

令和元年6月18日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11495

研究課題名(和文) 分子時計遺伝子群を標的とした骨関連疾患治療薬の創出に向けた分子薬理学的研究

研究課題名(英文) Molecular pharmacological analyses of a potential drug target regulating the clock gene in bone

研究代表者

平居 貴生 (HIRAI, Takao)

愛知学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：80389072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、これまでの研究結果から骨代謝における概日時計制御系が果たす役割について検討した。特に、 $\beta$ 1アドレナリン受容体アゴニストであるフェニレフリン投与による時計遺伝子の発現変動など、交感神経シグナルによる骨代謝制御における概日時計制御系の関与の可能性について検討を進めてきた。交感神経シグナルの標的分子として同定した時計遺伝子 Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated/E4 Promoter-Binding Protein (Nfil3/E4BP4) の機能解析の結果、時計遺伝子 Nfil3/E4BP4 は骨リモデリングにおいて重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、概日時計制御系による骨代謝制御の可能性が示唆されている。本研究は、時計遺伝子 Nfil3/E4BP4 の骨リモデリングにおける役割を明らかにするなど、体内時計と骨代謝を直接結びつける分子機構の一部を明らかにした。また、骨芽細胞における Nfil3/E4BP4 と時計遺伝子 Bmal1, Rev-erb との関連についても検討した結果、Nfil3/E4BP4 は Rev-erb によって負に制御されることが明らかとなった。これらの研究成果は時間薬理学の観点に基づいた新たな治療法や予防法の開発、時計遺伝子を標的とした骨粗鬆症に対する新たな治療理論の構築につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent studies demonstrated that the bone metabolic functions are closely related to an intrinsic biological rhythm, named the circadian clock. Previous reports have demonstrated that adrenergic receptor (AR) signaling in osteoblasts up-regulated the basic leucine zipper transcriptional factor nuclear factor IL-3 (Nfil3)/e4 promoter binding protein 4 (E4BP4). In the present study, we determined whether Nfil3/E4BP4 contributed to regulating the cellular function of osteoblasts. To evaluate the functionality of Nfil3/E4BP4 on bone metabolism, we compared the bone phenotype of Nfil3 null mice with that of WT littermates. The results suggest that Nfil3/E4BP4 plays a key role in bone formation. Since the circadian clock regulates key molecules in the cellular functions in osteoblasts, this system may be closely involved in the cellular functions associated with bone remodeling, indicating the potential of this clock system in the treatment of bone disorders.

研究分野：骨代謝学、分子薬理学

キーワード：時計遺伝子 骨代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 生物の生命活動は約 24 時間周期の体内リズムによって支配されており、そのリズムを制御しているのが時計遺伝子である。近年、肥満や糖尿病、高血圧症などの生活習慣病の発症に時計遺伝子が関与するという報告がある。また、時計遺伝子を標的とした薬剤である合成 REV-ERB リガンドは、代謝疾患の治療に有効である可能性が示されている<sup>1)</sup>。
- (2) 骨代謝には概日リズムが存在することが明らかになりつつある。我々は、糖質コルチコイドや交感神経シグナルによって骨芽細胞の時計遺伝子 (*Period1*, *Period2*, *Period3*, *Bmal1*) が同調化することを報告し、さらに、骨リモデリングにおいて重要な役割を果たす破骨細胞抑制因子 Osteoprotegerin (OPG) 発現は、時計遺伝子によって制御されることが明らかにした<sup>2)</sup>。また、骨芽細胞におけるシクロオキシゲナーゼ 2 (*Ptgs2*) 発現に関して同様の制御機構が存在することを報告している<sup>3)</sup>。

### 2. 研究の目的

- (1) 骨組織に発現する時計遺伝子の生理的意義、骨代謝に見られる概日リズムの分子制御機構に関してはほとんど解明されていない。したがって、細胞レベルおよび個体レベルの両面から骨関連細胞における時計遺伝子の役割の理解、さらに骨粗鬆症発症時における分子時計の関与を明らかにすることは骨粗鬆症発症の分子メカニズムを理解する上で非常に重要である。よって、本研究では、骨組織における時計遺伝子の機能と骨病態時における時計遺伝子の機能変動の関与の可能性について検討することを目的とした。
- (2) これまでの解析によって蓄積された情報を足掛かりに、交感神経シグナルの標的分子として同定した時計遺伝子 Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated/E4 Promoter-Binding Protein (*Nfil3/E4BP4*) に焦点を絞って、時計遺伝子 *Nfil3/E4BP4* の骨組織における特異的機能とその分子制御機構を明らかにすることを試みる。

### 3. 研究の方法

- (1) これまでの研究結果から骨組織における時計遺伝子発現が交感神経シグナルによって制御されることが明らかとなっている。事実、 $\alpha_1$  アドレナリン受容体アゴニストであるフェニレフリン投与によって、マウス骨組織における時計遺伝子群のリズミックな発現が変動することを既に見いだしている<sup>4)</sup>。本研究では、骨組織に発現する時計遺伝子の個体レベルでの機能解析の第一歩として、*Nfil3/E4BP4* 遺伝子欠損マウス (KO) の解析を試みた。具体的には、 $\mu$ CT 法を用いた骨量の測定、凍結切片またはパラフィン切片標本を用いた形態計測による破骨細胞数の測定、カルセイン二重標識法による骨形成能の測定等をおこない、*Nfil3/E4BP4* KO の詳細な個体異常と骨代謝能の変化について検討した。
- (2) 骨芽細胞における細胞機能に時計遺伝子 *Nfil3/E4BP4* が関与する可能性について検討するために、骨芽細胞様株 MC3T3-E1 細胞を用いて、RNA 干渉、リアルタイム PCR 法による分化マーカーの発現変動等について細胞生物学的解析を行った。
- (3) 時計遺伝子 *Nfil3/E4BP4* を過剰発現した MC3T3-E1 細胞を解析した結果、破骨細胞抑制因子 OPG<sup>2)</sup>、Cyclooxygenase-2<sup>3)</sup>、骨代謝関連遺伝子 Bone morphogenetic protein 4 (*Bmp4*)<sup>4)</sup>、転写因子 CCAAT/enhancer-binding protein delta (*Cebpd*) が *Nfil3/E4BP4* によって制御される可能性を既に見いだしている。したがって、本実験では *Nfil3/E4BP4* が *Cebpd* の標的遺伝子である可能性を検討する目的で、*Cebpd* が *Nfil3/E4BP4* を直接的に制御するかについて分子生物学的手法を用いて検討した。具体的には、ChIP アッセイを用いて、*Nfil3/E4BP4* プロモーター上における *Cebpd* の結合部位の同定と機能的意義について検討した。
- (4) 骨粗鬆症モデルである卵巣摘出マウスを用いて、骨粗鬆症発症時における時計遺伝子群の変動とその生物作用について検討した。

### 4. 研究成果

- (1) 骨リモデリングにおける時計遺伝子 Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated/E4 Promoter-Binding Protein (*Nfil3/E4BP4*) の新規機能の解明を中心に研究を進めた。時計遺伝子 *Nfil3/E4BP4* は、時計遺伝子 *Period2* を抑制的に制御して概日時計の時刻合わせをする重要な因子であるだけでなく、*Nfil3/E4BP4* は T 細胞の分化決定に必須な転写因子であることが報告されているが<sup>5)</sup>、本研究では  $\mu$ CT 法を用いた骨量の測定、形態計測による骨芽細胞数、破骨細胞数の測定、カルセイン二重標識法による解析を行った。その結果、*Nfil3/E4BP4* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べて BV/TV 値と骨形成の指標である BFR 値の減少が明らかとなった。すなわち、*Nfil3/E4BP4* は骨形成に関与する可能性が示唆された。
- (2) *Nfil3/E4BP4* ノックアウトマウスの解析では、骨形成に関与する可能性が示唆されたので、細胞レベルによる *Nfil3/E4BP4* の機能解析のために、骨芽細胞様株 MC3T3-E1 細胞を用い

- て Nfil3/E4BP4 過剰発現安定株を作製し、細胞生物学的解析を行った。その結果、Nfil3/E4BP4 過剰発現によって ALP 活性の有意な増加が観察された。一方、siRNA、リアルタイム PCR 法を用いて Nfil3/E4BP4 のノックダウンの影響について検討した結果、Nfil3/E4BP4 が Cdkn1a 遺伝子にコードされるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 1(p21) の遺伝子発現を負に制御することによって、細胞増殖に影響を及ぼす可能性が示唆された。
- (3) 骨芽細胞における Nfil3/E4BP4 の標的遺伝子として見出した Bmp4 の制御機構について解析すると同時に、転写調節因子 Ppargc1a の骨組織における新規機能についても解析した。その結果、骨芽細胞におけるアドレナリン受容体シグナリングによる Nfil3/E4BP4 発現上昇とそれに伴う Bmp4 発現の抑制には、転写因子 CCAAT/enhancer-binding protein delta が一部関与する可能性が示唆された。
  - (4) これまでの研究において炎症反応における Nfil3/E4BP4 の関与が指摘されている。したがって、骨関連疾患発症機構における時計遺伝子群の関与の可能性について検討する目的で、骨関連細胞の炎症性サイトカインの発現調節機構における時計遺伝子 Nfil3/E4BP4 の関与の可能性について検討した。siRNA を用いて C3H10T1/2 細胞に対する Nfil3/E4BP4 のノックダウンの影響について検討した結果、Nfil3/E4BP4 のノックダウンは IL-1 $\beta$  による炎症性サイトカイン IL6 の発現誘導を有意に増強した。一方、Nfil3/E4BP4 の一過性の過剰発現は、IL-1 $\beta$  による炎症性サイトカイン IL6 の発現誘導を有意に抑制した。さらに、骨粗鬆症における Nfil3/E4BP4 の関与の可能性について検討するために、卵巣摘出マウスの骨組織における時計遺伝子群 Nfil3/E4BP4、Period、Bmal1、Rev-erb、および Rora の遺伝子発現と破骨細胞分化関連因子 Rankl、Opg の発現変動について qPCR 法を用いて解析した。その結果、Sham 群に比して卵巣摘出マウスにおける Nfil3/E4BP4 の発現変動と同時に Rankl の有意な発現増加が観察された。
  - (5) これまでの研究成果より、時計遺伝子 Nfil3/E4BP4 は骨形成に関与する可能性が示唆された。また、Nfil3/E4BP4 は p21 の遺伝子発現を負に制御することによって、細胞増殖に影響を及ぼすことを明らかにした。さらに、卵巣摘出マウスから摘出した骨組織において、Nfil3/E4BP4 の発現変動が見出されたこと、シクロオキシゲナーゼ 2 をコードする Ptgs2 が Nfil3/E4BP4 の標的遺伝子であることを鑑みると、骨粗鬆症発症機構における Nfil3/E4BP4 の関与の可能性は十分に考えられる。特に、Nfil3/E4BP4 が破骨細胞分化関連因子 Rankl 発現を直接的に制御するかにかどうかについて検討するなど、骨リモデリングにおける Nfil3/E4BP4 の役割について明らかにする必要がある。
  - (6) 骨代謝における時計遺伝子の役割に関する全体像を明らかにするために、Nfil3/E4BP4 と時計遺伝子 Bmal1、Rev-erb との関連について検討した結果、骨芽細胞における Nfil3/E4BP4 は Rev-erb によって負に制御されることが明らかとなった。現在、約 150 種類の生薬エキストラブラリーを用いて、Bmal1 プロモーター活性を指標に、Rev-erb に対する天然物アゴニストの探索を試みている。これまでの研究によって見出された核内受容体 Rev-erb に作用する候補化合物の生物作用について、今後検証する必要がある。

#### 引用文献

- 1) Solt LA et al., Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists, *Nature*, 485(7396), 2012, 62 - 68
- 2) Hirai T, Tanaka K, Togari A,  $\beta$ -Adrenergic receptor signaling controls circadian expression of Tnfrsf11b gene by regulating clock genes in osteoblasts, *Biology Open*, 4 (11), 2015, 1400 - 1409
- 3) Hirai T, Tanaka K, Togari A,  $\beta$ -adrenergic receptor signaling regulates Ptgs2 by driving circadian gene expression in osteoblasts, *Journal of Cell Science*, 127(17), 2014, 3711 - 3719
- 4) Hirai T, Tanaka K, Togari A,  $\beta$ -Adrenergic Receptor Signaling in Osteoblasts Regulates Clock Genes and Bone Morphogenetic Protein 4 Expression through Up-regulation of the Transcriptional Factor Nuclear Factor IL-3 (Nfil3)/E4 Promoter-binding Protein 4 (E4BP4), *Journal of Biological Chemistry*, 289(24), 2014, 17174 - 17183
- 5) Yu X et al., TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock, *Science*. 342(6159), 2013, 727 - 30

#### 5 . 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計3件)

Takao Hirai, Kohei Nomura, Rie Ikai, Ken-ichi Nakashima, Makoto Inoue, Baicalein stimulates fibroblast growth factor 21 expression by up-regulating retinoic acid receptor-related orphan receptor in C2C12 myotubes、査読有、*Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 2019, 503 - 510

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.154>

Takao Hirai, Regulation of Clock Genes by Adrenergic Receptor Signaling in Osteoblasts、

査読有、Neurochemical Research、43(1)、2018、120 - 126.

doi: 10.1007/s11064-017-2365-y

Takao Hirai、Circadian clock and bone biology、査読有、Journal of Oral Biosciences、2017、59 (4)、2017、179 - 183

<https://doi.org/10.1016/j.job.2017.06.001>

[学会発表](計5件)

野村 康平, 平居 貴生, 三谷 侑平, 胡桃澤 香蓮, 中島 健一, 井上 誠, Baicalein による代謝調節因子 Fibroblast Growth Factor 21 の制御には ROR が関与する, 第 35 回和漢医薬学会学術大会, 2018 年

Kohei Nomura, Takao Hirai, Ken-ichi Nakashima, Makoto Inoue, Baicalein regulates FGF21 expression through ROR -mediated transcriptional activity, 第 91 回日本薬理学会年会, 第 18 回国際薬理学・臨床薬理学会議, 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018), 2018 年

平居 貴生, 高木 三千代, 中島 健一, 井上 誠, 脂肪組織の褐色化に作用する天然物の探索とその制御機構の解析, 日本薬学会第 138 年会一般シンポジウム「体性幹細胞の機能制御による疾患治療の新たな展望」, 2018 年

平居 貴生, 骨代謝における時計遺伝子の関与, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016 年

平居 貴生, 戸苅 彰史: 交感神経による骨代謝制御, 第 18 回応用薬理シンポジウム, 2016 年

[その他]

ホームページ等

[http://www.phar.agu.ac.jp/lab/med\\_res/top.html](http://www.phar.agu.ac.jp/lab/med_res/top.html)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 濱村 和紀

ローマ字氏名:(HAMAMURA, kazunori)

所属研究機関名: 愛知学院大学

部局名: 歯学部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 00422767

(2)研究分担者

研究分担者氏名: 近藤 久貴

ローマ字氏名:(KONDO, hisataka)

所属研究機関名: 愛知学院大学

部局名: 歯学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 40469002