

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07950

研究課題名(和文) 骨粗鬆症治療に対する骨芽細胞の増殖惹起の有効性に関する研究

研究課題名(英文) Is induction of osteoblasts proliferation useful to treat the osteoporosis patients?

研究代表者

高橋 勝彦 (Takahashi, Katsuhiko)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80307066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症の治療標的としてp57Kip2の機能抑制による骨芽細胞の増殖能促進が有効であることを想定した。細胞周期制御分子のうち骨代謝に影響を及ぼすp57Kip2の欠損マウスでは骨芽細胞の増殖能が促進し、野生型マウスに比べて破骨細胞数が有意に低下した。また主に細胞分裂期に働くプロリルイソメラーゼ・Pin1の欠損マウスでは破骨細胞の増加による骨粗鬆症様の変化を呈した。p57Kip2とPin1のダブル欠損マウスは、p57Kip2欠損体と同様の表現型であった。骨芽細胞においてp57Kip2はPin1の制御化にあることとPin1活性抑制による骨粗鬆症にp57Kip2抑制は有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We expected that suppression of p57Kip2 could increase osteoblastic proliferation, resulted in improvement of osteoporosis patients. A cell cycle regulator, p57Kip2-null mice had osteoblasts with high proliferation rates and their osteoclasts maturation were less than the wild-type mice. On the other hand, a cell cycle acceleration prolyl isomerase, Pin1-null mice displayed typical osteoporotic symptoms with many matured osteoclasts. Then we created p57Kip2/Pin1 double deficient mice, which also showed the phenotypes similar to p57Kip2-null mice. So we thought that p57Kip2 might be under Pin1 in osteoblasts, and the osteoporosis with Pin1 inactivation could be improved by p57Kip2 suppression.

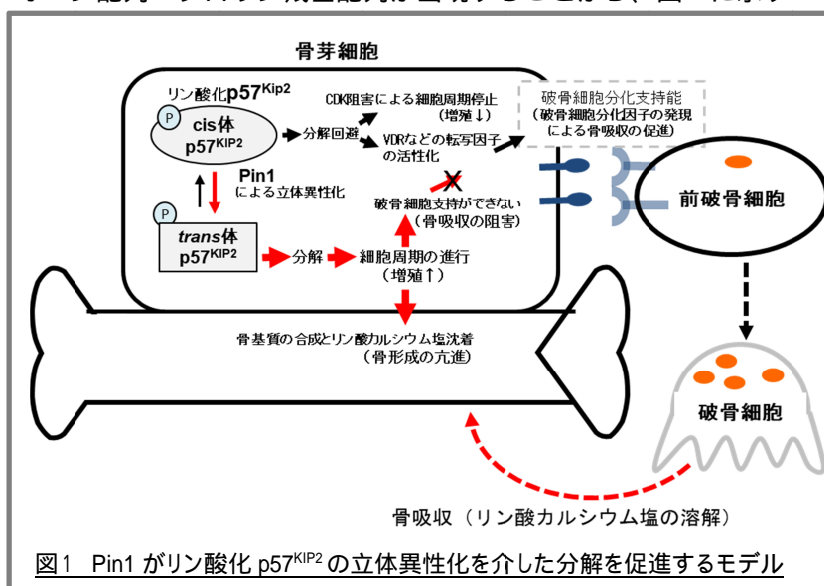
研究分野：生化学

キーワード：骨代謝 p57Kip2 Pin1 細胞周期 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

骨組織は、骨芽細胞が担うリン酸カルシウム塩沈着（骨形成）と破骨細胞が担うリン酸カルシウム塩の分解（骨吸収）が常に進行する動的器官である。骨粗鬆症は、骨形成より骨吸収が高まることで骨の可塑性が増し高齢者の骨折のリスクを高める。骨粗鬆症治療の二つの戦略、骨芽細胞による骨形成亢進と破骨細胞による骨吸収阻害とを同時に誘導できれば理想の骨粗鬆症治療薬となる。骨芽細胞は、骨形成を担うと共に破骨細胞の成熟化支持を果たすことで骨吸収を促すことから骨代謝の中心を担う細胞である。骨芽細胞は増殖と分化のバランスを維持して骨代謝を担うが、その分子的機序は不明である。これまで申請者らが取り組んできた細胞周期制御分子の遺伝子欠損マウスの表現型から、骨芽細胞の増殖能を惹起すれば骨形成亢進と骨吸収阻害を高めることができると示唆された。

CDK（サイクリン依存性キナーゼ）インヒビターである $p57^{KIP2}$ は、リン酸化修飾を受けた活性化体が細胞周期のブレーキ役として細胞の増殖を抑える。申請者らは、 $p57^{KIP2}$ 遺伝子欠損（ $p57^{KIP2}/-$ ）マウスが顕著な成熟化破骨細胞数の減少を伴う骨形成の異常亢進を呈することを見出し、 $p57^{KIP2}$ は骨代謝制御に必須であることを示した。これらの知見から申請者らは、 $p57^{KIP2}$ は骨芽細胞において細胞周期を停止させて増殖を抑え、骨形成の制御と破骨細胞支持能の亢進を促す、と考えた。一方、Pin1 はリン酸化タンパク質のフォールディングを制御する唯一のプロリルイソメラーゼとして、細胞周期を促進する。Pin1 は、基質とするリン酸化タンパク質にリン酸化トレオニン残基（あるいはリン酸化セリン残基）とプロリン残基との間のペプチド結合を認識し、*cis* 体と *trans* 体との立体異性化反応を触媒する。Pin1 遺伝子欠損（ $Pin1/-$ ）マウスは、成熟化破骨細胞数の増加を伴う骨粗鬆症様の病理像を呈する、という興味深い知見が報告された[3]。Pin1 活性が骨芽細胞の細胞周期を亢進し、骨粗鬆症を抑えることが示唆された。以上の知見から、申請者らは、「骨芽細胞では細胞周期を調整する特定分子を標的とした増殖惹起が骨粗鬆症の病態の改善に繋がる」ことを着想した。リン酸化を受けた $p57^{KIP2}$ にはリン酸化トレオニン配列 プロリン残基配列が出現することから、図1に示す「Pin1 がリン酸化 $p57^{KIP2}$ の



立体異性化を介した分解を促進する」モデルを考えた。そこで骨芽細胞の増殖能を高める骨粗鬆症治療薬の標的として細胞周期制御分子を考えるにあたり、「骨芽細胞においてリン酸化 $p57^{KIP2}$ が Pin1 による立体異性化を受けて *cis* 異性体が現れると、これがプロテアソーム分

と骨形成亢進 + 骨吸収抑制が促される」という骨粗鬆症治療メカニズムを着想した (図1)。

2. 研究の目的

申請者らは、新規の骨粗鬆症治療方策の基盤を築くことを本研究の究極の目的とした。そのためにまず p57^{KIP2} や Pin1 が骨芽細胞の骨形成能・骨細胞支持能を制御する分子的機序を明らかとすることを目指した。更に骨芽細胞を増殖能惹起する細胞外刺激とその有効性の探索から骨粗鬆症の治療薬や予防薬として有効な手段の提案をすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞の Pin1 が骨形成能及び破骨細胞支持能に関わる分子発現量に及ぼす影響の検討:

申請者らは、骨芽細胞の骨形成に関わる分子 (osteopontin, JNK) と破骨細胞支持能に関わる分子 (RANKL, osteoprotegenin) について Pin1 による骨芽細胞の発現レベルの変化を検討した。Pin1 発現未分化細胞と Pin1 欠損未分化細胞について骨芽細胞分化誘導を行い、経時的に試料を調製した。遺伝子発現レベルを定量的 RT-PCR 法で、タンパク質発現レベルをイムノプロット法でそれぞれ検出を試みた。

(2) 骨芽細胞の p57^{KIP2} 不活化が骨形成能及び破骨細胞支持能に関わる分子発現量に及ぼす影響の検討:

申請者らは、骨芽細胞の骨形成に関わる分子 (osteopontin, osteocalcin, JNK) と破骨細胞支持能に関わる分子 (RANKL, osteoprotegenin) について p57^{KIP2} 不活化による骨芽細胞の発現レベルの変化を検討した。初代骨芽細胞を試料に用いて遺伝子発現レベルを定量的 RT-PCR 法で、タンパク質発現レベルをイムノプロット法でそれぞれ検出を試みて p57^{KIP2} -/- マウス由来のものと同野生型マウス由来との比較検討を行なった。

(3) p57^{KIP2} と Pin1 のダブル欠損マウス (p57^{KIP2} -/-; Pin1 -/-) の作出・解析:

Pin1 欠損による骨粗鬆症の病態に対して p57^{KIP2} を欠損させることで骨粗鬆症の病理的所見が緩和されることが考えられた。そこで p57^{KIP2} -/-; Pin1 -/- マウスを作出し、p57^{KIP2} -/- マウスや Pin1 -/- マウスの表現型を比較した。

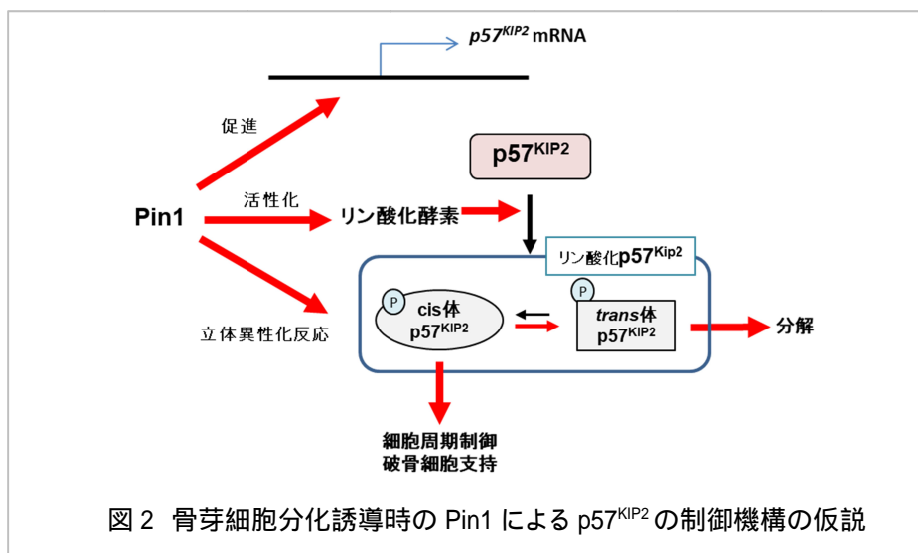
(4) 骨芽細胞で Pin1 が p57^{KIP2} の発現レベルに及ぼす影響の検討:

Pin1 発現未分化細胞と Pin1 欠損未分化細胞について骨芽細胞分化誘導を行い、経時的に試料を調製した。p57^{KIP2} の骨芽細胞内発現レベルが Pin1 に依存する事を確認するため、p57^{KIP2} の mRNA レベルを定量 PCR 法で解析し、またタンパク質レベルの検出をイムノプロット法で行なった。

4. 研究成果

未分化で維持している前骨芽細胞を骨芽細胞分化誘導刺激すると Pin1 依存的にカルシウム沈着が顕著に認められた。この時、骨形成に関わる分子のうち osteopontin の発現レベルは Pin1 発現細胞で分化誘導後の時間経過に伴い増加していたが、Pin1 欠損細胞では有意な変化は見られなかった。Pin1 発現細胞では JNK の活性化もカルシウム沈着と相関して検出された。破骨細胞支持能に関わる分子 (RANKL, osteoprotegenin) のうち RANKL mRNA レベルは Pin1 発現細胞特異的に顕著な増加(分化誘導3日後で約28倍)が認められた。また、Pin1 発現細胞に比べて p57^{KIP2} 発現レベルが Pin1 欠損型では顕著に多かった。骨芽細胞分化誘導により Pin1 発現細胞ではリン酸化 p57^{KIP2} が検出されるようになった。一方 Pin1 欠損細胞では、分化誘導前から p57^{KIP2} の検出

が顕著にされるがリン酸化体と機能を示さない非リン酸化体の両方が有意に認められた。これらの結果から、Pin1 は $p57^{KIP2}$ の発現レベルを抑制することが示された。Pin1 が $p57^{KIP2}$ に及ぼす影響がタンパク質分子間の酵素・基質の親和性に基づく立体異性化反応に由来する可能性と $p57^{KIP2}$ の遺伝子発現レベルへの影響に由来する可能性が考えられた。そこで、定量 PCR 法による $p57^{KIP2}$ mRNA の定量を試みた。 $p57^{KIP2}$ mRNA レベルは Pin1 発現細胞よりも Pin1 欠損細胞で約 1.5 倍多かった。分化誘導を受けた PIN1 発現細胞で分化誘導処理 (10 mM グリセロホスフェート、500 μ M L-アスコルビン酸、100 nM デキサメタゾン) を継続している間、 $p57^{KIP2}$ の mRNA は増加した。Pin1 欠損細胞では分化誘導剤処理して 1 日後が $p57^{KIP2}$ mRNA レベルのピーク (約 4.0 倍) で以後誘導剤処理をしているにも関わらず 6 日後までには処理前の発現レベルになった。骨芽細胞分化による $p57^{KIP2}$ mRNA 発現促進は Pin 依存的であることが認められたことから、 $p57^{KIP2}$ は Pin1 による翻訳後制御を受けてタンパク質発現レベルが低下したことが強く示唆された。この時 Pin1 発現レベルも分化誘導処理に伴い経時的に低下していたことから、Pin1 活性の低下に伴うリン酸化 $p57^{KIP2}$ が検出できるレベルにまで増加したことが考えられた。以上の結果から Pin1 は $p57^{KIP2}$ のリン酸化を触媒する酵素の活性化とリン酸化 $p57^{KIP2}$ の立体異性化を触媒することで $p57^{KIP2}$ の骨芽細胞への分化への関与に貢献することが示された (図 2)。



今回申請者らは Pin1; $p57^{KIP2}$ ダブル欠損マウスを作成した。このマウスは $p57^{KIP2}K0$ マウスと同様に生後すぐに口蓋裂による呼吸不全を呈し、新生児致死であった。このようにダブル欠損マウスの表現型は骨形成異常であったことから $p57^{KIP2}$ 欠損の影響が主であった。野生型マウスに比べて Pin1 あるいは $p57^{KIP2}$ 欠損マウスは、体長や四肢の長さが短かった。Pin1; $p57^{KIP2}$ ダブル欠損型マウスの体長や四肢は、さらに短くなった。この結果より、Pin1 と $p57^{KIP2}$ は個体の成長を骨形成から支える分子であることが示された。Pin1 と $p57^{KIP2}$ が別々の機序による骨芽細胞の制御を担う分子であれば、ダブル欠損マウスの表現型は骨での異常が相殺されるはずである。Pin1 と $p57^{KIP2}$ が同じ機序の流れを構成する因子として骨芽細胞の制御を担う分子であれば、下流にある分子の影響が表現型に反映する。今回作成したダブル欠損マウスは $p57^{KIP2}$ の欠損体の表現型であったことは、上記の前骨芽細胞を用いた検討から導かれた Pin1 による $p57^{KIP2}$ の制御

に関する考察と一致した。

今回得た知見は p57^{KIP2} の細胞周期ブレーキとしての役割の制御機序の解明に繋がものである。Pin1 による制御を受けるリン酸化酵素の探索は図 2 の仮説の証明になることから、今後この同定を試みていく。特に、遺伝子欠損マウスの表現型から申請者らは骨芽細胞に着目して取り組んだが、p57^{KIP2} の発現量ががん組織で減少することや Pin1 活性が細胞のがん化や悪性化に関与することが広く知られており、Pin1 とその制御を受ける分子としての p57^{KIP2} の分解の抑制の分子機構ががん治療の標的となりうる。そこで今後の展望として、細胞のがん化や悪性化におけるこれらに分子の関与を明らかとし、生体レベルでの脂肪代謝異常による生活習慣病やがんの悪液質の惹起とその治療方策の研究に発展できる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕

M.Hidaka, K.Kosaka, S.Tsushima, C.Uchida, K.Takahashi, M.Tsubuki, N.Takahashi, Y.Hara, and T.Uchida. Food polyphenols targeting peptidyl prolyl cis/trans isomerase Pin1, *Biochem Biophys Res Commun.* (2018) Accepted 査読有

H. Yagi, H. Tateno, K. Hayashi, T. Hayashi, K. Takahashi, J. Hirabayashi, K. Kato, and M. Tsuboi. Lectin microarray analysis of isolated polysaccharides from *Sasa veitchii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (2017) Vol.81,p1687-1689. 査読有

A. Sakai, M. Imai, K. Takahashi, S. Hasegawa, M. Yamasaki, T. Ohba, and N. Takahashi. Protein kinase A activation by retinoic acid in the nuclei of HL60 cells. *Biochim Biophys Acta.* (2017) Vol.1861, p276-285. 査読有

坪井正道、高橋勝彦：アグルチニン SSA の分子構造 レクチンと生薬、現代化学、2017 年、9 巻（東京化学同人） p55-59

坪井正道、高橋勝彦：ムール貝からのレクチンの分子構造とヒト細胞への働き、現代化学、2017 年、5 巻（東京化学同人） p52-55

坪井正道、高橋勝彦：ムスカリン性アセチルコリン受容体 M2 の分子構造、現代化学、2017 年、3 巻、（東京化学同人） p 51-57

N. Takahashi, T. Ohba, M. Imai, S. Hasegawa, K. Takahashi, M. Yamasaki, and Y. Kameoka. Retinoylation (covalent modification by retinoic acid) of Rho-GDI in the human myeloid leukemia cell line HL60 and its functional significance. *Biochim Biophys Acta.* (2016) Vol. 1861, p2011-2019. 査読有

T. Shimizu, Y. Bamba, Y. Kawabe, T. Fukuda, F. Fujimori, K. Takahashi, C. Uchida, and T. Uchida. Prolyl isomerase Pin1 regulates doxorubicin-inducible P-glycoprotein level by reducing Foxo3 stability. *Biochem Biophys Res Commun.* (2016) Vol.471, p328-333. 査読有

高橋勝彦、内田千代子、内田隆史 : 白血病治療薬剤 ATRA の新規標的分子、プロリン異性化酵素 Pin1、血液内科, 2016 年 73 巻、(科学評論社) p491-496. 査読有

K. Takahashi, N. Uchida, C. Kitanaka, C. Sagara, M. Imai, and N. Takahashi. Inhibition of ASCT2 is essential in all-trans retinoic acid-induced reduction of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *FEBS Open Bio.* (2015) Vol.5, p571-578. 査読有

〔学会発表〕

2017 年 12 月 6 日、日本生化学会総会 神戸

アミノ酸による脂肪細胞の Pin1 活性量調節

高橋 勝彦、片桐 啓暁、清水 愛、和泉田 有望、福田 翔大、高橋 典子、内田 隆史、東伸昭

2016 年 9 月 25 日、日本生化学会総会 仙台

各種アミノ酸欠乏による脂肪細胞成熟化への影響

高橋 勝彦、北村 有梨果、北村 愛理、赤井 夢乃、兼子 あやか、東寺 菜穂、高橋 典子

2015 年 12 月 2 日、日本生化学会総会 神戸

脂肪細胞分化におけるグルタミンの影響

高橋 勝彦、原田 実永子、松宮 孝人、磨田 直樹、岐部 光昭、藤原 大志、高橋 典子

〔図書〕

テコム(株) My 衛生化学 (高橋典子・山崎正博 編) 2017 年 11 月 9 日 33 ページ

6. 研究組織

研究代表者・高橋 勝彦 (Katsuhiko Takahashi)・星薬科大学・薬学部・准教授・80307066

研究分担者・内田 隆史 (Takafumi Uchida)・東北大学・農学系研究科(研究院)・教授・80312239

連携研究者・天野 均 (Hitoshi Amano)・大阪歯科大学・歯学部・准教授・90212571

連携研究者・高橋 典子 (Noriko Takahashi)・星薬科大学・薬学部・教授・50277696