

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09928

研究課題名(和文) ヒドロキサム酸系阻害剤による破骨細胞分化促進とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Effect of the hydroxamic acid class of inhibitors on osteoclast differentiation

研究代表者

池尾 隆 (Ikeo, Takashi)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40159603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒドロキサム酸系阻害剤として分類される低分子化合物(GM6001, Actinonin, Bestatin, Amastatin, MMPi3)の破骨細胞分化に及ぼす影響を検討した。本研究結果は、ヒドロキサム酸系阻害剤が破骨細胞分化、特に細胞同士が融合する期間に破骨細胞前駆細胞の相互作用に促進的な影響を及ぼしていることを示唆している。骨量維持を目指した破骨細胞分化制御の新たな標的としてヒドロキサム酸系阻害剤のターゲット分子の応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症や歯周病などの病的骨代謝疾患の治療薬は、歴史があり信頼性のあるものから特定の分子を標的とした抗体薬などが広く用いられている。しかしながら頻度は少ないとはいえ歯科領域で問題となる顎骨壊死などの副反応が解決すべき課題として残されている。従来の治療薬とは異なる標的の同定と、その知見に基づく治療薬の開発が必要である。本研究では、破骨細胞分化を促進する低分子化合物(ヒドロキサム酸系阻害剤)の発見と、そのメカニズムの解析を行い、新たな治療標的の可能性を広げる結果が得られたことから、より安全な治療薬開発への糸口となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of the hydroxamic acid class of metalloprotease inhibitors on osteoclast differentiation. Our results suggest that the hydroxamic acid class inhibitors increased osteoclast differentiation at later periods of the process. Although we did not identify the target of hydroxamic acid class inhibitors, our results suggest that the inhibitors might increase the interaction of osteoclast-precursors to become multi-nucleated giant cells. Our results suggest that metalloproteases seem to control the interaction of osteoclast precursors, and clarifying this process could be a clue to developing strategies for the prevention of pathogenic bone resorption.

研究分野：口腔生化学

キーワード：破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は単球・マクロファージ系細胞から分化する多核巨細胞である。その生理機能は、骨のリモデリングにおいて古くなった骨を吸収し骨芽細胞による形成の場を作ることである(骨の物理的強度の維持)。また、骨代謝を制御するホルモンの作用を受けて、最終的に骨を吸収し血液中にカルシウムを放出することで、血清カルシウム濃度の維持に寄与している。口腔局所では、顎の骨の成長の際にその複雑な形態形成に関与し、また歯の萌出時には骨や乳歯を吸収し、歯が生える空間を作る。歯科矯正時には歯に加わる矯正力によって積極的に骨吸収を起こして骨内での歯の移動を可能にする。また、リウマチや歯周病などの炎症性骨疾患では、免疫系の細胞の影響を受けて病的な骨吸収を起こし病態形成に関与する。さらに癌の骨転移では骨に存在する増殖因子を、骨吸収を介して癌細胞に供給していると考えられている。このように、骨代謝、歯の萌出、骨代謝疾患や癌の骨転移など、様々な生理的病理的現象に関与するのが破骨細胞である。そのため、治療薬のターゲットとしてその理解は重要であると考えられている。近年の研究の進歩により骨代謝に関する分子(RANKL、カテプシン K、スクレロスタチン等)を標的とした治療薬が開発・利用され始めており、骨代謝研究のトランスレーショナル・リサーチとしての可能性が期待されている。しかしながら有効性が示されつつある上記の薬剤の多くは中和抗体であり、単価が高いこともあり従来用いられてきたビスホスホネートの様に第一選択薬にはなりにくいのが現状である。さらには顎骨壊死や非定型骨折がこれらの薬剤との関連が取りざたされており、新たな薬剤やそのターゲットの研究の重要性は依然として高い。

2. 研究の目的

破骨細胞培養系を用いて、破骨細胞分化に影響を及ぼす低分子化合物をスクリーニングしたところ、ヒドロキサム酸を構造にもつ低分子化合物(以下、ヒドロキサム酸系阻害剤)が破骨細胞分化を促進するという結果を得た。ヒドロキサム酸系阻害剤の標的分子としてはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)などのタンパク質分解酵素が知られている。MMPファミリーであるTACEは骨芽細胞上のRANKLを細胞表面から切断することは知られていたが、このスクリーニングは破骨細胞前駆細胞とリコンビナントRANKLを用いて行っており、osteoclast intrinsicなタンパク質分解酵素の阻害が生じて、破骨細胞分化を促進したと考えられた。そこで、本研究ではヒドロキサム酸系阻害剤のターゲットになりうる、破骨細胞前駆細胞・破骨細胞のタンパク質分解酵素に着目して、新たな細胞制御機構を検討すると同時に、より一般的に非特異的な酵素によって破骨細胞分化に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

破骨細胞前駆細胞としてマウス細胞株RAW264.7を用いた。RAW264.7は10%FBS添加MEMで培養した。低密度で播種したRAW264.7にヒトリコンビナントRANKLを50ng/mLの濃度で添加し、3日間培養することで破骨細胞を分化誘導した。破骨細胞はTRAP染色によりその存在と大きさを評価した。

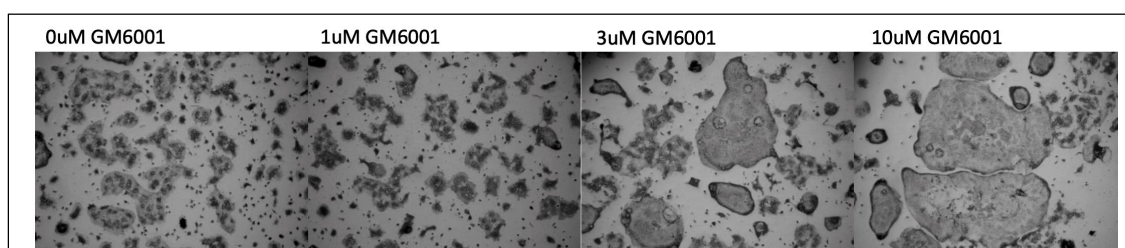
各種ヒドロキサム酸系阻害剤(GM6001, Actinonin, Bestatin, Amastatin, MMP i3など)はDMSOで溶解し、1-10 μ Mで破骨細胞分化実験に用いた。

RAW264.7上の細胞表面分子の発現状況は、蛍光標識モノクローナル抗体、ビオチン化リコンビナントタンパク質/蛍光標識ストレプトアビジンを用いて標識し、フローサイトメーターで検出・評価した。

また、主にNFATc1のタンパク質発現は、ウエスタンブロット法により評価した。

4. 研究成果

複数のタンパク質分解酵素阻害剤を用いてスクリーニングしたところ、GM6001が破骨細胞分化を促進することを確認した(下図)。



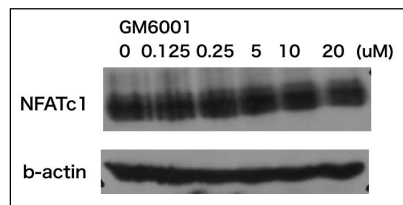
このことからGM6001の作用によってタンパク質分解酵素が阻害されることにより、破骨細胞分

化が促進されたと考えられる。

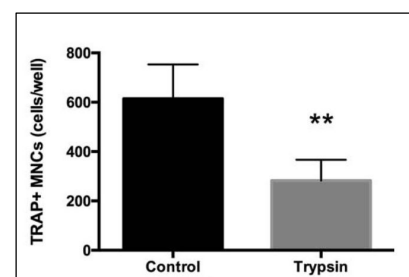
GM6001 はヒドロキサム酸系阻害剤に分類されるため、その他のヒドロキサム酸系阻害剤を用いて同様の実験を行ったところ、ターゲット酵素の異なる複数の阻害剤 (Actinonin, Bestatin, Amastatin, MMP i3) で破骨細胞分化促進作用を確認した。

ヒドロキサム酸系阻害剤	GM6001	MMP inhibitor 3	MMP 9/13 inhibitor	PD166793	Actinonin	Bestatin	Amastatin
破骨細胞分化	亢進	亢進	抑制	変化なし	亢進	亢進	亢進

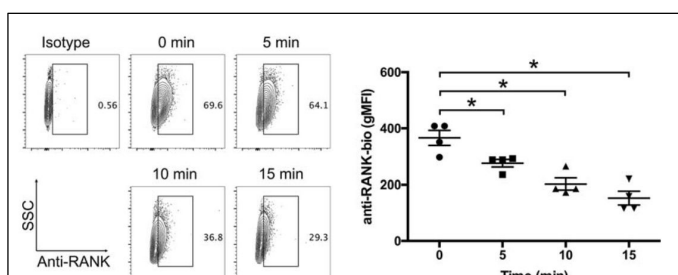
次にヒドロキサム酸系阻害剤の破骨細胞分化に中心的役割をはたす転写因子 NFATc1 の発現誘導に及ぼす影響を検討したところ、RANKL によって誘導される NFATc1 の量に変化を認めなかった (右図)。ヒドロキサム酸系阻害剤による破骨細胞分化促進は破骨細胞数の増加よりも破骨細胞の大きさの点で著明であることから、破骨細胞分化初期よりも細胞融合の時期に作用していると考えられる。そこで細胞間相互作用を起こしやすくするために、低接着基質上で RAW264.7 細胞を培養してヒドロキサム酸系阻害剤と RANKL 存在下で培養し、3 日後に接着性基質上で培養したところ、ヒドロキサム酸系阻害剤の有無に関わらず巨大な破骨細胞の形成を観察することができた。以上の結果からヒドロキサム酸系阻害剤は細胞間接着の促進あるいは RAW264.7 細胞の融合に至る相互作用において促進的な影響を及ぼしていると考えられる。現在、ヒドロキサム酸系阻害剤の標的分子の同定とその生理機能についての検討を継続している。



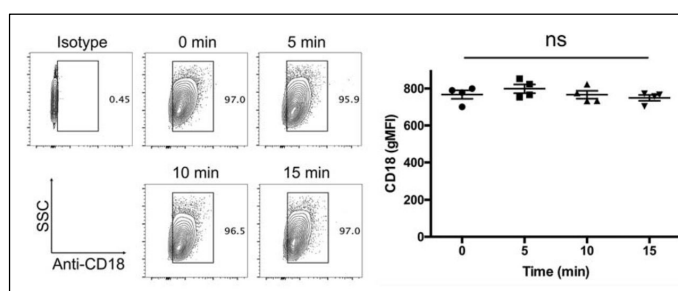
次に、破骨細胞分化に及ぼすタンパク質分解酵素の影響を直接的に検討した。細胞培養している RAW264.7 は基質に対して接着しているが、これをスクレイパーで剥離回収し用いた場合と、タンパク質分解酵素であるトリプシンを処理してから分化実験に用いた場合とで、破骨細胞分化に生じる影響を検討した。トリプシンを作用させた場合は分化した破骨細胞数が有意に減少した (右図)。



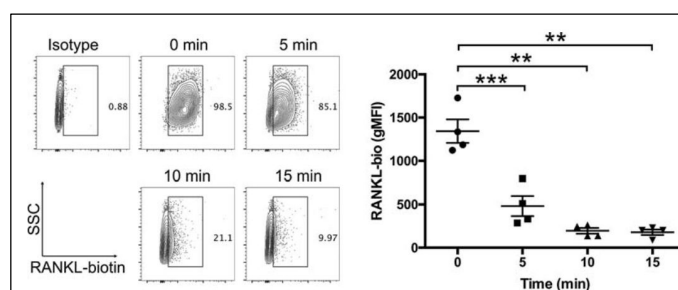
これは破骨細胞分化において中心的役割をはたす受容体 RANK が、タンパク質分解酵素によって分解されたと考えて、細胞表面の発現量をフローサイトメーター (FACS) で検討した。トリプシン処理 (5, 10, 15 分) した RAW264.7 細胞が発現する RANK (右図) の蛍光シグナルは有意に低下したが、対照実験として行った CD18 の蛍光シグナル (右図) には変化がなかった。



これは用いた抗 RANKL 抗体が結合する部位にトリプシンが影響した可能性があり、実際に RANK のリガンドである RANKL の結合強度が低下するか否かは不明である。そこでビオチン化 RANKL を用いて同様に検討した。その結果、トリプシンを作用させた場合は細胞に結合する RANKL の量が有意に減少することが明らかとなった (右図)。



以上の結果からタンパク質分解酵素によって RANK の細胞表面の発現および機能が抑制される事が明らかとなった。



これらの結果から、ヒドロキサム酸系阻害剤に分類される阻害剤の標的分子が破骨細胞分化

に影響を及ぼしており、これまで報告されていなかった破骨細胞分化機構の一つにタンパク質分解酵素が関与していることが示された。現在、阻害剤の標的分子の同定を続けており、またタンパク質分解酵素が RANK を分解することによる破骨細胞分化制御機構の可能性を同時に検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shintani T, Domae E, Yoshikawa Y, Kamada A, Ikeo T	4. 巻 53
2. 論文標題 Effect of serine protease trypsin on the interaction of RANKL and RANK	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Osaka Dent Univ	6. 最初と最後の頁 9-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	堂前 英資 (Domae Eisuke) (50454559)	大阪歯科大学・歯学部・講師 (34408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関