

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 24 年 4 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659065

研究課題名（和文） 内分泌器官としての骨組織

研究課題名（英文） Bone as an endocrine organ.

研究代表者

檜井 栄一 (HINOI EIICHI)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：70360865

研究成果の概要（和文）：骨組織から分泌されるホルモン様分子を網羅的にスクリーニングした結果、骨細胞から分泌される因子として、GDF15 を同定した。さらに、GDF15 が破骨細胞の分化・成熟化を促進すること、また、その中和抗体が虚血性骨粗鬆症の発症を予防することが明らかとなった。本研究により、虚血や低酸素等の病態生理学的条件下において骨細胞から分泌される GDF15 が、破骨細胞へ作用し骨代謝を制御していることが判明した。

研究成果の概要（英文）：We identified GDF15 as an endocrine factor secreted from osteocytes. Recombinant GDF15 significantly promoted osteoclastic differentiation. The anti-GDF15 antibody prevented bone loss through inhibiting osteoclastic activation in tibias from mice with femoral artery ligation in vivo. These findings suggest that GDF15 could play a pivotal role in the pathogenesis of bone loss relevant to hypoxia through promotion of osteoclastogenesis after secretion from adjacent osteocytes during disuse and/or ischemia in bone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	330,000	3,030,000

研究分野：骨代謝学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：骨組織、骨芽細胞、骨細胞、growth differentiation factor 15、ホルモン、骨代謝、破骨細胞、骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

骨組織では、骨新生後も骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が絶えず繰り返される、いわゆる骨リモデリングが営まれており、骨組織の形態や機能が維持されている。このバランスが一旦破綻すると、大理石

骨病や骨粗鬆症などのいわゆる骨代謝性疾患が引き起こされる。従来、骨組織を構成する骨芽細胞や破骨細胞は、骨の質および量を維持する機能を主に担っていると考えられてきたが、近年骨組織はミネラルの恒常性維持に加え、様々な新規機能を有する多くの証拠が世界中の複数の独立した研究機関から

報告されている。すなわち、骨芽細胞が造血系幹細胞のニッチとして働き、同細胞の創造、サイズ調節あるいは維持に決定的な役割を持つことが明らかとなってきた。また我々も近年、骨組織由来ホルモンであるオステオカルシンが、膵臓β細胞からのインスリン分泌、および脂肪細胞からのアディポネクチン分泌を制御することにより、全身の糖脂質代謝を制御する事を見出した。さらに我々は、脂肪細胞から分泌されるレプチンが中枢神経系に作用し、交感神経系を介して、骨組織に発現するオステオカルシンの活性を調節し、膵臓からのインスリン分泌を制御していることも明らかにした。我々が確立したこのような全く新しい分子基盤にもとづいて、骨組織を標的とした骨代謝性疾患および糖尿病を同時に指向する治療的戦略の展開が可能となった。事実、アメリカでは、我々の同定した骨組織由来ホルモン様分子であるオステオカルシンの活性を制御することにより、糖尿病治療薬への適応を目指す研究がすでに始まっている。したがって本研究では、さらなる骨組織由来ホルモンを網羅的に同定し、同分子を用いた糖尿病あるいは肥満などのメタボリックシンドロームに対する予防・改善薬の開発研究を行うこととした。

2. 研究の目的

従来、骨組織は骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞からなり、骨の質および量を維持する機能を担っていると考えられてきた。ところが近年、骨組織は骨量・骨質維持機能に加えて、様々な新規機能を有する証拠が複数の研究機関から報告されている。その中でも我々は、骨組織から分泌されるオステオカルシンが膵臓・細胞や脂肪細胞に作用し、インスリンやアディポネクチン分泌を制御していることを明らかにした。そして骨組織が糖脂質代謝を内分泌作用により調節する可能性を世界に先駆けて提唱した。この事実は、膵臓、脂肪、副腎あるいは卵巣等の既知の内分泌器官に加えて、骨組織もその一つとして脊椎動物の主要な生理機能の調節機構に関与することを示している。したがって本研究では、我々が提唱する全く新しい概念「内分泌器官としての骨組織」を基盤として、骨組織から分泌されるホルモン様分子を網羅的にスクリーニングし、かつ同定することを目的とした。

3. 研究の方法

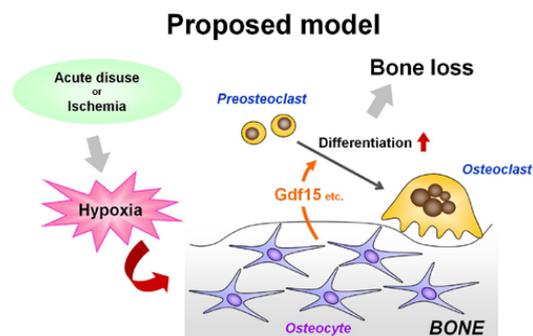
骨組織由来分泌タンパク質の探索：骨組織から分泌される分子を網羅的に探索する目

的で、骨芽細胞および骨細胞を無血清培養液中で培養した。ついで培養上清中に存在する分泌タンパク質を濃縮後に二次元電気泳動しゲル上に展開した。そしてゲルからスポットを切り出しトリプシン消化後にペプチドを抽出し、質量分析装置で解析した。そして同定した分子について、mRNA およびタンパク質両レベルでマウス各臓器における発現分布を調べ、骨組織においてのみ発現しているものあるいは骨組織に高発現している分子を同定した。そして、その分泌タンパク質について大腸菌を用いて組み換えタンパク質を作製した。

同定した分泌因子の機能探索：同定した因子について、骨芽細胞および破骨細胞に対する機能をしらべるため、組み換えたんぱく質を各細胞に添加し、それらの増殖能および分化能に対する影響を調べた。また、マウスに大腿動脈結紮術を施し、虚血性骨粗鬆症モデルマウスを作成した。同モデルマウスに対して、同定した因子の中和抗体を投与し、骨密度の測定を行った。

4. 研究成果

本研究では、我々が提唱する全く新しい概念「内分泌器官としての骨組織」を基盤として、骨組織から分泌されるホルモン様分子を網羅的にスクリーニングし、かつ同定することを目的とした。そして、我々は世界に先駆けて骨細胞から分泌される因子として、growth differentiation factor 15 (GDF15) を同定した。そこでつぎにGDF15の生理学的役割を検討するために、まず最初に骨代謝に与える影響について検討した。その結果、マウスに大腿動脈結紮を施し、骨組織を虚血・低酸素状態にしたときに、骨細胞からのGDF15の分泌が著明に上昇することを見出した。さらにGDF15の中和抗体を投与すること



図：骨細胞由来分泌因子であるGDF15は破骨細胞の分化を促進させる働きがあり、虚血性骨粗鬆症の発症に関与していることが明らかとなった。

により、大腿動脈結紮により誘導される骨密度低下が著明に抑制されることを見出した。また *in vitro* 実験により、GDF15 は骨芽細胞の機能には影響を与えないが、破骨細胞の分化・成熟化を強力に誘導することも明らかとなった。以上の結果により、虚血や低酸素等の病態生理学的条件下において骨細胞から分泌される GDF15 が、破骨細胞の分化・成熟化を調節することにより、骨代謝を制御していることが明らかとなった (図)。さらに現在はこの GDF15 について、*in vivo* および *in vitro* の両面から糖脂質代謝に対する機能的役割を調べており、骨組織に作用点をもつ肥満や糖尿病等のメタボリックシンドロームに対する新たな治療法開発の可能性の追求を行っている。

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 4 件)

- ① Hinoi, E., Ochi, H., Takarada, T., Nakatani, E., Iezaki, T., Nakajima, H., Fujita, H., Takahata, Y., Hidano, S., Kobayashi, T., Takeda, S., Yoneda, Y., Positive regulation of osteoclastic differentiation by growth differentiation factor 15 upregulated in osteocytic cells under hypoxia., *J Bone Miner Res.*, 27(2012), 938-949, 査読有 DOI: 10.1002/jbmr.1538
- ② Uno, K., Takarada, T., Takarada-Iemata, M., Nakamura, Y., Fujita, H., Hinoi, E., Yoneda, Y., Negative regulation of osteoblastogenesis through downregulation of runt-related transcription factor-2 in osteoblastic MC3T3-E1 cells with stable overexpression of the cystine/glutamate antiporter xCT subunit., *J Cell Physiol.*, 226(2011), 2953-2964, 査読有 DOI:

10.1002/jcp.22642.

- ③ Uno, K., Takarada, T., Nakamura, Y., Fujita, H., Hinoi, E., Yoneda, Y., A negative correlation between expression profiles of runt-related transcription factor-2 and cystine/glutamate antiporter xCT subunit in ovariectomized mouse bone., *J Pharmacol Sci.*, 115(2011), 309-319, 査読有 DOI: 10.1254/jphs.10310FP
- ④ Hinoi, E., Yoneda, Y., Possible involvement of glutamatergic signaling machineries in pathophysiology of rheumatoid arthritis., *J Pharmacol Sci.*, 116(2011), 248-256, 査読有 DOI: 10.1254/jphs.11R03CR

[学会発表] (計 2 件)

- ① 檜井栄一、骨組織を中心とした多臓器間ネットワークによる生理機能調節機構、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、京都国際会議場 (京都府)
- ② 檜井栄一、中谷絵莉、宝田剛志、米田幸雄、骨細胞由来因子 Growth differentiation factor 15 による破骨細胞活性制御、第 84 回日本薬理学会年会 (誌上開催)、2011 年 3 月 22 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書] (計 1 件)

- ① Hinoi, E., Control of bone remodeling by nervous system. Regulation of glucose metabolism by skeleton - Tangent point with nervous system-. *Clinical Calcium*, 20(2010), 1814-1819.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：破骨細胞が関与する疾患の予防剤及び
／又は治療剤

発明者：米田幸雄、檜井栄一、山本朋未、家
崎高志、石浦遼

権利者：金沢大学

種類：特許

番号：特願 2011-238455 号

出願年月日：2011 年 10 月 31 日

国内外の別：国内

名称：幹細胞から褐色脂肪細胞への分化誘導
促進剤

発明者：米田幸雄、檜井栄一、高田紗矢、中
村由香里、橋詰翔太

権利者：金沢大学

種類：特許

番号：特願 2010-290024 号

出願年月日：2010 年 12 月 27 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~yakubutu
/index.html](http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~yakubutu/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜井 栄一 (HINOI EIICHI)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：70360865

(2) 研究分担者

宝田 剛志 (TAKARADA TAKESHI)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：30377428

(3) 連携研究者

該当なし