

令和元年5月29日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11480

研究課題名(和文) Keap1/Nrf2による骨代謝制御機構の解明とインシリコ創薬への応用

研究課題名(英文) Elucidation of Keap1/Nrf2-mediated control system of bone metabolism and application to in silico drug discovery

研究代表者

坂井 詠子 (SAKAI, Eiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：10176612

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)：研究代表者は酸化ストレスを減らすNrf2の活性化が破骨細胞分化を著しく抑制するだけでなく、骨芽細胞分化も阻害することを明らかにした。しかしながら予想に反して、骨格の顕著な異常は認められなかった。さらに、Keap1/Nrf2ダブルノックアウトマウスを作製し、Nrf2の恒常的な活性化がNFATc1抑制分子であるMafBの発現を上昇し、破骨細胞分化を負に制御していることを明らかにした。一方、1360種類の合成化合物および海洋微生物由来成分のうち、非常に低濃度で破骨細胞分化抑制効果を持つものや、あるいはNrf2を活性化するものを見出した。病態モデルマウスへの候補化合物の投与と病態の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレスを減らすことは体にとって良いイメージがあるが、本研究によって、Nrf2の恒常的な活性化は、破骨細胞や骨芽細胞の分化を阻害し、必ずしも骨にとって有益なことばかりではないことが明らかになった。しかしNrf2をマイルドに活性化する化合物は、骨芽細胞分化を促進することも見出した。高齢化社会を迎え、日本の総人口の10%弱が骨粗鬆症といわれている。骨粗鬆症の第1選択薬であるビスフォスフォネート製剤に顎骨壊死の副作用が報告されてから、より安全な薬の開発が望まれている。本研究は新薬開発を目指した基礎的研究である。

研究成果の概要(英文)：We revealed that Nrf2 activation, which reduces oxidative stress, not only suppresses osteoclast differentiation, but also inhibits osteoblast differentiation. However, contrary to expectation, no remarkable abnormality of the skeleton was observed. Furthermore, we constructed Keap1/Nrf2 double knockout mice to determine whether the cause of marked suppression of osteoclast differentiation in Keap1 deficiency is due to constitutive activation of Nrf2. As a result, it was revealed that the constitutive activation of Nrf2 raises the expression of MafB, a NFATc1 inhibitor molecule, and negatively regulates osteoclast differentiation. On the other hand, among 1360 kinds of synthetic compounds and marine microorganism-derived components, those having an osteoclast differentiation inhibitory effect at very low concentrations, or those activating Nrf2 were found. Administration of candidate compounds to pathological model mice and analysis of pathological conditions were conducted.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：破骨細胞 Keap1 Nrf2 創薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は抗酸化酵素である H0-1 の発現を増加させると破骨細胞分化が阻害されることを見出し (Sakai E. et al.: J Cell Biochem., 2012) H0-1 の転写因子である Nrf2 を活性化させると破骨細胞分化を阻害できるのではないかと考えた。

(2) そこで研究代表者は、Nrf2 を活性化するとされていた化合物を用いて破骨細胞への分化阻害効果を解析した。その結果、食品添加物である tert-Butylhydroquinone (tBHQ) (Yamaguchi Y. et al.: J Appl Toxicol., 2012)、イチゴポリフェノールであるフィセチン (Sakai E. et al.: J Pharmacol Sci., 2013)、コーヒー豆ジテルペン化合物であるカウエオール (Fumimoto R. et al.: J Pharmacol Sci., 2012) に破骨細胞分化抑制効果があることを明らかにした。

(3) Nrf2 の活性化は Keap1 という分子によって制御されていて、活性酸素や求電子性化合物などは Keap1 と結合し、Keap1 が Nrf2 から離れることによって Nrf2 は活性化し核内へ移行することがわかっていた。コーヒージテルペン化合物であるカウエオールとカフェストールは化学構造が極めて類似していて 2 重結合が 1 つ多いカウエオールの方が Keap1 に強く結合すると報告されていた。研究代表者らは両化合物を比較し、カフェストールの方が破骨細胞分化抑制がマイルドで骨芽細胞分化を促進する効果もあることを見出した (Fukuma et al.: BioFactor, 2015)。これらのことは Keap1 に結合し Nrf2 を活性化する化合物は、効果的に破骨細胞分化を抑制する可能性を示唆しているが、研究開始当初、Keap1 がどのように破骨細胞分化に関与しているか明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

Keap1/Nrf2 を介したレドックスシステムが、骨代謝に如何に関わっているかを解明し、Keap1 に結合する化合物の *in silico* による探索およびスクリーニングシステムの開発と骨破壊疾患に対する治療効果を解析する。

3. 研究の方法

(1) Keap1 および Nrf2 遺伝子欠損マウスと野生型マウスから調整した細胞を用い、どの分化シグナルに関与するのか細胞レベルで解析する。

(2) Keap1 および Nrf2 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの透明骨格標本による軟骨形成・硬骨形成の解析と、マイクロ CT による骨形態計測、および骨組織標本を作製し骨代謝における Keap1/Nrf2 の役割を個体レベルで解析する。

(3) Keap1 と結合し Nrf2 を活性化する化合物をスクリーニングし候補化合物を絞る。

(4) 病態モデルマウスを用いて候補化合物の効果を検証する。

4. 研究成果

(1) Keap1 および Nrf2 遺伝子欠損マウス由来破骨細胞を用いて *in vitro* で解析した結果、Keap1/Nrf2 を介した酸化ストレス制御系が破骨細胞分化シグナル系と複数の経路で関与し、破骨細胞分化を制御していることを明らかにした。また、Keap1/Nrf2 を介した酸化ストレス制御系は破骨細胞分化に非常に影響を与えるだけでなく、骨芽細胞分化にも影響することが明らかになった。さらに、Keap1 遺伝子欠損マウス由来細胞において破骨細胞分化が著しく抑制している原因が、Keap1 欠損による Nrf2 の恒常的活性化に起因するものかを明らかにする目的で、Keap1/Nrf2 ダブルノックアウトマウスを作成し、骨髄細胞および脾臓細胞を用いた破骨細胞分化実験を行った。その結果、Nrf2 の恒常的な活性化が NFATc1 抑制分子である MafB の発現を上昇し、破骨細胞分化を負に制御していることを明らかにした。

(2) 細胞レベルでは Keap1/Nrf2 によって破骨細胞分化も骨芽細胞分化も制御されていることが明らかであったが、予想に反して、個体レベルでの顕著な骨格の異常を認めることができなかった。そこで軟骨細胞も含めた骨の超微細構造を観察することを目的に、マウス大腿骨・脛骨の大気圧下での走査電顕水中観察の方法の開発を行った。

(3) 一方、天然物由来化合物であるルテカルピンとジヒドロアルテミニンに破骨細胞分化抑制作用があることを明らかにしたが、これらの化合物は NFATc1 の発現を抑制したものの、Nrf2 の活性化を誘導するものではなかった。また、Nrf2 活性化作用を持つことが知られている既知の化合物の破骨細胞分化抑制効果が、Nrf2 に依存したものであることを、Nrf2 ノックアウトマウス由来細胞で証明した。さらに、長崎大学創薬研究センターより提供していただいた 1360 種類の合成化合物および海洋微生物由来成分のうち、非常に低濃度で破骨細胞分化抑制効果を持つものや、Nrf2 を活性化するものが見つかった。

(4) 病態モデルマウスへの候補化合物の投与と病態の解析を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Sato C., Yamazaki D., Sato M., Takeshima H., Memtily N., Hatano Y., Tsukuba T., and Sakai E. Calcium phosphate mineralization in bone tissues directly observed in aqueous liquid by atmospheric SEM (ASEM) without staining: microfluidics crystallization chamber and immune-EM, Scientific Report, 査読有 2019, 9:7352. DOI: 10.1038/s41598-019-43608-6

Komaki S., Sakai E., Fukuma Y., Nishishita K., Okamoto K., and Tsukuba T. Dihydroartemisinin represses osteoclastogenesis of bone marrow macrophages through reduced NFATc1 expression and impaired phosphorylation of IκBα, Biomedical Research (Tokyo), 査読有 2018, 39(4) 169-177. DOI: 10.2220/biomedres.39.169.

Fukuma Y., Sakai E., Komaki S., Nishishita K., Okamoto K., and Tsukuba T. Rutaecarpine attenuates osteoclastogenesis by impairing macrophage colony stimulating factor and receptor activator of nuclear factor κ-B ligand-stimulated signaling pathways, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 査読有 2018, 45:863-865. DOI: 10.1111/1440-1681.12941

Sakai E., Morita M., Ohuchi M., Kido M., Fukuma Y., Nishishita K., Okamoto K., Itoh K., Yamamoto M., and Tsukuba T. Effects of deficiency of Kelch-like ECH-associated protein 1 on skeletal organization: a mechanism for diminished nuclear factor of activated T cells cytoplasmic-1 during osteoclastogenesis. FASEB J., 査読有 2017, 31, 4011-4022. DOI: 10.1096/fj.201700177R

〔学会発表〕(計 10 件)

佐藤主税, Memtily Nassirhadjy, 籾野悠里, 佐藤真理, 坂井詠子: 電子顕微鏡による硬組織・細胞・リン酸カルシウムの親水環境での観察、第 38 回日本骨形態計測学会、2018

Sakai E., Yamaguchi Y, Fukuma Y, Nishishita K, Tsukuba T.: Effects of deficiency of Kelch-like ECH-associated protein 1 on osteoclastogenesis by constitutive activation of nuclear factor E2

p45-related factor 2, 18th World congress of basic and clinical pharmacology 2018

坂井詠子、福間裕、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸、Keap1 遺伝子欠損は Nrf2 の活性化を介して破骨細胞分化を抑制する、第 90 回日本生化学会 2017

坂井詠子、城戸瑞穂、福間裕、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸、Keap1 遺伝子欠損は IRF-8 と MafB の発現上昇を介して破骨細胞分化を抑制する、第 59 回歯科基礎医学会、2017

坂井詠子、岡元邦彰、筑波隆幸、ヘムオキシゲナーゼ 1 の発現抑制はカスパーゼ 3 の活性化、HMGB1 の細胞外遊離と破骨細胞分化に必要である、第 59 回歯科基礎医学会サテライトシンポジウム、2017

福間裕、坂井詠子、小巻俊介、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸、Rutaecarpine の破骨細胞分化抑制効果、第 90 回日本薬理学会年会、2017

小巻俊介、坂井詠子、福間裕、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸、Dihydroartemisinin の破骨細胞分化抑制効果、第 90 回日本薬理学会年会、2017

坂井詠子、福間裕、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸、Keap1 遺伝子欠損は *in vivo* および *in vitro* において骨の細胞分化を抑制する、第 90 回日本薬理学会年会、2017

坂井詠子、山口優、福間裕、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸、*tert*-Butylhydroquinone による Irf8 と MafB の発現増加を介した破骨細胞分化抑制機構、第 89 回日本生化学会大会、2016

坂井詠子、福間裕、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸、Keap1 遺伝子欠損は Irf8 の発現上昇を介して破骨細胞分化を抑制する、第 58 回歯科基礎医学会、2016

〔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:

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：筑波 隆幸

ローマ字氏名：TSUKUBA, Takayuki

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）

職名：教授

研究者番号（8桁）：30264055

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。