

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293214

研究課題名(和文)ロコモティブ症候群とメタボリック症候群発症に関わる新規内分泌因子の解明

研究課題名(英文) Identification of locomotive and metabolic syndrome-related genes by genome wide association and functional analysis

研究代表者

浦野 友彦 (Urano, Tomohiko)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20334386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：ロコモティブ症候群とメタボリック症候群発症に関わる新規内分泌因子の解明を目指して研究を行った。ロコモティブ症候群を構成する脆弱性骨折においては葉酸血中濃度の低下が関連することを示すとともに葉酸トランスポーター遺伝子であるSLC25A32の遺伝子多型が関連することを見出した。また筋細胞分化を制御するPRDM16遺伝子多型は筋肉量と関連することを見出した。メタボリック症候群においてはミトコンドリアに発現するSLC25A24遺伝子多型がヒトの体脂肪量と関連することを見出した。さらにSLC25A24ノックアウトマウスは肥満に関する抵抗性をしめし、脂肪細胞分化を制御する遺伝子であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Osteoporosis is a skeletal disease characterized by an increased susceptibility to fractures. Evidence from genetic analyses indicates that pathogenesis of osteoporosis is genetically controlled. We show that the SLC25A32, the mitochondrial inner membrane folate transporter, gene polymorphism could be a risk factor for lower folate concentration and future fracture. Moreover, we have identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) that are associated with the development of sarcopenia, which is characterized by a loss of lean body mass, and obesity, which is characterized by high fat mass by genome-wide association studies (GWAS). Here, we have shown that GWAS revealed a functional SNP in the 5'-flanking region of PRDM16 gene associated with lean body mass. We also found that genetic analyses in human and knock out mouse models revealed the importance of SLC25A24/Slc25a24 in the regulation of body fat mass and adipogenesis.

研究分野：内分泌学もしくは老年医学

キーワード：骨粗鬆症 サルコペニア 肥満 ゲノムワイド解析

### 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症、変形性関節症、サルコペニアに代表されるロコモティブ症候群ならびに肥満に代表されるメタボリック症候群は骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、免疫細胞といった細胞機能の異常が疾患の発症に大きく寄与する。これら細胞の中で、骨粗鬆症治療においては破骨細胞を標的とした骨吸収抑制剤が開発され、現在の骨粗鬆症治療の中心となっているが、生理的な骨質を保つためには破骨細胞機能を抑制するだけでなく、骨芽細胞などの他の骨代謝関連細胞の機能を活性化する薬剤の開発が重要であると考えられる。また、サルコペニアや肥満といった疾患においては上記の細胞を標的とした薬剤は開発されていない。これら疾患の発症には性ホルモンの低下が大きく関与しており、性ホルモンを介した疾患発症における Key regulator を同定することは重要である。申請者らは今までに内分泌ホルモンによるシグナル伝達に注目し、エストロゲン応答遺伝子 Efp を単離し、乳癌細胞での役割を世界にさきがけて報告してきた (*Nature* 417, 871-875, 2002, *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 12027-12032, 1999)。申請者らは、Efp がインターフェロン産生において重要な役割を果たしていることを更に発見した (*Cell Host Microbe* 5, 439-449, 2009, *Nature* 446, 916-920, 2007)。このことは性ホルモンが他の液性因子の分泌を制御するネットワーク形成を誘導していることを示唆する。しかしながら肥満やサルコペニアという疾患において性ホルモンから他の液性因子の分泌を制御するネットワーク形成の詳細は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

骨粗鬆症ならびに筋肉ならびに筋力減少を伴う疾患であるサルコペニアといった疾患を含むロコモティブ症候群と肥満や糖尿病といった疾患を含むメタボリック症候群の原因となる骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、免疫細胞の機能異常を解明するため、性ホルモンと他の内分泌系との相互作用を明らかにすることを本研究の目的とする。これら疾患の原因遺伝子として独自に見出した SLC25A24 遺伝子のノックアウトマウスを用いて疾患に影響を及ぼす内分泌因子を明らかにする。同時にヒト臨床サンプルを用いて研究代表者が明らかにしてきた疾患関連シグナル伝達経路に関与する内分泌因子の血中濃度を測定し、疾患との関連を明らかにし、新規診断マーカーの同定を目指す。本解析は研究代表者らの発見と独自に開発した動物モデルを用いており独創的である。本研究から新規発症メカニズムの解明から治療応用が期待される。

### 3. 研究の方法

サルコペニアならびに肥満関連遺伝子の解析：本解析においては閉経後女性を対象に

DXA 法により測定した全身筋肉量、全身体脂肪率と Affymetrix 社の一塩基置換遺伝子多型 (SNP) アレイを用いた遺伝子型との関連解析を行った。以上の一次スクリーニングにより選択された SNP に関し、二次スクリーニングとして第 2 集団において閉経後女性を対象として遺伝子型を決定しパラメーターとの関連解析を行った。以上の解析において、ヒトにおいて有意な関連が見出された SNP 上もしくは近傍に存在する遺伝子に注目し、ノックアウトマウスや細胞でのアッセイ系を用いてその機能と意義を解析した。

SERM 治療が体格に与える影響：本解析においては非骨粗鬆症無治療 (コントロール) 群 186 名ならびに SERM 治療中の骨粗鬆症群 50 名において治療前ならびに経過観察後の骨密度、体重ならびに骨代謝マーカーをはじめとした血中、尿中マーカーを測定した。無治療ならびに SERM 治療におけるベースラインデータから 5 年経過したところで再度、骨密度、体重を測定した。

### 4. 研究成果

ロコモティブ症候群構成疾患の一つである筋肉減少 (サルコペニア) の原因遺伝子をゲノムワイド解析で探索し、筋肉と褐色脂肪細胞分化のスイッチング因子である PRDM16 遺伝子の 5' 上流域に存在する SNP を同定した。PRDM16 遺伝子に存在する SNP は遺伝子変化により転写因子との結合が変化することも明らかにしており、今後、PRDM16 遺伝子の転写活性を制御する液性因子・内分泌因子を見出すことがサルコペニアの病態解明ならびに新規治療薬の開発につながる可能性が見出された。

一方、メタボリック症候群構成疾患の一つである肥満の原因遺伝子としてゲノムワイド解析により SLC25A24 遺伝子を同定し、ノックアウトマウスを独自に作成した。その結果、SLC25A24 ノックアウトマウスは、肥満抵抗性の表現型を示した。また SLC25A24 ノックアウトマウス由来脂肪組織や SLC25A24 遺伝子をノックダウンした脂肪細胞では脂肪細胞分化マーカーの発現が抑制され、脂肪蓄積も抑制されることを見出した (*J Clin Endocrinol Metab* 100, E655-663, 2015)。今後、SLC25A24 遺伝子の発現制御機構を見出すことがメタボリック症候群の発症メカニズムを解明する上で重要となる。

さらに、骨粗鬆症治療においては性ホルモン補充療法に代わって、選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) が多く用いられる。今回 SERM 治療が体格に与える影響に関して検討した。SERM 治療群経過 5 年において腰椎骨密度の有意な上昇が認められた。骨代謝マーカーでは有意な抑制を認めた。体重に関してはコントロール群では 5 年間で 3.4% の体重減少が認められたのに対し SERM 治療群では 1.0% の減少であり、二群間の比較では SERM 治療群において統計学的に有意に体重減少を抑制した ( $P=0.03$ )。BMI

に関してはコントロール群では 5 年間で 1.7%の減少が認められたのに対し SERM 治療群では 5.7%の上昇を認め、統計学的に有意に BMI 減少を抑制した ( $P=0.048$ )。年齢や骨代謝マーカーなどで補正を行っても、SERM 治療は体重、BMI の減少を抑制する独立した因子であった。以上より骨量減少のみならず、高齢者の体重減少も抑制することを見出した(J Bone Miner Metab. In press)。高齢者の体重減少はサルコペニアにより発生することが示唆されており、SERM 治療が筋肉量にあたる影響を検証する必要がある。さらに SERM 治療は前立腺癌の再発予防効果を示すことも見出した(BMC Cancer. 15, 836. 2015)。以上より本研究において SERM のエストロゲン受容体を介した内分泌作用が高齢者関連疾患において多面的な効果を有することを示した。

#### 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 21 件)

1. Urano T, Shiraki M, Kuroda T, Tanaka S, Inoue S: Preventive effects of raloxifene treatment on age-related weight loss in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab* (in press). 査読有
2. Fujimura T, Inoue S, Urano T, Takayama K, Yamada Y, Ikeda K, Obinata D, Ashikari D, Takahashi S, Homma Y: Increased expression of Tripartite Motif (TRIM) 47 is a negative prognostic predictor in human prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* (in press) 査読有
3. Obinata D, Takayama K, Fujiwara K, Suzuki T, Tsutsumi S, Fukuda N, Nagase H, Fujimura T, Urano T, Homma Y, Aburatani H, Takahashi S, Inoue S: Targeting Oct1 genomic function inhibits androgen receptor signaling and castration-resistant prostate cancer growth. *Oncogene* (in press) 査読有
4. Obinata D, Takada S, Takayama K, Urano T, Ito A, Ashikari D, Fujiwara K, Yamada Y, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Homma Y, Takahashi S, Inoue S: ABHD2, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Eur J Cancer* 57: 39-49, 2016. 査読有
5. Iwamoto J, Okano H, Furuya T, Urano T, Hasegawa M, Hirabayashi H, Kumakubo T, Makita K. Patient preference for monthly bisphosphonate versus weekly bisphosphonate in a cluster-randomized, open-label, crossover trial: Minodroate Alendronate/Risedronate Trial in Osteoporosis (MARTO). *J Bone Miner Metab* 34: 201-8, 2016 査読有
6. Urano T, Inoue S: Recent genetic discoveries in osteoporosis, sarcopenia and obesity. *Endocr J* 62(6): 475-484, 2015. 査読有
7. Azuma K, Shiba S, Hasegawa T, Ikeda K, Urano T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Amizuka N, Inoue S: Osteoblast-specific  $\gamma$ -glutamyl carboxylase-deficient mice display enhanced bone formation with aberrant mineralization. *J Bone Miner Res* 30(7): 1245-1254, 2015. 査読有
8. Fujimura T, Takahashi S, Kume H, Urano T, Takayama K, Yamada Y, Suzuki M, Fukuhara H, Nakagawa T, Inoue S, Homma Y: Toremifene, a selective estrogen receptor modulator, significantly improved biochemical recurrence in bone metastatic prostate cancer: a randomized controlled phase II a trial. *BMC Cancer* 15: 836, 2015. 査読有
9. Saito-Kanatani M, Urano T, Hiroi H, Momoeda M, Ito M, Fujii T, Inoue S: Identification of *TRIM22* as a progesterone-responsive gene in

- Ishikawa endometrial cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 154: 217-225, 2015. 査読有
10. Takayama K, Misawa A, Suzuki T, Takagi K, Hayashizaki Y, Fujimura T, Homma Y, Takahashi S, **Urano T**, Inoue S: TET2 repression by androgen hormone regulates global hydroxymethylation status and prostate cancer progression. *Nat Commun* 6: 8219, 2015. 査読有
  11. **Urano T**, Shiraki M, Sasaki N, Ouchi Y, Inoue S: *SLC25A24* as a novel susceptibility gene for low fat mass in humans and mice. *J Clin Endocrinol Metab* 100(4): E655-E663, 2015. 査読有
  12. Azuma K, Tsukui T, Ikeda K, Shiba S, Nakagawa K, Okano T, **Urano T**, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Ikawa M, Inoue S: Liver-specific  $\gamma$ -glutamyl carboxylase-1 deficient mice display bleeding diathesis and short life span. *PLoS ONE* 9, e88643, 2014. 査読有
  13. Yamaga R, Ikeda K, Boele J, Horie-Inoue K, Takayama K, **Urano T**, Kaida K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Ouchi Y, de Hoon M, Inoue S: Systemic identification of estrogen-regulated genes in breast cancer cells through cap analysis of gene expression mapping. *Biochem Biophys Res Commun* 447, 531-536, 2014. 査読有
  14. **Urano T**, Shiraki M, Sasaki N, Ouchi Y, Inoue S: Large-scale analysis reveals a functional single-nucleotide polymorphism in the 5'-flanking region of PRDM16 gene associated with lean body mass. *Aging Cell* 13, 739-743, 2014. 査読有
  15. Fujimura T, Takahashi S, **Urano T**, Takayama K, Sugihara T, Obinata D, Yamada Y, Kumagai J, Kume H, Ouchi Y, Inoue S, Homma Y: Expression of androgen and estrogen signaling components and stem cell markers to predict cancer progression and cancer-specific survival in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 20, 4625-4635, 2014. 査読有
  16. **Urano T**, Shiraki M, Saito M, Sasaki N, Ouchi Y, Inoue S: Polymorphism of *SLC25A32*, the folate transporter gene, is associated with plasma folate levels and bone fractures in Japanese postmenopausal women. *Geriatric Gerontol Int* 14, 942-946, 2014. 査読有
  17. Obinata D, Ito A, Fujiwara K, Takayama K, Ashikari D, Murata Y, Yamaguchi K, **Urano T**, Fujimura T, Fukuda N, Soma M, Watanabe T, Nagase H, Inoue S, Takahashi S: Pyrrole-imidazole polyamide targeted to break fusion sites in *TMPRSS2* and *ERG* gene fusion represses prostate tumor growth. *Cancer Sci* 105, 1272-1278, 2014. 査読有
  18. Takayama K, Suzuki T, Tsutsumi S, Fujimura T, Takahashi S, Homma Y, **Urano T**, Aburatani H, Inoue S: Integrative analysis of *FOXP1* function reveals a tumor suppressive effect in prostate cancer. *Mol Endocrinol* 28, 2012-2024, 2014. 査読有
  19. Takayama K, Suzuki T, Fujimura T, **Urano T**, Takahashi S, Homma Y, Inoue S: CtBP2 modulates the androgen receptor to promote prostate cancer progression. *Cancer Res* 74, 6542-6553, 2014. 査読有

2014. 査読有

20. Takayama K, Horie-Inoue K, Katayama S, Suzuki T, Tsutsumi S, Ikeda K, **Urano T**, Fujimura T, Takagi K, Takahashi S, Homma Y, Ouchi Y, Aburatani H, Hayashizaki Y, Inoue S: Androgen-responsive long noncoding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer. *EMBO J* 32, 1665-1680, 2013 and highlighted in “*Have you seen?*” pp.1653-1654. 査読有
21. Yamada Y, Fujimura T, Takahashi S, Takayama K, **Urano T**, Murata T, Obinata D, Ouchi Y, Homma Y, Inoue S: Clinical significance of amyloid precursor protein in patients with testicular germ cell tumor. *Adv Urol* 2013, 348438, 2013. 査読有

[学会発表](計 15 件)

1. 浦野友彦: [シンポジウム] 老年症候群および骨粗鬆症について. 第 62 回日本栄養改善学会、2015.9.24-26、福岡国際会議場 (福岡)
2. 浦野友彦、白木正孝、田中司朗、黒田龍彦、井上聡: 5 年間の選択的エストロゲン受容体モジュレーター治療が体格に与える影響第 17 回日本骨粗鬆症学会、2015.9.17-19、広島国際会議場 (広島)
3. 井上聡: [シンポジウム] アンドロゲン受容体による転写プログラムを制御する新しいエピゲノム作用メカニズム ( Novel epigenetic regulatory mechanisms that govern androgen receptor transcriptional program ) 第 67 回日本細胞生物学会、2015.6.30-7.2、タワーホール船堀 (東京)
4. 井上聡: [シンポジウム] アンドロゲンシグナルの分子メカニズムと去勢抵

抗性前立腺癌に対する治療戦略第 74 回日本癌学会学術総会、2015.10.8-10、名古屋国際会議場 (名古屋)

5. Inoue S: [Symposium] Non-coding RNA regulation of prostate cancer growth. 2015.3.5-8 ENDO 2015, コンベンションセンター (San Deigo, CA, USA.)
6. 浦野友彦、井上聡: [シンポジウム (Basic Science 1)] ゲノムワイド解析によるアンチエイジング医学関連遺伝子の探索と同定 2014.6.6-8 第 14 回日本抗加齢医学会総会 大阪国際会議場 (大阪)
7. 浦野友彦、秋下雅弘: [シンポジウム] 東京大学医学部附属病院老年病科病棟における高齢者診療の取り組み 2014.9.20 第 60 回日本老年医学会関東甲信越地方会杏林大学医学部附属病院大学院講堂 (東京)
8. 浦野友彦、井上聡: [ワークショップ] ゲノムワイド解析から捉える老年病と運動器の老化を制御する分子機構 (Genome-wide association studies identify novel genes associated with locomotive and geriatric syndrome) 2014.11.25-27 第 37 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 (横浜)
9. 浦野友彦: [研究奨励賞受賞] 骨粗鬆症ならびに乳癌における液性因子から受容体を介した新規病態メカニズムの探索と同定 2013.4.25-27 第 86 回日本内分泌学会学術総会 仙台国際センター (仙台)
10. 浦野友彦、白木正孝、大内尉義、井上聡: ヒトならびにマウスにおいて体脂肪量の制御に関与するミトコンドリアトランスポーター遺伝子の同定 2013.4.25-27 第 86 回日本内分泌学会学術総会 仙台国際センター (仙台)
11. 浦野友彦: [研究奨励賞受賞講演] ヒト

- 遺伝子解析・マウスモデル・細胞モデルを用いた骨粗鬆症の診断ならびに治療標的の探索と同定 2013.5.28-6.1 国際骨代謝学会・日本骨代謝学会第2回合同会議 神戸国際会議場(神戸)
12. 浦野友彦、白木正孝、大内尉義、井上聡：ヒトにおいて筋肉量の制御に關与する遺伝子の探索と同定 2013.5.28-6.1 国際骨代謝学会・日本骨代謝学会第2回合同会議 神戸国際会議場(神戸)
  13. 浦野友彦、大内尉義、井上聡：前立腺癌における Estrogen-responsive finger protein の機能に關する検討 2013.6.28-30 第13回日本抗加齢医学会総会 パシフィコ横浜(横浜)
  14. 浦野友彦、白木正孝、大内尉義、井上聡：ゲノムワイド解析による骨量ならびに脂肪量規定因子の探索 2013.10.11-13 第15回日本骨粗鬆症学会 大阪国際会議場(大阪)
  15. Urano T, Shiraki M, Ouchi Y, Inoue S: Identification of a single nucleotide polymorphism in the 5'-flanking region of PRDM16 gene as a novel susceptibility marker for low lean body mass. 2013.10.11-15 American Society of Bone and Mineral Research 35th Annual Meeting, コンベンションセンター (Baltimore, Maryland, USA.)

〔図書〕(計5件)

1. 書籍名: 骨粗鬆症-研究と臨床の最新動向、出版社: 医歯薬出版株式会社、編集: 杉本利嗣 執筆部分のタイトル(井上聡との共著): 骨粗鬆症発症遺伝子、記載頁: p67-p73: 2014年発行
2. 書籍名: 大腿骨近位部骨折ゼロを目指す治療・予防戦略、出版社: 医薬ジャーナル社、編集: 遠藤直人 執筆部

分のタイトル(秋下雅弘との共著): 高齢者の包括的評価、記載頁: p237-p246: 2015年発行

3. 書籍名: ファーマナビゲーター糖尿病と骨代謝編、出版社: メディカルレビュー社、編集: 松本俊夫、杉本利嗣 執筆部分のタイトル(単著): 遺伝要因からみた糖尿病と骨粗鬆症の関連、記載頁: p208-p221: 2015年発行
4. 書籍名: かかりつけ医のための老年病100の解決法、出版社: メディカルレビュー社、編集: 秋下雅弘 執筆部分のタイトル(単著): 骨粗鬆症、記載頁: p156-p159: 2015年発行
5. 書籍名: 臨床検査ガイド 2015年改訂版、出版社: 文光堂、編集: 三橋知明、和田攻、矢崎義雄、小池和彦、小室一成 執筆部分のタイトル(単著): 骨形成マーカー(オステオカルシン、低カルボキシ化オステオカルシン、I型コラーゲンN末端ペプチド、I型コラーゲンC末端ペプチド、骨型アルカリホスファターゼ)、記載頁: p409-p414: 2015年発行

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

浦野 友彦 (URANO, Tomohiko)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20334386

### (2)研究分担者

井上 聡 (INOUE, Satoshi)

東京大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号: 40251251