

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 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22659267

研究課題名（和文） $G\alpha q$ 蛋白シグナルの骨組織における選択的制御による新規骨形成促進薬の開発

研究課題名（英文） Development of novel osteoanabolic agents by selective inhibition of Gq signal in osteoblasts

研究代表者

緒方 直史 (OGATA NAOSHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10361495

研究成果の概要（和文）：PTHによる骨形成促進作用を減弱させる $G\alpha q$ シグナルに対して、RGS-2の発現調節による骨芽細胞分化への作用を検討し、RGS-2により $G\alpha q$ シグナルが有意に抑制され、RGS-2を強制発現させることでPTHの骨形成促進作用が増強された。一方、我々の持つ天然低分子化合物ライブラリーより、 $G\alpha q$ シグナルの抑制効果のある薬剤のスクリーニングを行ったが、我々の持つライブラリーの中では $G\alpha q$ シグナルの抑制効果のある薬剤は検出できなかった。

研究成果の概要（英文）：We have analyzed whether RGS-2 overexpression in osteoblasts will suppress Gq signal which is known to inhibit osteoblast differentiation leading enhancement of PTH osteoanabolic effect. RGS-2 suppressed Gq signal and inhibited osteoblast differentiation. We have also screened small compounds that would suppress Gq signal, like RGS-2, in osteoblasts using our small compound library consisted of 20000 compounds. However, we could not find the small compounds that suppress both Gq signal and enhance PTH effect on osteoblast differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	450,000	3,350,000

研究分野：医歯薬学

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：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

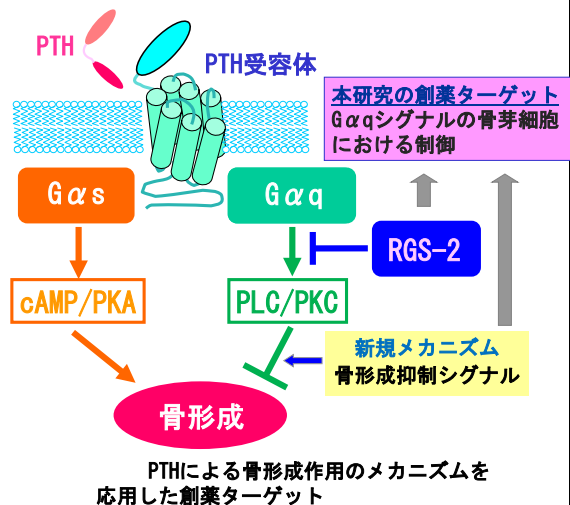
超高齢化社会を目前にして、年々増加する骨粗鬆症患者への治療対策が社会的急務となっている。骨粗鬆症治療は今まで骨吸収抑制療法が中心であったが、骨形成促進剤として初めてPTHが臨床で用いられるようになり、

良好な臨床結果が得られている。しかし、PTHの薬理効果の詳細な分子メカニズムは未だ不明であり、安全性の問題から期限付きの認可となっており、PTHより安全で、強力な骨形成促進作用を持つ新規薬剤の開発が切望されている。PTHの骨形成シグナルには、

G α s 蛋白を介したシグナルが主要な経路と考えられてきたが、我々はもう一方の G α q シグナルに骨形成抑制作用があることを明らかにし、さらに骨芽細胞特異的な G α q 遺伝子欠損マウスにおいて PTH の骨形成作用が増強されたことから、G α q シグナルを制御することにより、骨同化作用を調節することが可能となる事を明らかにした。しかし、G α q 蛋白は生体機能維持に重要な蛋白であり、全組織で制御した場合致死となるため、骨組織特異的な G α q シグナルの制御が必要となる。近年、G 蛋白シグナルの新たな制御蛋白として RGS (Regulator of G protein coupled receptor Signaling) が同定され、その中でも RGS-2 が G α q シグナルを特異的に抑制することから、RGS-2 による G α q シグナル制御の可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、この RGS-2 による骨組織における G α q シグナル制御を検討すると共に、RGS-2 に関連する新規 G α q シグナル制御分子を天然化合物ライブラリーより探索し、それらの骨形成性能の有無を検討することで、G α q 蛋白シグナルの選択的制御を応用した、新規の骨形成促進作用を持つ骨粗鬆症治療薬の開発に繋げることを目的とした。



3. 研究の方法

①RGS-2 による骨芽細胞での G α q シグナル制御及び骨芽細胞分化の検討

RGS-2 による G α q シグナルの抑制効果が骨芽細胞で見られるか検討し、その効果による骨芽細胞分化への検討を行う。骨芽細胞前駆細胞株である MC3T3-E1 細胞とマウス胎児頭蓋骨由来の初代骨芽細胞を用いて、RGS-2 のアデノウイルスを作製した後、遺伝子導入による強制発現させる。その後、各細胞における G α s および G α q シグナルの活性を、PKC 活性および cAMP の蓄積を、ELISA を用いて測定する。同時にレトロウイルス導入により、MC3T3-E1 細胞の RGS-2 安定発現細胞株を樹立

する。その細胞を 1-4 週間、骨芽細胞分化誘導培養液を用いて培養し、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現解析、ALP 染色や Von Kossa 染色による基質産生の評価を行う。同時に PTH 間欠投与の併用による分化増強効果についても検討する。他の既知の RGS (現在 23 種類同定) についても同様に、骨芽細胞に導入後、G 蛋白シグナル活性と分化への影響を評価する。

②G α q シグナルの選択的抑制作用を有する分子化合物のスクリーニングとその網羅的検索

我々の持つ天然低分子化合物ライブラリーより、G α q シグナルの抑制効果のある薬剤のスクリーニングから行う。G α q シグナルの下流では PLC を介して PKC が活性化され、一方、PTH のメインパスウェイである G α s シグナルの活性化により cAMP が蓄積される。PKC の活性および cAMP の蓄積は、ELISA を用いて網羅的に測定できる PKC assay-kit (Invitrogen 社製)、cAMP assay-kit (Amersham Bioscience 社製) を用いることで一度に大量のサンプルを用いて計測することが可能である。96 穴プレートに骨芽細胞前駆細胞株である MC3T3-E1 細胞を培養し、天然低分子化合物ライブラリー由来の化合物約 2,500 種を、PTH 存在下あるいは非存在下で添加し、cAMP の蓄積および PKC の活性を計測し、低分子化合物による G α s シグナル、G α q シグナルの活性化、あるいは PTH 存在下での G α s シグナル、G α q シグナルへの活性化誘導能を計測する。この中で、特に PKC の活性を制御する低分子化合物を中心にスクリーニングする。

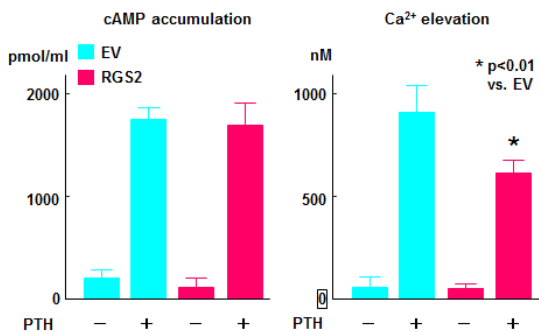
③候補化合物による骨芽細胞分化誘導能の検討およびその作用に関与するシグナル分子の検索

A. 骨芽細胞分化誘導の検討: G α q 蛋白質シグナルの選択的阻害作用を持つ低分子化合物の同定後、また効率的な G α q シグナル抑制効果のある構築後、それらに骨芽細胞分化促進作用があるかを、申請者らが開発した骨芽細胞分化検出システムである Coll1a1-GFP システムを用いて検討する (下図)。同時にスクリーニングした薬剤単体での分化促進作用のみではなく、上記システムに PTH を間欠投与し、それら薬剤による PTH の分化増強作用があるかを検討する。

B. 細胞毒性・至適濃度の検討: ①により明らかとなった候補化合物について、MC3T3-E1 細胞を用いて化合物処理濃度を段階的に変えて骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現解析、ALP 染色や Von Kossa 染色による基質産生の評価を行う。さらに細胞増殖率を指標にして細胞毒性試験を行う。これにより骨分化誘導能を検証し、その至適濃度・用量を明らかにする。

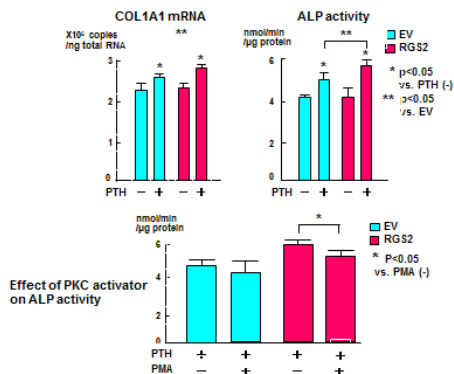
4. 研究成果

①RGS-2によるGαqシグナルの抑制効果が骨芽細胞で見られるか検討し、その効果による骨芽細胞分化への検討を行った。骨芽細胞前駆細胞株であるMC3T3-E1細胞とマウス胎児頭蓋骨由来の初代骨芽細胞を用いて、RGS-2のアデノウイルスを作製した後、遺伝子導入による強制発現させた。その後、各細胞におけるGαsおよびGαqシグナルの活性を、Ca活性およびcAMPの蓄積を、ELISAを用いて測定したところ、PTH刺激後のcAMPの蓄積は両者で違いはなかったが、PTH刺激による細胞内Ca蓄積はRGS-2強制発現により有意に減少した(図)。



RGS-2を過剰発現させ、PTH投与後のcAMP蓄積とカルシウム濃度を測定

②MC3T3-E1細胞のRGS-2安定発現細胞株を樹立し、その細胞を1-4週間、骨芽細胞分化誘導培養液を用いて培養し、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現解析、ALP染色やVon Kossa染色による基質産生の評価を行ったところ、PTH間欠投与により、分化増強効果は有意に上昇していた(図)。またその増強効果はGqシグナルの活性剤投与により抑制されたことから、Gqシグナル効果と考えられた。



RGS2を安定的に過剰発現させたMC3T3E1細胞におけるPTH投与による分化の検討

以上より、骨芽細胞において、RGS-2によりPTH下流に存在する骨形成抑制効果を持つGαqシグナルが有意に抑制されることが確認され、またRGS-2を強制発現させることで、PTHの骨形成促進作用を増強させることが確認された。

③一方、我々の持つ天然低分子化合物ライブラリーより、Gαqシグナルの抑制効果のある薬剤のスクリーニングを行った。Gαqシグナルの下流ではPLCを介してPKCが活性化され、一方、PTHのメインパスウェイであるGαsシグナルの活性化によりcAMPが蓄積される。PKCの活性およびcAMPの蓄積は、ELISAを用いて網羅的に測定できるPKC assay-kit (Invitrogen社製)、cAMP assay-kit (Amersham Bioscience社製)を用いることで一度に大量のサンプルを用いることが可能であったが、我々の持つ20000種類の天然低分子化合物の中ではGαqシグナルの抑制効果のある薬剤は検出できなかった。今後さらなる化合物をスクリーニングしていく予定である。

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1件) 査読有り
Ogata N, Shinoda Y, Wettchurack N, Offermanns S, Takeda S, Nakamura K, Segre GV, Chung UI, Kawaguchi H. G alpha(q) signal in osteoblasts is inhibitory to the osteoanabolic action of parathyroid hormone. *J Biol Chem.* 2011 15;286(15):13733-413740.

[学会発表] (計1件)
緒方直史、鄭雄一、川口浩、中村耕三; PTHによる骨形成促進作用の分子メカニズム: 第28回 日本骨代謝学会学術集会、2010年7月21日、東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]
 ○出願状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緒方 直史 (OGATA NAOSHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：22659267

(2) 研究分担者

齋藤 琢 (SAITO TAKU)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：30456107

三浦 俊樹 (MIRURA TOSHIKI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20376479

(3) 連携研究者

なし