

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860858

研究課題名(和文)骨基質形成と骨石灰化カップリング機構の解明 - スクレロスチンを鍵分子として -

研究課題名(英文)Elucidating mechanisms for coupling bone matrix formation with mineralization

研究代表者

窪田 拓生 (Kubota, Takuo)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40629135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨量獲得や維持に重要なWntシグナル阻害因子のスクレロスチンの発現調節機構は明らかではない。我々は、ヒト皮膚線維芽細胞においてATF3, KLF4, PAX4, SP7の4因子がSOST発現とスクレロスチン分泌を誘導することを見出した。副甲状腺ホルモン添加によって誘導SOST発現と分泌スクレロスチン濃度は減少し、低酸素培養下やプロスタグランジンE2添加によって誘導SOST発現は増加した。このシステムがSOST発現調節機構の解明や代謝性骨疾患の創薬につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Sclerostin, encoded by SOST, is a secretory protein that suppresses osteogenesis by inhibiting Wnt signaling. However, the regulatory mechanism underlying SOST expression remains unclear. We identified four transcription factors, ATF3, KLF4, PAX4, and SP7 that induced SOST expression and sclerostin secretion in human dermal fibroblasts. Parathyroid hormone suppressed the induced SOST and sclerostin, whereas hypoxia and prostaglandin E2 increased the induced SOST. This model may contribute to elucidating the regulatory mechanisms underlying SOST expression and advancing drug development for metabolic bone diseases.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：小児科学 骨代謝学 骨粗鬆症 スクレロスチン くる病 線維芽細胞 骨細胞 転写因子

1. 研究開始当初の背景

骨は骨芽細胞が分泌した I 型コラーゲンを中心とする骨基質蛋白にカルシウムやリンがハイドロキシアパタイトの形で沈着(石灰化)することで形成される。骨の石灰化には細胞外マトリックスに存在するリンやカルシウム、石灰化阻害物質であるピロリン酸が重要な役割を果たしている。さらに、骨芽細胞や骨芽細胞の最終分化形態である骨細胞は MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein) やオステオポンチン(OPN)などの石灰化阻害蛋白を分泌し石灰化を調節している (Rowe PSN. Cell Biochem Funct, 2012)。スクレロスチンは骨細胞において発現し、Wnt/ カテニンシグナルを阻害する強力な骨形成抑制因子であることが近年明らかになったが (Poole KE, et al. FASEB J, 2005)、骨の石灰化機構における役割や発現調節機構は明らかではない。Wnt/ カテニンシグナルが骨基質形成のみならず、骨石灰化過程にも関与する可能性があり、検討する必要があると考えている。なぜなら、スクレロスチンの骨形成抑制作用が、骨基質形成抑制によるのか、骨石灰化抑制によるのか、それとも、その両者によるのか、明らかではないからである。

骨・軟骨における石灰化障害を来す代表的な疾患がビタミン D 欠乏性くる病や低リン血症性くる病であり、低リン血症性くる病においては、現在、リン製剤と活性型ビタミン D による治療が行われているが、治療効果は十分ではなく、成長障害や軟骨・骨の石灰化障害が残存する。これらの疾患ではリンの不足が石灰化障害の原因であると考えられているが、X 連鎖性低リン血症性くる病(XLH)では骨細胞周囲の低石灰化が知られており (Marie PJ, Glorieux FH. Calcif Tissue Int, 1983) また、XLH のモデルマウスである Hyp マウスの骨は正常リン濃度の環境においても石灰化の異常が残存する(Liu S, et al. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007)。したがって、リン不足以外の要因、すなわち、骨基質形成と石灰化とのカップリング障害が強く示唆されるが、現在のところ、明らかではない。さらに、最近、Hyp マウスの骨における SOST (スクレロスチン遺伝子) の発現変化が報告されている (Liu S, et al. Mol Endocrinol, 2009; Atkins GJ, et al. J Bone Miner Res, 2011)。

2. 研究の目的

骨細胞が分泌するスクレロスチンを鍵分子として、骨における石灰化分子機構、さらには、スクレロスチンの発現機構、骨基質形成と骨石灰化のカップリング機構を解明し、Hyp マウス骨の石灰化障害の原因を同定することによって、低リン血症性くる病などの石灰化障害を来す疾患に対する新たな治療を開発し、獲得骨量を増加させることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) スクレロスチン発現調節機構の解明

細胞培養: SaOS-2 細胞は MEM と胎児ウシ血清 (FBS) を用いて培養した。分化培養として dexamethasone、L-ascorbic acid、-glycerophosphate を添加した。ヒト皮膚線維芽細胞は DMEM と FBS で、Plat-A packaging cells は DMEM high glucose、FBS、L-glutamine で培養した。HEK293A 細胞は DMEM、FBS、non-essential amino acids で培養した。

リアルタイム PCR 法: 抽出した全 RNA から SuperScript III を用いて cDNA を作成した。リアルタイム PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix、ABI PRISM 7900HI Sequence Detection System を用いて行った。参照遺伝子として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、Ct 法によって発現量を算出した。

候補転写因子の検索: SaOS-2 細胞を分化培養もしくは維持培養し、抽出した RNA を Array Platform SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2 にハイブリダイゼーションさせた。マイクロアレイデータを Subio Platform software を用いて解析し、分化培養で発現が 2 倍以上の遺伝子を選択した。Qiagen's Ingenuity Pathway Analysis (IPA) では、膨大な遺伝子ネットワークや分子シグナル経路を考慮に入れて、z-score が 1.5 倍以上の遺伝子を選択した。Promoter/enhancer binding expectations (TRANSFAC database) では、SOST プロモーター(-1440 ~ +30 bp) エンハンサー (ECR5, 255 bp) に結合する転写因子を選択した。

レトロウイルス導入: 各遺伝子の cDNA は pMXs レトロウイルスベクターに In-Fusion cloning technology を用いてクローニングした。pMXs レトロウイルスベクターは Plat-A packaging cells で増殖させた。ウイルスを含んだ培養上清をヒト皮膚線維芽細胞に添加した。

スクレロスチンと Dickkopf1 の測定: スクレロスチン ELISA キット (Biomedica 社)、ヒト Dkk-1 ELISA キット (RayBiotech 社) を用いた。

WNT/ β -catenin/TCF レポーターアッセイ: HEK293A 細胞に TCF/LEF 結合部位を有する Super8xTOPflash レポーターベクターを導入した。非特異的レポーター活性と導入効率の補正のため、TCF/LEF 結合部位に変異を有する Super8xFOPflash レポーターベクターと phRL-TK ベクターを使用した。

試薬: hPTH[1-34] (Sigma-Aldrich)、プロスタグランジン E2 (Wako)

免疫組織化学:

ヒト骨組織切片 (HuFPT181b; BIOMAX 社) における発現を各抗体 (ATF3, sc-188, Santa Cruz Biotechnology、KLF4, ab151733, Abcam、PAX4, ab42450, Abcam、osterix, ab22552, Abcam、コントロール, sc-2027, Santa Cruz)

を用いて検討した。

(2) XLH 患者における血清スクレロスチン濃度の有用性の検討

XLH 患者におけるスクレロスチン濃度およびカルシウム・リン関連マーカーを検討した。対象は XLH11 名で(男性 2 名、女性 9 名)、年齢は 1.1~44.5 歳(中央値 11.4 歳)で、全例、リン製剤およびビタミン D 製剤にて治療中であった。ヒトスクレロスチン ELISA キット(Biomedica 社)を用いて血清スクレロスチン濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) スクレロスチン発現調節機構の解明

骨芽細胞分化培養でスクレロスチン遺伝子をコードする SOST の発現上昇を認めるヒト骨肉腫由来細胞株 SaOS-2 において、分化培養と維持培養での遺伝子発現をマイクロアレイにより比較検討した。発現増加を示した転写因子は 70 個であった。次に、IPA 解析、SOST プロモーター/エンハンサーに結合する転写因子、骨芽細胞分化に関連する因子解析によって、SOST 発現促進の可能性のある転写因子を 20 個に絞った。選択された候補の転写因子をヒト皮膚線維芽細胞に強制発現させ、SOST 発現を評価した。7 因子の導入で線維芽細胞での SOST 発現が増加した。さらに抑制的と考えられる因子を除外した結果、ATF3, KLF4, PAX4, SP7 の 4 因子で SOST 発現の誘導を培養 1 週間、4 週間それぞれ認めた(図 1)。また、培養 4 週間後には培養液中へのスクレロスチン分泌が ELISA で確認された(図 1)。ヒト骨組織における ATF3, KLF4, PAX4, SP7 の遺伝子発現を PCR 法によって確認した。免疫組織化学染色ではヒト骨細胞における ATF3, KLF4, PAX4, SP7 の発現を認めた。

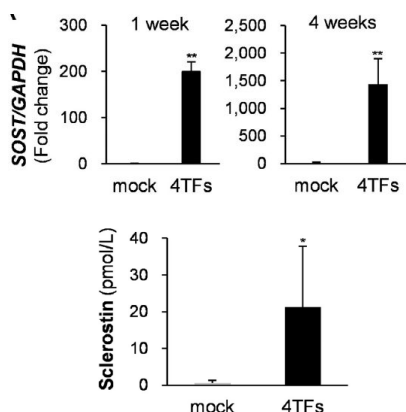


図 1 ATF3, KLF4, PAX4, SP7 導入によるヒト皮膚線維芽細胞における SOST 発現とスクレロスチン産生

次に、4 因子によって誘導されたスクレロスチンが Wnt/ β -catenin/TCF シグナルを抑制する機能を保持しているかどうかを TCF レ

ポーターアッセイによって検討した。4 因子導入のヒト線維芽細胞を 8 週間培養し、その培養上清(スクレロスチン 41.1 pmol/l)を添加すると、Wnt10b によって増加した TCF レポーター活性が抑制された。しかし、培養上清はスクレロスチンのみではなく、別の Wnt シグナル阻害因子である Dickkopf1 も検出され、4 因子導入によって Dickkopf1 も発現増加していた。

さらに、ヒト線維芽細胞に 4 因子により誘導された SOST 発現(培養 1 週間)と分泌スクレロスチン濃度(培養 4 週間)は副甲状腺ホルモン(PTH)添加によって減少した(図 2)。また、低酸素培養下(1%)での誘導 SOST 発現は、正常酸素培養下と比し増加を認めた(図 2)。

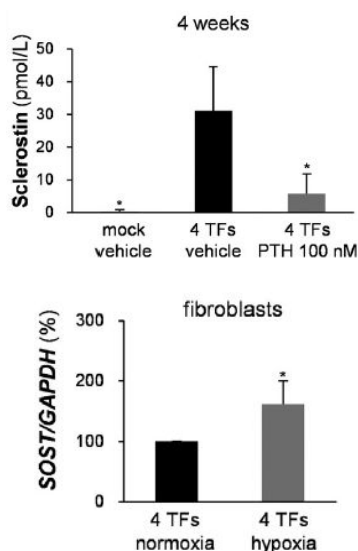


図 2 ヒト皮膚線維芽細胞における SOST 発現とスクレロスチン産生に対する PTH と低酸素の影響

最後に、4 因子導入し 4 週間培養したヒト線維芽細胞に対するプロスタグランジン E2 (PGE2) 添加の影響を検討した。PGE2 添加によって誘導 SOST 発現はさらに増加した(16 倍)。4 因子導入によって、PGE2 の受容体の一つである PTGER1 の発現増加を認めた(10 倍)。一方、PTGER2, PTGER3, PTGER4 の発現増加は認めなかった。

まとめ: 4 つの転写因子の導入により、ヒト線維芽細胞におけるスクレロスチン発現誘導システムを実現した。その発現は既知のスクレロスチン調節因子である PTH や低酸素、PGE2 により制御を受けた。この実験系が SOST 制御機構の解明や代謝性骨疾患に関連した創薬につながる事が期待できる。

(2) XLH 患者におけるスクレロスチン濃度の有用性の検討

血清スクレロスチン濃度は 45.1 ± 23.8 pmol/l であった。血清スクレロスチン濃度と

血清カルシウム値との間に相関を認めた (r =0.776、p0.005)。年齢、血清 intact FGF23、intact PTH、リン濃度、尿中カルシウム/クレアチニン比、尿細管リン再吸収率とは相関を認めなかった。XLH におけるスクレロスチン濃度測定の有用性については、経時的な推移も含め、さらに検討する必要がある。

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 4件)

Kitaoka T, Miyoshi Y, Namba N, Miura K, Kubota T, Ohata Y, Fujiwara M, Takagi M, Hasegawa T, Jüppner H, Ozono K. Two Japanese familial cases of Caffey disease with and without the common COL1A1 mutation and normal bone density, and review of the literature. *Eur J Pediatr* 173(6):799-804, 2014. DOI: 10.1007/s00431-013-2252-8.

Kubota T, Kitaoka T, Miura K, Fujiwara M, Ohata Y, Miyoshi Y, Yamamoto K, Takeyari S, Yamamoto T, Namba N, Ozono K. Serum fibroblast growth factor 23 is a useful marker to distinguish vitamin D-deficient rickets from hypophosphatemic rickets. *Horm Res Paediatr* 81(4):251-7, 2014. DOI: 10.1159/000357142.

Takeyari S, Yamamoto T, Kinoshita Y, Fukumoto S, Glorieux FH, Michigami T, Hasegawa K, Kitaoka T, Kubota T, Imanishi Y, Shimotsuji T, Ozono K. Hypophosphatemic osteomalacia and bone sclerosis caused by a novel homozygous mutation of the FAM20C gene in an elderly man with a mild variant of Raine syndrome. *Bone* 67:56-62, 2014. DOI: 10.1016/j.bone.2014.06.026

Fujiwara M, Kubota T, Wang W, Ohata Y, Miura K, Kitaoka T, Okuzaki D, Namba N, Michigami T, Kitabatake Y, Ozono K. Successful induction of sclerostin in human-derived fibroblasts by 4 transcription factors and its regulation by parathyroid hormone, hypoxia, and prostaglandin E2. *Bone* 85:91-8, 2016. doi: 10.1016/j.bone.2016.01.024.

[学会発表](計 5件)

武鍵真司, 山本威久, 木下祐加, 福本誠二, 道上敏美, 長谷川高誠, 北岡太一, 窪田拓生, 今西康雄, 下辻常介, 大藪恵一. FAM20C 遺伝子変異による低リン血症性骨軟化症の1例. 第87回日本内分泌学会学術総会. 2014.4.24-26. 福岡国際会議場・福岡サンパレス(福岡市).

藤原誠, 大幡泰久, 三浦弘司, 北岡太一, 窪田拓生, 北島康司, 難波範行, 道上敏美, 大藪恵一. ヒト線維芽細胞にスクレロスチンを発現させるために必要な転写因子の同定. 第32回日本骨代謝学会学術集会. 2014.7.24-26. 大阪国際会議場(大阪市).

Fujiwara M, Wang W, Ohata Y, Miura K, Kitaoka T, Kubota T, Kitabatake Y, Namba N, Michigami T, Ozono K. Sclerostin Expression can be Induced by Enforced Expression of Defined Transcription Factors in Human Fibroblasts. Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research 2014. 2014.9.12-15. Houston, TX, USA.

藤原 誠, 大幡 泰久, 北岡 太一, 窪田 拓生, 北島 康司, 難波 範行, 道上 敏, 大藪 恵一. スクレロスチンの発現は転写因子 ATF3, KLF4, PAX4, SP7 の導入によりヒト線維芽細胞で誘導され、PTH 及び低酸素培養による制御を受ける. 第33回日本骨代謝学会学術集会. 2015.7.23-25. 京王プラザホテル(東京都新宿区).

Makoto Fujiwara, Wei Wang, Taichi Kitaoka, Takuo Kubota, Yasuji Kitabatake, Noriyuki Namba, Toshimi Michigami, Keiichi Ozono. Defined Sets of Transcription Factors Induce the Expression of Functional Sclerostin in Human Dermal Fibroblasts and Its Expression Responds to Parathyroid Hormone, Hypoxia and Prostaglandin E2. Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research 2015. 2015.10.9-12. Seattle, WA, USA.

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 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 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

窪田 拓生 (Takuo Kubota)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：40629135

研究協力者

藤原 誠 (Makoto Fujiwara)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号：50625697

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：