

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 3月31日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591179

研究課題名（和文） 筋と骨ミネラル代謝の相互関連の解明

研究課題名（英文） The study of the interactions between muscle and bone/mineral metabolism.

研究代表者 梶 博史 (KAJI HIROSHI)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：90346255

研究成果の概要（和文）：筋と骨ミネラル代謝の相互関連を解明するために、筋における骨化調節因子および筋から産生され、骨形成促進的に作用する体液性因子の同定を試みた。筋由来の細胞と骨化シグナルを増強させた細胞で網羅的遺伝子解析をおこない、骨形成活性を有する因子を抽出した。そのなかで、Tmem119 は筋骨化を局所性に誘導する因子として期待され、オステオグリシンおよびFAM5C は筋から産生される新規の体液性骨形成因子の候補として、今後の骨粗鬆症治療薬開発の標的としてさらなる研究を進めたい。

研究成果の概要（英文）：The aim of our study is the identification of local ossification factors in muscle tissues and humoral bone anabolic factors produced from muscles in order to clarify the interactions between muscle and bone/mineral metabolism. We selected the factors with bone formation activity using the comprehensive gene analysis between muscle-derived cells and ossification signal-enhanced cells. Among them, Tmem119 is expected the factor, which locally induces muscle ossification. On the other hand, osteoglycin and FAM5C may be the candidates of novel humoral bone anabolic factors produced from muscles. We would like to proceed the further study of these factors as the putative targets for the development of the treatment of osteoporosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：筋、骨、骨芽細胞、分化、シグナル

1. 研究開始当初の背景

筋肉量は脂肪量よりも強く骨密度高値や骨折リスク低下と関連がある。さらに低カルシ

ウム血症におけるテタニー、ビタミンD欠乏やステロイド服用患者にみられる筋力低下などの知見より、骨

代謝と筋組織との相互関連が存在することが示唆される。しかし筋組織と骨ミネラル代謝の相互関連については、これまで研究がほとんど行われていない。

2. 研究の目的

本研究では臨床知見からその病態メカニズムを基礎的に解明し、さらにそれを臨床的に検証するというアプローチにより、筋と骨ミネラル代謝の相互関連を検討し、新しい視点から筋疾患と骨ミネラル代謝疾患の病態生理機構を解明すると同時に、創薬ターゲットとなる分子を同定することを目的とする。

全身の筋が遺伝子の変異により骨組織に変化するという顕著な所見を呈する進行性骨化性線維異形成症 (FOP) の遺伝子異常を手がかりに筋組織と骨組織の間の移行を調節する局所的なメカニズムを明らかにする。さらには FOP や骨代謝疾患の臨床検体、臨床所見と骨ミネラル代謝を調節する重要な組織を代表する臓器における細胞レベルでのアプローチを融合させて、筋組織から骨ミネラル代謝を調節する体液性分子の同定と筋組織から骨ミネラル代謝を体液性に調節するメカニズムを解明する

3. 研究の方法

(1) 筋特異的因子の探索

筋から骨へのシグナルを増強させるために ACVR1 (BMP 受容体) の活性型変異を導入できる DNA コンストラクトを作成する。引き続き野生型の筋芽細胞株、野生型の骨芽細胞株、BMP 受容体の活性型変異を安定過剰発現させた筋芽細胞株より Total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイをおこなう。筋特異的な遺伝子を抽出する。

(2) 筋特異的骨化調節因子の解明

FOP でみられる筋から骨への分化を局所で調節するメカニズム及びその責任因子の同

定をする。

前述したデータで抽出した筋特異的因子のうち骨芽細胞分化を促進する因子、石灰化を促進する因子を骨芽細胞株の分化マーカー発現、石灰化への影響及び Runx2 や骨形成因子 (BMP) 特異的 Smad の誘導する転写活性を指標に選択する。そのなかで有力な既知、未知の因子の筋芽細胞から骨芽細胞への分化に及ぼす影響について検討する。BMP 系及び転換成長因子 (TGF- β) 特異的 Smad は筋肉への分化に抑制的に働くと考えられる。新しく抽出した因子のこれらのシグナルへの影響を検討する。

(3) 臨床基礎研究融合による筋から骨ミネラル代謝調節のシグナルの解明

筋組織から骨ミネラル代謝の体液性調節が存在することが示唆される。そこで上記のマイクロアレイデータより筋特異的な骨に影響を及ぼす可能性の高い因子を既知、未知のものを含めて抽出する。

4. 研究成果

私共は副甲状腺ホルモン (PTH) の骨形成シグナルとして TGF- β とは独立した Smad3 が重要であり、骨芽細胞において Smad3 の下流で PTH により早期に誘導される新規骨形成促進因子として Tmem119 を見出した。今回の研究では、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞での DNA マイクロアレイで、筋骨化シグナルを活性化すると考えられる FOP の原因遺伝子変異である BMP 受容体 (ALK2) の恒常活性型変異 (R206H) を導入することにより発現が増加する因子の一つとして、数個の因子を抽出した。その中に Tmem119 が含まれていた。Tmem119 安定過剰発現は、C2C12 の骨芽細胞への分化及び石灰化を促進させたが、筋管細胞への分化を抑制し、軟骨細胞への分化には影響を及ぼさなかった。さらに C2C12 において、Tmem119 は BMP-2 非存在下でも Smad1/5 誘導性リポーターによる転写活性を促進させた。Tmem119 のこの骨化シグナルを誘導する作用は、骨形成促進剤の開発や骨再生誘導、骨化の生理あるいは病理的な機構を探求する手がかりとなる興味ある知見であった。次に、C2C12 細胞を用いて、Tmem119 が筋芽細胞を骨芽細胞に分化させる機序について検討した。

Tmem119 は BMP-2 レベルを増加させ、siRNA による内因性 Tmem119 の抑制は BMP-2 レベルを減少させた。BMP-2/4 中和抗体及び ALK2 阻害薬 dorsomorphin により、Tmem119 によるアルカリホスファターゼ (ALP)、オステオカルシン (OC) 発現促進が阻害された。一方、Tmem119 と Runx2 あるいは Smad1/5 には物理的、機能的な相互作用が存在するが、BMP-2 は Tmem119 の発現を増加させ、内因性 Tmem119 抑制は、BMP-2 による ALP、OC 発現増加を阻害したが、Runx2、Osterix の発現増加には影響を及ぼさなかった。これらの実験結果より、Tmem119 は、BMP-2 発現の誘導及び Runx2 及び Osterix 以降のレベルでの BMP シグナルとの相互作用、両者の機序により、筋芽細胞から骨芽細胞への分化を促進することが明らかとなり、Tmem119 は筋骨化シグナル分子として重要な分子である可能性が考えられた。

さらに、筋組織から産生され骨アナボリックに作用する体液性因子が存在すると仮定し、その手がかりとして筋で発現が高く、骨で発現が低くなる遺伝子に焦点を当てた。やはり FOP の原因遺伝子 ALK2 の恒常活性型変異 (R206H) で発現変化する遺伝子を探索した。DNA マイクロアレイを用いて、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞で ALK2 (R206H) 発現により発現が 1/4 以下に低下する因子として 25 個の遺伝子が抽出され、その中にオステオグリシン (OGN) と FAM5C が含まれていた。マウス骨芽細胞 (初代培養、MC3T3-E1) において、recombinant OGN 及び OGN 安定過剰発現は 1 型コラーゲン (Col1), β -カテニン, ALP 及び OC、石灰化を増加させ、siRNA による内因性 OGN の抑制は逆の結果を示した。C2C12 において、OGN は BMP-2 により増加する ALP 及び OCN レベルを抑制した。OGN は C2C12 や筋管細胞に分化した C2C12 培養上清及びヒト血清中に検出されたが、OGN 過剰発現 C2C12 培養上清は骨芽細胞において

ALP 及び OCN レベルを増加させ、内因性 OGN 抑制 C2C12 培養上清は逆の結果を示した。FAM5C についても、血清中に存在し、同様の結果であった。さらに MC3T3-E1 において、OGN は ERK1/2 リン酸化、TGF- β が誘導する転写活性及び Col1 産生を増強し、OGN の Col1mRNA レベル増加作用は内因性 TGF- β 阻害剤で阻害されず、ERK1/2 阻害剤により抑制された。これらの実験結果より OGN 及び FAM5C は筋細胞から産生されて、血中に分泌され、分化した骨芽細胞で骨形成促進的に作用することが示唆された。これらの因子は筋から産生されて骨アナボリック作用を有する因子の候補として初めての因子であり、さらに in vivo での検討を進めたい。筋から産生される骨形成因子は、骨粗鬆症治療における、筋肉や運動に関連した代謝マーカーとして期待できるとともに、その作用機構の解明により新しい視点からの骨粗鬆症治療薬の開発の標的となりうる可能性が期待される。

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 8 件)

- ① Tanaka K, Matsumoto E, Higashimaki E, Katagiri T, Sugimoto T, Seino S, Kaji H. Role of osteoglycin in the linkage between muscle and bone. *J Biol Chem*(査読有)287: 11616-11628, 2012 (DOI:10.1074/jbc.M111.292193)
- ② Canaff L, Vanbellinthen JF, Kaji H, Goltzman D, Hendy GN. Impaired transforming growth factor- β transcriptional activity and cell proliferation control of a menin in-frame deletion mutant associated with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *J Biol Chem* (査読有) 287: 8584-8597, 2012 (DOI: 10.1074/jbc.M112.341958).
- ③ Hisa I, Kawara A, Katagiri T, Sugimoto T, Kaji H. Effects of serum from a

- fibrodysplasia ossificans progressiva patients on osteoblastic cells. *Open J Endocr Metab Dis* (査読有)2:1-6, 2012 (DOI: 10.4236/ojemd.2012.21001).
- ④ Tanaka K, Matsumoto E, Higashimaki Y, Sugimoto T, Seino S, Kaji H. FAM5C is a soluble osteoblast differentiation factor linking muscle to bone. *Biochem Biophys Res Commun* (査読有)418: 134-139, 2012 (DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.147).
- ⑤ Hisa I, Inoue Y, Hendy GN, Canaff L, Kitazawa R, Kitazawa S, Komori T, Sugimoto T, Seino S, Kaji H. Parathyroid hormone-responsive Smad3-related factor, Tmem119, promotes osteoblast differentiation and interacts with the bone morphogenetic protein-Runx2 pathway. *J Biol Chem*(査読有)286: 9787-9796, 2011 (10.1074/jbc.M110.179127).
- ⑥ Yamauchi M, Kaji H., Nawata K, Takaoka S, Yamaguchi T, Sugimoto T. Role of parathyroid hormone in bone fragility of postmenopausal women with vitamin D insufficiency. *Calcif Tissue Int* (査読有)88:362-369, 2011 (DOI: 10.1007/s00223-011-9464-6).
- ⑦ Inoue Y, Hendy GN, Canaff L, Seino S, Kaji H. Menin interacts with β -catenin in osteoblast differentiation. *Horm Metab Res* (査読有)43: 183-187, 2011 (DOI: 10.1055/s-0030-1270527).
- ⑧ Kaji H., Imanishi Y, Sugimoto T, Seino S. Comparisons of serum sclerostin levels among patients with postmenopausal osteoporosis,

primary hyperparathyroidism and osteomalacia. *Exp Clin Endocr Diabet*(査読有)119: 440-444, 2011 (DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1275661>).

[学会発表] (計 3件)

- ① Tanaka K: Interaction of the osteoblast differentiating factor, Tmem119, and the bone morphogenetic protein pathway in the commitment of myoblastic into osteoblastic cells. 33th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, SanDiego, USA, 2011
- ② Tanaka K: Role of Tmem119 in the signaling of muscle ossification: 2nd International Osteoporosis Foundation-Asian-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting. Gold Coast, Australia, 2011
- ③ Hisa I: Novel parathyroid hormone-responsive Smad3-related factor, Tmem119, promotes osteoblast differentiation. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japan, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶 博史 (KAJI HIROSHI)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：90346255