

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790071

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

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

研究代表者

平田 美智子(HIRATA, MICHIKO)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40544060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：骨代謝は性ホルモンにより制御され、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人性骨粗鬆症を発症する。高齢化社会の進展により、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生殖器への作用はなく、骨選択的な治療効果を発揮し、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 bone resorption and 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 osteoporosis drugs with minimal undesired effects on reproductive tissues. Carboranes restored bone loss in orchidectomized mice without androgenic action in the sex organs. These result indicated that Carboranes are novel selective androgen receptor modulators (SARM) that may offer a new therapy option for osteoporosis.

研究分野：歯科医学

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人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、男性の骨粗鬆症の治療に有効な治療薬の開発が期待されている。現在、その候補の一つとして選択的アンドロゲン受容体作働薬(SARM: Selective Androgen Receptor Modulator)の開発が進められている。

研究代表者は、これまでの研究において、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にカルボラン化合物(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破壊が改善され、骨組織選択的に骨粗鬆症に予防・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。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いことを明らかとした(Hirata M et. al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 380: 218-222, 2009)。さらに、BE360を有機化学的に展開して得られた、BE380と

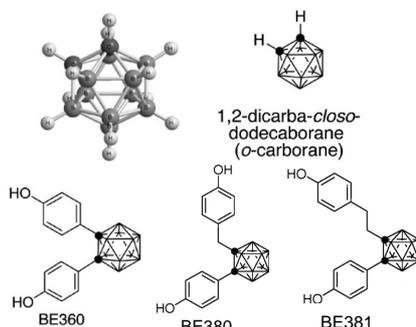


図1. カルボラン化合物の構造式

BE381がBE360と同等の骨組織選択的な骨量回復作用と副作用である子宮重量増加の抑制を示すことを見出し、閉経後骨粗鬆症治療薬としての開発を進めてきた。これら結果より、BE360を初めとした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。

2. 研究の目的

骨組織は『骨吸収』と『骨形成』のバランスにより、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。骨粗鬆症治療薬の開発において、男女共に共通して作用する作働薬は性ホルモンに起因する副作用の回避が前提となる。そこで、これら課題を解決するために、エストロゲン系BE化合物で得られた知見を発展させ、雌雄両性に副作用を示さず、骨は改善効果を示す、骨組織選択的な次世代のカルボラン化合物の研究を進めている。本研究課題では、性ホルモン受容体への結合予想を計算科学的に得た、新規のカルボラン化合物であるBA321とBA341(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、性差を超えた新規骨粗鬆症治療薬の創生を目指した。

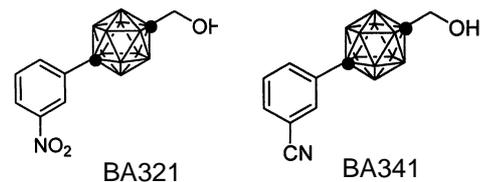


図2. BA321とBA341の構造式

3. 研究の方法

(1) 新規カルボラン化合物 BA321 および BA341 のアンドロゲン受容体およびエストロゲン受容体への結合解析を行なった。また、アンドロゲン応答配列と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。

アンドロゲン受容体および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 BA321 および BA341 のアンドロゲン受容体(AR)と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AR、ヒトER α 、ヒトER β と蛍光リガンドを用い、蛍光偏光法により解析を行った。

アンドロゲン応答配列およびエストロゲン応答配列を介したシグナル伝達

ARE (androgen response element) ならびに 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。前立腺がん細胞に ARE を、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、BA321 あるいは BA341 で処理した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

上記 2 項目の解析により、BA321 および BA341 がアンドロゲン様作用を示すか、エストロゲン様作用を示すかを見極め、次年度の雌雄マウスの 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 BA321 および BA341 が骨選択的にアンドロゲン様作用を示すか、エストロゲン様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。

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、大腿骨と精巣腺を摘出した。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。さらに、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。また、精巣腺は重量計測し、病理学的解析も行なった。

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) マウスを作製した。術後 4 週において、大腿骨と子宮を摘出した。大腿骨の解析法は上記 の場合と同様に行なった。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。

生殖器作用を示さない確認実験

性成熟前の幼若雄性マウスを用いた。投与後 4 週において、大腿骨と精巣腺を摘出した。大腿骨の解析法と精巣腺の解析は上記 の場合と同様に行なった。

4 . 研究成果

(1) - アンドロゲン受容体およびエストロゲン受容体への結合活性

組換え体ヒト AR、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、アンドロゲン受容体への結合活性は、BA321 と BA341 は強力な結合活性を示し、その強度はジヒドロテストステロンとほぼ同等であ

った。また、エストロゲン受容体への結合活性において、BA321 は微弱な結合活性を示した。従って、類似構造のカルボラン化合物でも、置換基の相違により結合活性が変化することが明らかとなった。

(1) - アンドロゲン応答配列およびエストロゲン応答配列を介したシグナル伝達

前立腺がん細胞に ARE を組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターを導入し、アンドロゲン応答配列を介した転写活性を検討したところ、BA321 と BA341 はアンタゴニスト活性を示し、ヒドロキシフルタミドの約 10 倍のアンタゴニスト活性を有することが明らかとなった。また、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、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、BA321 はアゴニスト活性を示した。

(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マウスに精巣摘出 (ORX) を施した解析において、BA321 投与群では ORX と比べ大腿骨骨密度の回復が認められ、偽手術マウスレベルまで回復した (図 3)。さらに、骨梁数 (Tb.N) の増加、骨量間隙 (Tb.Sp) の低下も確認された。貯精囊重量の変化は認められなかった (図 4)。BA341 は、ORX と同等の大腿骨骨密度であり、骨密度の回復効果は認められなかった。また、全てのカルボラン化合物は貯精囊の重量には影響を及ぼさなかった。以上の結果より、以降の実験は BA321 を用いて行うこととした。

(2) - 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、BA321 投与群において、OVX と比べ大腿骨骨量の回復が認められた。さらに、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。また、子宮重量の変化が認められた。従って、BA321 はエストロゲン様作用を有する可能性が示唆された。

(2) - 生殖器作用を示さない確認実験

性成熟前の幼若雄性マウスを用いた解析では、BA321 投与群において、大腿骨骨密度の増加が認められた。一方、貯精囊重量の低下が認められた。

本研究により、BA321 は副作用である男性生殖器過形成は示さず、骨選択的に改善作用を示し、Selective Androgen receptor modulator (SARM) 効果を発揮することが明らかとなった。

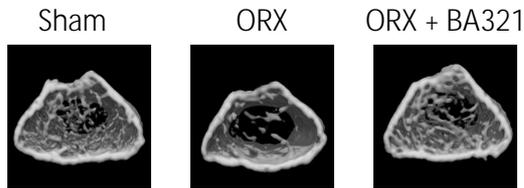


図3. 精巣摘出マウスの骨量におけるカルボラン化合物の投与効果(大腿骨マイクロCT画像)

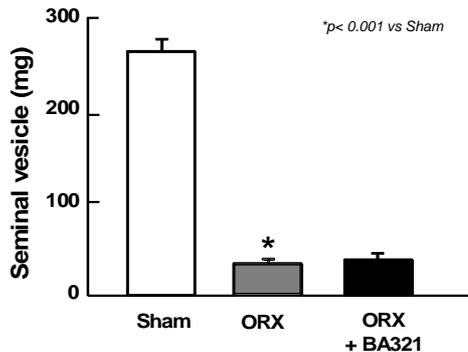


図4. 精巣摘出マウスの貯精嚢重量におけるカルボラン化合物の投与効果

5. 主な発表論文等

(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 3 件)

1. Matsumoto C, Ashida N, Yokoyama S, Tominari T, Hirata M, Ogawa K, Sugiura M, Yano M, Inada M, Miyaura C: The protective effects of β -cryptoxanthin on inflammatory bone resorption in a mouse experimental model of periodontitis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有, 77(4):860-862, 2013
2. Matsumoto C, Oda T, Yokoyama S, Tominari T, Hirata M, Miyaura C, Inada M: Toll-like receptor 2 heterodimers, TLR2/6 and TLR2/1, induce prostaglandin E production by osteoblasts, osteoclast formation and inflammatory periodontitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, 428(1):110-115, 2012
3. Abe J, Nagai Y, Higashikuni R, Iida K, Hirokawa T, Nagai H, Kominato K, Tsuchida T, Hirata M, Inada M, Miyaura C, Nagasawa K.: Synthesis of vitamin D(3) derivatives with nitrogen-linked substituents

at A-ring C-2 and evaluation of their vitamin D receptor-mediated transcriptional activity. *Org. Biomol. Chem.* 査読有, 10(38):7826-7839, 2012

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Yokoyama S, Watanabe K, Hirata M, Matsumoto C, Maruyama T, Miyaura C, Inada M: PGE2 receptor EP4 regulates breast cancer metastasis and bone resorption through osteoblastic RANKL production. 10/4 17:45~19:00 FR0459 Plenary Sessions(口頭発表) ASBMR 2013 Annual Meeting, October 4-7, 2013 Baltimore Convention Center in Baltimore, Maryland, USA.
2. Yokoyama S, Watanabe K, Hirata M, Matsumoto C, Maruyama T, Miyaura C, Inada M: PGE2 receptor EP4 regulates breast cancer metastasis and bone resorption through osteoblastic RANKL production. 10/5 12:00 ~14:00 PMSA0459 Poster Sessions(ポスター) ASBMR 2013 Annual Meeting, October 4-7, 2013 Baltimore Convention Center in Baltimore, Maryland, USA.
3. Watanabe K, Yokoyama S, Matsumoto C, Hirata M, Inada M, Miyaura C: Bone metastatic melanoma promotes angiogenesis with the production of prostaglandin E2 by host stromal cells. 10/7 12:00~14:00 MO0148 Poster Sessions(ポスター) ASBMR 2013 Annual Meeting, October 4-7, 2013 Baltimore Convention Center in Baltimore, Maryland, USA.
4. Matsumoto C, Hirata M, Inada M, Miyaura C: Effects of a carbon-containing polyhedral boron-cluster compound BA321 on bone loss due to sex steroid deficiency by AR- and ER-dependent mechanism. 10/6 12:00~14:00 SU0423 Poster Sessions(ポスター) ASBMR 2013 Annual Meeting, October 4-7, 2013 Baltimore Convention Center in Baltimore, Maryland, USA.
5. 横山智史, 松本千穂, 平田美智子, 丸山隆幸, 稲田全規, 宮浦千里: EP4 受容体は骨芽細胞の RANKL 発現を介して乳癌の骨吸収を制御する 2013年9月12日(2013

- 年 9 月 11 日 (水) ~ 13 日 (金))
2T10p-15/3P-444 16 時 10 分 ~ 口頭発表
表/14 : 15 ~ 15 : 15 ポスター発表 第
86 回日本生化学会大会 パシフィコ横
浜 (神奈川県)
6. 木内絵梨奈, 渡邊健太, 平田美智子, 稲田全
規, 宮浦千里: 前立腺癌細胞のグルコース
代謝と増殖調節への関与 2013 年 9 月
13 日 (2013 年 9 月 11 日 (水) ~ 13 日 (金))
3P-439 13 : 15 ~ 14 : 15 ポスター発表
第 86 回日本生化学会大会 パシフィコ
横浜 (神奈川県)
 7. 根本康利, 渡邊健太, 平田美智子, 稲田全規,
宮浦千里: mTOR の活性阻害による前立
腺癌細胞の増殖抑制 2013 年 9 月 13 日
(2013 年 9 月 11 日 (水) ~ 13 日 (金))
3P-441 13 : 15 ~ 14 : 15 ポスター発表
第 86 回日本生化学会大会 パシフィコ
横浜 (神奈川県)
 8. 横山智史, 渡邊健太, 平田美智子, 松本
千穂, 稲田全規, 宮浦千里: PGE2 regulates
breast cancer metastasis and osteoblastic
RANKL expression through its receptor
subtype EP4. 2013 年 5 月 31 日 (2013 年 5
月 28 日 (火) ~ 6 月 1 日 (土)) 国際骨
代謝学会 (IBMS) ・日本骨代謝学会
(JSBMR) 第 2 回合同国際会議 口頭発
表 神戸コンベンションセンター・神戸
ポートピアホテル (兵庫県)
 9. 渡邊健太, 横山智史, 松本千穂, 平田美
智子, 宮浦千里, 稲田全規: Bone
malignant melanoma induces angiogenesis
with the production of prostaglandin E2 by
host stromal cells. 2013 年 5 月 31 日 (2013
年 5 月 28 日 (火) ~ 6 月 1 日 (土)) 国
際骨代謝学会 (IBMS) ・日本骨代謝学
会 (JSBMR) 第 2 回合同国際会議 口頭
発表 (Young Investigator) /ポスター発表
神戸コンベンションセンター・神戸ポ
ートピアホテル (兵庫県)
 10. 松本千穂, 稲田全規, 平田美智子, 宮浦
千里: Effects of a carbon-containing
polyhedral boron-cluster compound BA321
on bone loss due to sex steroid deficiency
by AR- and ER- dependent mechanism.
2013 年 6 月 1 日 (2013 年 5 月 28 日 (火)
~ 6 月 1 日 (土)) 国際骨代謝学会
(IBMS) ・日本骨代謝学会 (JSBMR)
- 第 2 回合同国際会議 ポスター発表 神
戸コンベンションセンター・神戸ポ
ートピアホテル (兵庫県)
11. 増田光章, 横山智史, 渡邊健太, 平田美智子,
宮浦千里, 稲田全規: In Vivo イメージ
ングによる乳癌増殖の経時的な全身解析
法 2012 年 12 月 15 日 17 時 10 分 ~ 18
時 10 分 ポスター発表
(2012 年 12 月 14 日 (金) ~ 16 日 (日))
第 85 回日本生化学会 福岡国際会議
場・マリンメッセ福岡 (福岡県)
 12. 横山智史, 松本千穂, 平田美智子, 丸山隆幸,
宮浦千里, 稲田全規: 乳癌骨転移における
宿主反応と PGE2/EP4 シグナルの関与
2012 年 12 月 15 日 18 時 10 分 ~ 19 時
10 分 ポスター発表 (2012 年 12 月 14
日 (金) ~ 16 日 (日)) 第 85 回日本生
化学会 福岡国際会議場・マリンメッセ福
岡 (福岡県)
 13. 金田真雪, 渡邊健太, 平田美智子, 宮浦千里,
稲田全規: 1 型コラーゲンによる癌細胞
増殖制御の解析 2012 年 12 月 15 日 17
時 10 分 ~ 18 時 10 分 ポスター発表
(2012 年 12 月 14 日 (金) ~ 16 日 (日))
第 85 回日本生化学会 福岡国際会議
場・マリンメッセ福岡 (福岡県)
 14. 加藤綾華, 渡邊健太, 平田美智子, 宮浦千里,
稲田全規: 細胞外マトリックス分解と前
立腺癌の浸潤 2012 年 12 月 15 日 17 時
10 分 ~ 18 時 10 分 ポスター発表
(2012 年 12 月 14 日 (金) ~ 16 日 (日))
第 85 回日本生化学会 福岡国際会議
場・マリンメッセ福岡 (福岡県)
 15. 渡邊健太, 横山智史, 松本千穂, 平田美智子,
宮浦千里, 稲田全規: 前立腺癌の浸潤と骨
破壊におけるマトリックスプロテアー
ゼ (MMPs) の関与 2012 年 12 月 15 日
18 時 10 分 ~ 19 時 10 分 ポスター発表
(2012 年 12 月 14 日 (金) ~ 16 日 (日))
第 85 回日本生化学会 福岡国際会議
場・マリンメッセ福岡 (福岡県)
 16. 富田夏美, 横山智史, 平田美智子, 稲田全規,
宮浦千里: 悪性黒色腫におけるメラニン
産生機構の解析 2012 年 12 月 16 日 17
時 ~ 18 時 ポスター発表 (2012 年 12
月 14 日 (金) ~ 16 日 (日)) 第 85 回日
本生化学会 福岡国際会議場・マリンメ
ッセ福岡 (福岡県)

17. 松本千穂,小田俊男,富成 司,平田美智子, 稲田全規,宮浦千里, : Toll-like receptor 2 ヘテロ受容体 (TLR1/2, TLR 2/6) シグナルによる骨吸収亢進のメカニズム 第30回日本骨代謝学会 2012年7月20日 (金) 15:15~16:15 口演7「シグナル伝達・転写因子」, 京王プラザホテル(東京都)

〔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

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・講師
研究者番号：405444060

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし