

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659865

研究課題名(和文) ユビキチン-プロテアソーム系制御を介した骨形成の新規分子機構の解明と骨形成誘導法

研究課題名(英文) Regulation of osteoblastic differentiation by the ubiquitin-proteasome pathway and novel induction of bone formation

研究代表者

田村 正人 (TAMURA, Masato)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30236757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン-プロテアソーム系は骨形成や骨吸収の過程で種々の細胞内シグナル伝達分子の制御に関与している。本研究では、プロテアソーム阻害剤の一つであるBortezomibが筋分化を抑制し、Runx2のユビキチン-プロテアソームシステムによる分解を抑制することにより、骨芽細胞分化を誘導することを明らかにした。また、Bortezomibは骨芽細胞分化に関与するマイクロRNAの発現も誘導した。さらに、ユビキチンリガーゼ(E3)阻害剤やそのノックダウンによって骨芽細胞分化を促進する効果があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Recent observations suggest that bone metabolism is regulated by the ubiquitin-proteasome pathway, and certain proteasome inhibitor has been reported to induce differentiation of osteoblasts in vitro and in vivo. In this study, we show that bortezomib induces osteoblastic differentiation and inhibits myogenic differentiation in C2C12 cells in culture. Bortezomib inhibits ubiquitin proteasome pathway to degradation of osteogenic transcriptional factor Runx2 and the function of proteasome in controlling degradation of signaling molecules in osteoblast differentiation. Bortezomib could not alter transcriptional activities of beta-catenin dependent reporter and canonical Wnt signaling target gene expression. We also demonstrated that inhibition of certain ubiquitin ligase (E3) up-regulates the differentiation of osteoblasts.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：プロテアソーム阻害剤 Bortezomib 骨芽細胞 Wntシグナル ユビキチン-プロテアソーム系

## 1. 研究開始当初の背景

ユビキチン プロテアソーム系はタンパク質に付加されたユビキチン鎖をプロテアソームが認識し、迅速かつ不可逆に標的タンパク質を分解するシステムである。標的タンパク質へのユビキチン付加反応はユビキチン活性化酵素(E1),ユビキチン結合酵素(E2),ユビキチンリガーゼ(E3)によって行われる。このユビキチン プロテアソーム系は、不要タンパク質の分解、抗原提示、細胞周期調節など生命活動に必須な重要な役割を果たしている。

1990年代後半からの研究の発展で、骨芽細胞分化に関わる転写因子やシグナル伝達分子が同定されてきた。これらの転写因子である Runx2, Smad,  $\beta$ -catenin や Ik-B は、いずれもプロテアソームで分解され、BMP-2 は Runx2 のプロテオソームでの分解を抑えるとの報告もある。最近では、E3である Smrf1,  $\beta$ -TrCP1 や Schnur1 3 のノックアウトしたマウスでは骨量が減少し、これらを過剰発現マウスでは骨量が減少することが、報告されている。さらに、近年多発性骨髄腫に有効な治療薬として臨床に使用されるようになった 26S プロテオソーム阻害剤 Bortezomib は、がん細胞のアポトーシスを誘導すると共に、骨吸収を抑制し骨量を増加させることが報告されている。マウスを用いた実験から Bortezomib は、骨形成を促進し骨量を増加させる。

これらの研究動向から、骨形成・骨吸収の過程にユビキチン プロテアソーム系が極めて重要な役割を果たしていることが予想される。しかし、この作用の分子機構は未解明である。

## 2. 研究の目的

ユビキチン プロテアソーム系は、不要タンパク質の分解、抗原提示、細胞周期調節など生命活動に必須な重要な役割を果たしている。近年、このユビキチン プロテアソーム系が、骨形成・骨吸収の過程でさまざまな細胞内シグナル伝達分子の制御に関与し、極めて重要な役割を果たしていることが推測されるようになりつつある。そこで、本研究では、種々のプロテオソーム阻害剤およびユビキチンリガーゼ(E3)阻害剤やノックダウンの骨芽細胞分化に及ぼす効果と、Smad, Runx2,  $\beta$ -catenin, NF- $\kappa$ B などのシグナル伝達分子のユビキチン化・プロテオソームにおける分解と骨芽細胞分化に関する分子機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) プロテアソーム阻害剤の細胞分化に及ぼす効果の検討

未分化間葉系細胞である C3H10T1/2, ST-2, C2C12 細胞もしくは骨髄間葉系幹細胞培養系に、26S プロテアソーム阻害剤である Bortezomib, 20S プロテアソーム阻害剤である Lactacystin, epoxomicin もしくは MG132 を添加し培養した。リアルタイム定量 RT-PCR 法、Western blot 法などにより、osteocalcin, ALP, Runx2, などの骨芽細胞分化に関係する mRNA 発現やタンパク質産生に及ぼす影響を調べ、骨芽細胞分化に及ぼす効果を検討した。また、筋細胞分化や脂肪細胞分化に対するプロテアソーム阻害剤の効果を調べた。

### (2) ユビキチンリガーゼ E3 のノックダウンによる骨芽細胞分化誘導効果の検討

C3H10T1/2, ST-2, C2C12 細胞もしくは骨髄間葉系幹細胞培養系で、種々のユビキチンリガーゼ E3 の発現を sgRNA, miRNA など低分子 RNA を用いてノックダウンさせ、アルカリフォスファターゼ活性染色等を行った。また、リアルタイム定量 RT-PCR 法により osteocalcin 等の骨芽細胞分化に関与する mRNA の発現量を測定した。複数のユビキチンリガーゼ E3 を標的とした組み合わせ実験も行い細胞分化誘導効果を有する sgRNA, miRNA など低分子 RNA を調べた。

### (3) プロテアソーム阻害剤とユビキチンリガーゼ E3 の骨芽細胞分化誘導機構の解明

骨芽細胞分化の促進活性を有するプロテアソーム阻害剤とユビキチンリガーゼ E3 抑制性 sgRNA, miRNA など低分子 RNA について、Smad, Runx2,  $\beta$ -catenin, NF- $\kappa$ B などのシグナル伝達分子のユビキチン化とプロテオソームにおける分解を Western blot 解析を行い調べた。これにより、骨芽細胞分化に最も有効な標的となるユビキチン プロテアソーム系のシグナル伝達分子の同定を行った。さらに、細胞分化促進活性を有する sgRNA, miRNA など低分子 RNA について、in vitro の系で Wnt シグナル応答性プロモーターコンストラクトや BMP-2 応答性プロモーターコンストラクトを用いて、どのシグナル伝達系の活性化がもたらされるか調べた。

### (4) プロテアソーム阻害剤とユビキチンリガーゼ E3 抑制性低分子 RNA の骨・軟骨形成に及ぼす影響の検討

骨形成および骨吸収の程度について組織学的手法を用いて測定し評価した。この際、プロテアソーム阻害剤とユビキチンリガーゼ E3 抑制性低分子 RNA の同時投与の効果、

投与回数ならびに投与量の検討を行った。Fluorescein 標識した 2'-O-methyl RNA を用い、組織への取り込み動態を検討した。

#### 4. 研究成果

本研究で用いた C2C12 細胞は未分化な間葉系細胞で、BMP2 存在下では骨芽細胞に分化し、低増殖培地で培養すると筋管細胞に分化することが知られている。C2C12 細胞培養系を用いて 26S プロテアソーム阻害剤である Bortezomib, 20S プロテアソーム阻害剤である Lactacystin, epoxomicin もしくは MG132 をそれぞれ加え培養し、骨芽細胞及び筋分化に関連する分化マーカーの mRNA 発現を RT-PCR やリアルタイム PCR を用いて調べた(図 1)。Bortezomib はオステオカルシンや ALP mRNA 発現を誘導した。一方、Bortezomib は筋分化に関連したマーカーである myogenin や MCK mRNA 発現を抑制し、筋管細胞の形成を抑制した(図 2)。

近年 miRNA 発現も細胞分化に関連していることが報告されている。miR-34b は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルや BMP シグナルにより発現が誘導されるが、Bortezomib はこれらと同様に miR-34b 発現を誘導した。一方、miR-206 は C2C12 細胞を含む骨格筋にのみ発現し、筋分化に伴って発現が増加することが知られているが、Bortezomib は miR-206 発現を抑制した。

さらに、骨代謝に重要な役割を果たしている  $\beta$ -catenin/Wnt シグナルや BMP/Smad シグナル、骨芽細胞分化に関わるシグナル分子である Runx2 や ATF4 への Bortezomib の関与についてルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。Bortezomib は、Smad や  $\beta$ -catenin 応答レポーターの転写活性は促進せず、BMP2 や Wnt の標的遺伝子である Id-1、OPG や RANKL mRNA 発現も誘導しなかった。一方、Bortezomib はオステオカルシンプロモーターへの転写を活性化し、オステオカルシンプロモーターの Runx2 や ATF4 結合部位を変異させたコンストラクトを用いた解析から、Runx2 結合部位の変異によって Bortezomib による転写活性化が失われた。Bortezomib の Runx2 への関与について、クロマチン免疫沈降法及びウエスタンブロットによりさらに検討した。Bortezomib で処理した細胞では Runx2 抗体によってオステオカルシン遺伝子の Runx2 結合部位が免疫沈降され、Bortezomib によって Runx2 のタンパクレベルの増加が認められた。しかし、Bortezomib により Runx2 mRNA 発現は誘導されなかった。これらの結果より、プロテアソームインヒビター Bortezomib は筋分化を抑制し、Runx2 のユビキチン プロテアソームシステムによ

る分解を抑制することにより、骨芽細胞分化を誘導する機構が考えられた(図 3)。

図 1

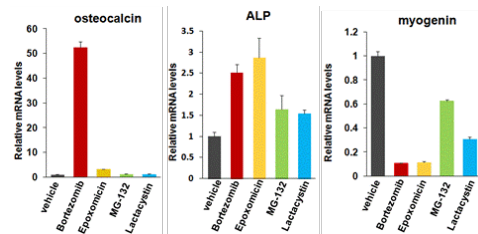


図 2

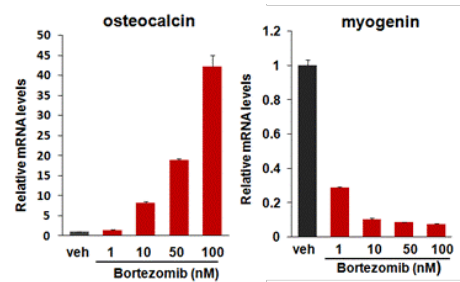
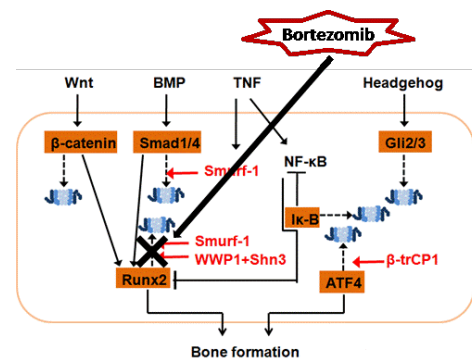


図 3



また、C2C12 細胞培養系で Smuf-1 siRNA もしくは sgRNA をトランスフェクションさせた。細胞抽出物を Western blot 解析を行い行ったところ、Smrf-1 のタンパク量は著しく減少していた。リアルタイム定量 RT-PCR 法を用いてこの細胞の骨芽細胞分化に関与するオステオカルシン mRNA 発現量を測定したところ増加していた。また、アルカリフォスファターゼ活性染色を行うとその活性増加が認められた。これらの結果から Smrf-1 siRNA は、骨芽細胞分化誘導効果を有する可能性が考えられた。E3 抑制性 siRNA もしくは sgRNA について、Smad, Runx2,  $\beta$ -catenin, NF- $\kappa$ B などのシグナル伝達分子のユビキチン化とプロテアソームにおける分解を Western blot 解析を行い調べた。Bortezomib によって Runx2 のユビキチン化が抑制されていた。Bortezomib と Smrf-1 siRNA もしくは sgRNA を同時に加えると、この抑制はさらに増強されることが明らかになった。さらに古典的

Wnt シグナル応答性プロモーターを用いて検討したところ、転写活性が活性化した。

次に、ST-2 細胞培養系でユビキチンリガーゼ E3 の一つである Smrf-1 について TRUE gene silencing 法を用いた sgRNA を数種類設計しトランスフェクションした。Western blot 解析を行って Smrf-1 の発現量を調べたところ、ノックダウンが確認された。また、アルカリフォスファターゼ活性染色を行ったところ、活性の増加が観察された。これらの結果より Smrf-1 sgRNA が骨芽細胞分化誘導作用を有する可能性が考えられた。また、Schnurri-3 (Shn3) と WWP-1 の si RNA を MC3T3-E1 細胞に導入し、それらの発現をノックダウンさせ、同様に検討した。Runx2 およびオステオカルシン mRNA の発現が増加した。PTH の間欠的投与を MC3T3-E1 細胞を用いて行ない、mRNA の発現量の変動についてマイクロアレイを用いて解析した。Wiskott-Aldrich syndrome protein family member (Wasp) 2 の発現が特異的に減少し、新たな標的分子であることを明らかにした。Wnt inhibitor である IWP-2 や protein kinase C inhibitor である Go6976 はこの Wasp 2 発現の変化を抑制した。同時に骨シアロタンパク質 BSP は著しく発現が低下し、Wnt 経路や PKC 経路を介して Wasp2 を調節し、さらに骨のマトリックスタンパク質の産生を制御する新たな機構が明らかになった。

本研究によって、ユビキチン・プロテアソーム系制御を介した骨形成の新たな分子機構が解明され、新たな骨形成誘導法の開発のための基礎となる知見が得られた。

#### 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2件)

1. Uyama M, Kawanami M, Tamura M. Wasp2: a novel target of intermittent PTH administration. *Int J Mol Med*. 2013 May;31(5):1243-1247. doi:10.3892/ijmm.2013.13151 査読有
2. Uyama M, Sato MM, Kawanami M, Tamura M. Regulation of osteoblastic differentiation by the proteasome inhibitor bortezomib. *Genes Cells*. 2012 Jul;17(7):548-558. doi:10.1111/j.1365-2443.2012.01611. 査読有

[学会発表](計5件)

1. Uyama M, Kawanami M, Tamura M. Actions of small molecular inhibitors on

anabolic effects of intermittent PTH treatment. 2012 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. October 16 - 20, 2012, Minneapolis Convention Center, Minneapolis, MN, USA.

2. Uyama M, Sato M, Kawanami M, Tamura M. Regulation of osteoblastic differentiation by the proteasome inhibitor bortezomib. *Europeo7*, June 6-10, 2012. Messe Wien Exhibition & Conference Center, Vienne, Austria.
3. Uyama M, Sato M, Kawanami M, Tamura M. Regulation of both osteoblastic and myogenic differentiation by proteasome inhibitor bortezomib. 4th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry. October 9-10, 2011, International Conference Center Hiroshima, Hiroshima, Japan
4. Uyama M, Sato M, Kawanami M, Tamura M. Regulation of both osteoblastic and myogenic differentiation by proteasome inhibitor bortezomib. 2011 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. September 16 - 20, 2011, San Diego Convention Center San Diego, CA, USA.
5. Uyama M, Sato M, Kawanami M, Tamura M. Regulation of both osteoblastic and myogenic differentiation by proteasome inhibitor bortezomib. The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai. Sendai International Center, Sendai, March 7-8, 2011.

[図書](計1件)

1. Uyama M, Sato M, Kawanami M, Tamura M. Regulation of osteoblastic differentiation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Interface Oral Health Science* 2011. p164-166. Springer, 2012 ISBN 978-4-431-54069-4 doi: 10.1007/978-4-431-54070-0\_43

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.den.hokudai.ac.jp/seika/SeikaPub.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 正人 (TAMURA Masato)  
北海道大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：30236757

(2) 研究分担者

川野 光興 (KAWANO Mitsuoki)  
新潟薬科大学・応用生物学部・助教  
研究者番号：00455338

(3) 連携研究者

該当なし