

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15655

研究課題名(和文)骨粗鬆症の病態制御へのIRISINと協調する新分子機構とエピジェネティクスの解明

研究課題名(英文) Analysis on osteoporosis pathophysiology regarding new molecular mechanism including Irisin and epigenetics

研究代表者

野田 政樹 (NODA, Masaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：50231725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症の病態制御に向けて新しい戦略基盤の確立のために、IRISIN と協調する副甲状腺ホルモン受容体(PPR)のシグナルとの相互作用に基づく骨形成促進の分子機構に着目した。まず IRISIN が硬組織に発現することを時系列で検討した。その結果、IRISIN の硬組織における発現とその時間依存性を明らかにした。さらに硬組織におけるエピジェネティック制御研究として、ヒストンメチル化酵素G9aに注目して解析をおこない mRNA および 蛋白の局在を明らかにし、酸化ストレスで Lgr4 の mRNA のレベルが抑制されることイリシンと協調する副甲状腺ホルモン受容体のシグナルと b2AdR の相互作用を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a new strategic foundation for the control of the pathology of osteoporosis, we focused on the molecular mechanism of bone formation promotion based on the interaction with the signal of parathyroid hormone receptor (PPR) coordinated with IRISIN. First, IRISIN was expressed in hard tissues in a time series. As a result, IRISIN expression in hard tissues and its time dependence were clarified. In addition, as an epigenetic control study in hard tissues, we focused on histone methyltransferase G9a to clarify the localization of mRNA and protein. We also revealed that oxidative stress suppressed the level of Lgr4 and the interaction between PTH receptor and beta AdR.

研究分野：整形外科

キーワード：骨芽細胞 分子メカニズム 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

我が国においては急速な高齢化により骨粗鬆症とその骨折による“寝たきり”や“運動機能の障害”は急増し、前者による生命予後の悪化と医療費の高騰と共に、後者による健康寿命とQOLの低下の上で重要な問題となっている。これまでビスフォスフォネートによる骨吸収抑制の治療が行われ、次には副甲状腺ホルモン（PTH）による骨形成の促進治療が導入されたが骨折率は尚 65%までの改善に留まり、さらにPTHには使用期間の2年の制限と経済的負担が大きく今後の新治療法の開発が望まれる。即ちより有効な骨の形成が必須であるが、PTHによる骨形成の機構は尚不明の点が多い

2. 研究の目的

本研究では骨に対するイリシンに関わるPTHの骨形成作用におけるb2AdRによる制御に基づく骨形成の分子機構とその解析により、骨粗鬆症の病態制御に向けた新分子戦略基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

骨芽細胞を用いたモデルにより骨粗鬆症の病態基盤に関わる新しい分子を同定するとともに特に老化に関わる条件の影響ならびに骨形成に必須のPTHの機能を解析する。

4. 研究成果

骨粗鬆症の病態制御に向けて新しい戦略基盤の確立のために、IRISINと協調する副甲状腺ホルモン受容体（PPR）のシグナルとの相互作用に基づく骨形成促進の分子機構に着目した。まずIRISINが硬組織に発現することを時系列で検討した。その結果、IRISINの硬組織における発現とその時間依存性を明らかにした。さらに硬組織におけるエピジェネティック制御研究として、ヒストンメチル化酵素G9aに注目して解析をおこないmRNAおよび蛋白の局在を明らかにした。PPRシグナルの骨粗鬆症に対する骨量増加のメカニズムはなお十分に

は明らかでないことから、骨形成のアナボリックな作用を老化の観点から検討する新しい遺伝子のLgr4の解析を行った。その結果、酸化ストレスとして用いた過酸化水素により骨芽細胞様細胞MC3T3EにおけるLgr4のmRNAのレベルが抑制されることが明らかとなった。この酸化ストレスによる骨芽細胞様細胞MC3T3EにおけるLgr4のmRNAのレベルの抑制は0.1mMで有意差はなかったが1mMでは50%以上の抑制として観察された。酸化ストレスによる骨芽細胞様細胞MC3T3EにおけるLgr4のmRNAのレベルの抑制は時間依存性であり12時間以内に観察されその後48時間まで持続していた。制御モードの検討では酸化ストレスによる骨芽細胞様細胞MC3T3EにおけるLgr4のmRNAのレベルの抑制は転写阻害剤DRBの存在下ではなおも観察されたが、一方でたんぱく質合成阻害剤の存在下では観察されないことから酸化ストレスによる骨芽細胞様細胞MC3T3EにおけるLgr4のmRNAのレベルの抑制は新蛋白の合成を必要とする転写後性の制御によると推察された。従ってLgr4が骨芽細胞では酸化ストレスにより制御されこのことから骨量制御に寄与することが示唆された。さらにイリシンと協調する副甲状腺ホルモン受容体（PPR）のシグナルとベータ2アドレナリン受容体（b2AdR）シグナルの相互作用に基づく骨形成促進の分子機構を明らかにした。ベータ2アドレナリン受容体は副甲状腺ホルモン受容体によるシグナルに基づく骨の形成促進作用に必須である。従ってPTHのシグナルがベータ2アドレナリン受容体のシグナルで制御をうけていることが推察されるがその二つの受容体がどのように相互作用をするかは明らかでなかった。そこでベータ2アドレナリン受容体のシグナルがそれ自身は比較的短い時間のみ細胞内においてc

AMP シグナルを伝えるが 一方でこのシグナルが副甲状腺ホルモン受容体によるシグナルに対しては核内の PKA ならびに CREB の活性をより長く効かせることが明らかとなった。このメカニズムは エンドソーム上に細胞表面から リガンドの結合のあとで移行した副甲状腺ホルモン受容体が細胞内においてエンドソームに存在したままで cAMP を造り続ける時間が ベータ 2 アドレナリン受容体によって延長することによるものであることが観察された。この際の cAMP の産生の増加においては G 蛋白とアデニルシクラーゼの相互作用が必須であった。ベータ 2 アドレナリン受容体シグナルは G 蛋白複合体の一定のプールを遊離させこのことがさらなるエンドソームの cAMP 増加作用にいたるものと考えられた

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 7 件) (すべて査読有り)

- ① Pawaputanon C, Ezura Y, Kawasaki M, Smriti A, Moriya S, Yamada T, Izu Y, Nifuji A, Nishimori K, Izumi Y, Noda M. BMP-2 enhances Lgr4 gene expression in osteoblastic cells. J Cell Physiol, 231(4):887-95 2016
- ② Katsumura S, Ezura Y, Izu Y, Shirakawa J, Miyawaki A, Harada K, Noda M. Beta adrenergic receptor stimulation suppresses cell migration in association with cell cycle transition in osteoblasts - live imaging analyses based on FUCCI system. J Cell Physiol; 231(2):496-504, 2016
- ③ Moriya S, Izu Y, Arayal S, Kawasaki M, Hata K, Pawaputanon Na Mahasarakham

C, Izumi Y, Saftig P, Kaneko K, Noda M, Ezura Y. Cathepsin K Deficiency Suppresses Disuse-Induced Bone Loss. J Cell Physiol. 231(5):1163-70, 2016.

- ④ Izu Y, Ezura Y, Koch M, Birk DE, Noda M. Collagens VI and XII form complexes mediating osteoblast interactions during osteogenesis. Cell Tissue Res. 364(3):623-35, 2016
- ⑤ Kawasaki M, Izu Y, Hayata T, Ideno H, Nifuji A, Sheffield VC, Ezura Y, Noda M. Bardet-Biedl Syndrome 3 regulates development of cranial base midline structures. Bone. S8756-3282(16)30043-6, 2016
- ⑥ Jean-Alphonse FG, Wehbi VL, Noda M, Xiao K, Vilardaga JP. β_2 -adrenergic receptor control of endosomal PTH receptor signaling via G $\beta\gamma$. Nature Chemical Biology 213(3):259-261, 2017
- ⑦ Pawaputanon Na Mahasarakham C, Izu Y, Nishimori K, Izumi Y, Noda M, Ezura Y. (ア)Lgr4 Expression in Osteoblastic Cells Is Suppressed by Hydrogen Peroxide Treatment. J Cell Physiol. 232(7):1761-1766, 2017

[学会発表] (計 4 件)

- ① Chantida Pawaputanon na Mahasarakham, Yoichi Ezura, Masaki Noda. Alpha-lipoic Acid (ALA) Pre-treatment Specifically Prevents the Suppression of Lgr4 Expression by TGF-beta. The 39th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, Sept 8-11, 2017

② Takuya Notomi, Miyuki Kuno, Akiko Hiyama, Yoichi Ezura, Kiyoshi Ohura, Masaki Noda.
Role of the lysosomal channel, Two Pore Channel 2, in osteoclast differentiation and bone remodeling under normal and low-magnesium conditions. The 39th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, Sept 8-11, 2017

③ Chantida Pawaputanon Na Mahasarakham, Yoichi Ezura, Yayoi Izu, Katsuhiko Nishimori, Yuichi Izumi, Masaki Noda Hydrogen peroxide suppresses *Lgr4* expression in osteoblasts.
International Association for Dental Research (IADR), San Francisco, March 22-25, 2017

④ Sakie Katsumura, Masaki Noda.
Regulation of bone cell function.
World Congress on Osteoporosis- International Osteoporosis Foundation, European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases. Florence, Italy. March 23-26, 2017

江面陽一 (EZURA, Yoichi)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授
研究者番号 : 50333456

二藤彰 (NIFUJI, Akira)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号 : 00240747

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 政樹 (NODA, Masaki)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師
研究者番号 : 50231725

(2) 研究分担者