

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10050

研究課題名(和文) プロテインキナーゼN3による破骨細胞機能制御機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism in the osteoclast function through protein kinase N3 and its clinical application.

研究代表者

上原 俊介 (Uehara, Shunsuke)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90434480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症や炎症性骨疾患において、過剰な骨吸収により、骨量が減少する。骨共役の傷害による骨形成の低下を防ぐために、破骨細胞の骨吸収機能のみを抑制する薬剤の開発が必要である。我々は、Wntシグナルの下流で破骨細胞の機能を亢進させるProtein kinase N3 (Pkn3)を見出した。このタンパク質は、破骨細胞以外の正常な組織には、ほとんど発現していないため、副作用の少ない薬剤を開発する標的として適している。本研究課題において、我々は、骨吸収亢進による骨量減少を示すモデルマウスにPkn3阻害作用が報告されていた低分子化合物を投与した。この化合物は、骨吸収を抑制することで、骨量減少を緩和した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症は、日本国内だけでも推定1000万人以上の患者さんが存在する疾患である。骨量の減少による、骨折の増加は、QOLを低下させるだけでなく、寝たきりにつながる可能性もある。骨量の減少は、骨吸収を行う破骨細胞の働きが、骨形成を行う骨芽細胞の働きを上回ることによって生じるため、破骨細胞の骨吸収機能を抑制する化合物は、骨粗鬆症の治療薬になり得る。我々は、Pkn3というタンパク質が破骨細胞機能に重要であることを見出した。本研究はその阻害剤が、骨量減少モデルマウスの治療に利用できることを示したもので、臨床応用へつながる成果である。

研究成果の概要(英文)：In osteoporosis and inflammatory bone diseases, excessive bone resorption results in loss of bone mass. In order to prevent the deterioration of bone formation due to the failure of osteoclast-osteoblast coupling, it is necessary to develop a drug that suppresses only the bone-resorbing activity of osteoclasts. We found Protein kinase N3 (Pkn3), which enhances the function of osteoclasts downstream of the Wnt signaling. Since this protein is rarely expressed in normal tissues other than osteoclasts, it is suitable as a target for developing drugs with few side effects. In this research project, we administered a low-molecular-weight compound that had been reported to have a Pkn3 inhibitory effect on model mice showing bone loss due to increased bone resorption. This compound alleviated bone loss by suppressing bone resorption.

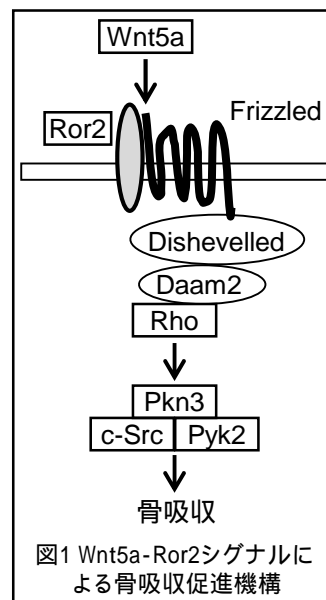
研究分野：口腔生化学

キーワード：破骨細胞 骨吸収

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患や関節リウマチなどの炎症性疾患や骨粗鬆症において、破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を上回るため、骨量の減少が生じる。ビスフォスフォネート製剤及び抗 RANKL 抗体という既存の骨吸収抑制薬は、破骨細胞の数も減少させてしまうため、破骨細胞 骨芽細胞間の共役が傷害され、それにより、骨形成も低下する。そのため、破骨細胞の数に影響を及ぼすことなく、骨吸収機能のみを抑制することが出来る薬剤の開発が望まれる。

破骨細胞の骨吸収機能には、細胞骨格の再編成が必要であり、その制御機構について、インテグリン及びその下流で活性化されるチロシンキナーゼ c-Src のシグナルが知られているが、詳細については不明な点が多く残されている。我々は、Wnt 非古典経路が破骨細胞の骨吸収機能に果たす役割について解析し、本研究開始前までに、1) Wnt5a が破骨細胞に発現する共受容体 receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (Ror2) に結合して Rho を活性化すること、2) Rho の下流で protein kinase N3 (Pkn3) を介して c-Src が活性化されることで骨吸収が亢進することを見出していた (図 1)。



2. 研究の目的

Pkn3 は破骨細胞の機能を制御する重要な分子であり、かつ、腫瘍以外の正常な組織には殆ど発現していないため、骨吸収抑制薬の治療標的として適している。Pkn3 を全身で欠損したマウスは、骨吸収低下による骨量増加を呈するが、それ以外に顕著な異常は示さない。骨粗鬆症の投薬治療は長期間に及ぶため、高価かつ投与方法が注射に限られるタンパク質製剤(抗体製剤を含む)よりも、経口投与可能な低分子化合物の方が臨床で用いるには適していると考えた。そこで、リコンビナント Pkn3 に対する阻害活性が報告されている低分子化合物の in vitro 及び in vivo での骨吸収に対する効果を検証し、臨床応用に向けての検討を加えることを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞の培養

6~9週齢の ddY マウスの脛骨から骨髓を採取し、M-CSF 存在下で 18 時間培養した。非接着細胞を回収し、M-CSF 存在下でさらに 3 日間培養して骨髓マクロファージ (bone marrow macrophage; BMM) を得た。BMM を M-CSF と RANKL 存在下 3 日間培養し、多核破骨細胞へと分化させた。各種阻害剤を添加するタイミングと期間は、分化への影響を見る場合は、BMM から多核破骨細胞への 3 日間、生存及び機能への影響を見る場合は、多核破骨細胞形成後 24 時間である。形成された破骨細胞を TRAP 染色に供し、TRAP 陽性の多核細胞 (3 核以上) を破骨細胞とした。

アクチンリング形成及び吸収窩形成を観察する際は、BMM を象牙切片に播種し、培養した。アクチンリングの可視化には、ローダミン-ファロイジンを用いた。象牙切片上の吸収窩は、マイヤーのヘマトキシリン液で染色して可視化した。

(2) 免疫沈降法

破骨細胞にアデノウイルスを用いて GFP 誘導体である Venus を付加した Pkn3 を過剰発現させた。そこに、SB202190 又は SB203580 を添加して 2 時間培養後、細胞を溶解し、破骨細胞タンパク質溶液を得た。プロテイン A 結合ビーズに抗 GFP 抗体を架橋したものを破骨細胞タンパク質溶液に添加し、4、16 時間インキュベート後ビーズに結合しているタンパク質を回収し、SDS-PAGE で分離後、c-Src 及び Pyk2 をイムノプロット法により検出した。

(3) 卵巣摘出マウスに対する SB202190 及び SB203580 投与

骨吸収亢進による骨量減少を呈するモデルマウスとして、卵巣摘出術 (ovariectomy) を施したマウス (OVX マウス) を用いた。10 週齢のメス B16/J マウス 32 匹のうち、24 匹に両側の卵巣を摘出する手術を施した (OVX 群)。残り 8 匹には偽手術を施した (Sham 群)。手術の翌日、OVX 群 24 匹を 8 匹ずつ 3 群に分けた。SB202190 投与群、SB203580 投与群にはそれぞれ、該当する試薬の生理食塩溶液 (2 mg/kg 体重) を週 6 回 4 週間にわたって腹腔投与した。Control 群には、溶媒である DMSO を生理食塩液に混和したものを薬剤と同じスケジュールで腹腔投与した。薬剤投与開始から 4 週間後に、大腿骨、脛骨及び血清を採取した。大腿骨の海綿骨量を μ CT で解析した。脛骨を用いた骨形態計測は、(株) 医創蔵に外注した。血清中の骨吸収マーカーである CTX-I を ELISA 法で測定した。また、血清中の骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼの酵素活性をキットを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) In vitro での破骨細胞への効果

予備的な実験として、Pkn3 に対する阻害活性が報告されている、Y27632 (Rock 阻害剤)、H-8 (PKA 阻害剤)、SB202190 (p38 阻害剤) の破骨細胞形成及び吸収窩形成に対する効果を 1 μM 及び 10 μM の濃度で検討した。Y27632 はどちらの濃度でも破骨細胞形成を阻害しなかったが、H-8 と SB202190 は、10 μM で、破骨細胞形成を阻害した。Y27632 は、10 μM でも吸収窩形成を抑制しなかった。H-8 は、1 μM では、わずかに阻害したが、10 μM では、阻害しなかった。SB202190 は、1 μM で、60~70%程度吸収窩形成を阻害した。そこで、以後の実験では、SB202190 について詳細に検討することにした。Pkn3 に対する阻害活性は、精製したタンパク質を用いて検討されたものである。破骨細胞において、いくつかの化合物が阻害活性を示さなかったことから、破骨細胞の Pkn3 は、一部のアミノ酸配列が異なるバリエーションであるか、又は何らかの翻訳後修飾を受けている可能性があり、今後の検討課題である。

SB202190 と類似の構造を持つ p38 阻害剤 SB203580 は、Pkn3 阻害活性が報告されていないため、これらの2つの化合物の作用を比較しながら以後の実験を行った(図2)。

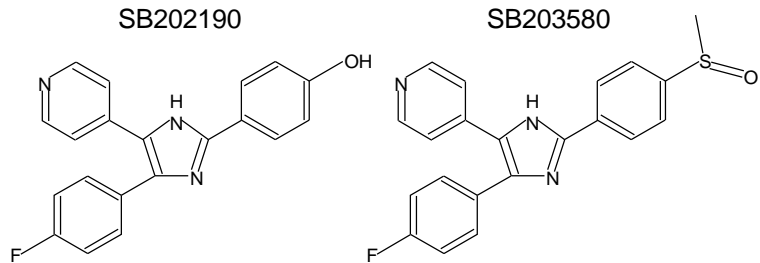


図2 本研究で用いた阻害剤の構造式

SB202190、SB203580 とも、破骨細胞の MAPKAPK2 (p38 の基質) のリン酸化を抑制したが、Pkn3 の自己リン酸化抑制は、SB203580 ではわずかに、SB202190 では強く認められた。

SB202190、SB203580 とも、破骨細胞分化を濃度依存的に抑制し、その IC50 は、それぞれ、1.41 μM 、0.99 μM だった。アクチンリング形成は、SB202190 により濃度依存的に阻害され、その IC50 は、0.085 μM だったのに対し、SB203580 は、試した全ての濃度で阻害しなかった(図3)。このことは、SB202190 は、破骨細胞形成を阻害するよりも 10 倍以上強くアクチンリング形成を阻害することを示唆する。アクチンリング形成と一致して、吸収窩形成も、SB202190 により阻害されたが、SB203580 では阻害されなかった。

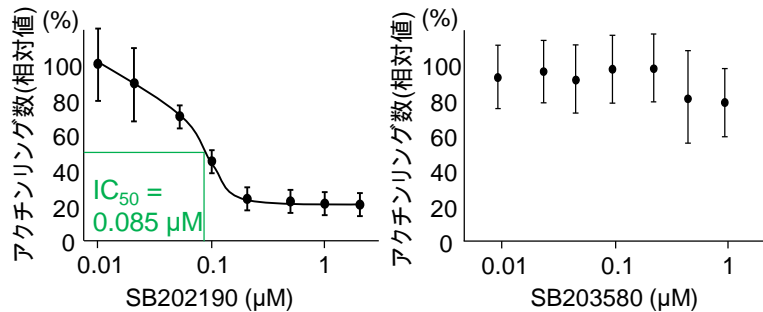


図3 アクチンリング形成への影響

OVX マウスの Control 群は、Sham 群と比べて海綿骨量が有意に減少していた。OVX マウスに SB202190 を投与した群では、Control 群と比べて有意に骨量が増加していた。一方、SB203580 投与群では、骨量の増加は認められなかった(図4)。骨形態計測により、OVX-Control 群及び OVX-

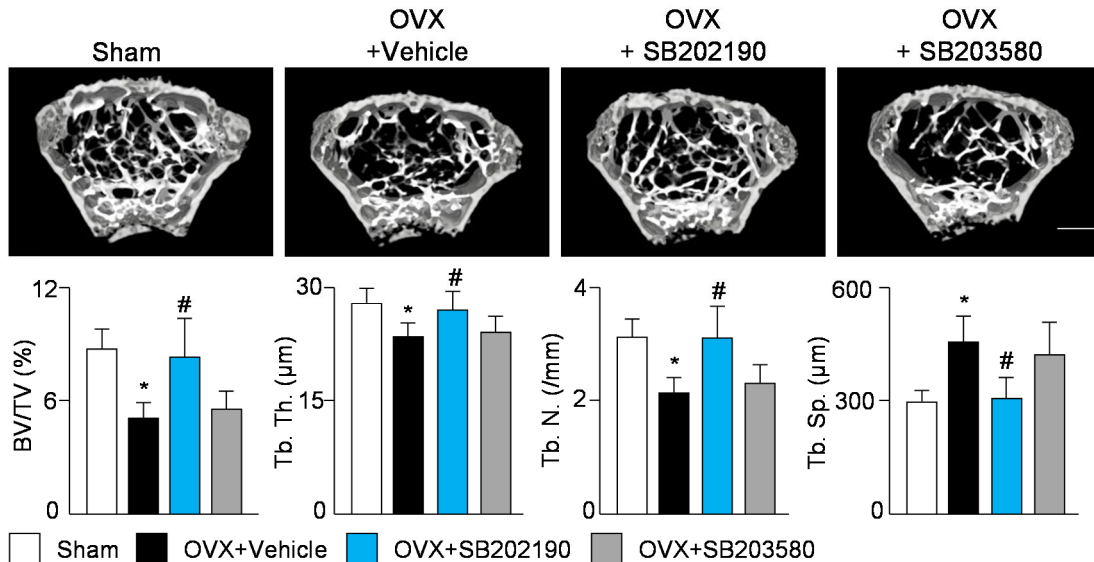


図4 OVXマウスの骨量減少に対する効果

SB203580 投与群では、吸収窩の深さが Sham 群より増加している一方、OVX-SB202190 投与群では吸収窩の深さが Sham 群と同程度であることが明らかになった。骨吸収マーカーである血清 CT-

Xの値も吸収窩の深さと同じ傾向を示した。全ての群において、骨形成速度及び血清アルカリフォスファターゼ活性には差が無かった。

これらの結果は、SB202190投与が骨吸収を抑制することにより、OVXによる骨喪失を緩和することを示唆している。OVXによる骨量減少は術後3か月程度かけて悪化していくため、今回の投与実験は、初期段階での予防的効果を示していると考えられる。より長期にわたる投与実験により、治療効果の程度を調べるのが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Shunsuke Uehara, Hideyuki Mukai, Teruhito Yamashita, Masanori Koide, Kohei Murakami, Nobuyuki Udagawa, Yasuhiro Kobayashi | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Inhibitor of protein kinase N3 suppresses excessive bone resorption in ovariectomized mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 J Bone Miner Metab . | 6. 最初と最後の頁 251-261 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-021-01296-1. | 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 - |
| 1. 著者名 Tsuda E, Fukuda C, Okada A, Karibe T, Hiruma Y, Takagi N, Isumi Y, Yamamoto T, Hasegawa T, Uehara S, Koide M, Udagawa N, Amizuka N, Kumakura S. | 4. 巻 Epub 2021 Oct 27. |
| 2. 論文標題 Characterization, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of anti-Siglec-15 antibody and its potency for treating osteoporosis and as follow-up treatment after parathyroid hormone use. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Bone. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.116241. | 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 - |
| 1. 著者名 Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, Kobayashi Y, Furuya Y, Yasuda H, Fukuda C, Tsuda E. | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Bone Miner Metab. | 6. 最初と最後の頁 19-26 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-020-01162-6. | 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 - |
| 1. 著者名 Nobuyuki Udagawa, Masanori Koide, Midori Nakamura, Yuko Nakamichi, Teruhito Yamashita, Shunsuke Uehara, Yasuhiro Kobayashi, Yuriko Furuya, Hisataka Yasuda, Chie Fukuda, Eisuke Tsuda | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Bone Miner Metab . | 6. 最初と最後の頁 19-26 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-020-01162-6. | 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 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Tomoki Mori, Kanji Horibe, Masanori Koide, Shunsuke Uehara, Yoko Yamamoto, Shigeaki Kato, Hisataka Yasuda, Naoyuki Takahashi, Nobuyuki Udagawa, Yuko Nakamichi | 4. 巻 161 |
| 2. 論文標題 The Vitamin D Receptor in Osteoblast-Lineage Cells Is Essential for the Proresorptive Activity of 1,25(OH) ₂ D ₃ In Vivo | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Endocrinology . | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqaa178. | 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 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Masanori Koide, Teruhito Yamashita, Kohei Murakami, Shunsuke Uehara, Keigo Nakamura, Midori Nakamura, Mai Matsushita, Toshiaki Ara, Hisataka Yasuda, Josef M Penninger, Naoyuki Takahashi, Nobuyuki Udagawa, Yasuhiro Kobayashi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Sclerostin expression in trabecular bone is downregulated by osteoclasts | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep . | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70817-1. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kobayashi Y, Uehara S, Koide M | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Regulations of osteoclast formation and function by Wnt signals. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Clin Calcium | 6. 最初と最後の頁 309-315 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20837/4201903309 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Uehara S, Udagawa N, Kobayashi Y | 4. 巻 61 |
| 2. 論文標題 Regulation of osteoclast function via Rho-Pkn3-c-Src pathways. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Oral Biosci | 6. 最初と最後の頁 135-140 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2019.07.002 | 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 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Siddique SM, Kubouchi K, Shinmichi Y, Sawada N, Sugiura R, Itoh Y, Uehara S, Nishimura K, Okamura S, Ohsaki H, Kamoshida S, Yamashita Y, Tamura S, Sonoki T, Matsuoka H, Itoh T, Mukai H | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 PKN1 kinase-negative knock-in mice develop splenomegaly and leukopenia at advanced age without obvious autoimmune-like phenotypes. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep | 6. 最初と最後の頁 13977 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50419-2 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, Uehara S, Okamoto M, Ishihara A, Kayama T, Saito M, Marumo K | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Int J Mol Sci | 6. 最初と最後の頁 E5525 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225525 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 上原俊介, 山下照仁, 村上康平, 小出雅則, 宇田川信之, 小林泰浩 |
| 2. 発表標題 プロテインキナーゼN3 (Pkn3) 阻害剤は、卵巣切除に伴う骨量減少を骨吸収抑制により軽減する |
| 3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔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 | 小林 泰浩 (Kobayashi Yasuhiro) (20264252) | 松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授 (33602) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|