

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 4 月 15 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590656

研究課題名（和文） 骨形成低下に伴う骨粗鬆症の治療法の開発を目指した骨形成シグナルの解明

研究課題名（英文） Elucidation of bone formation signal aimed at the development of medical treatment of osteoporosis induced by deterioration of bone formation

研究代表者

杉本 利嗣 (SUGIMOTO TOSHITSUGU)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：00226458

研究成果の概要（和文）：ストロンチウムが骨芽細胞に発現するCaSRを介して骨形成促進作用を発揮することを立証した。副甲状腺ホルモン-smad3系の下流の新規骨形成促進分子としてTmem119を見だし、これが骨形成シグナルとして注目されているWnt系の促進因子であること、BMP-Runx2系とクロストークすることを立証した。またTmem119は筋芽細胞から骨芽細胞への分化を促進させる小胞体ストレス関連因子であること、終末糖化産物は小胞体ストレスセンサーの抑制を介して骨芽細胞分化を阻害することを示した。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that strontium exhibited anabolic action on bone partly through activating calcium-sensing receptor. We identified a smad3-related factor, Tmem119, which is induced by parathyroid hormone(PTH) and promotes osteoblast differentiation partly via

Wnt signal and cross-talk with bone morphogenetic protein-Runx2 pathway. Endoplasmic reticulum stress pathway is involved in the differentiation of myoblasts into osteoblasts enhanced by Tmem119. Advanced glycation end-products inhibits osteoblast differentiation via the suppression of this pathway.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般

キーワード：老年医学、骨粗鬆症、骨形成

1. 研究開始当初の背景

社会の急速な高齢化に伴う骨粗鬆症患者の急増により、骨折などに伴う高齢者のQOL低下や寝たきり患者の増加が社会的脅威となりつつあり、その予防・治療法の確立が老年医学における重大な課題となっている。現在、治療薬として骨吸収抑制剤の開発が大幅に進み、臨床レベルに次々と登場してきているが、高齢者の多くでは骨量が骨折閾値以下にまで低下しており、これを著明に増加させ得る骨形成促進剤は未だほとんどないのが現状である。また最近ステロイド服用に起因する骨粗鬆症の管理や糖尿病患者での骨折リスクの上昇が特に高齢者で大きな問題となっている。これらの主病態は骨形成の低下であり、この機序に関わる骨形成シグナルの解明と骨形成促進剤の臨床応用への展開が急務である。現在、骨形成促進剤として有望視されている薬剤には、副甲状腺ホルモン(PTH)、ストロンチウム(Sr)、カルシウム感知受容体(CaSR)作動薬などが挙げられるが、その促進機序の詳細は明らかではない。本研究は骨形成の低下に伴う骨粗鬆症の治療法の開発を目指した骨形成シグナルの解明を目的とし、これを通じて骨形成促進剤の開発の進展に寄与したい。

2. 研究の目的

(1) 骨形成促進剤として有望視されている副甲状腺ホルモン(PTH), ストロンチウム(Sr), カルシウム感知受容体(CaSR)作動薬の骨形成促進機序の解明

(2) 骨形成の低下に伴う骨粗鬆症の治療法の開発を目指した骨形成シグナルの解明と新規骨形成促進剤の開発の進展への寄与。

3. 研究の方法

(1) CaSRの骨形成シグナルとしての役割とSr, CaSR作動薬の骨形成促進機序については、

CaSR antisense ベクター、dominant negative作用のあることを既に証明しているCaSR R185Q変異を含んだベクター、siRNA CaSRの過剰発現、MEK dominant-negativeを過剰発現させた細胞を用いて解析した。

(2) PTH-Smad3で誘導される新規骨形成因子の同定とその機能解析については、私どもはこれまでの研究において、smad3が重要な骨形成シグナル分子であり、PTHの骨形成促進機序に関与すること、さらにMAPキナーゼのERK1/2を阻害するとsmad3の骨形成作用が増強されることを示した。そこで本研究では新規の骨形成因子を探索するためMC3T3-E1細胞を用い、smad3を安定過剰発現した細胞にERK1/2阻害剤PD98059処置した群と空ベクターのみを導入した群でDNAマイクロアレイ解析を行い、見いだした新規因子の機能解析をした。

(3) 新規骨形成因子の他の転写調節及び情報伝達因子、BMPシグナルなどとの相互作用について、細胞生物学的ならびに分子生物学的手法(共免疫沈降、DNA結合、転写活性、アンチセンス等を用いた実験)により検討した。

(4) 新規骨形成因子の筋と骨を結びつける候補因子としての役割に関しては、私どもは上記の研究により見いだした新規骨形成因子Tmem119が筋芽細胞から骨芽細胞への分化を促進し、筋骨連関に関わる可能性を提起した。そこで、マウス筋芽細胞株C2C12を用いて、Tmem119さらに終末糖化産物(AGEs)と小胞体ストレスの関連性について解析した。

4. 研究成果

(1) Srは骨芽細胞に発現するCaSRを介して骨芽細胞活性化と骨形成促進作用を惹起することを立証した。この研究成果はSrの骨形成促進機序のみならず経口の骨形成促進剤として期待されているCaSR作動薬の開発にもつながる知見である。

(2) PTH-smad3系の下流に位置する骨芽細胞の分化、石灰化を促進する新規分子として Tmem119 をみいだした。そして PTH-smad3-Tmem119系が骨形成シグナルとして注目されている Wnt- β -cateninシグナルの重要な促進因子であることをはじめに立証した。さらに Tmem119は BMPによって誘導される因子でもあり、また骨形成に重要な Runx2や BMP 特異的 smad である smad1.5 と相互作用することをみいだした。以上の知見により、PTHの骨形成促進機序の解明のみならず、Tmem119は骨形成促進因子として骨粗鬆症治療薬の標的としても期待しうる分子であることが示された。

(3) DNAマイクロアレイ解析を用いた筋と骨を結びつける因子の探索により、その候補因子として、osteoglycin (OGN), family with sequence similarity 5 (FAM5C) とともに Tmem119も挙げられた。OGN及びFAM5Cは筋細胞から産生されて、血中に分泌され、分化した骨芽細胞で骨形成促進的に作用することが示唆された。これらの因子は筋から産生されて骨アナボリック作用を有する因子の候補として初めての因子である。一方、Tmem119は筋芽細胞において筋骨化 (ALK-2) シグナルにより発現が増加し、BMPシグナルとの相互作用により骨芽細胞分化を促進することを示した。また Tmem119は ATF4及びFOXO1を介して筋芽細胞から骨芽細胞への分化を促進させる小胞体ストレス関連因子であることをはじめに示した。以上は Tmem119が筋骨連関に重要な役割を担う骨形成促進因子であり、今後の骨形成促進剤の開発に非常に重要な着眼点を与える知見である。

(4) 上記の研究過程で、終末糖化産物 (AGEs) の骨芽細胞分化抑制にも小胞体ストレスセンサーの阻害が関与することを示す結果を得ている。糖尿病における骨脆弱性亢進機序に、AGEs の骨芽細胞分化抑制が関わっている

ことを示してきたが、この機序にこの関与が考えられる。

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 11 件)

① Sugimoto T, Shiraki M, Nakano T, Kishimoto H, Ito M, Fukunaga M, Hagino H, Sone T, Kuroda T, Nakamura T. Vertebral fracture risk after once-weekly teriparatide injection-follow-up study of teriparatide once-weekly efficacy research (TOWER) trial. *Curr Med Res Opin* 査読有 29, 2013, 195-203

② Shiraki M, Sugimoto T, Nakamura T. Effects of a single injection of teriparatide on bone turnover markers in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 査読有 24, 2013, 219-226

③ Yano M, Inoue Y, Tobimatsu T, Hendy GN, Canaff L, Sugimoto T, Seino S, Kaji H. Smad7 inhibits differentiation and mineralization of mouse osteoblastic cells. *Endocr J* 査読有 59(8), 2012, 653-662

④ Tanaka K, Matsumoto E, Higashimaki Y, Katagiri T, Sugimoto T, Seino S, Kaji H. Role of osteoglycin in the linkage between muscle and bone. *J Biol Chem* 査読有 287(15), 2012, 11616-11628

⑤ Nakamura T, Sugimoto T, Nakano T, Kishimoto H, Ito M, Fukunaga H, Hagino H, Sone T, Yoshikawa H, Nishizawa Y, Fujita T, Shiraki M. Randomized teriparatide [human parathyroid hormone (PTH) 1-34] once-weekly efficacy research (TOWER) trial for examining the reduction in new vertebral fractures in subjects with primary osteoporosis and high fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab* 査読有 97(9), 2012, 3097-3106

⑥ Tanaka K, Inoue Y, Hendy GN, Canaff L, Katagiri T, Kitazawa R, Komori T, Sugimoto T, Seino S, Kaji H. Interaction of Tmem119 and the bone morphogenetic protein pathway in the commitment of myoblastic into osteoblastic cells. *Bone* 査読有 51, 2012, 158-167

⑦ Yamamoto M, Yamaguchi T, Nawata K, Yamauchi M, Sugimoto T. Decreased PTH levels accompanied by low bone formation is associated with vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 査読有 97, 2012, 1277-1284

- ⑧Tanaka K, Matsumoto E, Higashimaki Y, Sugimoto T, Seino S, Kaji H. FAM5C is a soluble osteoblast differentiation factor linking muscle to bone. Biochem Biophys Res Commun 査読有 418, 2012, 134-139
- ⑨Hisa I, Inoue Y, Hendy GN, Canafi L, Kitazawa R, Kitazawa S, Komori T, Sugimoto T, Seino S, Kaji H Novel parathyroid hormone-responsive smad3-related factor, Tmem119, promotes osteoblast differentiation. J Biol Chem 査読有 286(11), 2011, 9787-9796
- ⑩Takaoka S, Yamaguchi T, Yano S, Yamachi M, Sugimoto T. The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast differentiation and mineralization. Horm Metab Res 査読有 42, 2010, 627-631
- ⑪Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamachi M, Sugimoto T. Fasudil hydrochloride induces osteoblastic differentiation of stromal cell lines, C3H10T1/2 and ST2, via bone morphogenetic protein-2 expression. Endocr J 査読有 57(5), 2010, 415-421

[学会発表] (計5件)

- ①杉本利嗣、骨粗鬆症新規治療薬：テリパチド、第30回日本骨代謝学会、2012年7月20日(東京・京王プラザホテル)
- ②杉本利嗣、骨・カルシウム代謝異常とPTH、第85回日本内分泌学会学術総会2012年4月19日(名古屋・名古屋国際会議場)
- ③杉本利嗣、骨粗鬆症治療の進歩、第109回日本内科学会総会・講演会、2012年4月13日(京都・みやこメッセ)
- ④杉本利嗣、新規骨粗鬆症治療薬 PTH、第29回日本骨代謝学会学術集 2011年7月28日(大阪・大阪国際会議場)
- ⑤杉本利嗣、骨形成促進剤としてのPTHの臨床応用への展開、第28回日本骨代謝学会2010年7月21日(東京・京王プラザホテル)

[図書] (計1件)

- ①杉本利嗣、診断と治療社、先制医療 日本の未来を拓く医療：治療医学から先制医療へ：骨粗鬆症 2012年、139-150

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 利嗣 (SUGIMOTO TOSHITSUGU)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：00226458

(2) 研究分担者

山内 美香 (YAMAUCHI MIKA)
島根大学・医学部・講師