

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 8日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790062

研究課題名（和文）骨組織選択的なエストロゲンおよびアンドロゲン受容体作働薬の解析

研究課題名（英文）Analysis of bone selective estrogen and androgen receptor modulators.

研究代表者

平田 美智子 (HIRATA MICHIKO)

東京農工大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：40544060

研究成果の概要（和文）：

骨は骨吸収と骨形成のバランスにより、一定の骨量を維持する。骨代謝は性ホルモンにより制御され、性ホルモン欠乏により骨粗鬆症を発症する。高齢化社会の到来により、男女両性の骨粗鬆症患者の増加により、性差を越えた安全性の高い薬剤の開発が必須となっている。本研究では、カルボラン化合物が骨選択的な治療効果を発揮し、生殖器への作用を回避した、新規な骨粗鬆症治療薬の候補化合物となりうることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

Bone remodeling is regulated by osteoclastic bone resorption and new bone formation. Estrogen deficiency induced by menopause results in marked bone loss in women. The elderly men exhibit marked bone loss due to androgen deficiency. We developed the new anti-osteoporosis drugs with minimal undesired effects on reproductive tissues. Carboranes restored bone loss in ovariectomized mice and orchidectomized mice without estrogenic activity or androgenic action in the sex organs. Therefore, Carboranes are novel selective estrogen receptor modulators (SERM) that may offer a new therapy option for osteoporosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：骨粗鬆症、エストロゲン、アンドロゲン、受容体作働薬

1. 研究開始当初の背景

からだを支える骨は、古い骨を壊す『骨吸収』と新たな骨を造る『骨形成』のバランスにより、一定の骨量を保っている。骨の代謝は性ホルモンにより制御されており、女性では、閉経により女性ホルモン（エストロゲン）が欠乏すると閉経後骨粗鬆症、男性では、加

齢により男性ホルモンが低下すると老年性骨粗鬆症を発症する。

骨粗鬆症治療薬としては、ビスホスホネートなど骨吸収抑制剤の開発が先行してきた。一方、エストロゲン補充療法は子宮がんのリスクの懸念から汎用に至っていない。現在、閉経後骨粗鬆症の治療に用いられる選択的

エストロゲン受容体作働薬 (SERM) は、ラロキシフェンが臨床応用に至っている。しかし、ラロキシフェンの適用は女性に限られる。そこで、近年、罹患者の増加が懸念される、男性の老人性骨粗鬆症の治療に有効な因子の開発が期待されている。

申請者はこれまでの研究において、新規のカルボラン化合物が骨組織選択的にエストロゲン作用を示し、女性骨粗鬆症に治療効果を発揮することを見出した。カルボラン (ジカルバ-closo-ドデカボラン) とは、炭素原子を含む多面体ホウ素クラスターであるカルボラン骨格を有する化合物であり、熱安定性に優れ、疎水性を特徴とする (図1)。カルボラン化合物の立体形状がステロイドホルモンに類似性を示し、ドッキングシミュレーションにおいて、エストロゲン受容体への結合性が明らかとなった。そこで、女性の閉経後骨粗鬆症のモデル動物である卵巣摘出マウスに新規カルボラン化合物 (BE360) を投与したところ、エストロゲン欠乏により亢進する骨吸収と骨破壊が改善され、骨粗鬆症に予防・治療効果を有することを CT 解析ならびに骨密度測定により明らかとした (Hirata M et. al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 380: 218-222, 2009)。加えて、BE360 は副次作用である女性生殖器へのエストロゲン作用を示さず、子宮内膜増殖作用を認めなかった。さらに、男性骨粗鬆症モデル動物である精巣摘出マウスにおいても、BE360 は骨量回復作用を発揮し、男性生殖器への作用は認められなかった。これら結果より、BE360 を初めとしたカルボラン化合物は生殖器への作用を回避した、骨選択的に作用するエストロゲン受容体作働薬として、男女の両性に適用可能な治療因子となりうる可能性を示唆した。

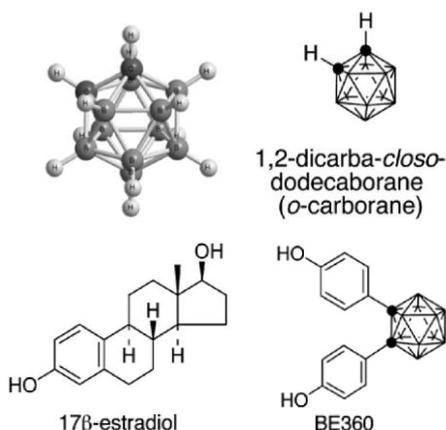


図1. カルボラン化合物の構造

2. 研究の目的

骨組織は『骨吸収』と『骨形成』の balan

スにより、一定の骨量を保っている。骨代謝は性ホルモンにより制御され、女性は閉経によりエストロゲンが欠乏すると閉経後骨粗鬆症、男性は加齢によるアンドロゲン低下により、老人性骨粗鬆症を発症する。申請者はカルボラン化合物である BE360 が、雌雄両性の骨粗鬆症モデルマウスにおいて、副作用である生殖器への作用なしに、骨組織選択的な作用を示すことを見出した。本研究課題では、カルボラン化合物の新規構造展開と骨組織への有効性評価を実施する。具体的には、新規カルボラン化合物である BE380 と BE381 (図2) を用い、その生理活性評価、骨組織への特異性と有効性評価、生殖器への作用評価を検証し、男性と女性の双方に効果を示す、新規のエストロゲン/アンドロゲン受容体作働薬の評価を行った。

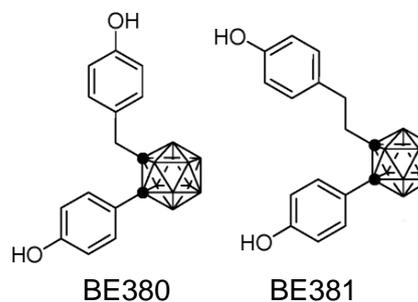


図2. BE380 と BE381 の構造式

3. 研究の方法

(1) BE380 ならびに BE381 のエストロゲン受容体への結合解析を行なった。エストロゲン応答配列を用い、シグナル伝達と転写活性を比較した。

①エストロゲン受容体への結合活性

新規カルボラン化合物 BE380 および BE381 のエストロゲン受容体 (ER α , ER β) への結合親和性を検討した。組換え体ヒト ER α 、ヒト ER β を用い、蛍光偏光法により解析した。

②エストロゲン応答配列を介したシグナル伝達

ERE (estrogen response element) への応答活性をルシフェラーゼアッセイにより解析した。乳がん細胞に ERE を組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターを導入し、BE380 あるいは BE381 で処理した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

①②項目の解析により、BE380 および BE381 がエストロゲン様作用を示すかを見極め、雌雄マウスの In vivo 評価に用いる優先順位を決定した。

(2) 新規カルボラン化合物 BE380 および

BE381 が骨選択的な作用を示すかを明らかにするため、以下の実験系における投与実験を実施した。

①女性骨粗鬆症モデル動物を用いた解析

女性骨粗鬆症モデル動物として、雌性で卵巣摘出(OVX)マウスを作成した。術後4週において、大腿骨と子宮を摘出した。骨の解析は、破骨細胞の分化と骨密度解析、CT解析により評価した。大腿骨の骨密度(BMD; bone mineral density)はDEXA(dual energy X-ray absorptiometry)を用いて定量化した。また、マイクロCT解析により大腿骨遠位部における海綿骨の解析を行なった。女性生殖器への作用として、子宮重量を計測し、組織切片の作製により病理学的に観察した。

②男性骨粗鬆症モデル動物を用いた解析

男性骨粗鬆症モデル動物として、雄性で精巣摘出(ORX)マウスを作製した。術後4週において、大腿骨と精嚢腺を摘出した。大腿骨の解析法は上記①の場合と同様に行なった。また、精嚢腺は重量計測し、病理学的解析も行なった。

4. 研究成果

(1) -①エストロゲン受容体への結合活性

組換え体ヒト ER α 、ヒト ER β を用い、蛍光偏光法により解析した。その結果、エストロゲン受容体への結合活性は、BE360とBE381は強力な結合活性を示し、その強度はエストラジオールに匹敵した。BE380のエストロゲン受容体への結合活性は、BE360やBE381に比較して低下した。従って、類似構造のカルボラン化合物でも、カルボラン骨格の一方が延びることにより結合活性が変化することが明らかとなった。

(1) -②エストロゲン応答配列を介したシグナル伝達

乳がん細胞にEREを組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターを導入し、エストロゲン応答配列を介した転写活性を検討したところ、BE380はアゴニスト活性を示し、一方、BE381はアンタゴニスト活性を示した。BE360はアンタゴニスト活性を示すが、高い濃度では、弱いアゴニスト活性を示した。これら知見は今後の骨選択治療薬の開発における基盤知見となった。

(2) -①女性骨粗鬆症モデル動物を用いた解析

女性骨粗鬆症モデル動物として雌性の卵巣摘出(OVX)マウスを用いた解析では、BE360、BE380、BE381すべてにおいて、OVXと比べ大腿骨骨量の回復が認められた(図3)。また、骨梁幅(Tb.Th)ならびに骨梁数(Tb.N)の増加、骨量間隙(Tb.Sp)の低下も確認された。子宮重量の変化は認められなかった(図4)。

(2) -②男性骨粗鬆症モデル動物を用いた解析

男性骨粗鬆症モデル動物として雄性マウスに精巣摘出(ORX)を施した解析において、BE380とBE381はORXと比べ大腿骨骨密度の回復が認められ、BE360は偽手術マウスレベルまで回復した。また、全てのカルボラン化合物は貯精嚢の重量には影響を及ぼさなかった。

本研究により、カルボラン化合物は骨へ選択的に作用して生殖器へのリスクを回避でき、男性と女性の双方に骨選択的に治療効果を発揮する、性差を越えた新規骨粗鬆症治療薬の候補となりうることを明らかとした。

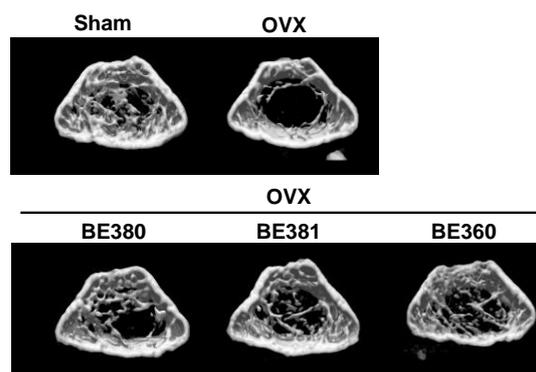


図3. 卵巣摘出マウスの骨量におけるカルボラン化合物の投与効果(大腿骨マイクロCT画像)

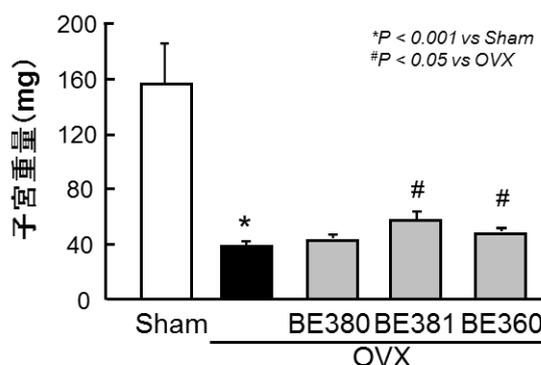


図4. 卵巣摘出マウスの子宮重量におけるカルボラン化合物の投与効果

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① Tominari T, Hirata M, Matsumoto C, Inada M, Miyaura C、Polymethoxy flavonoids, nobiletin and tangeretin, prevent lipopolysaccharide-induced inflammatory bone loss in an experimental model for periodontitis.、J. Pharmacol. Sci、査読有、2012、印刷中
 - ② Kobayashi M, Matsumoto C, Hirata M, Tominari T, Inada M and Miyaura C、The correlation between postmenopausal osteoporosis and inflammatory periodontitis regarding bone loss in experimental models.、Exp. Anim.、査読有、61(2)、2012、183-187
 - ③ Kobayashi M, Watanabe K, Yokoyama S, Matsumoto C, Hirata M, Tominari T, Inada M and Miyaura C、Capsaicin, a TRPV1 ligand, suppresses bone resorption by inhibiting the prostaglandin E production of osteoblasts, and attenuates the inflammatory bone loss induced by lipopolysaccharide.、ISRN. Pharmacol.、査読有、(DOI) 10.5402/2012/439860、巻号(2012)、2012
 - ④ Harada S, Tominari T, Matsumoto C, Hirata M, Takita M, Inada M, Miyaura C、Nobiletin, a polymethoxy flavonoid, suppresses bone resorption by inhibiting NF κ B-dependent prostaglandin E synthesis in osteoblasts, and prevents bone loss due to estrogen deficiency、J. Pharmacol. Sci.、査読有、115(1)、2011、89-93
 - ⑤ Hirata M, Kobayashi M, Matsumoto C, Miyaura C, Asakura T, Inada M、Cell Shape and Matrix Production of Fibroblasts cultured on fibroin-organized scaffold with type-II β -turn structured (Ala-Gly-Ala-Gly-Ser-Gly)_n sequences.、J. Health Sci.、査読有、56(6)、2010、738-744
- [学会発表] (計12件)
- ① Hirata M、 β -Cryptoxanthin, A Citrus Xanthophyl Carotenoid Prevents Inflammatory Bone Loss of Alveolar Bone in the Model for Periodontal Disease.、American Society For Bone and Mineral Research 2011、2011年9月16日~20日、San diego, California, USA
 - ② Matsumoto C、Toll-like Receptor 2 Heterodimer, TLR1/2 and TLR2/6, Induces Inflammatory Bone Loss via PGE2 Production by Osteoblasts.、American Society For Bone and Mineral Research 2011、2011年9月16日~20日、San diego, California, USA
 - ③ 高木梨名、Daidzeinの皮膚細胞に対する生理活性、第84回日本生化学会大会、2011年9月21日~24日、国立京都国際会館(京都府)
 - ④ 青木崇史、ビタミンD3の脂肪細胞分化への影響、第84回日本生化学会大会、2011年9月21日~24日、国立京都国際会館(京都府)
 - ⑤ 門間奈津希、抗酸化物質の細胞に与える影響の解析、第84回日本生化学会大会、2011年9月21日~24日、国立京都国際会館(京都府)
 - ⑥ 松本千穂、Toll-like receptor 2ヘテロ受容体 (TLR1/2, TLR 2/6) シグナルによる炎症性骨吸収の亢進、第29回日本骨代謝学会学術集会、2011年7月30日、大阪国際会議場(大阪府)
 - ⑦ 松本千穂、ガレート基含有カテキンは骨芽細胞におけるプロスタグランジンE産生を制御して炎症性骨吸収を抑制する、日本骨代謝学会学術集会、2010年7月21日~23日、京王プラザホテル(東京都)
 - ⑧ 清水和、皮膚細胞の増殖と分化を制御するステロイド性因子の解析、第83回日本生化学会大会、2010年12月10日、神戸ポートアイランド(兵庫県)
 - ⑨ 高田秀春、脂肪細胞の分化と脂肪蓄積におけるプロスタグランジンE₂の関与、第83回日本生化学会大会、2010年12月10日、神戸ポートアイランド(兵庫県)
 - ⑩ 増井聡美、血管内皮細胞による管腔形成制御の解析、第83回日本生化学会大会、2010年12月10日、神戸ポートアイランド(兵庫県)
 - ⑪ 小林愛、脂肪前駆細胞の分化成熟におけるコラーゲン産生の解析、第83回日本生化学会大会、2010年12月10日、神戸ポートアイランド(兵庫県)
 - ⑫ Chiho Matsumoto、Catechins with Gallate Moiety Suppress Bone Resorption by Inhibiting Prostaglandin Biosynthesis and RANKL Expression in Osteoblasts, Tumor Growth and Bone Metastasis of Cancer.、ASBMR 2010、2010年10月17日、Toronto, Ontario, Canada

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 美智子 (HIRATA MICHIKO)
東京農工大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：405444060

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし