

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04963

研究課題名(和文)性ホルモンと低酸素応答性分子による骨恒常性制御

研究課題名(英文)Regulation of bone homeostasis by sex hormones and hypoxia responsive molecules

研究代表者

宮本 健史 (Miyamoto, Takeshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授

研究者番号：70383768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：閉経によるエストロゲン欠乏は、骨を吸収する破骨細胞の活性化から骨量減少をきたし、骨粗鬆症を発症する。申請者は、低酸素応答性の代表的な転写因子であるHIF1 α が、エストロゲン欠乏により破骨細胞に発現することを見出した。そこで、閉経後骨粗鬆症治療薬の候補として、破骨細胞のHIF1 α を抑制する活性がある薬剤を同定した(2016年論文報告)。また、男性骨粗鬆症モデルにおいても、破骨細胞にHIF1 α が蓄積することを見出し(2016年論文報告)、同定した破骨細胞のHIF1 α の阻害剤のいずれもが、男性骨粗鬆症モデルによる骨量減少を完全に抑制できることを明らかにした(2017年論文報告)。

研究成果の概要(英文)：Estrogen deficiency due to menopause causes activation of osteoclastic bone-resorption leading to osteoporosis development. We found that HIF1 α , a hypoxia responsive transcription factor, was expressed in osteoclasts under an estrogen deficient condition. Then, we screened and identified several HIF1 α inhibitors as candidate therapeutic agents for postmenopausal osteoporosis treatment (published in 2016). We also found that HIF1 α was expressed in osteoclasts in male osteoporosis model mice (published in 2016). We demonstrated that reduction of bone mass in male osteoporosis model mice could be completely abrogated by administration of the HIF1 α inhibiting agents, all of which were identified by us (published in 2017).

研究分野：整形外科学

キーワード：骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

閉経によるエストロゲン欠乏は、原発性骨粗鬆症発症の最も大きなリスクの1つであり、エストロゲン欠乏により破骨細胞の活性化から骨量減少をきたし、骨粗鬆症を発症する。しかし、その詳細なメカニズムについては明らかにされていなかった。申請者は、破骨細胞に発現する低酸素応答性の代表的な転写因子である hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1 α)が、エストロゲンにより抑制されることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では性ホルモンと低酸素応答性分子、特に HIF1 α による、破骨細胞制御を介した骨恒常性制御機構を解明することを目的とした。HIF1 α は通常、酸素濃度に依存したタンパク質分解系により制御されていることが知られているが、性ホルモンにより制御されていることは知られていなかった。本研究の発展により、新たな HIF1 α の制御機構の解明と、そのことによる骨代謝の新たな制御機構を解明できると考えられた。

3. 研究の方法

性ホルモン欠乏性骨粗鬆症モデルとして、両側卵巣切除によるエストロゲン欠乏性骨粗鬆症モデルである ovariectomy (OVX) マウスを用いた。また、同様に男性の性ホルモン欠乏性骨粗鬆症モデルとして両側精巣切除による男性性ホルモン欠乏性骨粗鬆症モデルである Orchidectomy (ORX) を用いた。これらのモデルを用いて、破骨細胞の HIF1 α を阻害する活性がある可能性のある化合物を用いて、それらの効能評価は DEXA 法による骨密度解析などで行った。In vitro では、低酸素培養チャンバーを用いて破骨細胞を行い、破骨細胞に発現する HIF1 α は、western blot にて評価を行った。

4. 研究成果

破骨細胞の HIF1 α を制御することで、性ホルモン欠乏による破骨細胞活性化からの骨量減少を抑制できるかを検証することとした。破骨細胞の HIF1 α を阻害する活性を有する阻害薬のスクリーニングの過程で、すでに臨床的に用いられている破骨細胞の骨吸収抑制薬の中で、その薬理機序が明らかではない薬剤の中に、破骨細胞の HIF1 α を抑制する活性があるものがあることを見出した (PLOS One 2016)。selective estrogen receptor modulator である raloxifene と bazedoxifene、tamoxifen が低酸素培養で破骨細胞に蓄積する HIF1 α タンパク質を抑制する活性があることを見出した。ビタミン D 受容体アゴニストである eldcalcitol に破骨細胞の HIF1 α を抑制する活性があることはすでに見出しており (PLOS One 2014)、臨床的に使用可能な破骨細胞の HIF1 α の阻害剤を複数確認することができた。また、性ホルモン欠乏性の

骨粗鬆症は、女性の閉経後骨粗鬆症に限ったものではなく、男性骨粗鬆症モデルである ORX でも、精巣摘出後に破骨細胞に蓄積することを見出し (Biochem Biophys Res Commun. 2016)、同定した破骨細胞の HIF1 α の阻害剤のいずれもが、ORX による骨量減少を完全に抑制できることを明らかにした (Biochem Biophys Res Commun. 2017)。以上のように、破骨細胞の HIF1 α は、男女共通の性ホルモン欠乏性の骨粗鬆症の治療標的であり、その阻害薬は性ホルモン欠乏性の骨粗鬆症の発症を完全にブロックできることを明らかにした。HIF1 α は低酸素応答性の転写因子であり、研究課題である「性ホルモンと低酸素応答性分子による骨恒常性制御」の少なくとも一旦を解明し、さらにその制御法も提案できたと考えている。今回 HIF1 α は破骨細胞の活性を上昇させる転写因子であることを明らかにしたが、一方で破骨細胞を抑制する転写因子として Smad4 を同定することにも成功している (Sci Rep. 2016)。HIF1 α は破骨細胞に限らず、腫瘍細胞の増殖等にも重要な役割を担うことが報告されており、今回の成果は、腫瘍制御にも展開できる可能性があると考えている。

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 22 件)

1, Oya A 他 (14人中ラスト). J Bone Miner Metab. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 is required to inhibit foreign body giant cell formation and activate osteoclasts under inflammatory and infectious conditions. J Bone Miner Metab. 2018 in press; doi: 10.1007/s00774-017-0890-z. 査読あり

2, Ishii T, 他 (18人中17番目). OC-STAMP promotes osteoclast fusion for pathogenic bone resorption in periodontitis via up-regulation of permissive fusogen CD9. FASEB J. 2018 in press; :fj201701424R. doi: 10.1096/fj.201701424R. 査読あり

3, Itoh H, 他 (13人中9番目). TET2-dependent IL-6 induction mediated by the tumor microenvironment promotes tumor metastasis in osteosarcoma. Oncogene. 2018 in press; doi: 10.1038/s41388-018-0160-0. 査読あり

4, Abe K, 他 (8人中5番目). Quantification of edematous changes by diffusion magnetic resonance imaging in gastrocnemius muscles after spinal nerve ligation. PLoS One. 2018;13(2):e0193306. doi: 10.1371/journal.pone.0193306. eCollection 2018. 査読あり

5, Sakamoto Y, 他 (35人中11番目). Genome-wide Association Study of Idiopathic

Osteonecrosis of the Femoral Head. *Sci Rep.* 2017;7(1):15035. doi: 10.1038/s41598-017-14778-y. 査読あり
6, Omiya T, 他 (1 2 人中 1 1 番目). The effect of switching from teriparatide to anti-RANKL antibody on cancellous and cortical bone in ovariectomized mice. *Bone.* 2017;107:18-26. doi: 10.1016/j.bone.2017.10.021. 査読あり
7, Oike T, 他 (1 3 人中ラスト). Stat3 as a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Sci Rep.* 2017;7(1):10965. doi: 10.1038/s41598-017-11233-w. 査読あり
8, Watanabe R, 他 (1 5 人中ラスト). Enpp1 is an anti-aging factor that regulates Klotho under phosphate overload conditions. *Sci Rep.* 2017;7(1):7786. doi: 10.1038/s41598-017-07341-2. 査読あり
9, Nakamura S, 他 (1 4 人中 1 2 番目). Negative feedback loop of bone resorption by NFATc1-dependent induction of Cadm1. *PLoS One.* 2017;12(4):e0175632. doi: 10.1371/journal.pone.0175632. eCollection 2017. 査読あり
10, Morita M, 他 (1 7 人中ラスト). Elevation of pro-inflammatory cytokine levels following anti-resorptive drug treatment is required for osteonecrosis development in infectious osteomyelitis. *Sci Rep.* 2017;7:46322. doi: 10.1038/srep46322. 査読あり
11, Mito K, 他 (1 0 人中ラスト). The nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential negative regulator of bone mass. *Sci Rep.* 2017;7:45597. doi: 10.1038/srep45597. 査読あり
12, Takeshima K, 他 (1 5 人中ラスト). A missense single nucleotide polymorphism in the ALDH2 gene, rs671, is associated with hip fracture. *Sci Rep.* 2017;7(1):428. doi: 10.1038/s41598-017-00503-2. 査読あり
13, Miyamoto T, 他 (2 1 人中ファースト). A serum metabolomics-based profile in low bone mineral density postmenopausal women. *Bone.* 2017;95:1-4. doi: 10.1016/j.bone.2016.10.027. 査読あり
14, Sato Y, 他 (1 0 人中ラスト). Selective estrogen receptor modulators and the vitamin D analogue eldecalcitol block bone loss in male osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482(4):1430-1436. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.053. 査読あり
15, Suzuki S, 他 (1 1 人中 8 番目). Potential Involvement of the IL-6/JAK/STAT3 Pathway in the Pathogenesis of Intervertebral Disc Degeneration. *Spine (Phila Pa 1976).* 2017;42(14):E817-E824. doi: 10.1097/BRS.0000000000001982. 査読あり
16, Luo J, 他 (1 7 人中 5 番目). Increased sorbitol levels in the hypertrophic ligamentum flavum of diabetic patients with

lumbar spinal canal stenosis. *J Orthop Res.* 2017;35(5):1058-1066. doi: 10.1002/jor.23302. 査読あり

17, Watanabe R, 他 (1 2 人中ラスト). Ibandronate concomitantly blocks immobilization-induced bone and muscle atrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;480(4):662-668. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.112. 査読あり

18, Morita M, 他 (1 3 人中ラスト). Selective Estrogen Receptor Modulators Suppress Hif1 α Protein Accumulation in Mouse Osteoclasts. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165922. doi: 10.1371/journal.pone.0165922. eCollection 2016. 査読あり

19, Morita M, 他 (2 1 人中ラスト). Smad4 is required to inhibit osteoclastogenesis and maintain bone mass. *Sci Rep.* 2016;6:35221. doi: 10.1038/srep35221. 査読あり

20, Kanagawa H, 他 (1 7 人中ラスト). Methotrexate inhibits osteoclastogenesis by decreasing RANKL-induced calcium influx into osteoclast progenitors. *J Bone Miner Metab.* 2016;34(5):526-31. doi: 10.1007/s00774-015-0702-2. 査読あり

21, Omata Y, 他 (1 6 人中 1 5 番目). Identification of Nedd9 as a TGF- β -Smad2/3 Target Gene Involved in RANKL-Induced Osteoclastogenesis by Comprehensive Analysis. *PLoS One.* 2016;11(6):e0157992. doi: 10.1371/journal.pone.0157992. eCollection 2016. 査読あり

22, Fujita N, 他 (1 3 人中 1 0 番目). A chordoma-derived cell line U-CH1-N recapitulates the biological properties of notochordal nucleus pulposus cells. *J Orthop Res.* 2016;34(8):1341-50. doi: 10.1002/jor.23320. 査読あり

〔学会発表〕(計 32 件)

1, 宮本健史、ビタミン D の新たな制御機構、第 3 回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会、平成 2 9 年

2, 宮本健史、破骨細胞の分化と免疫機能、第 3 5 回日本骨代謝学会学術集会、平成 2 9 年

3, 宮本健史、骨粗鬆症の基礎と臨床、第 4 8 回日本口腔外科学会教育研修会・口腔四学会合同研修会、平成 2 9 年

4, 宮本健史、中村雅也、松本守雄、出産による骨代謝状態の変化、第 9 0 回日本整形外科学会学術総会、平成 2 9 年

5, Takeshi Miyamoto、What is next in Musculoskeletal Research –the Japanese perspective、44th European Calcified Tissue Society Congress, 2017

6, 宮本健史、骨粗鬆症の基礎と臨床、第 4 7 回日本口腔外科学会教育研修会・口腔四学会合同研修会、平成 2 9 年

7, 宮本健史、破骨細胞と免疫：最新の知見、

第2回骨免疫ウインターセミナー、平成29年
8, 宮本健史、骨代謝研究と骨粗鬆症研究の展開、第31回日本整形外科学会基礎学術総会、平成28年
9, 宮本健史、松本守雄、中村雅也、不動性筋萎縮の発症機構、第31回日本整形外科学会基礎学術総会、平成28年
10, 宮本健史、松本守雄、中村雅也、骨粗鬆症と骨代謝研究の接点、第31回日本整形外科学会基礎学術総会、平成28年
11, Ryuichi Watanabe, Takeshi Miyamoto, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura, The roles of ENPP1 in osteocytes under phosphate overload condition、Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research 2016、2016
12, Mayu Morita, Ryotaro Iwasaki, Hiromasa Kawana, Shigeyuki Yoshida, Taneaki Nakagawa, Takeshi Miyamoto、Smad4 In Osteoclasts Reduce Bone Mass by Inhibiting Osteoclast Differentiation、Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research 2016、2016
13, Toshinobu Omiya, Jun Hirose, Yuhu Kadono, Yasunori Omata, Naohiro Izawa, Takeshi Miyamoto, Sakae Tanaka, The Effects of Switching From Teriparatide to Anti-Rankl Antibody on Bone Metabolism、Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research 2016、2016
14, Shinya Nakamura, Naohiro Izawa, Hiroyuki Aburatani, Takeshi Miyamoto, Sakae Tanaka, Functional analysis of Cadml gene, involved in epigenetic regulation during osteoclastogenesis、Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research 2016、2016
15, Takatsugu Oike, Takeshi Miyamoto, Hiroya Kanagawa, Yasuo Niki, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura, Establishment of autoinflammatory disease model in mice、Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research 2016、2016
16, 宮本健史、関節炎疾患における単球系細胞の役割、第44回日本臨床免疫学会総会、平成28年
17, 宮本健史、ビタミンDと骨・筋、第2回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会、平成28年
18, 宮本健史、ビタミンDと骨粗鬆症、第34回日本骨代謝学会学術集会・第3回アジア太平洋骨代謝学会議、平成28年
19, 大宮俊宣、廣瀬旬、門野夕峰、小俣康徳、大野久美子、伊沢直広、宮本健史、田中栄、テリパラチドから抗RANKL抗体への切替投与の効果、第34回日本骨代謝学会学術集会・第3回アジア太平洋骨代謝学会議、平成28年
20, 中村伸哉、田中栄、宮本健史、油谷浩

幸、伊沢直広、破骨細胞分化におけるエピジェネティクス制御遺伝子の機能解析、第34回日本骨代謝学会学術集会・第3回アジア太平洋骨代謝学会議、平成28年
21, 渡邊隆一、宮本健史、松本守雄、中村雅也、石灰化抑制遺伝子 ENPP1 のリン負荷応答における役割、第34回日本骨代謝学会学術集会・第3回アジア太平洋骨代謝学会議、平成28年
22, 森田麻友、岩崎良太郎、河奈裕正、吉田重之、中川種昭、宮本健史、破骨細胞に発現する Smad4 は破骨細胞の分化抑制および骨量維持に必須である、第34回日本骨代謝学会学術集会・第3回アジア太平洋骨代謝学会議、平成28年
23, 尾池崇嗣、宮本健史、二木康夫、松本守雄、中村雅也、自己炎症症候群関節炎モデルマウスの樹立とその治療標的の樹立、第34回日本骨代謝学会学術集会・第3回アジア太平洋骨代謝学会議、平成28年
24, 宮本健史、骨代謝と骨粗鬆症、第2回日本骨免疫学会、平成28年
25, 宮本健史、佐藤結子、中村雅也、松本守雄、出産後授乳期における若年性骨粗鬆症と椎体骨折、第89回日本整形外科学会学術集会、平成28年
26, 宮本健史、松本守雄、中村雅也、免疫炎症と破骨細胞分化、第60回日本リウマチ学会総会・学術集会、平成28年
27, Takeshi Miyamoto, Pathogenesis and therapeutic strategy for osteoporosis、Moscow International Forum of Bones and Joints Disorders、2016
28, 宮本健史、松本守雄、中村雅也、病態形成における破骨細胞の役割、第30回日本整形外科学会基礎学術総会、平成27年
29, 宮本健史、炎症に伴う骨脆弱性・骨破壊機序、第33回日本骨代謝学会、平成27年
30, 宮本健史、骨粗鬆症治療の新展開 ~ 抗 RANKL 抗体の位置付け ~、第1回日本骨免疫学会、平成27年
31, 宮本健史、骨代謝-骨はどのように調節されているか-、第88回日本整形外科学会学術集会、平成27年
32, 宮本健史、勝山詠理、藤江厚廣、丹藤世身、渡辺隆一、戸山芳昭、25(OH)D 低値は39~65歳において若年齢層により顕著に認められる、第88回日本整形外科学会学術集会、平成27年

〔図書〕(計0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

宮本 健史 (MIYAMOTO, Takeshi)
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任准
教授

研究者番号：70383768

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者