

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591105

研究課題名（和文）

老年期骨粗鬆症治療戦略確立の探索的研究～骨形成促進作用を持つ新規骨粗鬆症薬～

研究課題名（英文）

Therapeutic target for aging osteoporosis～New anti-osteoporosis drug with stimulating bone formation～

研究代表者

岡田 洋右 (OKADA YOUSKE)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：80333243

研究成果の概要（和文）：ガレクチン9はヒト骨芽細胞膜上において、lipid raft の局在を変化させ、Src-family 分子のチロシンリン酸化を経て、細胞増殖のシグナルスイッチをオンにさせて骨芽細胞増殖を誘導する機序を明らかにした。今回の結果より、高齢者骨粗鬆症における病態の特徴である骨形成低下に対してガレクチン9は骨形成を促進する有力な治療薬となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Galectin-9 is a  $\beta$ -galactoside-binding lectin expressed in various tissues, including bone. The role of galectin-9 in human osteoblasts, however, remains unclear. We showed that galectin-9 interacts with lipid rafts and induces osteoblast proliferation through the c-Src/ERK signaling pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：内分泌学

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来により老年期骨粗鬆症の重要性がクローズアップされている。本邦では、骨粗鬆症の罹患者数は1000万人以上とされ、今後もさらに増加の一途を辿ることが予想されている。骨粗鬆症に起因する骨折は、高齢者の生活の質を低下させ、寝たきりの原因となり大きな社会問題ともなっている。日本の場合、世界に例をみな

い速度で高齢化が進行しており、2050年には35%を上回ると予測されている。骨の強度は加齢に伴い弱くなり、ある程度以下になると日常生活の僅かな外力でも骨折するようになる。骨量の減少は、骨折を生じる主要な危険因子であるが、骨量以外にも骨折の危険因子はあり、その最たるものは加齢である。例え骨量が同じでも年齢が高いほど骨折頻度は増加する。つまり、高齢化社

会においては、骨粗鬆症に対する積極的な介入による骨折予防が社会的急務である。骨粗鬆症治療薬としてビスホスホネート、選択的エストロゲン受容体モジュレーターが出現し、一定の効果を示すようになってきているが、これらの薬剤は主に骨吸収抑制作用を中心とした薬剤である。しかし、高齢者における骨粗鬆症病態の一番の特徴は骨形成能の低下であり、治療的観点からは骨にアナボリックに作用する薬剤が必要である。現在の骨吸収抑制薬のみでは、本当の意味での骨の健康維持・骨折防止には不十分である。申請者らは、これまで強い骨形成作用を持つFGF-2の骨代謝調節機構について報告してきた (Montero A. et al. J Clin Invest 105: 1085-1093, 2000, Okada Y. et al. J Biol Chem 278:21258-21268, 2003, Nakano K. et al. Arthritis Rheum. 50:2450-2458, 2004, Sobue T. et al. J Cell Biochem 95:83-94, 2005, Hurley MM. et al. Biochem Biophys Res Commun 341:989-994, 2006)。しかし、FGF-2は骨吸収・骨形成ともに誘導する事が明らかとなり、骨粗鬆症治療薬としては非現実的と考えられる。そこで、申請者らはC型レクチンの1つであるガレクチン9に着目した。ガレクチンは糖鎖を認識し結合するが、ガレクチン9は各種ガレクチンの中でも糖鎖結合部位を2つ有するタンデムリピート型に属する。ガレクチン9は、各組織に存在し、細胞のアポトーシス、接着、遊走、形態形成など種々の作用があるとされているがその機序は未だ十分に解明されていない。現在までのところ、ガレクチン9が骨組織に存在することは報告されていたが、その役割については全く不詳であった。

## 2. 研究の目的

レクチンファミリーであるガレクチンは、 $\beta$ -ガラクトシドに親和性を持ち、T細胞のアポトーシス作用、好中球の遊走作用などの様々な生理的活性をもった糖タンパク質である。タンデムリピート構造をもつガレクチン9はヒト骨芽細胞内に発現しているが、その骨代謝における役割は不詳である。今回、ガレクチン9のlipid raftを介するヒト骨芽細胞増殖メカニズムに及ぼす作用機序について検討した。

## 3. 研究の方法

人工股関節置換術を行う患者からインフォームドコンセントを得て摘出した大腿骨骨頭からヒト骨芽細胞を得る。このヒト骨芽細胞を用いて以下の事項を検討した。

- (1) 骨芽細胞にガレクチン9に添加し、ALP(アルカリフォスファターゼ)染色、ALP活性を行う。
- (2) ガレクチン9を添加し、ヒト骨芽細胞の増殖をtetra color one assayにて測定する。
- (3) ガレクチン9を15分刺激後に共焦点レーザー顕微鏡で、その局在変化を観察する。
- (4) ガレクチン9を添加し、オステオカルシンの分泌をELSA法で測定する。
- (5) ガレクチン9を添加し、von kossa染色を行い、石灰化能を検討する。
- (6) ガレクチン9を添加し、Smad1/5/8のリン酸化をwestern blottingで検出する。
- (7) ガレクチン9を添加し、Smad1/5/8とSmad4の結合を免疫沈降法で検出する。
- (8) ガレクチン9を添加し、Smad1/5/8とSmad4の複合体がDNAと結合するかChip assayで検出する。

## 4. 研究成果

- (1) galectin-9添加によりヒト骨芽細胞のALP活性、ALP染色が用量依存性に増加した。
- (2) galectin-9添加によりALP、osteocalcin、OsterixのmRNAが増加した。
- (3) tetra color one assayにてガレクチン9はヒト骨芽細胞の増殖を濃度依存性に誘導し、その細胞増殖はラクトースにより阻害された。
- (4) ガレクチン9を15分刺激後に共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、lipid raft中のGM1が増加し、その局在が変化していた。
- (5) lipid raftの構成成分であるコレステロール、スフィンゴミエリンを $\beta$ -シクロデキストリンで破壊させると、ガレクチン9による細胞増殖作用は濃度依存性に抑制された。
- (6) Src-family阻害剤であるPP2によってもガレクチン9による細胞増殖作用は濃度依存性に抑制された。
- (7) 骨芽細胞分化におけるTGF- $\beta$ やSmadの関与を検討したところ、galectin-9添加によりSmad1/5/8のみが経時的にリン酸化された (Smad2/3では認めず)。しかし、

galectin-1 ではどちらもリン酸化されなかった。

(8) galectin-9 が BMP receptor に関与していることが示唆されたため、BMP response element である Id-1 promoter を遺伝子導入すると galectin-9 添加により用量依存性に promoter 活性は上昇した (luciferase assay)。

(9) ChIP assay では galectin-9 添加により Smad1 が核内へ 5~180 分まで留まっていた。

(10) CD44 と Smad1 が細胞内でアンカーしている事実より、恒常的にリン酸化している BMP receptor 2 と CD44 が galectin-9 により cross-link され、CD44 直下の Smad1 をリン酸化している可能性を考え、BMP receptor2 と CD44 をラベルし、confocal microscopy で観察すると、BMP receptor 2 と CD44 の co-localize が確認された。

(11) CD44 の中和抗体を galectin-9 と同時に添加し、30分後に p-Smad1/5/8 の western blotting を行ったところ、抗体用量依存性にバンドは消失した。

ガレクチン9がヒト骨芽細胞膜上において、lipid raft の局在を変化させ、Src-family 分子のリン酸化を経て、細胞増殖のシグナルスイッチをオンにさせて骨芽細胞増殖を誘導する機序が存在することを明らかにした

さらに、ガレクチン9はヒト骨芽細胞において BMP receptor2 と CD44 をクロスリンクして CD44 直下の Smad1 を直接リン酸化し、骨芽細胞分化を誘導する事が明らかとなった。以上の結果より、ガレクチン9は、サイトカインや転写因子の直接的介在を迂回し、糖・脂質を人為的に制御することによる骨疾患制御を齎すものと期待される。

骨代謝に対するガレクチン9の報告は、今回の申請者らの報告が初めてである。更にガレクチン9は骨形成を促進するとともに、骨吸収を抑制する両面の作用を有する可能性を示す予備成績も得ており、さらに本来生体内に存在している物質であることを考慮すると、全く新しい骨粗鬆症治療薬としての可能性を秘めていると考える。現在の臨床現場において、骨形成を促進する薬剤として確立されたものは無く(本年から本邦でも骨形成作用を持つPTH製剤が使用可能となったが)、ガレクチン9は骨粗鬆

症治療薬として画期的な物質となりえる可能性があると考えられる。

骨粗鬆症ならびにそれに起因する骨折を予防することは社会的な急務であるが、ガレクチン9は現在の骨粗鬆症治療薬には無い、骨形成促進作用を持つばかりでなく、骨吸収にも作用するという点で非常にユニークな物質である。現地点で存在している骨粗鬆症治療薬にはこのような2面性をもつものは存在せず、画期的な治療薬になりうる可能性がある。また、本来、体内に存在している物質であるため、安全性の面でも期待できうるのではないかと考える。また、糖鎖を認識する物質であるため、サイトカインやホルモンのように特異的な受容体に結合するとは考えにくい。申請者らが骨芽細胞の増殖機構の解明において証明してきたように細胞膜上の構成物質を変化させ、つまり、lipid raft のようなシグナル伝達分子の会合する脂質を集合、離散させることによってシグナル伝達を効率的に行っている可能性がある。さらに、細胞の種類やコンディションによって会合するシグナル伝達分子も異なっている可能性もある。骨粗鬆症治療薬の中でこのように細胞膜を変化させることによって作用していくものはなく、この点では学術的にも画期的なものと考えられる。

## 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 18 件)

① Oshita K, Yamaoka K, Udagawa N, Fukuyo S, Sonomoto K, Maeshima K, Kurihara R, Nakano K, Saito K, Okada Y, Chiba K, Tanaka Y: Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. Arthritis Rheum 査読有、(in press)

② Mori H, Okada Y, Yamaoka K, Saito K, Tanaka Y: Marked improvement of calcinosis in adult dermatomyositis with etidronate therapy. J Bone Miner Metab 査読有、(in press)

③ Tanikawa R, Tanikawa T, Hirashima M, Yamauchi A, Tanaka Y: Galectin-9 induces

osteoblast differentiation through the CD44/Smad signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun 査読有、394: 317-322, 2010

④ Hirose A, Tanikawa T, Mori H, Okada Y, Tanaka Y: Advanced glycation end products increase endothelial permeability through RAGE/Rho signaling pathway. FEBS Letters 査読有、584: 61-66, 2010

⑤ Tanikawa T, Okada Y, Tanikawa R, Tanaka Y: Advanced glycation end products induce calcification of vascular smooth muscle cells through RAGE / p38 MAPK. J Vascular Res 査読有、46: 572-580, 2009

⑥ Okada Y, Nawata M, Nakayamada S, Saito K, Tanaka Y : Alendronate protects premenopausal women from bone loss and fracture associated with high-dose glucocorticoid therapy. J Rheumatol 査読有、35: 2249-2254, 2008

⑦ Kawahara T, Takahashi K, Inazu T, Arai T, Kawahara C, Tabata T, Moriyama H, Okada Y, Morita E, Tanaka Y : Reduced progression to type 2 diabetes from impaired glucose tolerance after a 2-day in-hospital diabetes educational program: the Joetsu Diabetes Prevention Trial. Diabetes Care 査読有、31: 1949-1954, 2008

⑧ Nishida K, Okada Y, Nawata M, Saito K, Tanaka Y : Induction of hyperadiponectinemia following long-term treatment of patients with rheumatoid arthritis with infliximab (IFX), an anti-TNF-alpha antibody. Endocrine J 査読有、20: 213-216, 2008

⑨ Mine S, Iida T, Tabata T, Okada Y, Tanaka Y : Increased esophageal mucosal/submucosal blood flow in patients with gastroesophageal reflux disease: Normalization by treatment with a proton pump inhibitor. J Gastroenterol Hepatol 査読有、23: 303-309, 2008

⑩ Tanikawa R, Tanikawa T, Okada Y, Nakano K, Hirashima M, Yamauchi A, Hosokawa R, Tanaka Y : Interaction of galectin-9 with lipid rafts induces osteoblast proliferation through the

c-Src/ERK signaling pathway. J Bone Miner Res 査読有、23: 278-286, 2008

[学会発表] (計 17 件)

① 岡田洋右、他、ステロイド骨粗鬆症の早期診断の確立と早期薬剤介入による治療意義 日本骨代謝学会 2010 年 7 月 21 日大阪

② Okada Y, et al. Etidronate Prevents Vascular Calcification and Improves Bone Mineral Density in Patients with Chronic Dialysis. 国際内分学会 2010 年 3 月 29 日 京都

③ Mori H, Okada Y, et al. Effects of raloxifene on bone metabolism and lipid profile in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. 国際内分学会 2010 年 3 月 29 日 京都

④ 岡田洋右、田中良哉、ステロイド骨粗鬆症の病態と治療戦略ー骨折予防を目指してー 日本骨代謝学会 2010 年 7 月 21 日大阪

⑤ 尾下浩一、岡田洋右、他、Osteoprotegerin 産生を介したヒト間葉系細胞の破骨細胞分化抑制作用 日本骨代謝学会 2010 年 7 月 21 日大阪

⑥ 谷川隆久、岡田洋右、他、Galectin-9 は mesenchymal cell の脂肪分化を抑制し骨分化を促進する 日本内分泌学会 2009 年 5 月 26 日 東京

⑦ 岡田洋右、他、アレンドロネートは大量ステロイド療法による骨量減少・骨折を抑制できる 日本骨代謝学会 2009 年 7 月 23 日 大阪

⑧ 森 博子、岡田洋右、他、選択的エストロゲン受容体モジュレーターは閉経後 2 型糖尿病患者における脂質・骨質改善作用を有する 日本骨粗鬆症学会 2009 年 10 月 21 日 東京

⑨ 谷川隆久、岡田洋右、他、Advanced glycation endproducts (AGE) による血管平滑筋細胞石灰化促進機構の解明 日本骨代謝学会 2008 年 10 月 29 日 大阪

⑩ 岡田洋右、他、ステロイド骨粗鬆症の病態と治療戦略 日本骨代謝学会 2008 年 10 月 29 日 大阪

〔図書〕（計 1 件）

① 岡田洋右、他、医薬ジャーナル社、ステロイド性骨粗鬆症と関節リウマチに伴う骨粗鬆症 2008、pp87-95

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田 洋右 (OKADA YOUSKE)  
産業医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80333243

### (2) 研究分担者

田中 良哉 (TANAKA YOSHIYA)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30248562