

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21681

研究課題名（和文）骨芽細胞分化能を指標とした骨代謝制御因子PRIPの阻害剤の探索

研究課題名（英文）Screening of compound library for inhibitors of PRIP

研究代表者

松田 美穂（Matsuda, Miho）

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：40291520

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：超高齢社会の日本において、身体を支える骨の健康維持は高齢者のQOLに直結する。本研究は、新規骨代謝制御分子PRIPを標的として阻害剤を探索し骨量・骨密度の維持・改善への効果を明らかにすることを目的として解析を行った。骨芽細胞分化と共に発現が増加するオステオカルシンの遺伝子プロモーターの下流にGFPを繋いだコンストラクトを作製しMC3T3-E1細胞に導入したノックイン細胞を作製した。この細胞を用いて、化合物存在下でBMP刺激により骨芽細胞へ分化誘導し、GFP蛍光強度によりPRIP機能の阻害効果を有する化合物を選択する系を確立した。これを用いて現在、化合物ライブラリーを探索中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会の日本で増加する骨粗鬆症は、骨折だけでなく各種骨関連疾患を引き起こすため、その治療法の確立は急務である。近年、様々な作用機序の治療薬が登場しているが、例えばビスフォスフォネートによる顎骨壊死やエストロゲン製剤による視力障害など副作用を有するものが多い。また、低ホスファターゼ症へのALP補充療法においても、乳児型での高カルシウム血症発症などの副作用が根本的治療を阻んでいる。このような中、新規骨代謝関連分子であるPRIPの阻害剤が見いだされれば、骨代謝制御の新たな分子基盤の解明に貢献し骨関連疾患のメカニズム解明にも繋がり、それに基づく治療法開発のbreak throughになりえる。

研究成果の概要（英文）：We tried to search for inhibitors of PRIP, a novel molecule regulating bone metabolism, to investigate the effects of the inhibitors on bone volume and the density in vivo. PRIP (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein) is involved in the regulation of bone formation through negatively controlling osteoblast differentiation, and the inhibitors of PRIP would be able to suppress the decrease of bone volume and the density, or maintain bone health. We constructed the GFP vector driven by osteocalcin gene promoter, to generate GFP knock-in MC3T3-E1 cells. Now search for the inhibitors are in progress, using the knock-in cells and the compound library.

研究分野：骨代謝制御 生殖制御

キーワード：骨芽細胞分化 阻害剤 PRIP

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の日本では、骨粗鬆症患者が推計1200万人を越え、予備軍を含めると2000万人に達すると言われている。骨粗鬆症は、骨折だけでなく各種骨関連疾患を引き起こすため、その治療法の確立は急務である。そのため世界中で研究・開発が進められており、近年様々な作用機序の治療薬が登場しているが、例えばビスフォスフォネートによる顎骨壊死やエストロゲン製剤による視力障害など副作用を有するものが多い。また、低ホスファターゼ症においては近年ALP補充療法が開発されつつあるが、乳児型での高カルシウム血症の発症など、やはり副作用の問題が根本的治療を阻んでいる。

このように、治療法の確立が追いつかない中、細胞内シグナル分子PRIP (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein) のノックアウトマウスにおいて、ヒト閉経後と類似したホルモン状態であるにもかかわらず骨量が増加し、かつ野生型同様の健康状態で同等の寿命を全うすることが分かった。そこでこのマウスが、ヒトの健康寿命の延伸に貢献できるモデルマウスになる可能性があると考えた。これは、PRIPの阻害剤が副作用の少ない骨関連疾患の治療薬になりえることを示唆している。PRIPの機能や作用の分子メカニズムについては不明な点が多いため、阻害剤の発見によりそれら基礎的な研究が劇的に進展し、新たな分子基盤の解明に繋がることも期待された。以上より、本研究の構想に至った。

2. 研究の目的

超高齢社会の我が国は、医療、福祉など様々な課題を抱えているが、各人が自立した生活を送ることが理想であり、その実現が種々の課題解決に大きく貢献する。「立つ、歩く、座る」などの基本的動作は日常生活に不可欠であり、身体を支える骨の健康維持は、高齢者の QOL に直結する。私は、細胞内シグナル分子 PRIP の機能解析を進める過程で、本分子が骨代謝を制御する新規分子であることを見出した。そこで本研究では、PRIP が、閉経後骨粗鬆症など老化による骨量減少性疾患や、低ホスファターゼ症や骨軟化症など難病指定の重症骨関連疾患への治療の標的になりうると考え、本分子の阻害剤を探索し、骨量・骨密度の維持・改善への効果を明らかにすることを目的として解析を行った。

3. 研究の方法

・ ALP/GFP 細胞の作製

蛍光タンパク質 Green Fluorescent Protein (GFP) 遺伝子の 5' 端に自己切断ペプチド (T2A 配列) を繋ぎ、GFP の下流に薬剤 (puromycin) 耐性遺伝子を繋いだベクターを構築し、マウス頭蓋冠由来細胞株 MC3T3-E1 のゲノム上で ALP 遺伝子の最終エクソン (exon12) の 3' 端に挿入し、ALP の発現と同時に GFP を発現する細胞 (ALP/GFP 細胞) を作製した。この細胞を BMP4 刺激により骨芽細胞に分化させると、ALP の発現とともに GFP が発現する。

・ ROSA/GFP 細胞の作製

ALP/GFP 細胞が予想通りに作動しなかったため、同じく骨芽細胞分化マーカーであるオステオカルシン遺伝子のプロモーターの下流に GFP 遺伝子および薬剤耐性遺伝子を繋いだドナーベクターおよびターゲット切断ベクターを構築した。これをマウスゲノム上の ROSA26 領域に挿入した ROSA/GFP 細胞を作製した。

・ PRIP2-KO 細胞の作製

骨芽細胞系で発現する PRIP2 遺伝子をノックアウトするため、EF1 α プロモーターの下流に薬剤耐性遺伝子-SV40pA を繋いだベクターを構築し、ガイド RNA を設計した。CRISPR-Cas9 法にて MC3T3-E1 の PRIP2 遺伝子エクソン2内にベクターを挿入し、PRIP2-KO 細胞を作製した。

・ マウス前骨芽細胞の調製

生後1日のマウス未熟頭蓋骨を採取し、酵素処理を行う(0.1%コラゲナーゼ、500U/ml ディスパーゼ)。当量の培地を加え酵素反応を停止させ、セルストレイナーにて濾過し細胞を回収する。10cm dish にまき、2~4日間培養し、回収して凍結保存した。

・ 骨芽細胞分化

MC3T3-E1 およびその遺伝子改変細胞について、2つの系で骨芽細胞分化を行った。培地(1MEM α 、0% FBS、ペニシリン・ストレプトマイシン)中に BMP4 を 20ng/ml 濃度で添加し 3 日間培養、またはアスコルビン酸 (AA) を 50ng/ml および β -グリセロリン酸 (β -GP) を 10ng/ml の濃度で 7 日間培養し、ALP 染色および ALP 活性測定を行った。

4. 研究成果

化合物スクリーニングシステムの構築

骨芽細胞へ分化誘導可能な未分化細胞を分化刺激すると、PRIP 欠損 (KO) 細胞では野生型 (WT) より多くの骨芽細胞が産生される。KO 細胞のこの性質に鑑みて、骨芽細胞分化マーカーである Alkaline Phosphatase (ALP) 遺伝子を利用したスクリーニングシステムの構築を行った。まず図1に示すように、GFP 遺伝子の 5' 端に自己切断ペプチド (T2A 配列) をつないだベクターを構築し、MC3T3-E1 のゲノム上で ALP 遺伝子の末端に挿入し、ALP の発現と同時に GFP を発現する細胞 (ALP/GFP 細胞) の作製を行った。この細胞を骨芽細胞に分化させると GFP が発現するので、その蛍光強度をプレートリーダーで測定することが可能である。PRIP は、正常な骨芽細胞分化において BMP シグナルを抑制的に制御するので、化合物存在下で蛍光強度が増加すれば、その化合物は PRIP の阻害剤である可能性がある。一方、化合物が KO 細胞の蛍光強度をさらに増強していれば、PRIP 阻害以外の作用で骨芽細胞分化を促す可能性が高いので、候補から除外する。

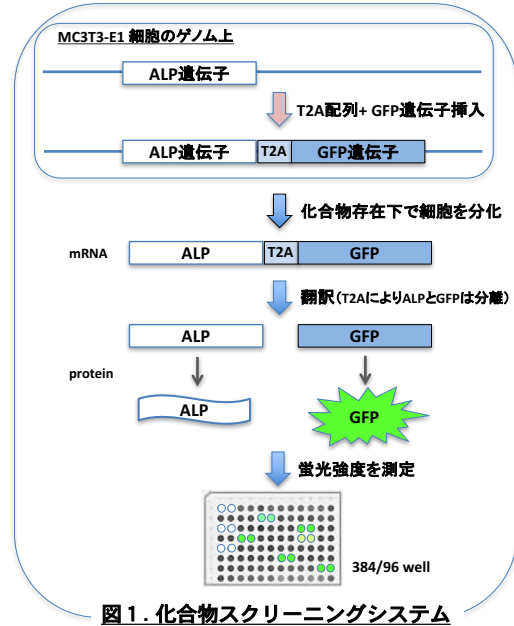


図1. 化合物スクリーニングシステム

このような計画のもと、ALP/GFP 細胞の作製を行ったが、作製は非常に困難で何度か構築方法を変更した。まず、当初の計画通り T2A-GFP ベクターの ALP 遺伝子末端への挿入を行ったがクローンが取れなかったため、薬剤耐性遺伝子を下流に追加してベクターを再構築し MC3T3-E1 への遺伝子導入を行った。188 クローンについて PCR を行い 10 クローンでノックイン配列を確認したが、シーケンス解析により一塩基置換などの変異やゲノム編集前の配列の残存の可能性などが認められた。この 10 クローンについて骨芽細胞分化を誘導し ALP 染色を行ったところ、野生型 MC3T3-E1 に比べ8個のクローンで殆ど染色されなかった (図2 に一部を示す。#12 は染色が認められたクローン)。リアルタイム PCR

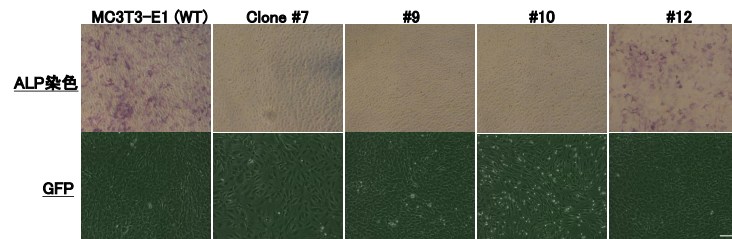


図2. ALP/GFPクローンの骨芽細胞分化誘導 (いくつかを示す)

の解析から、ALP と類似して骨芽細胞分化に伴って発現量が増加するオステオカルシンでは、野生型同様の遺伝子発現の増加が見られたが、ALP は分化0日でのベースの発現量が 1/10 ほどに減少していた (図3)。これらの結果から、分取された ALP/GFP クローンの多くは、ゲノム編集による影響により ALP の発現調節に異常を来し発現しにくくなっていることが示唆された。

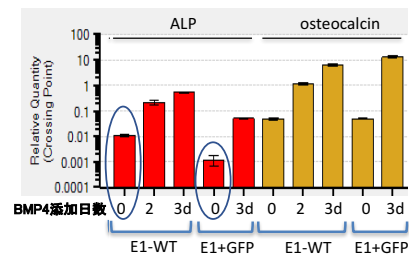


図3. 骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現

そこで、マウスゲノム上で遺伝子ターゲティングの安全領域と言われる ROSA26 に GFP を挿入することとした。オステオカルシンプロモーターの下流に GFP および薬剤耐性遺伝子を繋いだドナーベクターを作製して ROSA26 に挿入し、薬剤セレクションにより ROSA/GFP 細胞 2 クローンを得た。これらについて、骨芽細胞分化 (図4) および GFP の発現を確認した。野生型に比べ、分化能が多少下がっていたが、現在のこれらのクローンについて、最適な分化条件 (BMP 刺激および AA+ β -GP 刺激による分化誘導の条件) を検討中である。今後、分化に伴う遺伝子発現変化を確認後、化合物ライブラリーを用いた PRIP 阻害剤のスクリーニングを行う予定である。

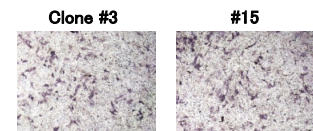


図4. ROSA/GFPクローンのALP染色

また、MC3T3-E1 の PRIP2-KO 細胞を作製し、PRIP2 発現量の低下を確認した。マウス野生型および PRIP-KO の頭蓋骨より前骨芽細胞を調製した。これらの細胞を用いて、スクリーニング後得られた PRIP の阻害剤候補について、その効果を検討し、候補化合物をさらに絞り込む。

In vitro での検討後絞り込まれた化合物について、マウス個体を用いた *in vivo* での骨への効果を検

討する(候補化合物を WT マウスに投与し、1、2、4ヶ月後に骨密度、骨形成速度等の骨形態計測(μ CT、pQCT)を行い、非投与群や PRIP-KO と比較検討する。また、経時的に生体観察や採血を行い、血清の生化学検査等を通して副作用の可能性を検討する)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Aoki Tsukasa, Hiura Fumitaka, Li Aonan, Yang Nan, Takakura-Hino Nana, Mukai Satoru, Matsuda Miho, Nishimura Fusanori, Jimi Eijiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Inhibition of non-canonical NF- B signaling suppresses periodontal inflammation and bone loss	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1179007	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 Yoshimoto Shohei, Matsuda Miho, Kato Kenichi, Jimi Eijiro, Takeuchi Hiroshi, Nakano Shuji, Kajioka Shunichi, Matsuzaki Etsuko, Hirofujii Takao, Inoue Ryuji, Hirata Masato, Morita Hiromitsu	4. 巻 895
2. 論文標題 Volume-regulated chloride channel regulates cell proliferation and is involved in the possible interaction between TMEM16A and LRR8A in human metastatic oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173881 ~ 173881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2021.173881	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 Mukai Satoru, Mizokami Akiko, Otani Takahito, Sano Tomomi, Matsuda Miho, Chishaki Sakura, Gao Jing, Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Tang Ronghao, Kanematsu Takashi, Takeuchi Hiroshi, Jimi Eijiro, Hirata Masato	4. 巻 296
2. 論文標題 Adipocyte-specific GPRC6A ablation promotes diet-induced obesity by inhibiting lipolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100274 ~ 100274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100274	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 Gao Jing, Muroya Ryusuke, Huang Fei, Nagata Kengo, Shin Masashi, Nagano Ryoko, Tajiri Yudai, Fujii Shinsuke, Yamaza Takayoshi, Aoki Kazuhiro, Tamura Yukihiko, Inoue Mayuko, Chishaki Sakura, Kukita Toshio, Okabe Koji, Matsuda Miho, Mori Yoshihide, Kiyoshima Tamotsu, Jimi Eihiro	4. 巻 101
2. 論文標題 Bone morphogenetic protein induces bone invasion of melanoma by epithelial?mesenchymal transition via the Smad1/5 signaling pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1475 ~ 1483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-021-00661-y	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 Inoue Akane, Kiyoshima Tamotsu, Yoshizaki Keigo, Nakatomi Chihiro, Nakatomi Mitsushiro, Ohshima Hayato, Shin Masashi, Gao Jing, Tsuru Kanji, Okabe Koji, Nakamura Ichiro, Honda Hiroaki, Matsuda Miho, Takahashi Ichiro, Jimi Eihiro	4. 巻 154
2. 論文標題 Deletion of epithelial cell-specific p130Cas impairs the maturation stage of amelogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116210 ~ 116210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.116210	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 Takakura Nana, Matsuda Miho, Khan Masud, Hiura Fumitaka, Aoki Kazuhiro, Hirohashi Yuna, Mori Kayo, Yasuda Hisataka, Hirata Masato, Kitamura Chiaki, Jimi Eihiro	4. 巻 135
2. 論文標題 A novel inhibitor of NF- B-inducing kinase prevents bone loss by inhibiting osteoclastic bone resorption in ovariectomized mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115316 ~ 115316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115316	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 Yoshimoto Shohei, Morita Hiromitsu, Matsuda Miho, Katakura Yoshinori, Hirata Masato, Hashimoto Shuichi	4. 巻 101
2. 論文標題 NFAT5 promotes oral squamous cell carcinoma progression in a hyperosmotic environment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 38 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-020-00486-1	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoko Kiya, Shinichiro Sawa, Miho Matsuda
2. 発表標題 Prip2 is required for the formation of gut-associated lymphoid tissue
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木 司, 松田 美穂, 自見英治郎
2. 発表標題 転写因子 NF- κ B の新たな活性化制御機構とその機能解析
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aoki, T., Jimi, E., Matsuda, M. and Nishimura, F.
2. 発表標題 Phosphorylation of serine 536 of NF- κ B p65 subunit negatively regulates transcriptional activity
3. 学会等名 International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田 美穂, 自見 英治郎, 平田 雅人
2. 発表標題 シグナル分子PRIP欠損マウスにおける破骨細胞分化異常のメカニズム
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大谷 崇仁, 松田 美穂, 溝上 颯子, 北河 憲雄, 自見 英治郎, 稲井 哲一朗, 平田 雅人
2. 発表標題 脂肪細胞の「数と質」を改善するオステオカルシン
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝上 颯子, 大谷 崇仁, 松田 美穂, 安河内(川久保) 友世, 竹内 弘, 自見 英治郎, 平田 雅人
2. 発表標題 脂肪細胞表面受容体 GPRC6A の食事誘発性肥満における役割
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------