

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390413

研究課題名 (和文) 骨特異的新規分泌タンパク HA4 の基礎研究および臨床応用

研究課題名 (英文) Basic analysis and clinical usage of a bone-specific secreted protein, HA4

研究代表者

秋山 治彦 (AKIYAMA HARUHIKO)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60402830

研究成果の概要：

我々は骨形成因子の下流因子として HA4 を同定した。HA4 ノックアウトマウスは生後の骨量の減少を認め、骨特異的に HA4 を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは骨量の増加を認めた。このトランスジェニックマウスは卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスの骨量減少を抑制した。これらの結果より HA4 が生後骨量を調節する骨分泌タンパク質である事が明らかとなった。HA4 をターゲットとした骨粗鬆症薬の開発のため、HA4 受容体の探索も実施した。また HA4 は血清中にも検出できることから、血清 HA4 値を測定し骨疾患の病態進行の指標をするためサンドウィッチ ELISA システムを構築した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,000,000	0	8,000,000
2007年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	2,160,000	17,360,000

研究分野：骨代謝学、分子生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：HA、新規分泌蛋白質、骨特異的、ノックアウトマウス、トランスジェニックマウス

## 1. 研究開始当初の背景

骨形成因子 (以下 BMP) は骨発生のみならず生後の骨量の維持にも重要であるが、その下流因子に関しては十分な解析がなされていなかった。よって BMP の骨量維持機能をその下流で担う因子の同定は、骨粗鬆症などの骨疾患の治療に有効であると考えられた。特に現在の骨粗鬆症薬は破骨細胞による骨吸収を抑制する薬効であるが、骨芽細胞の骨形成を促進する薬剤は副甲状腺ホルモンがあるのみで、新規の物質の発見が期待されていた。

## 2. 研究の目的

BMP の骨量維持機能を担う下流因子の同定により、生後の骨量調節因子を同定し、その機能を明らかとする。さらに、骨疾患の病態や進行の指標となるかを検討し、測定システムを構築する。

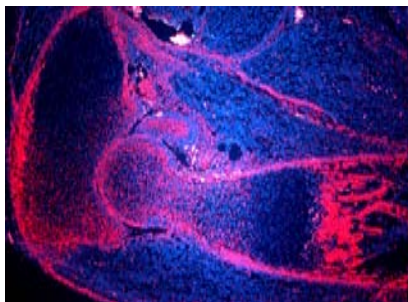
## 3. 研究の方法

(1) BMP の下流因子を suppression subtractive hybridization 法にて同定する。

- (2) 同定された遺伝子の骨での発現を *in situ hybridization* 法にて検討する。
- (3) ノックアウトマウスを作製し、骨の表現系を解析する。
- (4) 骨特異的に HA4 を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、骨の表現系を解析する。
- (5) モノクローナル抗体を作製し、サンドウィッチ ELISA 法を構築する。
- (6) HA4 受容体の同定のため放射能ラベル HA4 タンパク質をもちいて *binding assay* を施行する。

#### 4. 研究成果

(1) 骨芽細胞における BMP の下流因子の同定のため、骨軟骨前駆細胞 ATDC5 に BMP 2 を添加し、添加細胞および無添加細胞より抽出した RNA を用いて *suppression subtractive hybridization* 法、さらに *differential screening* 法を施行した。見出された遺伝子を HA4 と命名した（これはこの後、他のグループにより *Cthrc1* として発表された）。ノザンブロット解析では HA4 遺伝子は ATDC5 細胞で BMP2 によって発現が亢進し、さらに骨芽細胞株 MC3T3-E1 で高発現を認めた。マウス胎児を用いた *in situ hybridization* 法での解析では HA4 遺伝子は主に骨膜および骨に高い発現を認めた（図 1）。



(図 1) マウス胎児 *in situ hybridization*

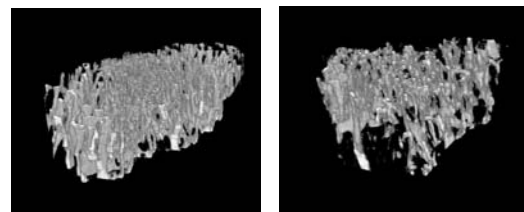
(2) HA4 の生体での機能を明らかにするため、ノックアウトマウスを作製した。HA4 遺伝子は 4 つのエクソンより構成されており、第 2 エクソンに IRES-LacZ-pA/floxed PGK-neo-bpA カセットを相同組み換えでマウス ES 細胞に導入することによって作製した。マウス胎児では X-gal 染色により HA4 が主に骨格組織に発現している事が明らかとなった（図 2）。HA4 ノックアウトマウスの胎生期には明らかな形態学的異常を認めなかったが、生後の骨量を解析した結果、ノックアウトマウスでは約 20% 骨量が減少している事が明らかとなった（図 3）。骨形態計測マーカーは骨形成マーカー（骨梁数および骨芽細胞数、Bone Forming Rate）の低下をみとめるものの骨吸収マーカーに有意な変化を認めなかった。



(図 2) X-gal 染色

またノックアウトマウスでは骨芽細胞の増殖も抑制されていた。以上の結果より HA4 は生後の骨芽細胞性骨形成を正に制御し破骨細胞性骨吸収には影響を与えていない事が明らかとなった。

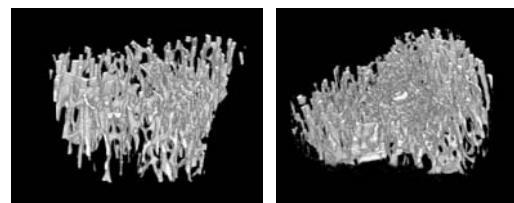
野生型                      ノックアウト



(図 3) マイクロ CT 3D データ

(3) マウスにおける HA4 機能欠損において生後の骨量減少が認められたが、HA4 の過剰発現では生後の骨量に変化があるかどうかを解析するために、I 型コラーゲンの骨特異的プロモーター 2.3Kb を用いて骨組織特異的に HA4 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスも胎生期には明らかな形態学的異常を認めず正常に出生するが、生後の骨量を解析した結果、トランスジェニックマウスでは約 20% 骨量が増加している事が明らかとなった（図 4）。

野生型                      トランスジェニック



(図 4) マイクロ CT 3D データ

骨形態計測マーカーは骨形成マーカー（骨梁数および骨芽細胞数、Bone Forming Rate）の増加をみとめるものの骨吸収マーカーに有意な変化を認めなかった。またトランスジェニックマウスでは骨芽細胞の増殖も亢進していた。

ノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスの結果から、HA4 は骨芽細胞の骨形成を亢進することによって骨量を正に制御する因子である事が明らかとなった。

(4) HA4 の骨芽細胞の増殖および分化に対する作用を、ノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスの頭蓋骨より骨芽細胞を単離し in vitro 培養系を用いて検討した。ノックアウトマウスから単離した HA4 遺伝子欠失骨芽細胞は、細胞増殖、細胞分化および骨基質石灰化すべてにおいて野生型骨芽細胞に比して低下していた (図5)。



(図5) ノックアウトマウス由来の骨芽細胞では基質石灰化が低下していた。

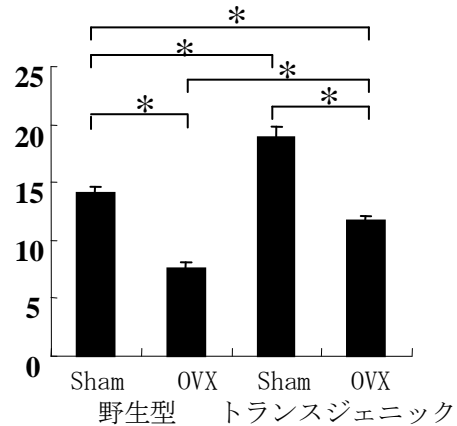
一方、トランスジェニックマウスから単離した HA4 を過剰発現している骨芽細胞は細胞増殖、細胞分化および骨基質石灰化すべてにおいて野生型骨芽細胞に比して亢進していた (図6)。以上の結果から、HA4 が骨芽細胞の増殖および分化、基質石灰化において細胞レベルで正に制御している事が明らかとなった。



(図6) トランスジェニックマウス由来の骨芽細胞では基質石灰化が亢進していた。

(5) 上記の実験から HA4 が生後の骨量の維持および増加に関与していることが明らかとなった事より、HA4 が骨粗鬆症の治療に有効である可能性が示唆される。メスの HA4 トランスジェニックマウスの卵巣を摘出した骨粗鬆症マウスモデルを作製した (OVX)。野生型マウスでは卵巣摘出モデルマウスでは骨量の著しい低下をきたす。しかしトランスジェニックマウスの卵巣摘出モデルマウスでは骨量の減少が見られるものの野生型の骨

量レベルを維持していた (図7)。これはトランスジェニックマウスでは卵巣摘出をおこなっても Bone forming rate の増加を維持しており、骨芽細胞性骨形成が亢進しているためであった。よって HA4 は骨粗鬆症においても骨芽細胞性骨形成を刺激することによって骨量を増加させる事が十分可能であると思われ、新しい治療薬として期待できる。



(図7) 卵巣摘出による骨量の変化

(6) HA4 は骨芽細胞で産生、分泌され、骨芽細胞の増殖および分化を促進する事から、骨芽細胞には HA4 に対する受容体が発現していると思われる。HA4 受容体が同定されれば、薬剤による骨粗鬆症薬の開発につながる可能性が期待される。マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を培養し、<sup>131</sup>I ラベルおよびノンラベル HA4 組み換えタンパク質を添加したのち細胞を洗浄し、細胞膜に結合した <sup>131</sup>I ラベル HA4 組み換えタンパク質を <sup>131</sup>I を測定することによって検出した。<sup>131</sup>I ラベル HA4 組み換えタンパク質の添加量を増やしていくと総結合量は増加していき、ノンラベル HA4 組み換えタンパク質により結合量が低下していた。非特異的結合に比して特異的結合が検出された事より、MC3T3-E1 細胞には HA4 タンパク質と結合するタンパク質が存在している事が明らかとなった。今後はこのタンパク質を同定し、HA4 受容体であるかどうかを検討する予定である。

(7) 骨特異的に HA4 を過剰発現させたトランスジェニックマウスの解析から、骨芽細胞で産生、分泌された HA4 が血清中に存在している事が明らかとなった。すなわち血清中の HA4 タンパク質量が骨粗鬆症をはじめとする骨疾患の病態を反映する可能性が示唆される。HA4 タンパク質量を測定するサンドウィッチ ELISA システムの構築のため HA4 組み換えタンパク質を HA4 ノックアウトマウスに免疫し脾臓を摘出、ハイブリドーマ細胞を作製後、HA4 に対するモノクローナル抗体を作製した。このように作製したモノクローナル

抗体3種類と市販の抗HA4抗体すべての組み合わせでサンドウィッチELISAシステムに適する抗体の組み合わせを検索した。HA4組み換えタンパク質を用いた基礎実験ではng/mlオーダーの濃度のHA4タンパク質を測定可能なサンドウィッチELISAシステムが構築できた。今後は骨粗鬆症患者の血清中HA4タンパク質とDEXAによる骨量を測定し、骨粗鬆症の病態と血清中HA4濃度に相関があるかどうかを検討する予定である。

## 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1件)

- ① Kimura H, Kwan KM, Zhang Z, Deng JM, Darnay BG, Behringer RR, Nakamura T, de Crombrughe B, Akiyama H. Cthrc1 is a positive regulator of osteoblastic bone formation. PLoS ONE. 9;3(9):e3174, 2008. 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 木村浩明、秋山治彦、小田竜治、金永優、添田恒光：遺伝子HA4は骨芽細胞性骨形成を促進することにより生後骨量を増加させる、第23回日本整形外科学会基礎学術集会(2008.10.23 京都)
- ② 木村浩明、秋山治彦、金永優、小田竜治、添田恒光、村尾浩樹、中村孝志：生後の骨量調節における遺伝子HA4の解析、第26回日本骨代謝学会学術集会(2008.10.29 大阪)
- ③ Haruhiko Akiyama, A new secreted protein HA4 is involved in osteoblastic bone formation. 4<sup>th</sup> Meeting of Bone Biology Forum (2007.8.25 大阪)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋山 治彦 (AKIYAMA HARUHIKO)  
京都大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：60402830

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし