

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成26年9月18日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790308

研究課題名（和文） 骨ストレス応答の分子基盤確立と診断法開発

研究課題名（英文） Establishment and development of stress biomarker of hard tissue

研究代表者

藤田 隆司（FUJITA TAKASHI）

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号：30319793

研究成果の概要（和文）：

硬組織のストレスバイオマーカー探索研究をマイクロアレイベースで実施し、2件の特許案件を生むことが出来た。

第1件は、幹細胞活性化メカニズムを探り、幹細胞ストレスバイオマーカーとして、標的となる遺伝子Aの抽出に成功した。遺伝子Aのプロモーター活性を指標に、約4000の植物性エキスから100以上の候補エキスを選別した。これらのうち、原材料コストを考慮して、実用化可能なエキスを数種試験したところ、現在市場にある唯一の対照薬効果を上回る有効性を確認するに至った。

第2件は、皮膚ストレスのバイオマーカーとして、老化受容体応答遺伝子Bを抽出した。硬組織ストレスバイオマーカーとしても適合し、遺伝子Bプロモーター活性を指標に上述と同様、約4000の植物性エキスからスクリーニングを開始する段階にある。

当初計画では、骨ストレスバイオマーカー同定が主眼であったが、他の組織におけるストレスバイオマーカーとして実用化が見込める段階に到達した。

研究成果の概要（英文）：

I was able to perform the microarray-based stress biomarker discovery research of hard tissue, produce two patent projects.

To explore the stem cell activation mechanism, as stem cell stress biomarker, successful extraction of gene A to be targeted. To index the promoter activity of gene A, were selected candidate extract more than 100 from vegetable extract of about 4000. Of these, when taking into account the raw material costs, and tested several as practicable extract, leading to check the validity of greater than control drug effect only on the market today.

As a biomarker of skin stress, extracted the aging receptor response gene B. In order to meet as well as hard tissue stress biomarkers, similar to that described above as an indicator gene B promoter activity, it is in the beginning stages of screening plant extracts about 4000.

The initial plan bone stress biomarker identification was focus, but it has reached the stage of practical use is expected as a stress biomarker in other tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：基礎医学・薬理学一般

キーワード：Biomarker、Stress、Aging、Skin、Skeletalgenesis

1. 研究開始当初の背景

骨代謝領域において、早期に疾病を見はかるストレスバイオマーカーは存在しない。骨代謝性疾患は、重篤化が予見でき、日常生活に支障が生じることから、発症早期、ないしはリスク診断を行うことは、必然的社会的ニーズであり、寿命にも関わる。このため、分子生物学的、生理学的、組織学的手法により、骨ストレスバイオマーカー同定を目指した。

- (1) 骨ストレスの定義付けは難しく、トリガーとするモデル物質もまた一義的ではない。例えば、重力や運動負荷は、硬組織のストレスとなっているにも関わらず、逆に硬組織の健康を高めている。糖尿病領域ではよく知られる「悪玉」であるメーラード反応によって産生する **advanced glycation endproducts: AGE** は、硬組織にとっても「悪玉」となり得ることから、本研究では、**AGE-RAGE** 系を骨ストレスとして取り上げ、早期診断のためのバイオマーカー探索を試みた。
- (2) 硬組織における骨形成担当細胞の分化制御において、**Runx** ファミリーの重要性は既報の通り、極めて重要である。骨組織は常に作り替えられている、言いかえると幹細胞の機能は高度に維持されている組織であると考えられることから、骨がストレス状態にあっても、幹細胞の機能を高めることで、骨ストレスを克服できると考えた。そこで、「善玉」シグナルを特定すべく、**Runx** ファミリーの標的遺伝子探索を進めてきた。並行して、**Runx** ファミリーの共役タンパク質の同定を試みてきた研究から、**FoxO** ファミリーを同定した。時間的・空間的なタンパク質相互作用から生じる幹細胞活性制御においては、最終的にノックアウトマウスにおける表現型からも、骨組織における **Runx** ファミリーの重要性に揺るぎがない。しかしながら、マイクロアレイベースでの解析においては、データマイニングによる絞り込みを必要とし、特異的シグナルを効率的に特定する必要がある。よって、**Runx** ファミリー、共役因子である **FoxO** ファミリーの標的を「善玉」シグナルの同定と位置づけ、「悪玉」シグナルと拮抗作用を誘導する因子の探索を試みた。
- (3) マイクロアレイベースでの解析において重要な要素は、用いる試料にある。ノックアウトマウスからの試料調製においては、個体としての器官試料となるが、特定の器官の成熟時期から見られる表現型に合致する標的遺伝子を抽出することに

なる。しかしながら、表現型が見られることは、トリガーなのか、結果なのかを判断することが非常に難しい。(1)(2)より、総合的なデータマイニングを行うためには、同じプラットフォームでの評価が欠かせない。よって、*in vitro* と *in vivo* の相関をとり代替試験法を確立し、その上で、機能獲得、機能欠損の遺伝子操作を行うことで、評価しなければならないと考えた。

2. 研究の目的

骨ストレスバイオマーカー同定のために、マイクロアレイベースで試験し、早期診断法開発を目的とした。

3. 研究の方法

In vitro での代替試験法の確立
特開 2014-166164 参照。

4. 研究成果

骨ストレスバイオマーカー同定を目的に、実験を実施した。代替試験法を確立した後、マイクロアレイベースで、骨ストレスの標的遺伝子を抽出し、リアルタイム PCR 測定により再現性を確認、ストレスバイオマーカーを同定した。ストレスバイオマーカーとなる遺伝子 A のプロモーター活性を指標に、植物性エキスから 100 以上の有効エキスを抽出した。これらのうちいくつかを動物実験にて検証したところ、既存薬よりも強い活性を認めた。よって、特許申請に至った（特開 2014-166164）。

バイオマーカー探索研究から、他に 20 のバイオマーカー候補遺伝子を見いだした。これらは、バイオマーカーとしての有効性について解析が遅れている。

当初計画では、骨ストレスバイオマーカー同定が主眼であったが、他の組織におけるストレスバイオマーカーとして実用化が見込める段階に到達した。植物性エキスライブラリ（企業より提供）を用いてスクリーニングを行い、バイオマーカーとしての妥当性を検証することに成功した（特開 2014-166164）。

特開 2014-166164（抜粋）

上皮幹細胞において、ストレスバイオマーカー **Infrsf19** を同定、本遺伝子が発毛に関わること、また本遺伝子の発現調節に **Runx** ファミリーが大きく寄与すること、並びに発毛機序で中心的な役割を果たす **Shh** 受容体 **Ptch1** と受容体シグナル分子 **Gli1** を同定した。

すなわち、早期に脱毛症リスクを診断するバイオマーカーの実用化が見込める。加えて、

疾病を予防、治癒するエキス、化合物を抽出することにも成功した。特に、これら遺伝子については、老化により発症率が高く、これを改善する効果を持つエキスを多数同定していることから、成分同定を最優先と考え、物質特許、用途特許取得を目指して解析中である。本研究における最大のセレンディピティーは、細胞のストレス応答と幹細胞再生応答が共通のマシーナリーを経ていることである。そして、毛包形成過程では、Runxファミリーがこれら両方の応答に反応することを見いだしたことである。

次に、未公開特許案件(特願 2013-170817号)を出願するに至った。こちらは解析をすすめた結果、糖尿病性受容体 RAGE 活性化によるストレス応答の観点からは、軟骨細胞の分化障害、皮膚バリア形成障害の重要な機序が明らかになった。RAGE の標的遺伝子として Cdx を同定し、1) 変形性軟骨症やリュウマチのような代謝性骨疾患における骨変形の初期反応と捉えることができ、バイオマーカーとなりうる。ただし、ヒトへの適応を考えたとき、生検を余儀なくするため、患者負担の少ない皮膚組織からの評価に焦点を当てた。糖尿病時における RAGE 高発現を、糖尿病モデルマウス:NC/Nga マウスの皮膚組織に認めたことから、皮膚組織における低侵襲性の評価デバイス開発に向けた新たなプロジェクト策定に至った。

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 1 件)

- ① 著者名: Tatsuya Kosaka, Rino Fukui, Mio Matsui, Yuko Kurosaka, Haruka Nishimura, Motoki Tanabe, Yuuki Takakura, Keisuke Iwai, Takuya Waki, Takashi Fujita
論文タイトル: RAGE, receptor of advanced glycation endproducts, negatively regulates chondrocytes differentiation.
雑誌名: PLOS ONE, 査読: 有
発行年: 2014 年, 9(9):e108819.
DOI:10.1371

[学会発表] (計 9 件)

- ① 発表者: Takashi Fujita
発表タイトル: Fucoxanthin for UV care and atopic dermatitis.
学会名: Cosme Tech 2014
発表年月日: 2014 年 10 月 21 日
発表場所: 東京ビッグサイト (東京)

- ② 発表者: Nobumasa Iwanaka, Takumi Yokokawa, Takashi Fujita, Kazumi Masuda, Takeshi Hashimoto
発表タイトル: Caffeine treatment stimulates myoglobin synthesis via cAMP signaling in L6 skeletal muscle cells.
学会名: ACSM Conference on Integrative Physiology of Exercise
発表年月日: 2014 年 9 月 17-20 日
発表場所: フロリダ (アメリカ)
- ③ 発表者: Takashi Fujita
発表タイトル: RAGE, receptor of advanced glycation endproducts, negatively regulates chondrocytes differentiation.
学会名: FIP World congress 2014
発表年月日: 2014 年 9 月 1-3 日
発表場所: バンコク (タイ)
- ④ 発表者: 西村 春香, 東口 直樹, 松井 滯, 福井 梨乃, 山田 陽一, 橋本 健志, 藤田 隆司
発表タイトル: フコキサンチン(FX)による皮膚障害保護効果および治療効果
学会名: 第 36 回日本分子生物学会年会
発表年月日: 2013 年 12 月 5 日
発表場所: 神戸国際会議場 (兵庫)
- ⑤ 発表者: 西村 春香, 東口 直樹, 松井 滯, 福井 梨乃, 山田 陽一, 橋本 健志, 藤田 隆司
発表タイトル: フコキサンチン(FX)による皮膚障害保護効果および治療効果
学会名: 第 36 回日本分子生物学会年会
発表年月日: 2013 年 12 月 5 日
発表場所: 神戸国際会議場 (兵庫)
- ⑥ 発表者: Mio Matsui, Naoki Higashiguchi, Yuya Hirano, Motoki Tanabe, Yoichi Yamada, Takashi Fujita
発表タイトル: The mechanism of action of seaweed extracts on skin barrier formation.
学会名: 第 86 回 日本生化学会大会
発表年月日: 2013 年 9 月 13 日
発表場所: パシフィコ横浜 (神奈川)
- ⑦ 発表者: Rino Fukui, Tatsuya Kosaka, Yuko Kurosaka, Takaaki Honse, Takuya Waki, Takashi Fujita
発表タイトル: The Mechanism of inhibitory action of chondrocyte differentiation by RAGE.
学会名: 第 86 回 日本生化学会大会

発表年月日：2013年9月11日
発表場所：パシフィコ横浜（神奈川県）

- ⑧ 発表者：Rino Fukui, Tatsuya Kosaka, Yuko Kurosaka, Takaaki Honse, Takuya Waki, Takashi Fujita
発表標題：RAGE, Receptor of Advanced Glycation endproducts, Mediates the Inhibition of Differentiation, but not the Stimulation of Proliferation in Chondrocytes
学会名：第35回日本分子生物学会年会
発表年月日：2012年12月13日
発表場所：福岡国際会議場マリネメッセ福岡（福岡県）
- ⑨ 発表者：黒坂裕子、小坂達也、福井梨乃、本瀬貴章、藤田隆司
発表標題：老化因子 AGE 受容体：RAGE の軟骨分化抑制メカニズム
学会名：日本薬学会 第62回近畿支部総会
発表年月日：2012年10月20日
発表場所：武庫川女子大学（兵庫県）

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

- ① 名称：カロテノイドの新規用途
発明者：藤田隆司
権利者：学校法人 立命館
種類：特許
番号：特願 2013-170817 号
出願年月日：2013年8月21日
国内外の別：国内
- ② 名称：発毛調節物質のスクリーニング方法
発明者：藤田隆司
権利者：学校法人 立命館
種類：特許
番号：特願 2013-039767 号
出願年月日：2013年2月28日
国内外の別：国内
番号：特開 2014-166164 号
公開年月日：2014年9月11日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 隆司 (FUJITA TAKASHI)
立命館大学・薬学部・准教授
研究者番号：30319793