

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591204
 研究課題名（和文）カルシウム調節ホルモンによる β -カテニンシグナル増強・骨量増加作用の検討
 研究課題名（英文）The effect of calciotropic hormone on bone forming action of β -catenin signal

研究代表者
 大園 恵一(OZONO KEIICHI)
 大阪大学・医学系研究科・教授
 研究者番号:20270770

研究成果の概要：細胞株を用いて、活性型ビタミン D、副甲状腺ホルモン(PTH)などのカルシウム調節ホルモンと canonical wnt 経路のクロストークが存在することを証明した。さらに、wnt の coreceptor の 1 つである low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (Lrp6) の骨代謝における機能を LRP6 の機能が低下した自然発症マウス rs を用い、解析した。その結果、wnt の LRP6 を介する効果としては骨芽細胞における RANKL の発現を抑制する事によって破骨細胞形成を抑制し、骨量を増加させることである事を証明し、論文として公表した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：カルシウム調節ホルモン、wnt シグナル、骨量、骨粗鬆症、骨形成

1. 研究開始当初の背景

wnt/LRP/ β -catenin シグナル系 (canonical wnt pathway: β -カテニンシグナルと略す) の骨代謝における重要性が分子遺伝学の成果より明らかにされている。すなわち、骨塩量の高い家系を用いた linkage analysis から、染色体 11q12-13 に責任部位があることがわかり、この部位にある LRP5(LDL receptor-related protein 5) 遺伝子が、骨塩量を規定することが判明した (Boyden LM et al. N Engl J Med, 2002)。

LRP5 遺伝子の活性を失うタイプの変異は小児期に低骨塩量による易骨折性や骨変形および眼球における一次硝子体遺残を示す osteoporosis-pseudoglioma 症候群の原因となることが判明し、LRP5 遺伝子が骨塩量規定因子であることは確実となった (Gong Y et al. Cell, 2001)。すなわち、LRP5 遺伝子の活性型変異で骨量が増加し、不活性型変異で骨量が低下する。Wnt は発生や癌化に重要な働きを持つ分泌性の活性物質で LRP5 と Frizzled を介して細胞内にシ

グナルを送る。細胞内シグナルには複数あるが、骨作用を含む主要な作用を及ぼす経路は β -カテニンに担われ、wnt は β -カテニンを安定化させることで核における量を増加させ、TCF/LEF という転写因子を介して遺伝子発現の調節を行う(β -カテニンシグナルの概要)。

LRP6 は LRP5 と高い相同性を有し、機能的にも LRP5 と同じく wnt の co-receptor として働くとされている。Lrp6^{-/-}マウスは周産期致死であり、骨格形成の異常も高度であることから LRP6 の方が LRP5 よりも骨格形成、骨代謝に重要とも推定されるが、研究は進んでいなかった。申請者らは、自然発症マウスの rs マウスの責任遺伝子が Lrp6 であることを発見し、LRP6 も骨格形成、骨代謝に重要であるとの確証を得た (Development, 2004)。

以上のような研究の流れから、骨量規定因子である β -カテニンシグナルを増強させる方法を検討することには意義があると考えられる。本研究ではカルシウム調節ホルモンである副甲状腺ホルモン(PTH)と活性型ビタミンDに焦点を当てることとした。PTHは間欠投与で骨量を増加させることが知られ、臨床応用が始まっているがそのメカニズムは明らかではない (Tashjian & Gagel J Bone Miner Res, 2006)。また、臨床上の問題点として骨肉腫の発生の危険性があげられる。一方、ビタミンDは欠乏症ではくる病となり骨発育に必須の因子であるが、薬理効果としては骨吸収亢進から骨量減少をもたらすことが知られている。

2 . 研究の目的

骨量増加作用をもつとされる β -カテニンシグナルに対して、PTHおよび活性型ビタミンDがどのような作用を有するか、細胞系および β -カテニンシグナルに異常のある rs マウスを用いて検討する

3 . 研究の方法

a. ビタミン D の β -カテニンシグナルに対する影響

ビタミン D の β -カテニンシグナル全体に及ぼす影響を、レポーター (Super

8xTOPFLASH) assay や骨芽細胞機能を指標として検討する。さらに、 β -カテニン自身およびGSK3 の細胞内量やリン酸化状態を免疫組織化学法、Western blotting 法などで検討する。

b. 副甲状腺ホルモン(PTH)の β -カテニンシグナルに対する影響

PTHあるいはForskolin(FK)を添加し、Super 8xTOPFLASH レポーター活性を検討する。また、PTHの間欠的な処理を行い、Super 8xTOPFLASH のレポーター活性を測定する。内因性の遺伝子発現に対する効果をみるため、wntの標的遺伝子のwisp2、nkd2の発現に対するPTHの効果を検討する。

c. Lrp6 変異 rs マウスの骨代謝異常の機序の検討

本マウスの骨組織を詳細に検討し、 β -カテニン活性化により代償されないLRP6経路特異的事象を検討する。長期生存 LRP6^{-/-}に、PTHあるいは活性型ビタミンDを投与し、 β -カテニンシグナルが活性化されるかどうか検討する。

4 . 研究成果

骨髄間質系細胞株ST2細胞に1,25(OH)₂D₃(1,25D)を添加するとwntのco-receptorであるlow-density lipoprotein receptor-related protein 6 (Lrp6)の発現は増加しなかったが、Lrp5の発現は増加した。さらに、 β -cateninシグナルに対する検討では、wnt3aにより増強されるTCF依存性転写活性を1,25Dは抑制した。また、骨芽細胞系株MG63細胞に、1,25Dを添加したところ、ビタミンDレセプター(VDR)およびLrp5の遺伝子発現上昇が認められsFRP1の発現は低下した。培養上清中のオステオカルシン濃度の著明な産生亢進が認められた。PTHの間欠的な処理では、Super 8xTOPFLASHレポーター活性は上昇し、この効果はH7添加により阻害された。またwisp2、nkd2の発現も、PTHの添加により誘導された。このPTHの効果はGSKの阻害効果によることを証明し、論文発表した(Suzuki A, et al. J Cell Biochem, 2007)。

Lrp6 の機能を Lrp6 機能異常マウス rs を用い解析した。その結果、wnt の Lrp6 を介する効果としては骨芽細胞における RANKL の発現を抑制する事によって破骨細胞形成を抑制し、骨量を増加させることである事を証明し、論文発表した (Kubota T, et al. J Bone Miner Res, 2008)。この結果は、Lrp5 が骨形成の増加作用を介して骨量を増加させるとの知見と対照的であった。申請者らの発表後、Karsenty らが、Lrp5 の骨量増加作用はセロトニンを介する事が発表した (Yadav VK et al. Cell 2008)。骨における Wnt の作用と LRP5/6 の使い分けについては、今後さらに検討されることが期待される。

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 8 件)

Fukumoto S, Namba N, Ozono K, (他 8 名). Causes and Differential Diagnosis of Hypocalcemia – Recommendation Proposed by Expert Panel Supported by Ministry of Health, Labour and Welfare. Japan -Endocr J. in press. 2009. 有

Ohata Y, Yamamoto T, Ozono K (9 番目), (他 6 名). Severe arterial hypertension : a possible complication of McCune-Albright syndrome. Eur J Pediatr. in press. 2009. 有

Endo I, Fukumoto S, Ozono K, (他 8 名). Clinical usefulness of measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF23) in hypophosphatemic patients: proposal of diagnostic criteria using FGF23 measurement. Bone. 42(6). 1235-1239. 2008 , 有

Suzuki A, Ozono K, Kubota T, (他 3 名). P T H /cAMP/PKA Signaling Facilitates Canonical Wnt Signaling Via Inactivation of Glycogen Synthase Kinase-3 in Osteoblastic saos-2 Cells. Journal of

Cellular Biochemistry. 104(1). 304-317. 2008. 有

Kubota T, Michigami T, Ozono K (10 番目), (他 7 名). Lrp6 hypomorphic mutation affects bone mass through bone resorption in mice and impairs interaction with Mesd. J Bone Miner Res. 23(10). 1661-1671, 2008, 有

Miyoshi Y, Akagi M, Ozono K (14 番目), (他 11 名). Severe mandibuloacral dysplasia caused by novel compound heterozygous ZMPSTE24 mutations in two Japanese siblings. Clin Genet. 73(6). 535-544. 2008. 有

Gordillo M, Vega H, Ozono K (23 番目) (他 23 名). The molecular mechanism underlying Roberts syndrome involves loss of ESCO2 acetyltransferase activity. Hum Mol Genet. 17(14). 2172-2180. 2008. 有

大園恵一、低リン血症性疾患の病態と治療—クル病/骨軟化症を含めて—、THE BONE、22(6)、747-751、2008、無

[学会発表](計 2 件)

大園恵一、骨量を規定する新たな遺伝子 LRP6 に変異を有するマウスの解析、第 42 回日本小児内分泌学会学術集、2008 年 10 月 2 日-10 月 4 日、鳥取

大園恵一、血清カルシウム(Ca)・リン(P)値の異常とその原因、第 173 回大阪小児科学会、2007 年 4 月 7 日、大阪市

[図書](計 2 件)

大園恵一、医学書院、今日の治療指針・私はこちら治療している・くる病、2008、1039-1040

大園恵一、医学書院、小児科学 第 3 版 8 章 先天代謝異常症、代謝疾患 J くる病 Rickets、2008、537-540

[その他]

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大園 恵一(OZONO KEIICHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号:20270770

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし