

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 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659365

研究課題名（和文） 細胞周期分子 Cdk4/6 を利用した新規骨疾患治療法の開発

研究課題名（英文） Novel therapeutic approaches to bone diseases using cell cycle factors Cdk4/6

研究代表者

小笠原 徹 (OGASAWARA TORU)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20359623

研究成果の概要（和文）：

本研究は細胞周期関連分子（Cdk4/6）を利用した新たな骨粗鬆症・遺伝性骨疾患治療薬の開発を目指して計画された。まず、*in vitro* において Cdk4 あるいは Cdk6 を抑制するだけでなく、骨芽細胞分化能を促進する Cdk 活性阻害物質を同定した。さらに、その作用機序を解明するために、下流で働く因子を網羅的手法によって検索し、下流因子として Zinc フィンガータンパクや G タンパク共有受容体等の存在を見出した。また、それらについて実際の細胞内遺伝子発現レベルの確認と細胞内機能解析を行った。*in vivo* においては、ある遺伝子のヘテロ欠損マウスが呈する骨系統疾患の表現形が、細胞周期制御によって部分的にレスキューされることを明らかにした。すなわち、本研究によって、細胞周期制御を介して骨分化能がコントロール可能であること、また、骨系統疾患の治療が可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to develop novel therapeutic approaches to bone diseases using cell cycle factors, Cdk4/6. First, we investigated the effects of several Cdk inhibitors on osteoblast differentiation. We discovered that some Cdk inhibitors could alter osteoblast differentiation. In addition, to identify downstream molecules involved in the promotion of osteogenic differentiation by Cdk inhibition, we performed a DNA microarray analysis. From the up-regulated genes, we selected several genes as candidates which could regulate osteogenic differentiation as downstream effectors of Cdk inhibition. Among these genes, we focused on Zinc finger proteins or G protein-coupled receptors etc., in consideration of both the expression change and findings gathered from the literature. Real-time quantitative RT-PCR analyses confirmed that there were up-regulations of some of candidate genes. Next, to investigate the functional relevance of such genes to the osteogenic differentiation promoted by Cdk inhibition, we knocked down candidate genes through small RNA interference (siRNA). Moreover, we generated several double mutant mice to investigate the effects of Cdk inhibition *in vivo*. One of double mutant mice proved that the phenotype in some knockout mice was partially rescued by Cdk inhibition. In conclusion, the results of this study imply that the modulation of Cdks may lead to novel therapeutics to treat bone catabolic disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	0	1,100,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	510,000	3,310,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：骨再生 細胞周期 遺伝子操作マウス 骨系統疾患 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞を作用点とするビスフォスフォネート (BP) は有用な骨粗鬆症治療薬であるが、特に口腔外科領域で問題となる顎骨壊死 (BRONJ) という副作用が指摘されているため、新たな戦略に基づく治療薬の開発が待たれている。また、頭蓋顎顔面領域に関連する遺伝性骨疾患である、鎖骨頭蓋異形成症 (Cleidocranial dysplasia: CCD) や進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: FOP) は、原因遺伝子は違うものの、いずれも骨形成を司る遺伝子の異常によって起こる遺伝性骨疾患であり、有効な治療法は見つかっていない。CCD は全身骨格に骨化の遅延を認め、鎖骨低形成、頭蓋骨縫合骨化遅延、歯牙萌出遅延を特徴とする疾患で、その原因は Runx2 遺伝子のヘテロ欠損である (Mundlos et al. Cell. 1997)。また、Runx2 のホモ欠損マウスでは骨形成が全く欠如し、ヘテロ欠損マウスではヒトの場合と同様に CCD の表現系を呈すること (Komori et al. Cell. 1997)、ヘテロ欠損マウスの表現形は、Runx2 の活性化機能を持つ MAPK/ERK1 を過剰発現するマウスとの交配を行うことで、部分的にレスキューされる (Ge C et al. J Cell Biol. 2007) ことも報告されている。また、筋肉が骨に置き換わり徐々に体の自由が奪われていく FOP の原因が、BMP I 型受容体遺伝子の恒常活性型変異である (Shore et al. Nat Genet. 2006) こと、組織特異的に BMP4 を発現するトランスジェニックマウスの表現形はヒトの FOP と酷似し、その表現形は、BMP のインヒビターである Noggin を過剰発現するマウスと交配することでレスキューされる (Kan et al. Am J Pathol. 2004) ことも報告されている。つまり、CCD は骨形成に必須の転写因子である Runx2 遺伝子のヘテロ欠損、FOP は骨形成に重要な BMP シグナルを伝達する BMP I 型受容体の変異により起こることが報告され、両者は、骨分化制御機構の中心である Runx2 あるいは BMP の異常による疾患であることが明らかとなった。そして、少なくともマウスモデルでは、その機能異常をコントロールすることで、CCD や FOP の病態を改善しうることが示唆されていた。

また、細胞周期研究の世界では、相同性の高い Cdk4 と Cdk6 の間で、その基本的な機能に違いはないと想定されていたが、われわれの

研究成果により、生理的条件下においては Cdk6 が骨芽細胞・破骨細胞・軟骨細胞の分化を抑制していることが明らかとなっていた (Ogasawara et al. Mol Cell Biol 2004, J Bone Miner Res 2004, Moro, Ogasawara et al. J Cell Physiol 204 2005)。つまり、Cdk6 の制御を通じて骨系統細胞の分化あるいは骨格形成を制御出来る可能性が指摘されていた。さらに、相同性の高い Cdk4 にも骨系統細胞分化制御機構への関与が想定されていた。

2. 研究の目的

本研究は Cdk4 と Cdk6 のコントロールによって骨分化が制御可能であるという仮説に基づき、新規骨疾患治療法開発に挑戦することを目的として企画・遂行された。

3. 研究の方法

(1) 安全な Cdk6 阻害剤であるインドール-3-カルビノールをはじめとした Cdk 活性阻害剤を骨芽細胞培養液に添加して細胞を培養した後、細胞から抽出した mRNA をリアルタイム RT-PCR に供して、オステオカルシン等の各種骨芽細胞分化マーカーの変化を解析するとともに、ALP 染色等の染色法も併用しながら、Cdk 活性阻害による骨芽細胞分化能の変動を総合的に評価した。

(2) Cdk 活性阻害剤が Cdk 活性のみならず、骨芽細胞分化能をも変化させることが分かったため、その作用メカニズムを明らかとする目的で、コントロール細胞と Cdk を抑制した細胞との間で網羅的手法による解析を行った。

(3) 網羅的手法で同定された因子から、遺伝子変動率と文献的検索結果を考慮して重要な因子をピックアップした。その後、実際の細胞内遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR によって確認した。細胞内でも遺伝子発現が変化することが確認された分子については、siRNA による遺伝子ノックダウンを利用して細胞内機能解析を行った。

(4) 各種遺伝子操作マウスの交配によりダブルミュータントマウスを作製し、それらダブルミュータントマウスの全身の X 線学的

検査、骨格標本作成等を実施して、in vivo における遺伝学的手法を用いた Cdk 阻害による骨粗鬆症・遺伝性骨疾患の治療効果を検討した。

4. 研究成果

(1) まず基礎検討として、骨分化を向上させる可能性を持つと想定されていた Cdk 活性阻害物質を骨芽細胞培養液に添加し、骨芽細胞分化の変動を検討することで、in vitro における Cdk 活性阻害物質の骨分化に対する影響を解析した。そして、in vitro において Cdk4 あるいは Cdk6 を抑制するだけでなく、同時に骨芽細胞分化能を促進する Cdk 活性阻害物質を同定した。

(2) in vitro において Cdk4 あるいは Cdk6 を抑制するだけでなく、同時に骨芽細胞分化能を促進する Cdk 活性阻害物質が同定されたため、それらの作用機序を明らかとする目的で、下流で働く因子を網羅的手法によって検索し、細胞周期制御と骨分化の両方に関わる候補因子として複数の Zinc フィンガータンパクや G タンパク共有受容体等の存在を見出した。また、それらの遺伝子に関して実際の細胞内遺伝子発現を確認するためにリアルタイム RT-PCR を行い、実際に細胞内でも遺伝子発現が変化することが確認された遺伝子については、siRNA による遺伝子ノックダウンを利用して細胞内機能解析を行った。そして、いくつかの遺伝子をノックダウンすることで、骨芽細胞分化能が抑制されることを発見した。

(3) in vivo においては、各種遺伝子操作マウスの飼育・ダブルノックアウトマウスの作製ならびに解析を進めた。そして、ある遺伝子のヘテロ欠損マウスが呈する骨系統疾患の表現形が、細胞周期を制御する遺伝子とのダブルミュータントマウスを作成することで部分的にレスキューされることを明らかとした。すなわち、本研究によって、in vitro だけでなく in vivo においても、細胞周期制御を介して骨分化能がコントロール可能であること、ならびに、骨系統疾患の治療が可能であることが示唆された。

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)

①Ogasawara T, Ohba S, Yano F, Kawaguchi H, Chung UI, Saito T, Yonehara Y, Nakatsuka T, Mori Y, Takato T, Hoshi K. Nanog promotes osteogenic differentiation of

the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2 by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling.

J Cell Physiol. 2013 Jan;228(1):163-71. doi:10.1002/jcp.24116. PubMed PMID: 22585661. 査読有

②Ogasawara T, Mori Y, Abe M, Suenaga H, Kawase-Koga Y, Saijo H, Takato T. Role of cyclin-dependent kinase (Cdk)6 in osteoblast, osteoclast, and chondrocyte differentiation and its potential as a target of bone regenerative medicine.

Oral Sci Int. 2011 May; 8(1):2-6. http://dx.doi.org/10.1016/S1348-8643(11)00007-3 査読有

③Chikazu D, Fujikawa Y, Fujihara H, Suenaga H, Saijo H, Ohkubo K, Ogasawara T, Mori Y, Iino M, Takato T.

Cyclooxygenase-2 activity is important in craniofacial fracture repair. Int J Oral Maxillofac Surg. 2011 Mar;40(3):322-6. doi:10.1016/j.ijom.2010.10.011. PubMed PMID: 21081265. 査読有

④Ogata N, Shinoda Y, Wettschureck 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 Apr 15;286(15):13733-40. doi: 10.1074/jbc.M110.200196. Epub 2011 Feb 23. PubMed PMID:21345793; PubMed Central PMCID: PMC3075717. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

①Ogasawara T, Ohba S, Yano F, Kawaguchi H, Abe T, Takato T, Hoshi K.

Nanog promotes osteogenic differentiation of mesenchymal cells by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling. 2011 annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research September 17, 2011 San Diego, California, USA

②斎藤 忠仁, 小笠原 徹, 森 良之, 近津 大地, 阿部 雅修, 末永 英之, 白土 博司, 高戸 毅, 米原 啓之
間葉系細胞において Nanog は BMP シグナルを増強する。

第64回日本口腔科学会学術集会

2010年6月24-25日 北海道札幌市

[図書] (計1件)

①小笠原 徹 ほか

注意すべき骨系統疾患患者が来院したら？
医師・歯科医師のための口腔診療必携 困ったときのマニュアル・ヒント集 202, 195 高
戸 毅 監修, 金原出版, 東京, 2010
総ページ数 263

[その他]

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小笠原 徹 (OGASAWARA TORU)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20359623

(2) 研究分担者

筑田 博隆 (CHIKUDA HIROTAKA)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30345219

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

(3) 連携研究者

なし ()