

平成 21 年 4 月 9 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390421
 研究課題名（和文）
 骨形成制御の細胞内シグナル伝達系におけるクロストークの解明と骨再生への応用
 研究課題名（英文）
 Crosstalk of intra-cellular signaling pathway in bone formation
 研究代表者
 小池 達也 (KOIKE TATSUYA)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：50271177

研究成果の概要：骨形成を促進する代表的サイトカインである BMP (Bone morphogenetic protein、骨形成因子) の細胞内シグナル伝達機構を cAMP が促進することを明らかにした。この機構が遺伝子レベルにおいても成立することを明白にし、作用機序が明らかでないまま臨床応用されている副甲状腺ホルモン (PTH, Parathyroid hormone) のセカンドメッセンジャーである cAMP 系にも BMP シグナル促進効果が存在することを発見した。そして、PTH の作用の一部が BMP を介して発揮されていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2007 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	12,200,000	3,660,000	15,860,000

研究分野：医薬薬学

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：副甲状腺ホルモン、骨形成因子、細胞内情報伝達系、サイクリック AMP

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症の治療薬として骨吸収抑制剤の研究は大きく進歩し、多くの骨吸収抑制剤が骨量維持の目的に臨床応用されている。しかし、骨形成促進剤の方が失われた骨量回復にはより有効であることが示され、欧米では骨粗鬆症の治療薬として PTH (副甲状腺ホルモン) がすでに使用されている。しかし、PTH の骨芽細胞活性化による骨形成促進効果の詳細な機序は明らかではないのが現状であり、高用量・長期間投与によって実験動物で骨肉腫の発生も報告されており、早期の作

用機序解明と適正な使用法の確立が望まれている。

PTH の細胞内シグナル伝達系は、サイクリック AMP (cAMP) -PKA 系および PKC 系が主体であると考えられている。PTH はペプチド長の変化によりシグナル伝達系が異なることが知られており、PKA 系および PKC 系両者を活性化する PTH (1-34) および、PKA 系のみ活性化する PTH (1-31) はラットにおいて骨形成作用を示す (Whitfield JF, Calcif Tissue Int, 1996年) が、PKC 系のみ活性化する PTH (3-38) においては骨形成作用を示さない (Armento-Villareal R,

J Bone Miner Res、1997年) という報告があり、cAMP-PKA系がPTHの骨形成作用の中心的なシグナル伝達系と予測される。

一方、強力な骨形成促進作用を持つ骨形成タンパク (BMP: Bone Morphogenetic Protein) の作用機序は以前から研究が進んでおり、受容体から細胞内情報伝達経路とその制御機序さらに生理的阻害物質などが明らかになっている。我々は、smads による BMP の細胞内伝達系と cAMP-PKA 系の関わりについて報告してきた。つまり、細胞内 cAMP 濃度を上昇させる phosphodiesterase inhibitor や、プロスタグランジン E2 EP4 受容体選択的アゴニスト (ONO-4819) などが BMP の効果を増強することを in vivo, in vitro とともに報告してきた (Horiuchi H、Bone、2001 年、Horiuchi H、Bone、2002 年、Tsutsumimoto T、Bone、2002 年、Horiuchi H、J Bone Miner Res、2004 年、Sasaoka R、Biochem Biophys Res Commun、2004 年、Toyoda H、Bone、2005 年、Nakagawa K、Bone、2007 年)。以上の背景から、PTH の作用は、BMP シグナル伝達系を刺激することで発揮されるという仮説をたてた。

2. 研究の目的

(1) 骨形成促進効果の作用機序が未だ不明である PTH の作用機序を明らかにするため、BMP シグナル伝達系と PTH の主なシグナル伝達系である cAMP/PKA 系との関連を明らかにすること。

(2) cAMP/PKA によってリン酸化される転写因子 CREB が BMP 初期応答遺伝子での Smads による転写活性に対して促進効果を示すか検証すること。

3. 研究の方法

(1) BMP の初期応答遺伝子の代表的遺伝子である Id-1 遺伝子のプロモーター領域には、

BMP 応答領域 (リン酸化 Smad-1, 5, Smad4 複合体結合領域、BRE) と cAMP 応答領域 (リン酸化 CREB 結合領域、CRE) が存在するため、このプロモーター領域を利用して両シグナル伝達系の相互作用を検索した。human Id1 gene のプロモーター上に存在する BMP 応答領域 (BRE) とそれに隣接する cAMP 応答領域 (CRE) に着目し、それぞれ単独あるいは両者に変異導入した luciferase reporter plasmid を作製した。各 luciferase reporter plasmid を細胞に導入し、BMP-4 あるいは dibutyryl-cAMP (dbcAMP) を添加後のルシフェラーゼ活性を測定し、同時に PKA inhibitor である H89 及び CRE-binding protein (CREB) RNAi の導入での CREB ノックダウンによる抑制効果の有無を検討した。

(2) CRE の BRE に対する役割について検索した。BMP リガンド刺激によって BRE に結合したリン酸化 Smad 複合体と cAMP で活性化されたリン酸化 CREB に結合し、両者をつなぐ共役因子、すなわち BRE に結合したリン酸化 Smads と cAMP/PKA でリン酸化された CREB を介する転写調節複合体形成の有無を検索した。本実験に関してはリン酸化 Smads、CREB の各抗体を用いた免疫沈降法を行った。

(3) (1) で用いた luciferase reporter plasmid を用いて、BMP-2 及び PTH を添加後のルシフェラーゼ活性を測定し検討した。その際 PTH 単独 (以下 PTH single treatment) ではあまり効果を認めなかったため、PTH single treatment の際の 1/10 量を 3 分おきに 10 回投与する投与方法 (以下 PTH cyclic treatment) を用いて行った。

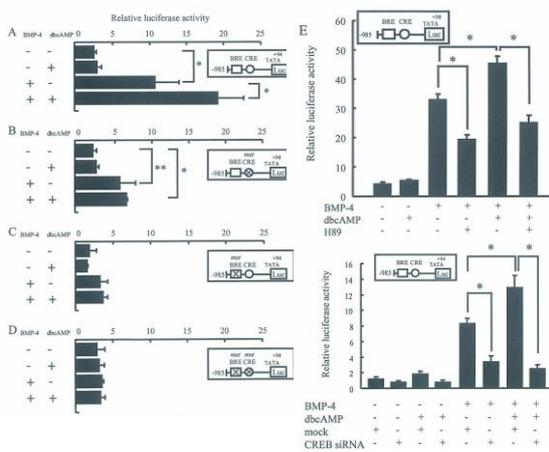
(4) real time RT-PCR にて骨形成マーカーである ALP、Runx2、osteocalcin、抑制 Smad である Smad6 を検討した。また、蛋白レベルでの骨形成を調べるために、ALP アッセイを行った。

(5) PTHについて細胞内 cAMP がどのように変化しているか調べるために、経時的に cAMP 濃度を測定した。その際に様々な投与法 (PTH single treatment、PTH cyclic treatment、PDE 阻害薬である IBMX を PTH single treatment に追加) で検討した。

(6) PKA 阻害薬である H89、PDE 阻害剤である IBMX を用いて PTH の BMP に対する効果がどう変化するか ALP アッセイを行った。

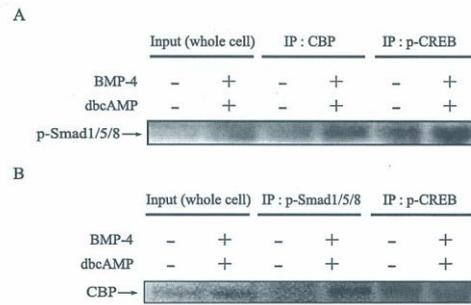
4. 研究成果

(1) BMP の応答細胞として筋芽細胞由来の未分化間葉系細胞である C2C12 細胞を用いた。ルシフェラーゼ活性の測定では CRE の変異導入で dbcAMP による BMP 転写活性の増幅を抑制すること、CREB RNAi、及び PKA 阻害薬により、BMP 転写活性の cAMP による促進効果が抑制されることが明らかとなった。(図 1)



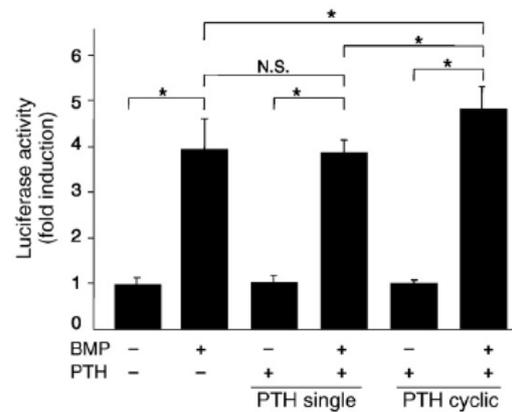
(図 1) ルシフェラーゼ活性

(2) 免疫沈降法による結果では、リン酸化 Smad1/5/8 とリン酸化 CREB 及び CREB-binding protein (CBP) との複合体形成が認められた。



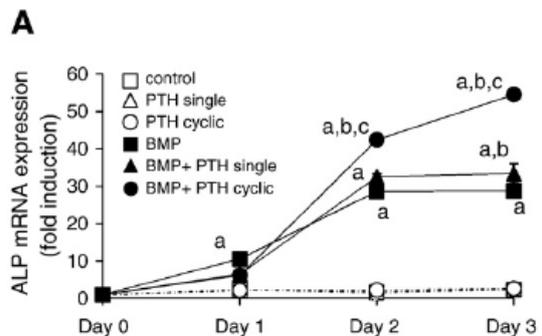
(図 2) 免疫沈降

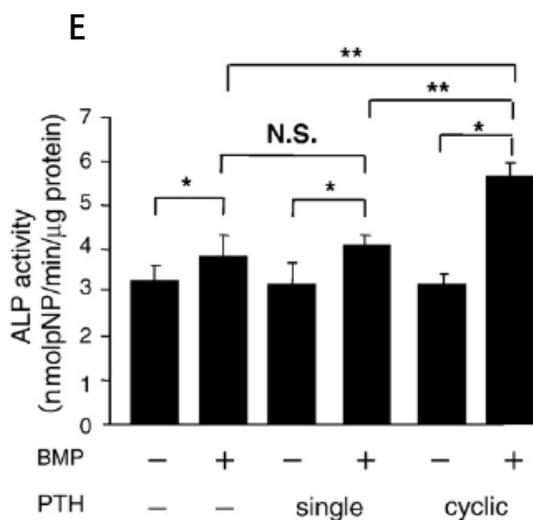
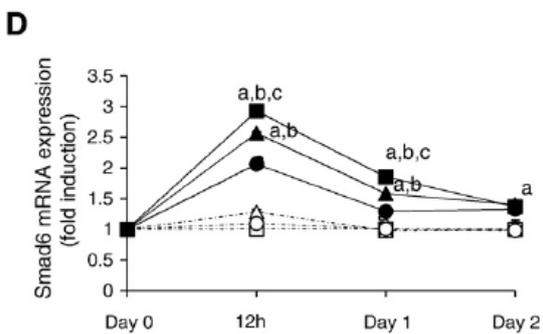
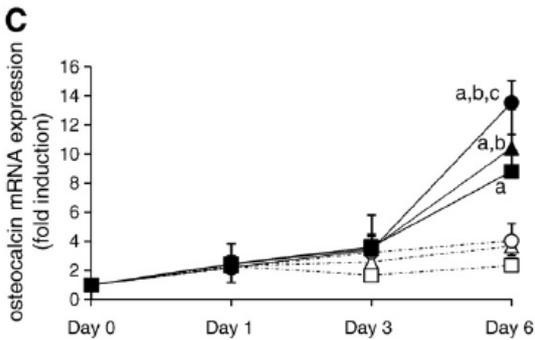
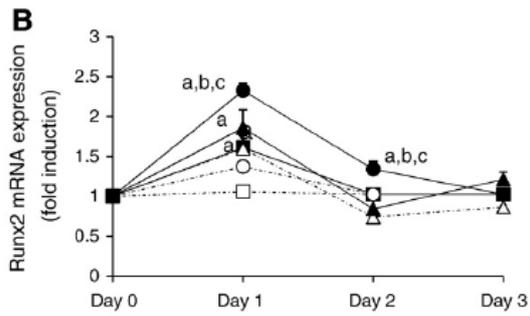
(3) 転写レベルにて PTH 投与 (PTH cyclic treatment) にて BMP による効果の増強を認めた。



(図 3) ルシフェラーゼ活性

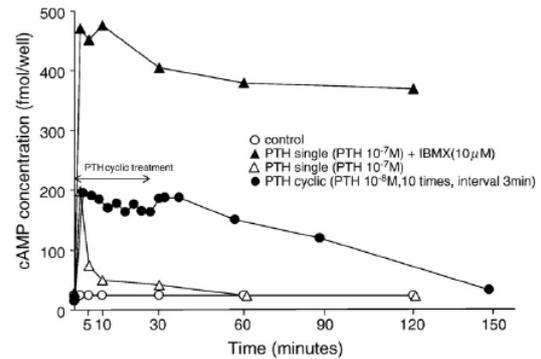
(4) mRNA、蛋白レベルにおいて PTH 投与 (PTH cyclic treatment) にて BMP による骨形成効果の増強を認めた。また抑制 Smad である Smad6 の抑制も認めた。





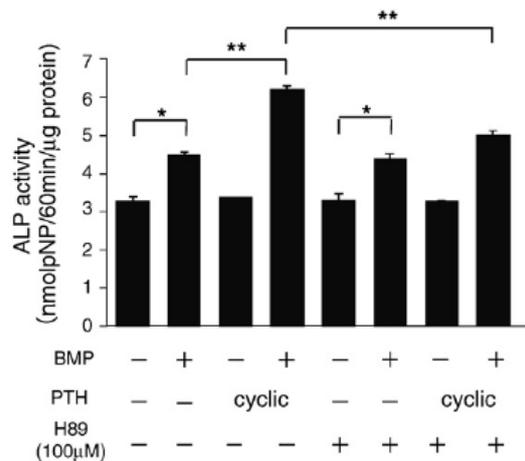
(図 4) real time RT-PCR (ALP, Runx2, Osteocalcin, Smad6) (A-D) 及び ALP 活性 (E)

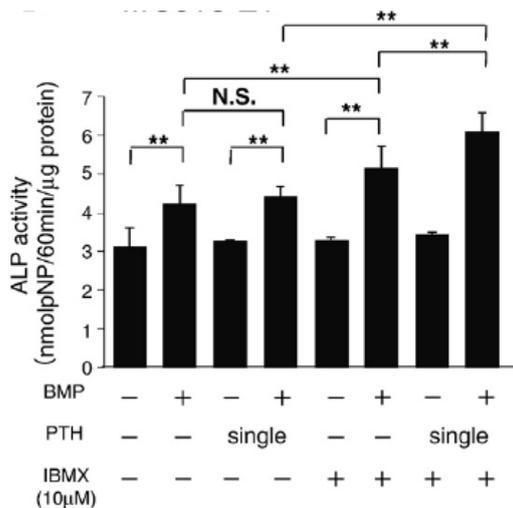
(5) dbcAMP, forskoline では長時間高濃度に細胞内 cAMP 濃度が維持されたが、PTH single treatment では 2.5 分をピークに 5 分前後でベースラインに戻った。しかし、PTH cyclic treatment においては、dbcAMP, forskoline と同様に長時間高濃度に細胞内 cAMP 濃度が維持された



(図 5) 経時的な細胞内 cAMP 濃度

(6) PKA 阻害剤である H9 を用いると増強された PTH cyclic treatment の効果は抑制された。また、PDE 阻害剤である IBMX を用いると、PTH single treatment でも BMP の効果を増強した。





(図6) ALP 活性

(7) したがって、PTH の作用の一部が BMP を介して発揮されることを世界で初めて示すことが出来た。これにより、PTH が臨床使用される際の安全性を保証できたと考えている。今後は、PTH の作用機序の更なる探求を行い、その効果発現を増強しうる方法を考案し、骨粗鬆症治療における PTH 効果の安全性の向上と医療経済的により安価な治療法の開発に結びつけたい。

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)

1. Takayama K, Suzuki A, Manaka T, Taguchi S, Hashimoto Y, Imai Y, Wakitani S, Takaoka K (2009) RNA interference for Noggin enhances the biological activity of bone morphogenetic proteins in vivo and in vitro. J Bone Miner Metab, Online Feb. 28, 2009, 査読有り
2. Nakao Y, Koike T, Ohta Y, Manaka T, Imai Y, Takaoka K (2009) Parathyroid hormone enhances bone morphogenetic protein activity by increasing intracellular

3', 5' -cyclic adenosine monophosphate accumulation in osteoblastic MC3T3-E1 cell. Bone. 44: 872-877, 査読有り

3. Ohta Y, Nakagawa K, Imai Y, Katagiri T, Koike T, Takaoka K (2008) Cyclic AMP enhances Smad-mediated BMP signaling through PKA-CREB pathway. J Bone Miner Metab. 26(5): 478-484, 査読有り
 4. Yu PB, Deng DY, Lai CS, Hong CC, Cuny GD, Boussein ML, Hong DW, McManus PM, Katagiri T, 以下 6 名略 (2008) BMP type I receptor inhibition prevents ectopic ossification in a mouse model of fibrodysplasia ossificans progressiva. Nat Med 14: 1363-1369, 査読有り
 5. Okabe T, Ohmori Y, Tanigami A, Hishigaki H, Suzuki Y, Sugano S, Kawaguchi A, Nakaya H, Wakitani S (2007) Detection of gene expression in synovium of patients with osteoarthritis using a random sequencing method. Acta Orthop 78: 687-692, 査読有り
 6. Kodaira K, Imada M, Goto M, Tomoyasu A, Fukuda T, Kamiyo R, Suda T, Higashio K, and Katagiri T. (2006) Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum. Biochem Biophys Res Commun 345: 1224-1231, 査読有り
 7. Zhao B, Katagiri T, Toyoda H, Takada T, Yanai T, Fukuda T, Chung U-I, Koike T, Takaoka K, and Kamiyo R. (2006) Heparin potentiates the in vivo ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. J Biol Chem 281: 23246-23253, 査読有り
- [学会発表] (計 4 件)
1. Nakao Y, Koike T, Ohta Y, Manaka T, Imai Y, Takaoka K. Parathyroid hormone

enhances bone morphogenetic protein activity by increasing intracellular 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate accumulation in osteoblastic MC3T3-E1 cell.

第 55 回アメリカ整形外科基礎学会、ラスベガス、2009 年 2 月 22 日

2. Ohta Y, Nakagawa K, Imai Y, Katagiri T, Koike T, Takaoka K (2007) Endogenous Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate AMP Response Element-Binding Protein (CREB) Signaling Enhances Smad-Mediated Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling. *Journal of Bone and Mineral Research* 22: S391

第 29 回アメリカ骨ミネラル代謝学会、ホノルル、2007 年 9 月 19 日

3. Ohta Y, Nakagawa K, Imai Y, Nomura C, Katagiri T, Koike T, Takaoka K (2006) Cyclic AMP Accelerates BMP Signaling by Enhancing the Transcriptional Activity of BMP Responsive Element through Cyclic AMP Responsive Element. *Journal of Bone and Mineral Research* 21: S126

第 28 回アメリカ骨ミネラル代謝学会、フィラデルフィア、2006 年 9 月 16 日

4. Ohta Y, Nakagawa K, Imai Y, Nomura C, Katagiri T, Koike T, Takaoka K (2006) Enhancement of BMP signaling by cyclic AMP : Its role and mechanism. *Bone* 38: S17

ダボス骨ワークショップ、ダボス、2006 年 3 月 18 日

[図書] (計 1 件)

1. Zhao B, Katagiri T, Toyoda H, Takada T, Koike T, Takaoka K, and Kamiyo R. (2006) Heparin enhances BMP activity by maintaining high levels of nuclear

phosphorylated Smad1/5/8. In *New Frontiers in Regenerative Medicine*, eds. Kusano M and Shioda S Springer, Japan, p37-42

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 達也 (KOIKE TATSUYA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：50271177

(2) 研究分担者

脇谷 滋之 (WAKITANI SHIGEYUKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70243243

高岡 邦夫 (TAKAOKA KUNIO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30112048

(3) 連携研究者

片桐 岳信 (KATAGIRI TAKENOBU)

埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：80245802