

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591680

研究課題名（和文） 転写因子 C I Z による副甲状腺ホルモンの骨への作用の制御

研究課題名（英文） CIZ regulates anabolic action of PTH on bone

研究代表者

中元 哲也（NAKAMOTO TETSUYA）

東京医科歯科大学・歯と骨の G C O E 拠点・G C O E 拠点形成特任教員

研究者番号：90334383

研究成果の概要（和文）：

当研究においては、BMP の抑制因子である CIZ の PTH シグナルへの関与について、解析した。PTH/PTHrP 受容体の恒常活性型を骨芽細胞/象牙芽細胞にて発現している caPPR マウスと、同じく骨量増加の表現型をもつ CIZ ノックアウトマウスを掛けあわせて、さらなる骨量増加の表現型が得られてたため、caPPR-CIZKO マウスの解析を行うことを目的としている。

caPPR-CIZKO マウスの繁殖に関しては、caPPR マウスが弱いことと、CIZKO マウスに過去に報告したように精巣の異常があるため、困難であったが、caPPR-CIZKO およびそのコントロール各群の計 8 群について、♂、♀それぞれ 6 例から 10 例のマウス検体を得た。

細胞培養の系では、骨芽細胞様細胞株 MC-3T3E1 細胞において、PPR の下流シグナルである CRE(cAMP response element)を介した転写活性化を見るため、pCRE-Luc ベクターでルシフェラーゼアッセイを行った。CIZ を大量発現させた場合には、当初 PPR による CRE の活性化が軽減される傾向があったが、その後の繰り返し実験の結果、ほぼ軽減はされないという結論に至った。CIZ が BMP シグナルの阻害因子であること、PTH が BMP シグナルを亢進するという報告があることから、CIZ の作用は、PTH の CRE 活性化作用そのものではなく、PTH から BMP へ至り骨形成につながる経路の側にあるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the involvement of CIZ, a BMP-inhibitory factor, in PTH-signaling. The caPPR mice express constitutively active PTH/PTHrP receptor (caPPR) in osteoblasts and in odontoblasts, and exhibit increased bone volume. The CIZKO mice also show increased bone volume. We crossed caPPR mice with CIZKO and caPPR-CIZKO mice exhibited further increased bone volume in our preliminary experiments.

We had difficulties in expanding the number of caPPR-CIZKO mice, because caPPR mice are weak and because CIZKO mice have defect in spermatogenesis as reported. However, we finally got 6-10 mice in each group of 4 genotypes x 2 sex.

In cell culture system, we used MC-3T3E1 cells, a osteoblast-like cell line. In order to analyze the transcriptional activity of CRE (cAMP response element), we transfected cells

with pCre-Luc vector and performed luciferase assays. When CIZ was overexpressed, caPPR-induced increase of CRE-activity did not show changes. CIZ inhibits BMP signal and PTH are reported to enhance BMP signals. Therefore we speculate that CIZ does not directly inhibit PTH-induced bone increase but that CIZ affects PTH-induced bone increase by way of inhibiting BMP signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学、骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、日本で、1000万人もの患者がいると言われており、高齢者の病的骨折を引き起こし、寝たきり状態を誘導して、生命予後を悪化させている。骨量は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨破壊のバランスによって決まるが、日本で使用されている骨粗鬆症の治療薬は、破骨細胞をターゲットとしており、いったん減った骨を再び増やすのは難しい。海外では、副甲状腺ホルモン(PTH)が、骨芽細胞に作用して、骨量を増やす薬として用いられており、日本にも導入されることが予想される(報告書作成時点ですでに導入されている)。しかしながら、PTHは、使用期間が限定されていることと、当初は効果があっても、使用する内に効果が減弱すること、破骨細胞の活性化を来すことなど、限界があることも認識されている。一方、骨形成因子(BMP)も、骨芽細胞に働きかけ、骨形成を促すが、骨折治療などでの人工骨に組み込んで、治癒を促進する薬剤として海外で用いられている。

PTHの骨に対する作用は、単純ではない。間欠的投与と連続投与で骨量への作用も異なることや、間欠投与でも投与している内に骨量増加の効果が薄れてくることもある。それらの機序については、さまざまな報告があるが、いまだ、課題が多い。一つの可能性として、PTHがBMPのシグナルを正または負の方向に制御していることがある。PTHがBMP産生を促すという報告もあるが、ヒト検体において、PTH治療中にBMPシグナル

が抑制されるために効果が限定されるとの報告もある。

我々は、CIZというタンパク質をクローニングし、CIZの骨格系における機能解析を行ってきた。骨芽細胞系の培養細胞においては、CIZの大量発現によってBMPによる骨分化が阻害された。さらに、CIZノックアウトマウスは、海綿骨量の増加、骨芽細胞による骨形成の促進、骨折治癒の促進、BMP刺激に対する過剰反応、非荷重負荷による骨量減少の消失などの表現形を示し、生体内においても、CIZがBMPの抑制因子であり、骨量抑制因子であることが示された(MCB 20:1659, 2000, JEM 201:962, 2005)。

caPPR トランスジェニックマウスは、PTH/PTHrP受容体の恒常活性化型が、1型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の2.3kbプロモーターの制御下に発現するようにしたトランスジェニックマウスで、骨芽細胞に特異的にPTHシグナルが入るようになっている。このcaPPRトランスジェニックマウスにおいては、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収の両者が亢進し、結果として、骨量が増加することが報告されている(JCI 107:277, 2001)

最近、我々は、CIZノックアウトマウスをcaPPRトランスジェニックマウスと掛け合わせた。caPPR-CIZノックアウトマウスは、CIZノックアウトマウスまたはcaPPRトランスジェニックマウスと比較しても、大幅な海綿骨量の増加を認めた。

前述したように、CIZはBMPシグナルの抑止因子でもあることから、CIZがない状態

では、BMP シグナルの亢進を介して、PTH のシグナル増強が起きている可能性が考えられるため、その可能性を追求するために本研究が計画された。

2. 研究の目的

副甲状腺ホルモン (PTH) は、骨形成を促す骨粗鬆症治療薬として海外で用いられているが、その作用には限界があり、その限界を解決する方法が模索されている。恒常活性型の PTH/PTHrP 受容体(caPPR)を骨芽細胞に発現するトランスジェニックマウスと、転写因子 CIZ のノックアウトマウスを掛け合わせたところ、海綿骨が骨内を覆い尽くすほどの著明な骨量増加を認めた。当研究では、その caPPR-CIZKO マウスの解析を行い、さらに、培養細胞系にて、CIZ の PTH シグナルにおける役割を解析する。PTH による骨量増加作用の限界の理由が解明され、その限界を突破するためのターゲットを見つけることが当研究の目的である。

3. 研究の方法

マウスの解析

caPPR-CIZKO マウスの繁殖を行う。現在、caPPR-CIZKO マウスは、♂3匹、♀3匹が得られており、骨量の著明増加は6匹とも認められているが、例数を増やす必要がある。歯にも表現形があると思われることから、離乳直後に死亡することも多いが、軟飼料にて対応する。

骨芽細胞様細胞株の MC3T3E1 細胞やストローマ細胞系の細胞株 ST2 細胞などを用いて、CIZ の PTH シグナルにおける機能解析を行う。

PTH シグナルの下流には、cAMP の上昇から、CRE (cAMP response element)を介した遺伝子転写活性化がある。そのシグナル系での CIZ の役割を見るために、caPPR (H223R-PPR) の発現ベクターで、PTH シグナルを入れ、出力は CRE-Luc ベクターでルシフェラーゼアッセイを行う実験系で、CIZ の大量発現あるいは siRNA を用いたノックダウンの影響を調べる。

4. 研究成果

caPPR-CIZKO マウスの繁殖に関しては、caPPR マウスが弱いことと、CIZKO マウスに過去に報告したように精巢の異常があるため、困難であったが、caPPR-CIZKO およびそのコントロール各群の計8群について、♂、♀それぞれ6例から10例のマウス検体を得た。細胞培養の系では、骨芽細胞様細胞株 MC-3T3E1 細胞において、PPR の下流シグナル

である CRE (cAMP response element)を介した転写活性化を見るため、pCRE-Luc ベクターでルシフェラーゼアッセイを行った。CIZ を大量発現させた場合には、当初 PPR による CRE の活性化が軽減される傾向があったが、その後の繰り返し実験の結果、ほぼ軽減はされないという結論に至った。CIZ が BMP シグナルの阻害因子であること、PTH が BMP シグナルを亢進するという報告があることから、CIZ の作用は、PTH の CRE 活性化作用そのものではなく、PTH から BMP へ至り骨形成につながる経路の側にあるものと考えられる。

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13件)

- ① Hanyu, R., Hayata, T., Nagao, M., Saita, Y., Hemmi, H., Notomi, T., Nakamoto, T., Schipani, E., Knonenbery, H., Kaneko, K., Kurosawa, H., Ezura, Y., Noda, M. Per-1 is a specific clock gene regulated by parathyroid hormone (PTH) signaling in osteoblasts and is functional for the transcriptional events induced by PTH. *J Cell Biochem* 査読有 112, 2011, 433-438
DOI: 10.1002/jcb.22957.
- ② Nagao, M., Saita, Y., Hanyu, R., Hemmi, H., Notomi, T., Hayata, T., Nakamoto, T., Nakashima, K., Kaneko, K., Kurosawa, H., Ishii, S., Ezura, Y., Noda, M. Schnurri-2 deficiency counteracts against bone loss induced by ovariectomy. *J Cell Physiol* 査読有 226, 2011, 573-538
DOI: 10.1002/jcp.22521.
- ③ Kamolratanakul, P., Hayata, T., Ezura, Y., Kawamata, A., Hayashi, C., Yamamoto, Y., Hemmi, H., Nagao, M., Hanyu, R., Notomi, T., Nakamoto, T., Amagasa, T., Akiyoshi, K., Noda, M. Nanogel-based scaffold delivery of prostaglandin E(2) receptor-specific agonist in combination with a low dose of growth factor heals critical-size bone defects in mice. *Arthritis Rheum* 査読有 63, 2011, 1021-1033
DOI: 10.1002/art.30151.
- ④ Morishita, M., Ono N., Miyai, K., Nakagawa, T., Hanyu, R., Nagao, M.,

- Kamolratanakul, P., Notomi, T., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., Kronenberg, H. M., Ezura, Y., Hayata, T., Nakamoto, T., and Noda, M. Osteopontin deficiency enhances parathyroid hormone/ parathyroid hormone related peptide receptor (PPR) signaling-induced alteration in tooth formation and odontoblastic morphology. *Tissue & cell* 査読有 43, 2011, 196-200
DOI: 10.1016/j.tice.2011.02.003.
- ⑤ Kondo, H., Ezura, Y., Nakamoto, T., Hayata, T., Notomi, T., Sorimachi, H., Takeda, S., and Noda, M. MURF1 deficiency suppresses unloading-induced effects on osteoblasts and osteoclasts to lead to bone loss. *J Cell Biochem* 査読有 112, 2011, 3525-3530.
DOI: 10.1002/jcb.23327.
- ⑥ Seo, S., Nakamoto, T., Takeshita, M., Lu, J., Sato, T., Suzuki, T., Kamikubo, Y., Ichikawa, M., Noda, M., Ogawa, S., Honda, H., Oda, H., and Kurokawa, M. Cas-L regulates myeloid cell motility and suppresses progression of leukemia induced by p210Bcr/Abl *Cancer Sci* 査読有 102, 2011 2109-2117.
doi:
10.1111/j.1349-7006.2011.02066.x.
- ⑦ Nagao, M., Feinstein, T. N., Ezura, Y., Hayata, T., Notomi, T., Saita, Y., Hanyu, R., Hemmi, H., Izu, Y., Takeda, S., Wang, K., Rittling, S., Nakamoto, T., Kaneko, K., Kurosawa, H., Karsenty, G., Denhardt, D. T., Vilaradaga, J. P., and Noda, M.. Sympathetic control of bone mass regulated by osteopontin *Proc Natl Acad Sci U S A* 査読有 108, 2011, 17767-17772
DOI: 10.1073/pnas.1109402108.
- ⑧ Izu, Y., Ezura, Y., Mizoguchi, F., Kawamata, A., Nakamoto, T., Nakashima, K., Hayata, T., Hemmi, H., Bonaldo, P., and Noda, M. Type VI collagen deficiency induces osteopenia with distortion of osteoblastic cell morphology *Tissue & cell* 査読有 44, 2012, 1-6.
DOI: 10.1016/j.tice.2011.08.002.
- ⑨ Sakuma, T., Nakamoto, T., Hemmi, H., Kitazawa, S., Kitazawa, R., Notomi, T., Hayata, T., Ezura, Y., Amagasa, T., and Noda, M. CIZ/NMP4 is expressed in B16 melanoma and forms a positive feedback loop with RANKL to promote migration of the melanoma cells. *Journal of cellular physiology* 査読有 227, 2012, 2807-2812
DOI: 10.1002/jcp.24066.
- ⑩ Hanyu R, Wehbi VL, Hayata T, Moriya S, Feinstein TN, Ezura Y, Nagao M, Saita Y, Hemmi H, Notomi T, Nakamoto T, Schipani E, Takeda S, Kaneko K, Kurosawa H, Karsenty G, Kronenberg HM, Vilaradaga JP, Noda M. Anabolic action of parathyroid hormone regulated by the beta2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有 109, 2012, 7433-7438
- ⑪ Miyajima D, Hayata T, Suzuki T, Hemmi H, Nakamoto T, Notomi T, Amagasa T, Böttcher RT, Costell M, Fässler R, Ezura Y, Noda M. Profilin1 regulates sternum development and endochondral bone formation. *J Biol Chem*. 287, 2012, 33545-33553
DOI:10.1074/jbc.M111.329938
- ⑫ Smriti AA, Miyai K, Ezura Y, Hayata T, Notomi T, Nakamoto T, Pawson T, Noda M. Nck1 deficiency accelerates unloading-induced bone loss. *J Cell Physiol*. 査読有 2013 in press.
DOI: 10.1002/jcp.24317
- ⑬ Suzuki T, Notomi T, Miyajima D, Mizoguchi F, Hayata T, Nakamoto T, Hanyu R, Kamolratanakul P, Mizuno A, Suzuki M, Ezura Y, Izumi Y, Noda M. Osteoblastic differentiation enhances expression of TRPV4 that is required for calcium oscillation induced by mechanical force. *Bone*. 査読有 54, 2013, 172-178.
- [学会発表] (計9件)
- ① 中元 哲也、羽田 佑、元吉 貴之、佐久間 朋美、早田 匡芳、江面 陽一、野田 政樹 CIZの欠損は、関節炎進展を抑制する 第28回日本骨代謝学会学術集会 2010年7月21日 京王プラザホテル (東京)

- ② T. Nakamoto, T. Hada, T. Motoyoshi, T. Sakuma, T. Hayata, Y. Ezura, R. Kitazawa, S Kitazawa, M Noda CIZ Expression is Enhanced by Inflammatory Stimulation and Transcriptionally Regulates the RANKL Promoter ASBMR 2010 2010年10月17日 コンベンションセンター (トロント、カナダ)
- ③ 佐久間 朋美, 中元 哲也, 宮井 健太郎, 辺見 弘明, 天竺 光雄, 早田 匡芳, 江面陽一, 野田 政樹 CIZ は悪性黒色腫細胞の転移に促進的に働く BMB 2010 2010年12月8日 ポートピアホテル (神戸)
- ④ 中元 哲也, 元吉 貴之, 川崎 真希理, 佐久間 朋美, 早田 匡芳, 江面 陽一, 野田 政樹 CIZ と IL-1 β は相互に発現を誘導し、関節炎に関与する 第29回日本骨代謝学会学術集会 2011年7月29日 大阪国際会議場 (大阪)
- ⑤ 川崎 真希理, 中元 哲也, 納富 拓也, 早田 匡芳, 江面 陽一, 野田 政樹 軟骨細胞 ATDC5 において炎症誘導因子 LPS は IL-1 β による CIZ 発現を制御する 第29回日本骨代謝学会学術集会 2011年7月29日 大阪国際会議場 (大阪)
- ⑥ Nakamoto T., Motoyoshi T, Kawasaki M, Sakuma T, Hayata T., Ezura Y, Noda M. Molecular mechanism of CIZ actions to exacerbate inflammation in serum-induced arthritis based on formation of positive feedback loop with IL-1 beta, ASBMR 2011 Annual Meeting 2011年9月16日 San Diego Convention Center, San Diego, CA USA
- ⑦ Hemmi H, Notomi T, Nakamoto T., Hayata T., Ezura Y, Sakuma T, Noda M. Role of CIZ in melanoma activity for metastasis. ASBMR 2011 Annual Meeting 2011年9月16日 San Diego Convention Center, San Diego, CA USA
- ⑧ 中元 哲也, 平林 恭子, Alexander Valentinitich, 川崎 真希理, 佐久間 朋美, 早田 匡芳, 江面 陽一, Ernestina Schipani, Henry M. Kronenberg, 野田 政樹 PTHの骨形成促進作用はシヤトリン グタンパク質CIZによって抑制される 第30回日本骨代謝学会学術集会 2012年7月21

日 京王プラザホテル (東京)

- ⑨ Tetsuya Nakamoto, Takayuki Motoyoshi, Tasuku Hada, Makiri Kawasaki, Tomomi Sakuma, Tadayoshi Hayata, Yoichi Ezura, Masaki Noda Chondrocyte Metabolism in Inflammatory Arthritis is regulated by CIZ ASBMR 2012 Annual Meeting 2012年10月15日 ミネアポリス、米国

[図書] (計1件)

- ① Masaki Noda, Tadayoshi Hayata, Tetsuya Nakamoto, Takuya Notomi and Yoichi Ezura Mechanosensing Biology: Mechanical Stress and Bone Springer 2011 16ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中元 哲也 (NAKAMOTO TETSUYA)
東京医科歯科大学・歯と骨の GCOE 拠点・
GCOE 拠点形成特任教員
研究者番号：90334383

(2) 研究分担者

早田 匡芳 (HAYATA TADAYOSHI)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号：40420252

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：