

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17390413
 研究課題名（和文） 副甲状腺ホルモンの骨形成促進作用の分子メカニズムに関する戦略的研究
 研究課題名（英文） The molecular mechanism of PTH anabolic action on bone

研究代表者
 緒方 直史（OGATA NAOSHI）
 東京大学・医学部附属病院・特任助教
 研究者番号：10361495

研究成果の概要：本研究の目的は、PTH の細胞内シグナルの主要経路である二つの G 蛋白質である G_s と G_q による骨代謝調節機構を、それぞれ骨組織特異的に遺伝子を欠損させた遺伝子操作マウスを用いて独立に解析し、それぞれの関連シグナルを同定すると同時に、G_s と G_q シグナルのバランスによる PTH の骨形成促進作用の分子メカニズムの解明を行った。骨組織特異的な G_s および G_q 遺伝子欠損マウスを作出し、その骨組織の解析を行い、また各遺伝子欠損マウスに PTH を投与し、その効果の検討を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	7,500,000	0	7,500,000
2006年度	4,200,000	0	4,200,000
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
総計	15,200,000	1,050,000	16,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：細胞・組織、骨代謝、副甲状腺ホルモン、骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会の到来により平均寿命は伸びている反面、健康寿命との差、すなわち高齢者の要支援、要介護者の増加が問題となり、それに伴う医療コストも増大してきている。特に骨粗鬆症の患者数が増大しており、その骨脆弱性により生じる骨折患者の数も増え、それに伴う要介護者が増え続けていることから、骨粗鬆症治療対策が社会的急務となっている。骨粗鬆症による骨の脆弱性は、骨形成と骨吸収のバランスが壊れることで骨量減少

を来たし生じるが、それに対する骨粗鬆症治療は今まで骨吸収抑制療法がその中心であり、骨形成を促進する薬剤は臨床応用されていなかった。また、従来の骨吸収抑制剤を長期使用した結果、骨代謝回転の低下による骨質の劣化も問題となってきた。近年、副甲状腺ホルモン（PTH）に強力な骨形成促進作用があることが明らかとなり、欧米ではヒト PTH（1-34）が初めての骨形成促進剤として臨床の現場で用いられ良好な臨床結果が得られている。しかし、この PTH の薬理効果の分子メカニズムについては未だ解明されていないのが

現状であり、更にラットへの PTH 投与で骨肉腫の発生が見られた事実から安全性に問題が残されているとして、欧米諸国では PTH の使用が二年間に制限され、かつ日本では未だ認可されていないことから、そのメカニズムの解明が切望されている。

PTH は PTH 受容体に結合し、その下流の G 蛋白を活性化することによって細胞内にシグナルを伝える。この G 蛋白には G s と G q の 2 種類があることが知られており、それぞれが独立したシグナル伝達経路を有している（次頁の図）。PTH の骨組織に対する多彩な作用は、G 蛋白を介するこの 2 つの異なるシグナルの使い分けやバランスによって調節されている可能性が高い。しかしながら、これらの 2 つのシグナルの生体内での骨代謝調節機構については殆ど解明されていない。この理由として、両 G 蛋白遺伝子欠損マウスが生直後に死亡してしまい、成長期以降の骨の解析ができない事があげられる。以上より、まずは組織特異的な G タンパク遺伝子欠損マウスを作成することが求められ、本研究では同マウスの作成に着手した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、G s と G q による骨代謝調節機構を、それぞれ骨組織特異的に遺伝子を欠損させた遺伝子操作マウスを用いて独立に解析し、それぞれの関連シグナルを同定すると同時に、G s と G q シグナルのバランスによる PTH の骨形成促進作用の分子メカニズムの解明、更にはより効果が強く副作用の少ない PTH 関連骨形成促進剤の開発に結びつけることである。具体的には以下の研究を予定した。

1. 骨組織特異的な G s および G q 遺伝子欠損マウス (conditional G s KO および conditional G q KO) の作出、およびその骨組織の解析
2. Conditional G s KO および conditional G q KO における PTH の効果の検討
3. 効率的な骨形成のための G s シグナルと G q シグナルのバランスの *in vitro* でのモデルの作成およびその検討

3. 研究の方法

1. Conditional G s KO および conditional G q KO の作出、およびその骨組織の解析

マウスの作成：今までの研究で、骨芽細胞において G q を介したシグナルに分化抑制作用があることが分かったが、G q の loss of function についての解析は行われてい

ない。コンベンショナルな G s、G q KO マウスは両者ともにすでに作成されているが、G s KO マウスは胎生初期に死亡してしまい、また G q KO マウスは胎生後期もしくは出生直後に血小板の異常により死亡してしまうため、骨量の変化が明らかとなる成人の骨の骨組織の解析が不可能である。そこで、両 G 蛋白の骨組織特異的な conditional KO マウスが必要となってくる。本マウスは Cre/loxP システムを用いて作成する予定であるが、両蛋白を flox で挟み込んだターゲティングベクターは既に構築済みであり、初年度はこのベクターを用いて MGH 内分泌科により flox マウスの作製を行われた。これによって作出されたそれぞれの flox マウスを、現在保有する骨芽細胞特異的に Cre を発現する I 型コラーゲン Cre マウスと交配させて、骨芽細胞特異的 conditional KO マウスを作出する。

In vivo の解析：まず作成した conditional KO マウスが骨芽細胞特異的に遺伝子欠損を起こしているかを、既存の ROSA マウスと掛け合わせて作った新生児を用いて確認する。具体的には、作成した各 conditional KO と、Lac Z 遺伝子と flox を組み合わせた ROSA マウスと掛け合わせ、生まれてきた新生児の骨組織の Lac Z 染色の有無を検討する。このシステムを用いると、理論上 Cre 遺伝子の発現しているところで Lac Z 染色陽性となり、作成した各 conditional KO での組織特異性を確認することができる。骨組織特異性を確認した後、各 conditional KO マウス、同胞 WT マウスの各週齢における長官骨および椎体について、まず X 線撮影を行い、全体の骨密度を測定する。長管骨についてはその長軸方向に近位から遠位まで 20 分割して各分画における骨密度を測定することによって、骨幹端部・骨幹部における海綿骨・皮質骨それぞれについての比較検討をおこなう。また、マイクロCT による 3 次元レベルでの微細形態学的検討を行い、量的解析のみならず、皮質骨・海綿骨の菲薄化、骨梁連続性等の質的検討も行う。組織学的解析としては、骨芽細胞、破骨細胞に特異的な組織染色法 (ALP 染色、TRAP 染色等)、更にはカルセイン二重標識、Villanueva Goldner 染色を用いた骨組織形態計測を行い、骨代謝動態を定量化する。同時に、組織学的検討においては、骨芽細胞の分化マーカーを用いて各々免疫組織染色、*in situ hybridization* の手法を用いて、骨芽細胞の分化の程度の検討を行い、G s、G q の骨芽細胞特異的な loss of function による骨代謝への影響を *in vivo* で調べる。

2. Conditional G s KO および conditional G q KO における PTH の効果の検討

Conditional G s、同 G q KO マウスを作成後、上述のごとく骨組織の解析を行うが、同時に両 KO マウスに PTH を間歇的に皮下注射し、PTH の骨組織に対する骨同化作用が認められるか検討する。具体的には 8 週齢、雄の両コンディショナル KO マウスおよびその同胞 WT マウスに対して、一日一回の PTH 皮下注射 (80 μ g/kg 体重) を毎日、4 週間行い、その効果を大腿骨、脊椎(L2-L5)の骨密度の変化を経時的に測定し比較する。骨密度は長官骨では分割して測定し、骨幹端部・骨幹部における海綿骨・皮質骨それぞれについての比較検討もおこなう。また、マイクロCT による 3 次元レベルでの微細形態学的検討を行い、量的解析のみならず、皮質骨・海綿骨の菲薄化、骨梁連続性等の質的变化の検討も行う。組織学的解析としては、4 週間の投与終了後に各骨組織を取り出し、標本作製し、骨芽細胞、破骨細胞に特異的な組織染色法 (ALP 染色、TRAP 染色等) 更にはカルセイン二重標識、Villanueva-Goldner 染色を用いた骨組織形態計測を行い、骨代謝動態を定量化する。また、PTH 投与、非投与での各マウスの骨および骨髄組織より mRNA を抽出し、各 G 蛋白が発現していない状態での、既に知られている PTH 下流のシグナル分子あるいは骨代謝関連分子の動態を検討する。

また、各 conditional KO マウスより採取した初代培養骨芽細胞を採取し、また上述した不死化骨芽細胞株を用いて、PTH 投与による分化への影響を検討する。PTH の様々な投与方法により、各 G 蛋白のシグナルが欠損していることにより、明らかに PTH の作用に違いが見られ、明らかな調節機構が証明された細胞系に関しては、gene chip microarray 等の手法を用いて、WT 由来の細胞と明らかに発現の違う関連分子を同定する。また、両 Conditional KO マウスの脛骨において骨折モデルを作成し、PTH を投与し骨折治癒過程を解析する。具体的には脛骨に手術的に骨折を形成し、髄内釘を挿入して固定し、治癒過程を X 線にて仮骨形成を観察し、最終的に骨折部の組織学的検討を行い、WT マウスと各 Conditional KO マウスと比較検討する。骨折治癒過程は、内軟骨性骨化のより再現モデルであり、この実験により PTH の内軟骨性骨化における同化作用への G 蛋白シグナルの関与について検討することが可能である。

3. 効率的な骨形成のための G s シグナルと G q シグナルのバランスの検討

今まで我々が確立した、PTH の骨形成促進作用が認められる骨芽細胞様細胞株 (MC3T3E1、ST2 等) 培養系を用いて PTH シグナルの下流分子の解析を行う。具体的には G s および G q をこれらの骨芽細胞に同時に強制発現させその発現バランスにより、骨芽細胞分化、および破骨細胞形成支持能に差が現れるかを検討する。そのためには、効率よく強制発現させるために、恒常的に活性を持つ CA-G s および CA-G q 遺伝子を含むアデノウィルスを作成し、これらを培養細胞に感染させる事により各々の G 蛋白の発現量の差で、分化へ影響、あるいは骨吸収の指標となる破骨細胞形成支持能すなわち RANKL の発現への影響があるかどうかを検討する。これによって、骨吸収に比べてより骨形成を促進させるための G s と G q の最適なシグナルバランスを決定する。同時に G s および G q の骨形成シグナルの下流分子の検討も上述のモデルを用いて検討する。

4. 研究成果

1. Conditional G s KO および conditional G q KO の作出、およびその骨組織の解析

本研究中、他施設において Conditional G s KO が作出され、その表現形も発表されたため、我々は Conditional G q KO の作出を中心に研究を進めた。

G q 蛋白を flox で挟み込んだターゲティングベクターを用いて MGH 内分泌科により flox マウスの作製を行われた。これによって作出されたそれぞれの flox マウスを、骨芽細胞特異的に Cre を発現する I 型コラーゲン-Cre マウスと交配させて、骨芽細胞特異的 conditional KO マウスを作出した。具体的には Gq のアイソザイムである G11 遺伝子を欠損しかつ Gq 遺伝子座に loxP 配列を挿入した Gq flox マウス (Gqfl/f1/G11 -/-) を作出して、COL 1(I) -Cre マウスと交配させ、骨芽細胞特異的 Gq/G11 欠損マウス (KO) を作出した。KO マウスは Cre 遺伝子が挿入されている者を PCR にて遺伝子配列を検索し、ジェノタイプを行った。

KO は正常に成長し、体重差も認めず、主な臓器に異常は見られなかった。骨組織特異的に Gq 蛋白が欠損していること確認するため、大腿骨、腰椎、頭蓋骨、および各主要臓器より RNA および蛋白を抽出し、各々 RT-PCR およびウェスタンブロット法を用いて Gq の発現を検索した。主要臓器での Gq の発現は確認されたが、骨組織での Gq の RNA および蛋白レベルでの発現は確認されず、骨組織特異的

に Gq が欠損しているが確認された。

KO の骨組織の解析を行うために、X 線撮影を行い、全体の骨密度を測定すると、WT タイプと KO での優位な差はどの年齢においても認められなかった。また、マイクロCT による 3 次元レベルでの微細形態学的検討でも両者に差は認められなかった。組織学的検討でも、骨芽細胞、破骨細胞に特異的な組織染色法 (ALP 染色、TRAP 染色等) 更にはカルセイン二重標識、Villanueva-Goldner 染色を用いた骨組織形態計測を行い、骨代謝動態を行ったが、同様に両者には優位な差が認められなかった。以上より、生理的条件下では Gq 遺伝子を骨組織で欠損させても影響は認められない事が判明した (図 1)。

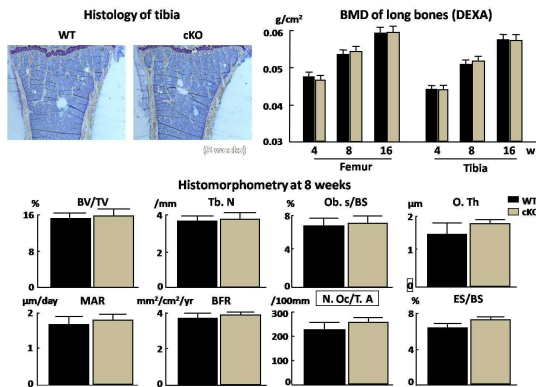


図 1

2. Conditional G s KO および conditional G q KO における PTH の効果の検討

そこで 8 週齢のマウスに一日一回の PTH 皮下注射 (80 μ g/kg 体重) を毎日、4 週間行い、その効果を大腿骨、脊椎 (L2-L5) の骨密度の変化を経時的に測定し比較した。すると KO では WT に比べて PTH の骨密度増加効果が増強していた (15%、8% vs. 12%、5%; $P < 0.05$)。組織学的解析を行うと、KO マウスの骨組織では ALP 染色に染まる骨芽細胞の数が増加しており、TRAP 染色による破骨細胞形成も増加していた (図 2)。

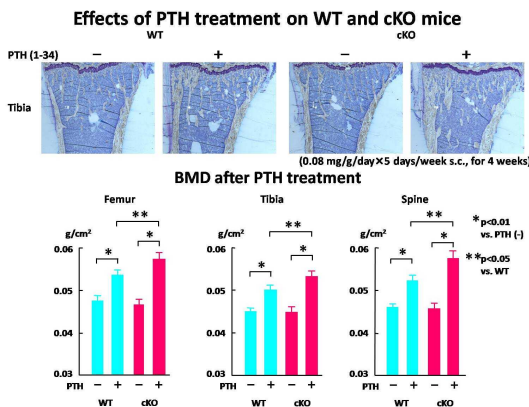


図 2

3. 効率的な骨形成のための G q シグナルの培養骨芽細胞での検討

Gq conditional KO マウスより採取した初代培養骨芽細胞を採取し PKC 各種イソザイムの発現を比較検討したところ、PKC δ が G q 過剰発現に最も強く反応して上昇した。次に、G q のイソザイムである G 11 遺伝子を欠損し、かつ G q 遺伝子座に loxP 配列を挿入した G q flox マウスを作成した。このマウス由来の頭蓋骨骨芽細胞 (POB) を取り出し Cre アデノウイルスで処理することによって、G q および G11 両蛋白の発現が欠損している骨芽細胞 (KO-POB) を樹立した。KO-POB の増殖能 (MTT assay)、分化能 (ALP 活性) は共に WT マウス由来 POB (WT-POB) と同程度であったが、PTH (1-34, 10 nM) 間欠投与下での分化能 (ALP 活性)、石灰化能 (Alizarin red) および骨芽細胞分化マーカー mRNA レベル (COL1, ALP, OCN) はどれも WT-POB よりも有意に上昇していた。これらの上昇は PMA 添加によって抑制された。また、KO-POB では PTH 投与による PKC の蛋白発現および細胞膜への移行が WT-POB と比較して抑制されていた。PTH 投与による細胞内 cAMP 蓄積量は KO-POB と WT-POB の間に有意な差は認められなかった。また、KO-POB においては、PTH 投与による Fra-2 の mRNA の発現が WT-POB と比較して増加しており、その発現増強が PMA 投与により低下したことから、PTH-G q シグナルの下流に PKC による Fra-2 の制御機構が存在することが示唆された。

以上より、PTH の骨芽細胞における G 蛋白シグナルには G s シグナルによる骨同化作用のみでなく、G q シグナルには骨形成能抑制作用を有することが示され、そのシグナルは一部 PKC δ を介していることが明らかとなり、また Gq シグナルを欠損させることで PTH の骨同化作用が増強され、それには PKC δ の細胞膜への移行が関与していたことから、Gq シグナルあるいは PKC δ の選択的抑制の臨床応用への可能性が示されました。

これらの研究をふまえて、PTH 下流に存在する Gq シグナルには骨形成抑制作用があることが明らかとなり、Gq シグナルをブロックすることで PTH の骨同化作用をより増強させることが可能となることが考えられた (図 3)。

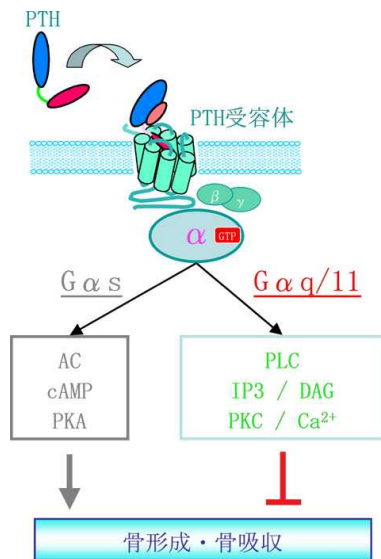


図 3

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Ogata N, Kawaguchi H, Chung UI, Roth SI, Segre GV. Continuous activation of G alpha q in osteoblasts results in osteopenia through impaired osteoblast differentiation. **J Biol Chem.** 282:35757-64, 2007(査読あり).
2. Ogata N, Kawaguchi H. Parathyroid and bone. The mechanism of anabolic function of parathyroid hormone on bone. **Clin Calcium.** 17:1843-9, 2007 (査読なし).

〔学会発表〕(計 9 件)

1. N. Ogata, Y. Shinoda, N. Wettschureck, S. Offerman, UI. Chung, H. Kawaguchi. "Inhibitory Role of G q / PKC Signal in the Bone Anabolic Action of PTH", オーストラリア・ニュージーランド骨代謝学会、2009.3.24、シドニー、オーストラリア
2. N. Ogata, Y. Shinoda, N. Wettschureck,

S. Offerman, UI. Chung, H. Kawaguchi. "Inhibitory Role of G q / PKC

Signal in the Bone Anabolic Action of PTH", 第30回アメリカ骨代謝学会、2008.9.13、モントリオール、カナダ

3. Y. Nagase, M. Iwasawa, T. Akiyama, Y. Kadono, N. Ogata, Y. Oshima, M. Nakamura, T. Yasui, T. Miyamoto, K. Nakamura, S. Tanaka. "Loss of a single Bim allele recovers the defective osteoclast function in bcl-2^{-/-} mice but does not restore the anabolic action of PTH", 第30回アメリカ骨代謝学会、2008.9.12、モントリオール、カナダ

4. 緒方直史、鄭雄一、中村耕三、川口浩「G q シグナルはPKC を介してPTHの骨同化作用を抑制する」、第26回日本骨代謝学会学術集会、2008.10.31、大阪、日本

5. N. Ogata, Y. Shinoda, N. Wettschureck, S. Offerman, G.V. Segre, UI. Chung, H. Kawaguchi. "G q Signaling in osteoblasts inhibits bone formation", 第29回アメリカ骨代謝学会、2008.9.18、ホノルル、アメリカ

6. 緒方直史、篠田裕介、矢野文子、鄭雄一、中村耕三、川口浩、「G q シグナルは骨芽細胞において骨形成抑制に働き、そのシグナルの阻害によりPTHの骨同化作用は増強される」、第25回日本骨代謝学会学術集会、2007.7.20、大阪、日本

7. 篠田裕介、緒方直史、東川晶郎、鄭雄一、中村耕三、川口浩、「副甲状腺ホルモンの骨形成および骨吸収作用の細胞・分子メカニズム」、第24回日本骨代謝学会学術集会、2006.7.10、東京、日本

8. Y. Shinoda, H. Kawaguchi, A.

Higashikawa, K. Nakamura, U. I. Chung,
N. Ogata. Intermittent and Continuous
PTH Treatments Act on Differentiated
Osteoblasts which Induce Bone
Formation and Resorption through
Distinct Mechanisms” 第 28 回アメリ
カ骨代謝学会、2006.9.18、フィラデル
フィア、アメリカ

9. 篠田裕介、緒方直史、中村耕三、川口浩
「PTH(1-34)による in vitro での骨形成
促進モデルシステムの確立」、第 20 回
日本整形外科学会基礎学術集会、
2004.10.19、東京、日本

6. 研究組織

(1)研究代表者

緒方 直史 (OGATA NAOSHI)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：10361495

(2)研究分担者

三浦 俊樹 (MIURA TOSHIKI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20376479
鄭 雄一 (CHUNG UNG -IL)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号：30345053

2005～2006 年度

中村 耕三 (NAKAMURA KOZO)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：60126133

2005 年度

山田 高嗣 (YAMADA TAKASHI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50376472

(3)連携研究者

なし