

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：83903
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：H22～H24
 課題番号：22590330
 研究課題名（和文） 骨吸収特異的転写制御機構の解明
 研究課題名（英文） Study for the mechanisms which Cthrc1 is transcriptionally regulated by osteoclastic bone resorption
 研究代表者 竹下 淳 (TAKESHITA SUNAO)
 独立行政法人国立長寿医療研究センター
 運動器疾患研究部・室長
 研究者番号：50263009

研究成果の概要（和文）：我々が骨カップリング因子として同定した Cthrc1 の破骨細胞における発現制御機構を解析した。破骨細胞の骨吸収により骨基質から遊離されるカルシウムやリンなどのイオンが転写活性化のトリガーであることを見出した。Cthrc1 遺伝子のプロモーターを用いて化合物ライブラリーから転写活性を促進する 12 種類の化合物を同定し、さらに、この中からマウスに投与して骨での Cthrc1 の遺伝子発現を促進する 1 つの化合物を同定した。骨粗鬆症治療薬の新規リード化合物として期待される。

研究成果の概要（英文）：We studied the mechanisms which Cthrc1, identified as a coupling factor by us, is transcriptionally regulated by osteoclastic bone resorption. We found that Cthrc1 is transcriptionally expressed in osteoclasts in the presence of high concentration of minerals, such as calcium and phosphate, which are released from bone matrices by osteoclastic bone resorption. Screening of a chemical library, we found 12 compounds which stimulate Cthrc1 transcription by using its promoter in vitro and identified one compound that induces Cthrc1 expression in bone when injected to mice. These results suggest that such compound will be a candidate of leading drug for osteoporotic patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
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：基礎医学・人体病理学

キーワード：骨代謝、骨粗鬆症、骨吸収、転写因子

1. 研究開始当初の背景

骨カップリング機構は骨代謝研究の中でも解明されていない最も重要な研究課題の一つである。我々が独自に骨カップリング因子として同定した Cthrc1 は、マウスの生体内における骨カップリング機能がまだ実証さ

れてなかっただけではなく、遺伝子発現の制御メカニズムは全く解明されていなかった。その後、我々は *in vitro* において Cthrc1 が破骨細胞の骨吸収時に特異的に発現上昇すること、骨芽細胞に働いて骨形成を促進することを明らかにした。マウスの生体内における Cthrc1 の機能を解明するために破骨細胞

特異的コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを樹立し、若年齢で骨形成に障害があり、低骨量を呈することを明らかにし、破骨細胞が産生する *Cthrc1* が骨形成に重要であることを示した。さらに、マウスに RANKL を投与することで骨リモデリングの骨吸収から骨形成への一連のサイクルを観察することが出来るカップリング機能の評価系を確立した。そこで、樹立した評価系を用いて *Cthrc1* cKO マウスのカップリング機能を調べたところ、骨吸収には障害は見られなかったが、骨吸収後に見られる骨形成の低下が見られ、さらに2ヶ月後に見られる骨量の回復にも顕著な障害が認められた。このことから破骨細胞が産生する *Cthrc1* はマウスの生体内において骨吸収から骨形成へのカップリングに重要な働きをするカップリング因子であることが明らかとなった。ところが、*Cthrc1* の破骨細胞における発現上昇の制御メカニズムについては不明であった。そこで、破骨細胞による骨吸収の何が *Cthrc1* の発現を制御するかを解明することが骨粗鬆症治療薬の開発の糸口を切り開く鍵となると考え、*Cthrc1* の転写制御機構の解明を試みた。

2. 研究の目的

破骨細胞が骨を吸収する時に特異的に産生・分泌する新規分泌タンパク質 *Cthrc1* の遺伝子転写制御メカニズムを解析することにより、骨カップリングを司る転写制御因子を同定し、骨吸収に関わる新たな転写活性化のメカニズムを解明するとともに、骨カップリングを促進する化合物をスクリーニングし、これまでにはない新規な骨粗鬆症治療薬のリード化合物の創出を目的とする。

3. 研究の方法

破骨細胞を象牙片やハイドロキシアパタイト(HA)上で培養し、RNAを抽出後、RT-PCR法により *Cthrc1* の発現を解析した。破骨細胞を象牙片やHA上で培養し、培養液中に骨吸収阻害剤であるアレンドロネート(ALN)、プロトンポンプ阻害剤であるバフィロマイシンA (BM) やNEN、またはカルシトニン(CT)を添加することで *Cthrc1* の発現に影響があるかどうかを調べた。破骨細胞による骨吸収の何が *Cthrc1* の発現を上昇させるのかを調べるために破骨細胞を骨基質であるフィブロネクチン、ビトロネクチンやオステオポンチでコートしたプレート上で培養し、*Cthrc1* の発現を解析した。さらに、培養液中に塩化カルシウム、塩化マグネシウムやリン酸を添加し *Cthrc1* の発現が上昇するかどうかを調べた。また、マウスに RANKL を投与し、骨吸収を促進したときに骨における *Cthrc1* の発現が上昇するかどうかを調べた。一方、マウスにアレンドロネート(ALN)を投与し、骨吸

収を抑制したときに骨における *Cthrc1* の発現が低下するかどうかを調べた。加齢に伴って骨における *Cthrc1* の発現が変化するかどうかを3週齢から24週齢のマウスを用いて解析した。また、骨代謝疾患である大理石骨病を発症する RANKL KO マウスと Src KO マウスの骨における *Cthrc1* の発現を調べ、破骨細胞のないマウス、または骨吸収機能の障害されたマウスの骨において *Cthrc1* の発現を調べることで *Cthrc1* の発現と骨吸収機能の関連性について解析した。*Cthrc1* 遺伝子を用いて新規骨吸収特異的転写制御機構を解明するために、*Cthrc1* プロモーターにレポーター遺伝子を結合し、レトロウイルス発現系を用いて象牙片上で破骨細胞を培養することにより、骨吸収特異的転写活性を検出した。最終的には生化学的に特異的エンハンサー活性を同定した。また、このエンハンサー活性をミミックする化合物のスクリーニング系を確立し、化合物ライブラリーをスクリーニングし、骨形成促進薬としてのリード化合物を検索した。

4. 研究成果

Cthrc1 は破骨細胞が骨、象牙やヒドロキシアパタイト(HA)上で骨吸収により発現上昇し(図1)、骨吸収阻害剤であるアレンドロネートとカルシトニン、及びプロトンポンプ阻害剤で発現上昇は抑制された(図2と3)。

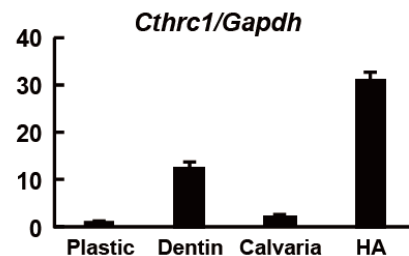


図1 *Cthrc1*は骨吸収で発現上昇する

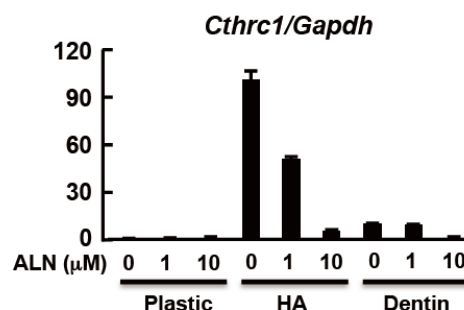


図2 *Cthrc1*は骨吸収阻害剤で発現が抑制する

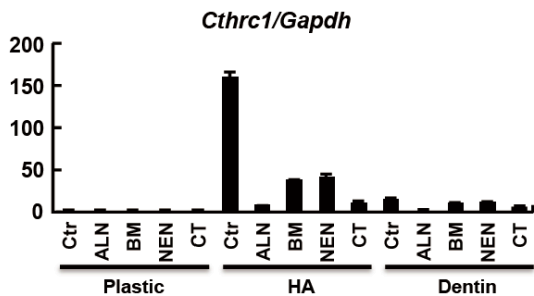


図3 Cthrc1は骨吸収阻害剤で発現が抑制する

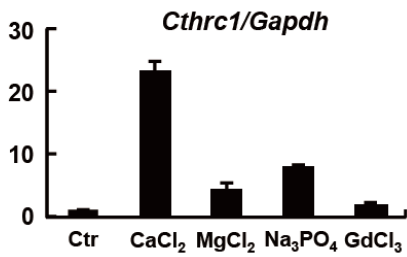


図4 Cthrc1はカルシウムやリンで発現上昇する

カルシウムやリンは Cthrc1 の発現を促進したが、フィブロネクチンやビトロネクチンなどの基質タンパクによる発現上昇は見られなかった (図4)。また、マウスに骨吸収因子の RANKL を投与すると骨における Cthrc1 の発現が上昇し (図5)、アレンドロネートの投与により発現は低下した (図6)。

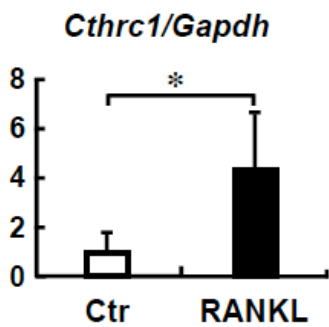


図5 マウスにRANKLを投与すると、骨でのCthrc1の発現が上昇する

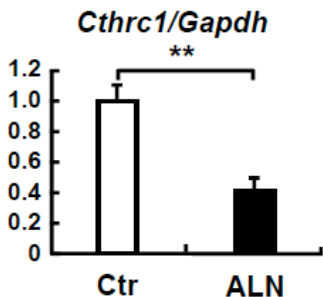


図6 マウスに骨吸収阻害剤を投与すると、骨でのCthrc1の発現が低下する

Cthrc1 の骨における加齢変化を調べたところ、3ヶ月齢で高く、6ヶ月齢から24ヶ月齢にかけて加齢と共に発現が低下することが明らかとなった (図7)。

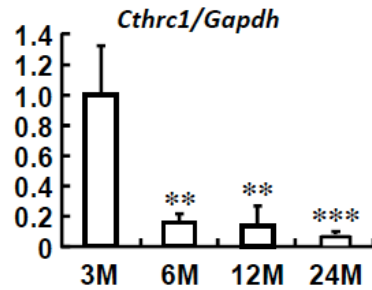


図7 Cthrc1の骨における発現は加齢と共に低下する 3~24M (ヶ月齢)

大理石骨病である RANKL KO マウスでは破骨細胞が存在せず、また Src KO マウスは骨吸収機能の著しく低下した破骨細胞が多く存在し、それぞれ野生型に比べ Cthrc1 の骨での発現が著しく低下していることが分かった (図8と9)。

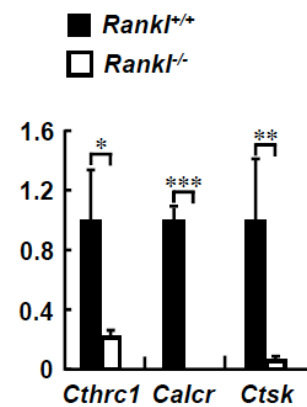


図8 RANKL KOマウスの骨におけるCthrc1の発現は野生型と比べると著しく低い

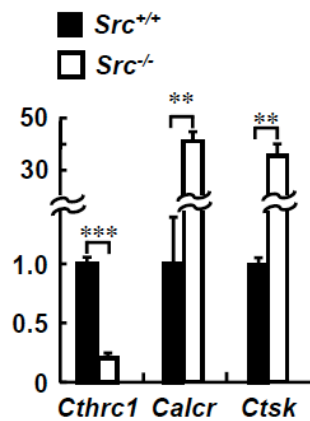


図9 Src KOマウスの骨におけるCthrc1の発現は野生型と比べると著しく低い

これらのことは破骨細胞における Cthrc1 の発現は骨吸収機能と深く関連することがマウスの病態モデルでも裏付けられた。

そこで、転写制御メカニズムの解明と、新規骨粗鬆症治療薬のリード化合物の創出を目的とし、1万種類の化合物ライブラリーをスクリーニングし Cthrc1 遺伝子の転写活性を促進する化合物12種類を同定した。さらに、6種類の化合物をマウスに投与し、骨において Cthrc1 の発現を上昇する化合物1種類を同定することに成功した。

骨吸収により発現が制御される遺伝子についてはこれまでに報告された例はない。本研究で、Cthrc1 遺伝子が骨吸収によるカルシウムなどのイオン濃度の上昇が引き金となって発現上昇し、骨形成を促進するカップリング因子として働くことを突き止めたことは、骨代謝を理解する上で極めて意義深い。同定した 1kb の Cthrc1 遺伝子発現調節領域には同定した化合物が結合することは明らかであり、今後カルシウムによる制御領域の同定と共に詳細な解析により Cthrc1 遺伝子の転写制御メカニズムの解明に有力な武器となるだけでなく、骨カップリング因子をターゲットとした斬新な切り口の新たな骨粗鬆症治療薬を目指した創薬のリード化合物にな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2件)

① Indo Y, Takeshita S, Ishii K, Hoshii T, Aburatani H, Hirao A, Ikeda K: Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function. **J Bone Miner Res** 2013 (DOI 10.1002/jbmr.1976)

② Takeshita S, Fumoto T, Matsuoka K, Park K-a, Aburatani H, Kato S, Ito M, Ikeda K: Osteoclast-secreted Cthrc1 in the coupling of bone resorption to formation. **JCI** 2013 (in press)

[学会発表] (計4件)

① Takeshita S, Fumoto T, Ikeda K: Pre-adipocytes support osteoclastogenesis through RANKL expression. The 34th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 10月15日 Minneapolis, Minnesota

② 松岡和彦、池田恭治、竹下 淳: 破骨細胞が分泌する骨芽細胞分化促進因子の精製 第85回日本生化学会大会 12月16日 福岡

③ Fumoto T, Takeshita S, Ito M, Ikeda K: Osteoblast- and T cell-derived RANKL in osteoclastogenesis. International Symposium on genetic and epigenetic control of cell fate, Nov 6, Kyoto

④ Indo Y, Takeshita S, Aburatani H, Ikeda K: Metabolic regulation of osteoclast differentiation and bone resorption. International Symposium on genetic and epigenetic control of cell fate, Nov 6, Kyoto

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncgg.go.jp/department/bjd/bjd/research.htm>

<http://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/1067.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 淳 (TAKESHITA SUNAO)

国立長寿医療研究センター・運動器疾患研究部・室長

研究者番号: 50263009

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし