

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19592375

研究課題名 (和文) 新規レチノイドX受容体リガンドによる骨量増加作用の解析

研究課題名 (英文) Elucidation of the mechanism of new retinoid X receptor ligand action in the enhancement of bone volume in vivo.

研究代表者

中村 美どり (NAKAMURA MIDORI)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号 90278177

研究成果の概要：

OPG 遺伝子欠損マウス (14 週齢雄) に対して、HX531 を混和 (0.03%) した飼料を 1 匹当たり毎日 3g、30 日間与える実験を行った。その結果、HX531 の投与は大腿骨皮質骨部における著明な骨量増加作用が認められた。この効果は、我々が、既に報告したビスフォスフォネート (骨吸収阻害薬) の皮下注射実験と同様の強いものであった。一方、RXR アゴニスト作用が報告されている HX630 と PA024 の投与においても、骨量増加作用が認められた。以上の結果から、新規レチノイドX受容体 (RXR) アンタゴニスト・アゴニスト共に、in vivo における破骨細胞による骨吸収を阻害することにより、強い骨量増加作用を示すことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：レチノイドX受容体 (RXR)、RXR アンタゴニスト、RXR アゴニスト、ビスフォスフォネート、骨吸収、骨形成、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨形成の亢進に先立って骨吸収の亢進が必ず認められることより、骨吸収と骨形成が共役していることは予想されてきた。OPG 遺

伝子欠損マウスは、骨吸収とともに骨形成も著しく亢進している。すなわち、OPG 欠損マウスは高い骨代謝共役状態にある。そこで、OPG 欠損マウスに骨吸収阻害薬であるビス

フォスフォネートを30日間連日投与し、骨吸収と骨形成を評価したところ、骨吸収の抑制に伴い骨形成も完全に抑制された

(Nakamura *et al.* *Endocrinology* 144:5441-5449, 2003)。この結果は、骨吸収と骨形成が厳格に共役していることを示すものであり、骨代謝共役を司る因子(カップリング因子)が実在することを示唆している。さらに、歯周病の原因のひとつであるリポ多糖(LPS)のシグナル伝達に関与するアダプター遺伝子であるMyD88欠損マウスの骨組織を解析したところ、骨吸収と骨形成の両者の抑制により低回転型の骨粗鬆症を呈することが明らかとなった(Sato *et al.* *J Exp Med* 200:601-611, 2004)。この所見も骨吸収と骨形成がカップリングしていることを示している。

そこで、これらの遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo* 実験で培ったノウハウを利用することにより、骨粗鬆症や歯周病に対する新規治療薬の開発を目的とした実験計画を策定するに至った。

骨粗鬆症においては、骨髄内の脂肪細胞の割合が高く認められ、脂肪髄となる。脂肪細胞は未分化間葉細胞から分化するが、骨芽細胞や軟骨細胞への分化能も有している。このことから我々は、骨が吸収された部分での脂肪細胞の存在は、単にその空間を充填するためのものではなく、骨芽細胞への分化がなされなかった間葉系細胞の末路であるのではないかと考えた。

この分化の流れを正常に戻し、間葉系細胞を脂肪細胞でなく骨芽細胞に分化させることができれば、骨を再生し骨粗鬆症治療の一助となるのではないかと考える。また、我々のカップリング因子の研究結果から、破骨細胞は骨芽細胞への分化を促進し、正常な骨組織を形成させるために必要不可欠な細胞であることが明らかとなってきた。

以上の知見は、カップリング因子の存在様式として今まで考えられてきた常識を覆すものであり、この仮説に基づいて策定された本実験計画は独創的かつ実現可能なものであると自負している。

2. 研究の目的

未分化間葉系細胞は様々な細胞へと分化するポテンシャルを秘めている。近年の研究により、その分化の際に、それぞれ特有の転写因子が作用することにより、分化する細胞が決定されることが解明されてきた。骨組織に存在する未分化間葉系細胞においては、骨芽細胞であればRunx2とOsterix、軟骨細胞であればSox5・6・9、筋細胞であればMyoD、脂肪細胞であればPPAR γ が転写因子として分化の振り分けに関与する。

PPAR γ は、核内受容体であるレチノイドX受容体(RXR)と結合することにより、分化後の様々な細胞の機能を制御する。このPPAR γ の機能とは、内皮細胞であれば修復・再生、血管平滑筋細胞であれば増殖・収縮・弛緩、単球・マクロファージであれば増殖・遊走・コレステロール取り込み、脂肪細胞であればサイトカイン産生と分泌などである。

我々は、このPPAR γ の作用を阻害する物質に着目した。その物質はHX531という、レチノイドX受容体のアンタゴニストである。レチノイドX受容体(RXR)と結合し、ヘテロダイマーを形成することで、PPAR γ の作用を適度に抑制することが報告されている。

東京大学の山内らの研究により、HX531を脂肪細胞の分化の過程で添加すると、未分化間葉系細胞から脂肪細胞への分化を抑制し、さらに分化している脂肪細胞に添加すると肥大化を抑制することが報告された。また、HX531を糖尿病マウスに投与することにより、体重増加・高血糖・高インシュリン血症が正常化することが示された。このことから、この物質は抗糖尿病薬・抗肥満薬に展開しうる可能性が示された。破骨細胞分化因子であるRANKLのデコイ受容体であるオステオプロテゲリン(OPG)の遺伝子欠損マウスは、破骨細胞分化の抑制が起こらないため、骨吸収が著しく亢進することにより、重篤な骨粗鬆症に似た病態を呈す。このOPG欠損マウスでは、骨梁が消失した部分は脂肪髄を呈している。

そこで、我々は、脂肪細胞の分化を抑制する作用を有しているレチノイドX受容体アンタゴニストであるHX531をOPG欠損マウスに投与することにより、脂肪髄が改善され骨量増加作用が認められるのではないか

と考えた。

本実験計画の最終目的は、新規に合成されたレチノイド受容体関連化合物の骨疾患治療薬としての応用と作用メカニズムの解明である。破骨細胞の骨形成における役割を明らかにすることを目的に、大理石骨病マウスである M-CSF 遺伝子欠損マウス (op/op) を用いて、破骨細胞がほとんど存在しない条件における BMP 誘導性の骨形成についての検討を行った。

3. 研究の方法

レチノイン酸は、細胞の分化・増殖・形態形成などを制御する内因性物質である。レチノイン酸のシグナルは、レチノイン酸受容体 (RAR) およびレチノイド X 受容体 (RXR) を介して、その作用が発揮される。今回、骨粗鬆症モデルマウスに各種 RXR リガンドを投与する実験を行った。

骨粗鬆症モデル動物である卵巣摘出術 (OVX) を施した C57BL/6J マウスと OPG 遺伝子欠損マウスに対して、各種 RXR 関連化合物を練り餌に混和して毎日 4 週間投与した。

4. 研究成果

(1) RXR アンタゴニストとして合成された HX531 の骨粗鬆症マウスに対する投与は、腰椎海綿骨部および大腿骨皮質骨部における著明な骨量増加を誘導した。この作用は、ビスフォスフォネート投与と同等の効果であった。

(2) HX531 投与は、骨組織における破骨細胞数を減少させ、高値を示す各種骨吸収パラメータを著しく低下させた。また、骨形成パラメータの亢進に対しても、HX531 は抑制作用を示した。

(3) RAR アンタゴニスト PA452 には、骨量増加作用は認められなかった。一方、RXR アゴニスト作用が報告されている HX630 と PA024 の投与においても、骨量増加作用が認められた。これらの薬物は骨形成パラメータには影響を与えず、骨吸収抑制作用のみ示した。

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 8 件) (全て査読あり)

- ① Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N et al. Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *J Cell Biol* 184:541-554, 2009
- ② Koide M, Kinugawa S, Udagawa N et al. Diphenylhydantoin inhibits osteoclast differentiation and function through suppression of NFATc1 signaling. *J Bone Miner Res in press*, 2009
- ③ Narita N, Kobayashi Y, Udagawa N et al. Multiwalled carbon nanotubes specifically inhibit osteoclast differentiation and function. *Nano Lett* 9:1406-1413, 2009
- ④ Yamashita T, Kobayashi Y, Udagawa N et al. MKK6-p38 MAPK signaling pathway enhances survival but not bone-resorbing activity of osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 365:252-257, 2008
- ⑤ Asami A, Nakamura M, Nakamura H, Udagawa N, Miyazawa H et al. Effects of heat treatment of hydroxyapatite on osteoblast differentiation. *J Hard Tissue Biol*, 17:37-46, 2008
- ⑥ Takaku H, Miyamoto Y, Udagawa N et al. Synthesis and structure-activity relationships of 16-ene-22-thia-1 α , 25-dihydroxy-26, 27-dimethyl-19-norvitamin D₃ analogs having side chains of different sizes. *Bioorg Med Chem* 16:1796-1815, 2008
- ⑦ Yamada C, Yamada Y, Udagawa N et al. The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption. *Endocrinology*, 149:574-579, 2008
- ⑧ Udagawa N, Sato N et al. Signal transduction of lipopolysaccharide-induced osteoclast differentiation. *Periodontology* 2000, 43:56-64, 2007

[学会発表] (計 1 件)

- ① Udagawa N Regulation of RANK ligand production and its signaling in osteoclast formation. 13th International Congress of Endocrinology November 9, 2008 (Rio de Janeiro)

[図書] (計 1 件)

- ① Takahashi N, Udagawa N et al.
Principles of Bone Biology,
Third Edition in press, 2009

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：レチノイドX受容体関連化合物を用いた骨粗鬆症の治療剤

発明者：宇田川信之、中村美どり、
影近弘之

種類：PCT 国際出願

権利者：松本歯科大学

番号：国際公開番号

W02007/029642A1

出願年月日：国際公開日

2007年3月15日

国内外の別：国際出願

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 美どり (NAKAMURA MIDORI)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：90278177

(2) 研究分担者

宮沢 裕夫 (MIYAZAWA HIROO)
松本歯科大学・大学院歯学独立研究科・
教授
研究者番号：90147637
中村 浩志 (NAKAMURA HIROSHI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：00278178
二宮 禎 (NINOMIYA TADASHI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：00360222
上原 俊介 (UEHARA SHUNSUKE)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：90434480
宇田川 信之 (UDAGAWA NOBUYUKI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：70245801

(3) 連携研究者