

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659824

研究課題名(和文)PTH様骨形成化合物の新規スクリーニングシステムの構築

研究課題名(英文)Establishment of a novel screening system to isolate PTH-like osteogenic small compounds

研究代表者

西村 理行(Nishimura, Riko)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60294112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：PTH(副甲状腺ホルモン)は骨粗鬆症を始めとする骨疾患治療薬として注目されている。しかしPTHは、高価であり、副作用による投与制限という課題を抱えている。そこで本研究計画では、PTHの骨形成作用を代替する低分子化合物をスクリーニングするシステム開発への知見の集約を目指した。PTHへの反応性を有する骨芽細胞株としてSaOS2がスクリーニングに有用であることが明らかとなった。またPTHの標的分子を探索した結果、Wnt5aが候補遺伝子であると見出された。したがって、Wnt5a遺伝子プロモーター活性を指標にしたスクリーニングシステムの開発が、骨形成を促進する低分子化合物の探索に活用できると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Parathyroid hormone (PTH) has been shown to be an effective therapeutic agent for bone diseases such as osteoporosis. However, PTH has two major problems; high cost and limitation of term due to its possible side effect. Thus, we have attempted to contribute to development of screening systems that can allow us to explore the small compounds to mimic osteogenic action of PTH. We found that an osteoblastic cell line, SaOS2, is useful and suitable for the screening system. We also attempted to identify the target genes of PTH. Our data suggest that Wnt5a would be a target gene of PTH during bone formation. Our study suggests that a screening system in which we can determine the Wnt5a gene promoter activity would be helpful for developing the therapeutic bone forming small compounds.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：PTH 骨形成 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

副甲状腺ホルモン PTH は、間歇的投与により骨形成を促進することが見出され、我が国でも骨粗鬆症治療薬として臨床応用されはじめています。特に PTH は、ビスホスホネート製剤などの骨吸収抑制剤とは異なり、骨リモデリングを促進すると見込まれており、その効果に注目が集まっています。また歯科領域においても、PTH が、歯周病によって吸収された骨組織の回復、抜歯窩の創傷治癒の改善などの効果を有することが報告されている (N Engl J Med 363 : 2396-)。このように PTH は、骨形成賦活薬として脚光を浴びているが、ビスホスホネートなどの骨粗鬆症治療薬と比較して高価であることが、臨床上の課題となっている。そこで、PTH の骨形成促進効果を代替できる低分子化合物の開発が期待されているが、PTH による骨形成および骨芽細胞分化を促進する分子作用機序が不明なためその開発は容易ではないと考えられており、国内はもちろん国外でもそのような開発は試みられていない。

しかしながら PTH 様骨形成作用をスクリーニングするハイスループットアッセイを確立することができれば、PTH 様骨形成薬剤の開発が可能になると期待されている。

2. 研究の目的

未曾有の超高齢化社会の到来に伴い、我が国では、骨粗鬆症を始めとする代謝性骨疾患患者の増大が大きな社会問題となりつつある。最近、骨形成促進作用を有する副甲状腺ホルモン PTH が骨粗鬆症治療薬として臨床応用されている。しかしながら、PTH は高価であるため、その作用を代替する低分子化合物の開発が待ち望まれている。そこで本研究計画では、PTH 様の骨形成促進効果を有する低分子化合物を同定するハイスループットアッセイを確立に貢献し、代謝性骨疾患に対する新規治療薬剤の開発に寄与することを目指した。

具体的には、骨芽細胞あるいはその前駆細胞において PTH 刺激より発現が促進される遺伝子を探索し、その遺伝子変動を指標に網羅的に低分子化合物をスクリーニングできるシステムを構築に必要な知見の集約を試みた。

3. 研究の方法

(1) スクリーニングシステムの開発に必要な骨芽細胞株の決定

多くの骨芽細胞株あるいはその前駆細胞株では、PTH 受容体の発現が少ない、あるいは PTH 刺激によりその発現低下するため、PTH の骨形成作用を的確に検討できない。またマウス初代骨芽細胞に PTH を持続的に作用させるとその石灰化は著しく抑制されることが報告されている。そこでリ

ザリンレッド染色による石灰化を指標に、PTH に反応する骨芽細胞株を探索した。

(2) 骨芽細胞株における PTH の標的遺伝子の探索

SaOS 細胞株を用いて、PTH 処理群および非処理群から RNA を採取し、Microarray 解析用のサンプルを調整し、Microarray を実施した。得られた Microarray 解析のデータをゲノムデータベース、遺伝子疾患データベース、WISH データベースなどのバイオインフォマティクス的情報と比較検討し、PTH の標的遺伝子候補群を絞り込んだ。さらに PTH 標的遺伝子候補の発現動態をリアルタイム PCR にて確認した。

(3) Wnt5a の過剰発現系の確立

アデノウイルスシステムを用いて、Wnt5a のアデノウイルスを作製し、SaOS 細胞への過剰発現実験を行った。Wnt5a の過剰発現は、リアルタイム PCR により確認を行った。

(4) PTH 反応性レポーターシステムの開発

Wnt5a 遺伝子プロモーター領域をルシフェラーゼレポーター遺伝子に組み込んだコンストラクトを作製した。次にこのコンストラクトとピューロマイシン耐性遺伝子プラスミドを SaOS2 細胞にトランスフェクションし、ピューロマイシン存在下培地にて培養し、Wnt5a 遺伝子プロモーター=ルシフェラーゼを恒常的に発現する SaOS2 細胞株を分離した。

(5) PTH 受容体の発現制御メカニズムの解明

骨芽細胞の PTH への反応性を理解するためには、骨芽細胞の分化過程における PTH 受容体の発現調節機構を明らかにする必要がある。そこで骨芽細胞分化能を有する MC3T3-E1 細胞および C3H10T1/2 細胞に種々のサイトカインを作用させ、PTH 受容体の発現をリアルタイム PCR にて検索した。

4. 研究成果

- (1) SaOS 細胞を PTH にて数分間処理した場合に、強力に骨芽細胞の石灰化が促進されることを見出した (図)。したがって SaOS2 細胞が、PTH の反応性の検討に適していると考えられた。

PTH 3min



- (2) PTH 刺激により発現誘導される遺伝子群の関与を SaOS2 細胞において検討した結果、骨形成への関与が示唆されている分子の中で、Wnt5a の発現が上昇することが確認された。この間の一連の解析において、PTH の標的遺伝子として知られている RANKL の発現誘導も認めているので、本研究での解析の確実性は高いと判断

された。

- (3) SaOS2 細胞に Wnt5a を過剰発現した結果、Wnt5a の過剰発現が SaOS 細胞の石灰化を促進させることが見出された。したがって、PTH は骨芽細胞に作用すると、Wnt5a の発現を増加させ、その結果、骨形成を促進させていると推察された。
- (4) 分離された細胞クローンのルシフェラーゼ活性を指標に、細胞株の決定を行った。ルシフェラーゼ活性が高い細胞株が得られたので、この細胞株が PTH の作用を代替できる低分子化合物の選出に効果的であると期待される。
- (5) BMP2 刺激により、PTH 受容体が著明に誘導されることが示された。また Smad6 の過剰発現により Smad シグナルを遮断すると、BMP2 により誘導される PTH 受容体の発現が阻害された。さらに骨形成に必須であり、BMP2 により制御を受けている転写因子 Runx2 を過剰発現させ、PTH 受容体発現への効果を検討したところ、Runx2 の過剰発現によっても PTH 受容体の発現が誘導された。

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 8 件)

Chudnovsky Y, Kim D, Zheng S, Whyte WA, Bansal M, Bray M, Gopal S, Theisen MA, Bilodeau S, Thiru P, Muffat J, Yilmaz OH, Mitalipova M, Woolard K, Lee J, Nishimura R, Sakata N, Fine HA, Carpenter AE, Silver SJ, Verhaak RGW, Califano A, Young RA, Ligon KL, Mellinghoff IK, Root DE, Sabatini DM, Hahn WC, Chheda MG (2013) ZFH4 interacts with the NuRD core member CHD4 and regulates the glioblastoma tumor initiating cell state. *Cell Reports* 6:1-12 DOI.org/10.1016/j.celrep.2013.12.0

Hata K, Takashima R, Amano K, Ono K, Nakanishi M, Yoshida M, Wakabayashi M, Matsuda A, Maeda Y, Suzuki Y, Sugano S, Whitson R, Nishimura R, Yoneda Y (2013) Arid5b facilitates chondrogenesis by recruiting the histone demethylase Phf2 to Sox9-regulated genes. *Nature Communications*. 4: 2850 DOI: 10.1038/ncomms3850

Masuda K, Ripley B, Nishimura R, Mino T, Takeuchi O, Kiyonari H, Shioi G, Kishimoto T. (2013) Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110: 9409-9413 doi: 10.1073/pnas.1307419110.

Hisada K, Hata K, Ichida F, Matsubara

T, Orimo H, Nakano T, Yatani H, Nishimura R, Yoneda T (2013) Retinoic acid regulates commitment of undifferentiated mesenchymal stem cells into osteoblasts and adipocytes. *J Bone Miner Metab* 31:53-63. doi: 10.1007/s00774-012-0385-x.

西村 理行 (2013) 骨代謝調節機構におけるシグナル伝達と転写制御の役割. *大阪大学歯学雑誌* 58:1-1

西村 理行, 波多 賢二, 高島 利加子, 吉田 倫子, 中村 恵理子, 木田 淳平, 八木 寛子 (2013) 骨および軟骨の発生ならびに疾患における転写制御機構の変動. *Clinical Calcium* 23: 1585-1593

Nishimura R, Hata K, Ono K, Amano K, Takigawa Y, Wakabayashi M, Takashima R, Yoneda T (2012) Regulation of endochondral ossification by transcription factors. *Frontiers in Biosci-Landmark* 17: 2657-2666

Nishimura R, Hata K, Ono K, Takashima R, Yoshida M, Yoneda T (2012) Regulation of endochondral ossification by transcription factors. *J Oral Biosciences* 54:180-183

[学会発表](計 10 件)

西村 理行. 転写ネットワークによる軟骨性骨形成の制御機構 第 55 回歯科基礎医学会学術大会 シンポジウム 2013 年 9 月 22 日 岡山コンベンションセンター Nishimura R. Regulation of Endochondral Ossification by Transcription Factor. 10th Bone Biology Forum, 2013 年 8 月 23 日 Fuji Institute of Education and Training Yoshida M, Hata K, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R, Yoneda T. Forkhead protein FoxC1 regulates chondrogenic genes expression by modulating Ihh/Gli2 signaling. The American Society for Bone and Mineral Research 35th Annual Meeting. 2013 年 10 月 4 日 Baltimore Maryland, USA

Yoshida M, Hata K, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R, Yoneda T. The transcription factor FoxC1 up-regulates PTHrP expression together with Gli2 in chondrocytes 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research. 2013 年 5 月 29 日 Kobe, Japan 波多 賢二, 高島利加子, Whitson RH, 西村 理行, 米田俊之. 転写因子 Arid5b は Sox9 標的遺伝子プロモーター領域のヒストン脱メチル化を介して軟骨細胞分化を促進する. 軟骨代謝学会シンポジウ

ム 第 26 回日本軟骨代謝学会 2013 年 3 月 1 日 千里ライフサイエンスセンター
Masuda K, Barry R, Nishimura R, Takeuchi O, Takashi M, Daron S, Kishimoto T. Arid5a is an IL-6 mRNA stability protein. Chlorpromazine mediates its inhibitory effect on IL-6 production in macrophages through inhibition of Arid5a expression. 第 41 回免疫学会学術集会シンポジウム . 2012 年 12 月 7 日 神戸国際会議場
Yoshida M, Hata K, Takashima R, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R, Yoneda T. The Transcription Factor FoxC1 Regulates Chondrogenesis Together with Gli2 through Induction of PTHrP . American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting, 2012 年 10 月 12 日 Minneapolis, USA
Yoshida M, Hata K, Takashima R, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R, Yoneda T. The transcription factor FoxC1 regulates chondrogenesis together with Gli2 through induction of PTHrP. Australian & New Zealand Bone & Mineral Society 22nd Annual Scientific Meeting in conjunction with 1st Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting. 2012 年 9 月 4 日, Pan Pacific Hotel, Perth, Western Australia.
波多 賢二、高島 利加子、西村 理行、米田 俊之 .軟骨細胞分化のエピゲノム . 日本骨代謝学会学術集会 2012 年 7 月 19 日 京王プラザホテル
西村 理行 . 骨格形成過程における転写因子ネットワークの制御機構 第 66 回口腔科学会教育研修会 2012 年 5 月 16 日 リーガロイヤルホテル広島

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西村 理行 (NISHIMURA, Riko)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号 : 60294112

(3)連携研究者

波多 賢二 (HATA, Kenji)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号 : 80444496