

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10490

研究課題名(和文)破骨細胞のHIF1 を標的とした閉経後骨粗鬆症制御に関する実験的研究

研究課題名(英文)A basic study for controlling postmenopausal osteoporosis by targeting HIF1 alpha in osteoclasts

研究代表者

佐藤 結子 (Sato, Yuiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員

研究者番号：70445443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000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粗鬆症発症の最も大きなリスクの1つであることはよく知られている。我々は、破骨細胞のHIF1 が閉経後骨粗鬆症の治療標的であることを明らかにしていた。今回我々は、閉経後骨粗鬆症治療薬として使用されるRaloxifene、Bazedoxifene、Tamoxifen、ED71のいずれもが、破骨細胞のHIF1 の抑制活性を有することを明らかにした。さらに、男性の性ホルモン欠乏性骨粗鬆症モデルにおいても、破骨細胞にHIF1 が発現すること、これらの薬剤のいずれもが男性の性ホルモン欠乏性骨粗鬆症モデルにおいても骨密度低下を抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Estrogen deficiency due to menopause is one of the most serious risks for osteoporosis development. We previously identified that HIF1 expressed in osteoclasts was a target for postmenopausal osteoporosis therapy. In the current study, we clarified that Raloxifene, Bazedoxifene, Tamoxifen and ED71, all of which are currently used for postmenopausal osteoporosis therapy, had HIF1 inhibiting activity in osteoclasts. We also demonstrated that HIF1 was expressed in osteoclasts under an androgen deficient condition in male osteoporosis model mice. We showed that decreased bone mineral density in androgen deficient male osteoporosis model mice was clearly blocked by administrating either Raloxifene, Bazedoxifene, Tamoxifen or ED71.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は加齢や閉経をリスク因子として発症する疾患であり、近年の超高齢社会の到来をうけて、その罹患患者数は増加の一途を辿り、骨粗鬆症を背景とした脆弱性骨折の発生数も増加し続けている状況であった。脆弱性骨折を防止するためには、骨粗鬆症に介入することが最もエビデンスレベルが高い方法として知られていた。閉経によるエストロゲン欠乏は、骨粗鬆症発症の最も大きな要因の1つであることは広く知られていたが、なぜエストロゲン欠乏により骨粗鬆症を発症するようになるのか、その分子メカニズムは不明であり、したがって、臨床で使用されている骨粗鬆症治療剤の中にも、その薬理作用が十分には解明出来ていないものがあるのが現状であった。

2. 研究の目的

閉経後のエストロゲン欠乏が、破骨細胞の活性化から骨粗鬆症発症の最も大きな要因の1つであることは知られていたが、意外にもその分子メカニズムは明らかにされていなかった。申請者らは、閉経によるエストロゲン欠乏により、低酸素応答性分子である hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1) が破骨細胞に蓄積し、骨吸収の活性化から骨量減少に寄与する現象を世界で初めて明らかにした (PNS 2013)。そこで、本研究では臨床で使用されている骨粗鬆症治療剤における HIF1 の阻害活性の有無をみることで、また HIF1 が骨粗鬆症の治療標的として適切であるかを検証することを目的として研究を実施することとした。

3. 研究の方法

破骨細胞の培養は、room air による正常酸素分圧と、低酸素培養チャンバーを用いた 5%酸素濃度分圧の2通りで培養した。エストロゲンあるいはエストロゲン受容体作動薬等を用いた培養実験では、エストロゲンを charcoal strip して除去した胎児牛血清を用い、エストロゲン類似作用があるフェノールレッドが無添加の培地で培養した。HIF1 の阻害活性が期待される薬剤としては、selective estrogen receptor modulator (SERM) である Raloxifene, Bazedoxifene, Tamoxifen と、ビタミンD作動薬である ED71 と活性型ビタミンDである 1,25(OH)₂D₃ を用いて、それぞれ vehicle と効果の比較を行った。これらの薬剤の HIF1 の阻害効果は HIF1 の western blot で検証した。

性ホルモン欠乏性の骨粗鬆症では、メスのみならず、オスでも HIF1 が治療標的となり得る可能性がある。上述の薬剤はいずれも女性の閉経後骨粗鬆症の治療薬として用いられているが、SERMs に関しては男性骨粗鬆症の治療薬としての承認が得られていない。そこで、*in vivo* での検証としては、オスの性ホルモン欠乏性骨粗鬆症モデル

である Orchiectomy (ORX) モデルを用いた解析を行い、骨組織における破骨細胞における HIF1 の発現は免疫染色で解析した。ORX モデルに対しては SERMs および ED71 を経口投与し、ORX による骨密度低下に対する薬剤の効果は dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) にて評価した。

4. 研究成果

まず、破骨細胞における HIF1 の発現は、正常酸素分圧に比べて低酸素分圧においてタンパク質レベルで著しく蓄積すること、エストロゲン存在下にそれが抑制されることをポジティブコントロールとして確認した。培養系が機能していることを確認したところで、この培養系に Raloxifene, Bazedoxifene, Tamoxifen, ED71 あるいは 1,25(OH)₂D₃ を添加し、HIF1 のタンパク質レベルでの抑制の有無を western blot で検証したところ、1,25(OH)₂D₃ を除くいずれの薬剤にも破骨細胞の HIF1 の抑制効果があることが明らかとなった。このことは、これまで明らかではなかった Raloxifene, Bazedoxifene, Tamoxifen, ED71 の破骨細胞の活性抑制効果の、少なくとも一部を説明する。また、興味深いことに男性ホルモンであるテストステロンにもエストロゲン同様、低酸素環境下における破骨細胞の HIF1 を抑制することが明らかとなった。このことは、男性骨粗鬆症においても破骨細胞の HIF1 が治療標的となり得ることを示唆している。そこで、ORX モデルを用いて Raloxifene, Bazedoxifene, Tamoxifen, ED71 あるいは vehicle の投与を行い、骨密度の変化を DEXA で検証した。この結果、ORX により Sham に比べて有意に低下した骨密度は、Raloxifene, Bazedoxifene, Tamoxifen, ED71 のいずれの薬剤の投与によってもブロックできることが明らかになった。これらの成果は、女性に比べて使える薬剤の選択肢が限られている男性骨粗鬆症患者にとって、新たな選択肢を提案するものとして期待される結果と考えられ、すでに臨床で用いられている薬剤であることから、今後の臨床試験においても安全性などの観点が一層クリアしやすく、臨床応用の可能性が現実的であると考えられた。また、これまでは ovariectomy (OVX) などの *in vivo* の動物モデルに対し薬剤を投与し、骨密度低下を防止する効果で薬剤をスクリーニングしていたところを、*in vitro* の破骨細胞の低酸素培養系における HIF1 の抑制能を検証することで薬剤をスクリーニングできることが考えられることから、より安価により大量に、よりスピーディに薬剤をスクリーニングし、より強力な骨粗鬆症治療薬の同定・開発が可能になると考えられた。

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 16 件)

1, Oya A, Katsuyama E, Morita M, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Nishiwaki T, Funayama A, Fujita Y, Kobayashi T, Matsumoto M, Nakamura M, Kanaji A, Miyamoto T. 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. 査読有り

2, Oike T, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Nakamura S, Kaneko Y, Kobayashi S, Harato K, Saya H, Matsumoto M, Nakamura M, Niki Y, Miyamoto T. Stat3 as a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. Sci Rep. 2017;7(1):10965. doi: 10.1038/s41598-017-11233-w. 査読有り

3, Watanabe R, Fujita N, Sato Y, Kobayashi T, Morita M, Oike T, Miyamoto K, Kuro-O M, Michigami T, Fukumoto S, Tsuji T, Toyama Y, Nakamura M, Matsumoto M, Miyamoto T. 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. 査読有り

4, Morita M, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Watanabe R, Oike T, Nakamura S, Keneko Y, Miyamoto K, Ishihara K, Iwakura Y, Ishii K, Matsumoto M, Nakamura M, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T. 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. 査読有り

5, Mito K, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Nitta E, Iwama A, Matsumoto M, Nakamura M, Sato K, Miyamoto T. The nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential negative regulator of bone mass. Sci Rep. 2017;7:45597. doi: 10.1038/srep45597. 査読有り

6, Takeshima K, Nishiwaki Y, Suda Y, Niki Y, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Uchida H, Inokuchi W, Tsuji T, Funayama A, Nakamura M, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T. 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. 査読有り

7, Sato Y, Tando T, Morita M, Miyamoto K, Kobayashi T, Watanabe R, Oike T, Matsumoto M, Nakamura M, Miyamoto T. 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. 査読有り

8, Miyamoto T, Hirayama A, Sato Y, Kobayashi T, Katsuyama E, Kanagawa H, Miyamoto H, Mori T, Yoshida S, Fujie A, Morita M, Watanabe R, Tando T, Miyamoto K, Tsuji T, Funayama A, Nakamura M, Matsumoto M, Soga T, Tomita M, Toyama Y. A serum metabolomics-based profile in low bone mineral density postmenopausal women. Bone. 2016;95:1-4. doi: 10.1016/j.bone.2016.10.027. 査読有り

9, Watanabe R, Fujita N, Takeda S, Sato Y, Kobayashi T, Morita M, Oike T, Miyamoto K, Matsumoto Y, Matsumoto M, Nakamura M, Miyamoto T. 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. 査読有り

10, Morita M, Sato Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Watanabe R, Oike T, Miyamoto K, Toyama Y, Matsumoto M, Nakamura M, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T. 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. 査読有り

11, Morita M, Yoshida S, Iwasaki R, Yasui T, Sato Y, Kobayashi T, Watanabe R, Oike T, Miyamoto K, Takami M, Ozato K, Deng CX, Aburatani H, Tanaka S, Yoshimura A, Toyama Y, Matsumoto M, Nakamura M, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T. Smad4 is required to inhibit osteoclastogenesis and maintain bone mass. Sci Rep. 2016;6:35221. doi: 10.1038/srep35221. 査読有り

12, Kanagawa H, Masuyama R, Morita M, Sato Y, Niki Y, Kobayashi T, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Tando T, Watanabe R, Miyamoto K, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Saya H, Miyamoto T. Methotrexate inhibits osteoclastogenesis by decreasing RANKL-induced calcium influx into osteoclast progenitors. J Bone Miner Metab. 2016 Sep;34(5):526-31. doi: 10.1007/s00774-015-0702-2. 査読有り

13, Tando T, Hirayama A, Furukawa M, Sato Y, Kobayashi T, Funayama A, Kanaji A, Hao W, Watanabe R, Morita M, Oike T, Miyamoto K, Soga T, Nomura M, Yoshimura A, Tomita M, Matsumoto M, Nakamura M, Toyama Y, Miyamoto T. Smad2/3 Proteins Are Required for Immobilization-induced Skeletal Muscle Atrophy. J Biol Chem. 2016;291(23):12184-94. 査読有り

14, Miyamoto T, Katsuyama E, Kanagawa H, Fujie A, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T,

Miyamoto K, Sato Y, Kobayashi T, Nakamura M, Matsumoto M, Nishiwaki Y, Hirose H, Kanda T, Saito I, Toyama Y. Vitamin D Deficiency with High Intact PTH Levels is More Common in Younger than in Older Women: A Study of Women Aged 39-64 Years. Keio J Med. 2016;65(2):33-8. 査読有り

15, Tando T, Sato Y, Miyamoto K, Morita M, Kobayashi T, Funayama A, Kanaji A, Hao W, Watanabe R, Oike T, Nakamura M, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T. Hif1 α is required for osteoclast activation and bone loss in male osteoporosis. Biochem Biophys Res Commun. 2016;470(2):391-6. 査読有り

16, Hao W, Tashiro S, Hasegawa T, Sato Y, Kobayashi T, Tando T, Katsuyama E, Fujie A, Watanabe R, Morita M, Miyamoto K, Morioka H, Nakamura M, Matsumoto M, Amizuka N, Toyama Y, Miyamoto T. Hyperglycaemia promotes Schwann cell de-differentiation and de-myelination via sorbitol accumulation and Igf1 downregulation. J Biol Chem. 2015;290(28):17106-15. 査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

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 2016年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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

佐藤 結子 (SATO, Yuiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・研究員

研究者番号：70445443

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者