore, S.I. Max, J. Wang, F. Hsieh, L. Diatchenko, K. Marusina, A.A. Farmer, G.M. Rubin, L. Hong, M. Stapleton, M.B. Soares, M.F. Bonaldo, T.L. Casavant, T.E. Scheetz, M.J. Brownstein, T.B. Usdin, S. Toshiyuki, P. Carninci, C. Prange, S.S. Raha, N.A. Loquellano, G.J. Peters, R.D. Abramson, S.J. Mullahy, S.A. Bosak, P.J. McEwan, K.J. McKernan, J.A. Malek, P.H. Gunaratne, S. Richards, K.C. Worley, S. Hale, A.M. Garcia, L.J. Gay, S.W. Hulyk, D.K. Villalon, D.M. Muzny, E.J. Sodergren, X. Lu, R.A. Gibbs, J. Fahey, E. Helton, M. Ketteman, A. Madan, S. Rodrigues, A. Sanchez, M. Whiting, A. Madan, A.C. Young, Y. Shevchenko, G.G. Bouffard, R.W. Blakesley, J.W. Touchman, E.D. Green, M.C. Dickson, A.C. Rodriguez, J. Grimwood, J. Schmutz, R.M. Myers, Y.S. Butterfield, M.I. Krzywinski, U. Skalska, D.E. Smailus, A. Schnerch, J.E. Schein, S.J. Jones, M.A. Marra, Mammalian Gene Collection Program Team, Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 16899-168903 (2002)

- 101) M. Kanematsu, K. Ikeda, Y. Yamada, Interaction between nitric oxide synthase and cyclooxygenase pathways in osteoblastic MC3T3-E1 cells, *J. Bone Miner. Res.*, **12**, 1789-1796 (1997)
- 102) M. Nagai, N. Sato, Reciprocal gene expression of osteoclastogenesis inhibitory factor and osteoclast differentiation factor regulates osteoclast formation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **257**, 719-723 (1999)
- 103) G.C Ulett, N. Ketheesan, R.G. Hirst, Proinflammatory cytokine mRNA responses in experimental *Burkholderia pseudomallei* infection in mice, *Acta. Trop.*, **74**, 229-234 (2000)
- 104) A.M. Mercad, D.A. Padgett, J.F. Sheridan, P.T. Marucha, Altered kinetics of IL-1 alpha, IL-1 beta, and KGF-1 gene expression in early wounds of restrained mice, *Brain Behav. Immun.*, **16**, 150-162 (2002)
- 105) H. Yamagami, T. Nishioka, E. Ochiai, K. Fukushima, M. Nomura, S. Kasugai, S. Moritani, K. Yokogawa, K. Miyamoto, Inhibition of osteoclastogenesis by a phosphodiesterase 4 inhibitor XT-611 through synergistic action with endogenous prostaglandin E2, *Biochem. Pharmacol.*, **66**, 801-807 (2003)
- 106) L. Anderson, N.G. Anderson, High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 5421-5425 (1977)
- 107) P.J. Reeds, S.M. Hay, P.M. Dorwood, R.M. Palmer, Stimulation of muscle growth by clenbuterol: lack of effect on muscle, *Br. J. Nutr.*, **56**, 249-256, (1986)
- 108) D.S. Criswell, S.K. Powers, R.A. Herb, Clenbuterol-induced fiber type transition in the soleus of adult rats. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, **74**, 391-396 (1996)
- 109) D.W. Benson, T. Foley-Nelson, W.T. Chance, F.S. Zhang, J.H. James, J.E. Fischer, Decreased myofibrillar protein breakdown following treatment with clenbuterol, *J. Surg. Res.*, **50**, 1-5 (1991)

- 110) K. Wong, K.R. Boheler, J. Bishop, M. Petrou, M.H. Yacoub, Clenbuterol induces cardiac hypertrophy with normal functional, morphological and molecular features, *Cardiovasc Res.*, **37**, 115-122 (1998)
- 111) M. Petrou, D.G. Wynne, K.R. Boheler, M.H. Yacoub, Clenbuterol induces hypertrophy of the latissimus dorsi muscle and heart in the rat with molecular and phenotypic changes, *Circulation.*, **92**, II483-11489 (1995)
- 112) N.G. Moore, G.G. Pegg, M.N. Sillence, Anabolic effects of the beta 2-adrenoceptor agonist salmeterol are dependent on route of administration, *Am. J. Physiol.*, **267**, E475-E484 (1994)
- 113) V.C. Busatto, V. Cunha, M.A. Cicilini, J.G. Mill, Differential effects of isoproterenol on the activity of angiotensin-converting enzyme in the rat heart and aorta, *Braz J Med Biol Res.*, **32**, 355-360 (1999)
- 114) 常川直子, 北浦孝, clenbuterol のラットの心筋および骨格筋に及ぼす影響, 北陸体育学会紀要, **36**, 57-66 (2000)
- 115) Y.S. Kim, R.D. Sainz, Beta-adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. *Life Sci.*, **50**, 397-407 (1992)
- 116) L. Stevens, C. Firinga, B. Gohlsch, B. Bastide, Y. Mounier, D. Pette, Effects of unweighting and clenbuterol on myosin light and heavy chains in fast and slow muscles of rat, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **279**, C1558-1563 (2000)
- 117) B. Polla, V. Cappelli, F. Morello, M.A. Pellegrino, F. Boschi, O. Pastoris, C. Reggiani, Effects of the beta(2)-agonist clenbuterol on respiratory and limb muscles of weaning rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **280**, R862-869 (2001)
- 118) B.Minkowitz, A.L. Boskey, J.M. Lane, H.S. Pearlman, V.J. Vigorita, Effects of propranolol on bone metabolism in the rat, *J. Orthop. Res.*, **9**, 869-875 (1991)
- 119) R.S. Ahima, J.S. Flier, Leptin, *Annu. Rev. Physiol.*, **62**, 413-437 (2000)

- 120) P. Ducy, M. Amling, S. Takeda, M. Priemel, A.F. Schilling, F.T. Beil, J. Shen, C. Vinson, J.M. Rueger, G. Karsenty, Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay a central control of bone mass, *Cell*, 100, 197-207 (2000)
- 121) J.S. Flier, Is brain sympathetic to bone? *Nature*, 420, 621-622 (2002)
- 122) S. Takeda, F. Elefteriou, R. Levasseur, X. Liu, L. Zhao, K.L. Parker, D. Armstrong, P. Ducy, G. Karsenty, Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system, *Cell*, 111, 305-317 (2002)
- 123) 竹田秀, レプチンと骨代謝, 実験医学, 20, 113-117 (2002)
- 124) T. Suda, N. Udagawa, I. Nakamura, C. Miyaura, N. Takahashi, Modulation of osteoclast differentiation by local factors, *Bone*, 17, 87S-91S (1995)
- 125) M. Takami, N. Takahashi, N. Udagawa, C. Miyaura, K. Suda, J.T. Woo, T.J. Martin, K. Nagai, T. Suda, Intracellular calcium and protein kinase C mediate expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in osteoblasts, *Endocrinology*, 141, 4711-4719 (2000)
- 126) L.C. Hofbauer, C.R. Dunstan, T.C. Spelsberg, B.L. Riggs, S. Khosla, Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 250, 776-781 (1998)
- 127) N.O. Vidal, K. Sjogren, B.I. Eriksson, O. Ljunggren, C. Ohlsson, Osteoprotegerin mRNA is increased by interleukin-1 alpha in the human osteosarcoma cell line MG-63 and in human osteoblast-like cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248, 696-700 (1998)
- 128) N.O. Vidal, H. Brandstrom, K.B. Jonsson, C. Ohlsson, Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids, *J. Endocrinol.*, 159, 191-195 (1998)



- 129) H. Takai, M. Kanematsu, K. Yano, E. Tsuda, K. Higashio, K. Ikeda, K. Watanabe, Y. Yamada, Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells, *J. Biol. Chem.*, **273**, 27091-27096 (1998)
- 130) N. J. Horwood, J. Elliott, T. J. Martin, M. T. Gillespie, Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells, *Endocrinology*, **139**, 4743-4746 (1998)
- 131) S. K. Lee, J. A. Lorenzo, Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation, *Endocrinology*, **140**, 3552-3561 (1999)
- 132) T. Murakami, M. Yamamoto, K. Ono, M. Nishikawa, N. Nagata, K. Motoyoshi, T. Akatsu, Transforming growth factor-beta1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **252**, 747-752 (1998)
- 133) M. Kanzawa, T. Sugimoto, M. Kanatani, K. Chihara, Involvement of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor in the stimulation of osteoclast formation by parathyroid hormone in mouse bone cells, *Eur. J. Endocrinol.*, **142**, 661-664 (2000)
- 134) S. Amano, K. Naganuma, Y. Kawata, K. Kawakami, S. Kitano, S. Hanazawa, Prostaglandin E2 stimulates osteoclast formation via endogenous IL-1 beta expressed through protein kinase A, *J. Immunol.*, **156**, 1931-1936 (1996)
- 135) T. Takeuchi, T. Tsuboi, M. Arai, A. Togari, Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells, *Biochem. Pharmacol.*, **61**, 579-586 (2001)
- 136) A. Togari, Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells, *Microsc. Res. Tech.*, **58**, 77-84 (2002)

- 137) A. Kondo, M. Mogi, Y. Koshihara, A. Togari, Signal transduction system for interleukin-6 and interleukin-11 synthesis stimulated by epinephrine in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells, *Biochem. Pharmacol.*, **61**, 319-326 (2001)
- 138) J.M. Gimble, J. Hudson, J. Henthorn, X.X. Hua, S.A. Burstein, Regulation of interleukin 6 expression in murine bone marrow stromal cells, *Exp. Hematol.*, **19**, 1055-1060 (1991)
- 139) C.W. Lowik, G. van der Pluijm, H. Bloys, K. Hoekman, O.L. Bijvoet, L.A. Aarden, S.E. Papapoulos, Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 1546-1552 (1989)
- 140) E.M. Greenfield, S.M. Shaw, S.A. Gornik, M.A. Banks, Adenyl cyclase and interleukin 6 are downstream effectors of parathyroid hormone resulting in stimulation of bone resorption, *J. Clin. Invest.*, **96**, 1238-1244 (1995)
- 141) Y. Gao, I. Morita, N. Maruo, T. Kubota, S. Murota, T. Aso, Expression of IL-6 receptor and GP130 in mouse bone marrow cells during osteoclast differentiation, *Bone*, **22**, 487-493 (1998)
- 142) H. Tai, C. Miyaura, C.C. Pilbeam, T. Tamura, Y. Ohsugi, Y. Koishihara, N. Kubodera, H. Kawaguchi, L.G. Raisz, T. Suda, Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoblasts is involved in interleukin-6-induced osteoclast formation, *Endocrinology*, **138**, 2372-2379 (1997)
- 143) E. Jimi, S. Akiyama, T. Tsurukai, N. Okahashi, K. Kobayashi, N. Udagawa, T. Nishihara, N. Takahashi, T. Suda, Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function, *J. Immunol.*, **163**, 434-442 (1999)
- 144) J. Tobias, T.J. Chambers, Glucocorticoids impair bone resorptive activity and viability of osteoclasts disaggregated from neonatal rat long bones. *Endocrinology*, **125**, 1290-1295 (1989)

- 145) A.S. Alam, A. Gallagher, V. Shankar, M.A. Ghatei, H.K. Datta, C.L. Huang, B.S. Moonga, T.J. Chambers, S.R. Bloom, M. Zaidi, Endothelin inhibits osteoclastic bone resorption by a direct effect on cell motility: implications for the vascular control of bone resorption. *Endocrinology*, 130, 3617-3624 (1992)
- 146) K. Fuller, J. Owens, T.J. Chambers, The effect of hepatocyte growth factor on the behaviour of osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212, 334-340 (1995)

## 第4章

## まとめ

本研究では前半を横紋筋である心筋と骨格筋組織を対象にし、後半を骨組織を対象としたので個々にわけてまとめる。

心筋と骨格筋組織におけるアドレナリン受容体作動薬の一つであるクレンプテロールの影響を従来の蛋白質レベルからさらに詳しく調べるため、収縮特性と代謝特性にかかわる種々の蛋白質の mRNA 発現レベルから検討した。

得られた結果は次の通りである。

- (1) 雌ラットへのクレンプテロール投与による成長に及ぼす影響に関しては、心臓、遅筋である SOL、速筋である EDL のすべてにおいても、筋湿重量の増加が認められた。
- (2) 収縮特性に関しては、MHC アイソフォーム変化において、SOL における Type I での有意な減少とそれに伴った Type II x の有意な増加が認められ、速筋化が認められた。また、EDL では MHC のアイソフォームには、差が認められず、クレンプテロールの影響はほとんど無いと考察された。  
MyoD の mRNA 発現に関して、SOL において有意な増加が観察されたが、一方 EDL においては影響が認められなかった。
- (3) 代謝特性に関しては、心筋の乳酸代謝には変化は見られなかったが、骨格筋においては SOL における LDH アイソザイムの LDH-M 型の増加が見られたことにより乳酸代謝の速筋型化が考察された。
- (4) MCT1 と CD147 蛋白発現において、心筋では変化は見られず、骨格筋では SOL と EDL 共に蛋白発現の減少が認められたが、mRNA 発現では MCT1 で蛋白発現とよく一致したが、CD147 では変化が見られなかった。
- (5) UCP3 の mRNA の有意な増加が SOL で見られたが、EDL においては変化が見られなかった。

これらのことにより、クレンプテロール投与により、LDH アイソザイムのように速筋の EDL よりも遅筋の SOL において顕著な変化が見られたことは、 $\beta_2$  レセプターを介した事による

ものと考えられる。しかし、MCT1、CD147 や UCP3 での結果のように  $\beta_2$  レセプターの少ない EDL のほうに強く影響したことは、間接的な影響が考えられ IGF-1 の関与も含め今後の検討課題である。

MCT1 と CD147 の発現制御に何らかの相関性が示唆されたが、mRNA 発現の解析により CD147 は MCT1 に影響を与えるがそれ自体は MCT1 とは異なる制御を受けている可能性が考察された。また、脂質代謝や呼吸によって生じる内膜のプロトン濃度勾配を ATP 合成をすることなく解消し、熱を発生するといわれている UCP3 に関しては、 $\beta_2$  レセプターが豊富にある SOL において強く作用したものと考察された。MCT1 との関与に関しては、MCT1 の減少に伴い細胞内に蓄積されたプロトン进行处理するため UCP3 の増加が起こったものと推察された。

乳酸代謝の更なる解明には、IGF-1 などの関与を遺伝子発現レベルから測定することや、心肥大に関与していると示唆されているカルシニューリンやレニン-アンジオテンシン系の検証も今後の検討課題である。また、脂質代謝への関与はペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) や GLUT 4 などの因子の関与も解決すべき今後の興味深い検討課題である。

次に、骨組織において得られた結果を要約すると以下の通りとなる。

1. ST2 細胞では  $\beta_2$ -AR の mRNA 発現はみられたが、 $\beta_1$ -AR の mRNA 発現は認められなかった。骨髄細胞培養系、非付着性骨髄細胞培養系では両 receptor とも発現が認められた。
2. マウス骨髄細胞培養における骨芽細胞形成系において、clenbuterol 処置により骨芽細胞の増加傾向がみられた。
3. マウス骨髄細胞培養における破骨細胞形成系において、clenbuterol 処置により破骨細胞の形成が増加し、その作用は propranolol、butoxamine、H 89 によって抑制された。
4. マウス骨髄細胞培養における破骨細胞形成系において、clenbuterol 処置により ODF、IL-6、IL-1 $\beta$ 、COX-2 の mRNA 発現が増加した。また、OCIF の mRNA 発現は低下した。RANK、CT-R の発現は変化しなかった。
5. ST2 細胞単独培養系において、clenbuterol 処置により骨芽細胞の形成が増加し、その

作用は butoxamine、H 89 によって抑制された。

6. ST2 細胞と非付着性骨髄細胞による共存培養系において、clenbuterol 処置により破骨細胞の形成が増加した。この増加は ST2 細胞単独培養系における骨芽細胞の形成の増加作用に比べ著しいものであった。
7. ST2 細胞において、clenbuterol 処置により ODF、IL-6、COX-2 の mRNA 発現が増加した。また、OCIF の mRNA 発現は変化しなかった。
8. 非付着性骨髄細胞において、clenbuterol 処置により破骨細胞の形成の弱い減少傾向がみられた。

以上より、clenbuterol は  $\beta_2$ -receptor を介し cAMP を上昇させることで、ODF、OCIF 等の破骨細胞の形成に関わる因子に作用し、骨芽細胞と破骨細胞間の相互作用を強め、破骨細胞の形成を強力に増加させることが示唆された。そして、その増加作用は骨芽細胞の形成の増加に比べ顕著に大きいものであるため、骨吸収が優位になり、ラットの骨組織に悪影響を及ぼした可能性が示唆された。

これらのことから、筋の肥大を目的として clenbuterol をドーピングとして安易に用いることは、とりわけ若年層においては、危険をはらんでいることが示唆された。また、clenbuterol の骨粗鬆症の治療への応用に関しては、今回の成長期のラットを用いた研究においては、有用性が見出せなかった。

身体トレーニングにおいて無酸素運動で生体内に増加すると推測される高濃度乳酸を薬物として単独負荷して検討したところ、骨芽細胞の増殖が促進されることが確認された。このことは clenbuterol が蛋白 A キナーゼ (PKA) を介した解糖系代謝の亢進だけでなく蛋白 C キナーゼ (PKC) やその他の細胞内調節機能を変動させる極めて複雑な作用機序を有していることを示唆する重要な知見をもたらすものであり、筋肥大のみに注目して薬物を使用することは、他の臓器においては有害な作用を発生する危険性を否定できない。これは身体トレーニングで生じる臓器間の相互の微妙な調節の重要性の存在を示唆するものであり、臓器間のクロストークによる調節機構を解明した上で薬物を適切に使用することの必要性を示唆するものであり、今後この方面での詳細な研究の進展を図る必要性を提案するものである。

## 謝辞

本研究は数多の皆様のご協力を頂いて実施することができました。感謝申し上げます。  
特に、金沢大学自然科学研究科 辻 彰 教授、金沢大学医学部附属病院薬剤部 宮本 謙  
一 教授、ならびに大学院生の小林 大祐君、大形 竜也君、佐藤 厚志君の多大なる援  
助を受けました。ここに記して謝意を表します。