

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592147

研究課題名（和文） 破骨細胞内シグナル分子、PICK1 制御による骨吸収抑制薬剤の開発

研究課題名（英文） Development of bone resorption inhibitors/drugs targeting signaling molecule PICK1

研究代表者

明石 喜裕（AKASHI YOSHIHIRO）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60571049

研究成果の概要（和文）：

骨のリモデリングにおいて重要な役割を担う破骨細胞を制御する新たな技術の開発は、補綴歯科治療で問題となる不要な骨吸収を抑制するための新たな治療法に結びつく可能性がある。これまでに我々は、神経細胞株 PC12 を用いた実験により、カルシニューリン B と結合して NFAT 活性を制御する分子として PICK1 を同定している。本研究で我々は、PICK1 が破骨細胞前駆細胞においてもカルシニューリンと結合しており、カルシニューリン - NFAT シグナルを介して分化を制御していることを明らかにした。本研究成果によって、PICK1 が新たな骨吸収抑制法の標的分子となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Novel molecular mechanisms and molecular targets for osteoclastogenesis could form the basis for effective therapeutic strategies against alveolar bone resorption. We previously identified PICK1 (protein interacting with C kinase) as a novel calcineurin B-binding protein that modulates NFAT activity in neuron-like PC12 cells. In this study, we found that PICK1 binds to calcineurin B in osteoclast progenitor cells and promotes osteoclast differentiation via the activation of calcineurin-NFAT signaling. The novel molecular target PICK1 may be useful for therapeutic strategies against alveolar bone resorption in prosthetic treatments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：破骨細胞・カルシニューリン・PICK1・シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

義歯床下の顎堤吸収や歯周病、抜歯などに

起因する歯槽骨吸収を抑制することは、補綴歯科治療後の経過を良好に維持する上で非

常に重要である。骨組織は、骨吸収を司る破骨細胞と、骨形成を担う骨芽細胞の細胞数および機能のバランスの上に成り立っている。しかし、破骨細胞による骨吸収が亢進すると、このバランスが崩れ、様々な疾患が生じる。

近年、破骨細胞分化を決定付ける遺伝子 Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT) の発見により、NFAT およびその上流の脱リン酸化酵素であるカルシニューリンが創薬のターゲットとして注目されている。しかし、NFAT やカルシニューリンをターゲットとした場合、多彩な生理作用をもつことから、それ自体を抑制すると強い副作用が惹起される。我々は破骨細胞に特異的に働く分子を同定し、その分子を創薬のターゲットとすることにより、副作用なく骨吸収を選択的にコントロールできるのではないかと考えた。我々はこれまでに、神経細胞株 PC12 を用いた実験により、カルシニューリンと結合する分子として Protein interacting with C kinase 1 (PICK1) の同定を報告した (Iida T et al, Biochem Biophys Res Commun, 2008)。

さらに、この報告でカルシニューリン B と PICK1 の結合部位も同定しており、その結合を阻害する物質としてペプチドを合成し、薬理作用を検討することで、破骨細胞分化を制御できる可能性を着想した (図 1)。ペプチドは、他の薬剤と比較すると分子量が小さいため生体により安全で、合成が容易で安価であるという利点を有する。

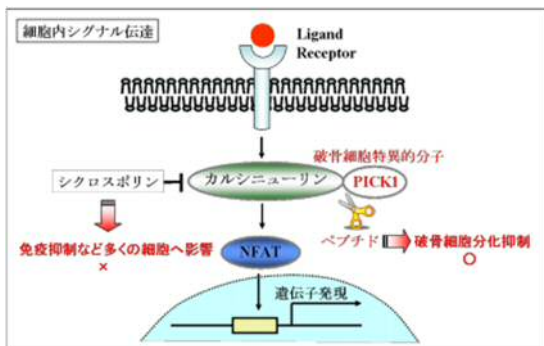


図 1 カルシニューリン/PICK1 結合をターゲットとした破骨細胞分化抑制の可能性

2. 研究の目的

本研究の目的は、破骨細胞分化におけるカルシニューリンと PICK1 結合の関与を明らかにし、この結合阻害あるいは PICK1 の遺伝子発現制御によって破骨細胞の分化を制御できる可能性を探ることである。

3. 研究の方法

(1) 骨細胞における PICK1 発現を、マウス組織 cDNA ライブラリーを用いて他の組織と比較検討した。また、マウスの骨髄細胞より M-CSF および RANKL 処置によって

分化誘導した破骨細胞における PICK1 の発現をリアルタイム RT-PCR 法およびウェスタンブロッティング法にて検討した。

- (2) マウスの骨髄細胞より分化誘導した破骨細胞における PICK1 およびカルシニューリン B の結合を検討した。破骨細胞のタンパク質抽出液に抗 PICK1 抗体を用いて免疫沈降を行った後、抗カルシニューリン B 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。ポジティブコントロールにはラット脳を用いた。
- (3) 破骨細胞前駆細胞株 (RAW264.7 細胞株) に、PICK1 強制発現ベクターを遺伝子導入し、PICK1 高発現 RAW 株を作製した。また、コントロール細胞株として、GFP 強制発現ベクターを遺伝子導入し、GFP 高発現 RAW 株を作製した。これらの RAW 株を RANKL 存在下で分化誘導し、誘導 4 日後に TRAP 染色を行うことで、PICK1 の高発現が破骨細胞形成に及ぼす影響を検討した。
- (4) これまでに我々は、破骨細胞分化に重要な役割をする NFAT 活性を指標としたルシフェラーゼレポーター破骨細胞前駆細胞 (RAW264.7) 株を樹立している (図 2)。

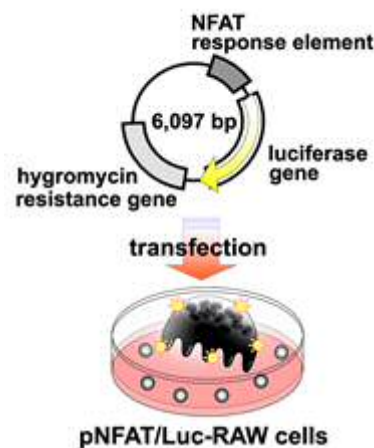


図 2 : NFAT/ルシフェラーゼレポーター破骨細胞株 (Egusa H et al. Bone, 2011)

このルシフェラーゼレポーター破骨細胞株に、テトラサイクリンリプレッサー発現ベクターおよび PICK1/テトラサイクリンオペレーター発現ベクターを遺伝子導入することにより、テトラサイクリン(ドキシサイクリン)誘導性 PICK1 高発現破骨細胞前駆細胞株を作製した。この株を用いることにより、ドキシサイ

クリンの添加によって破骨細胞株の PICK1 発現を制御でき、細胞の NFAT 活性をルシフェラーゼアッセイにより簡便に検出することが可能である。

4. 研究成果

- (1) マウス組織 cDNA ライブラリーを用いて各種組織における PICK1 発現を RT-PCR 法にて解析した結果、破骨細胞の存在する大腿骨および骨端組織における PICK1 の著明な発現が確認された (図 3)。

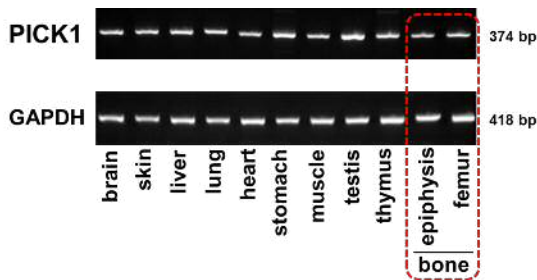


図 3 マウス骨組織における PICK1 遺伝子の発現

また、マウスの骨髄細胞より分化誘導した破骨細胞における PICK1 の遺伝子およびタンパク質の発現は、分化に伴い増加した (図 4)。

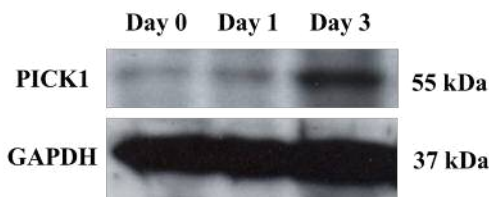


図 4 破骨細胞分化過程における PICK1 の発現亢進 (ウエスタンブロット像)

- (2) マウス骨髄由来破骨細胞におけるカルシニューリン B と PICK1 の結合を検討した結果、抗 PICK1 抗体を用いて免疫沈降を行ったサンプルでバンドを認めたことから、破骨細胞においてカルシニューリン B と PICK1 が結合することが明らかとなった (図 5)。

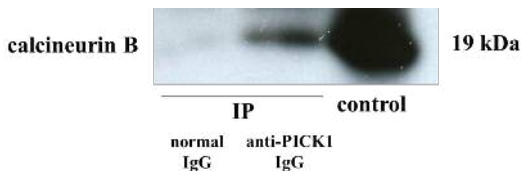


図 5 破骨細胞における PICK1 とカルシニューリン B の結合。カルシニューリン B で免疫沈降後に PICK1 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

- (3) RAW264.7 細胞に PICK1 遺伝子発現ベクターあるいは GFP 遺伝子発現ベクターを導入し、破骨細胞分化誘導後の TRAP 陽性多核巨細胞数を計測した結果、PICK1 の強制発現により TRAP 陽性多核巨細胞数は有意に増加することが明らかとなった。(図 6)

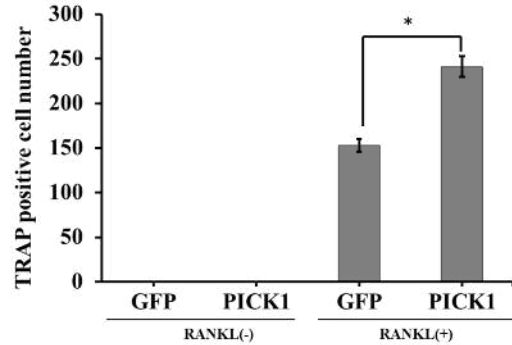


図 6 破骨細胞前駆細胞への PICK1 強制発現による TRAP 陽性多核巨細胞数。GFP (control) の強制発現と比較して TRAP 陽性多核巨細胞数は有意に増加した。

- (4) NFAT/ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入した RAW264.7 株を用いてテトラサイクリン誘導性 PICK1 遺伝子発現株を作製し、テトラサイクリン(ドキシサイクリン)刺激による NFAT 活性を計測した。その結果、ドキシサイクリンの添加は細胞の NFAT 活性を有意に促進した(図 7)。

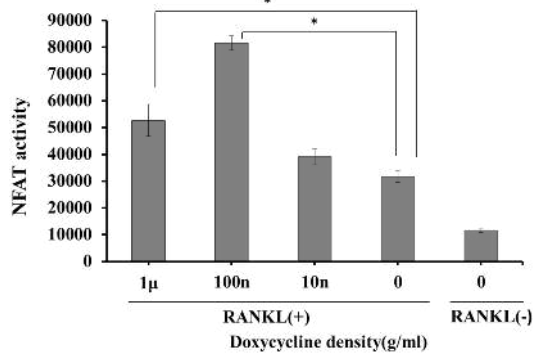


図 7 テトラサイクリン誘導による PICK1 遺伝子の強制発現を介した NFAT 活性の亢進

また、NFAT/ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入した RAW264.7 株に PICK1 とカルシニューリン B の結合阻害薬を添加し、RANKL 存在下で破骨細胞分化を 48 時間誘導した際の NFAT 活性を測定した。ルシフェラーゼ発光測定の結果、結合阻害薬はレポーター破骨細胞前駆細胞の NFAT 活性を有意に抑制した (図 8)。

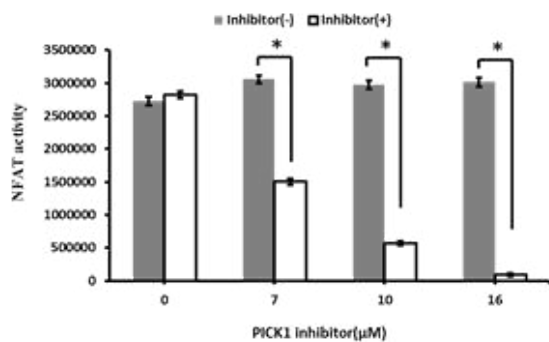


図8 PICK1 - カルシニューリン B 結合阻害薬による NFAT 活性の抑制

以上の結果から、PICK1 は破骨細胞前駆細胞においてカルシニューリン B と結合しており、カルシニューリン - NFAT シグナルを介して分化を制御していることが明らかとなった。本研究成果は、PICK1 が新たな骨吸収抑制法の標的分子となり得る可能性を示唆するものであり、今後の研究の発展が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

- (1) Kamano Y, Egusa H, Saeki M, Iida T, Uruguchi S, Yatani H. PICK1 regulates osteoclastogenesis by binding to calcineurin B. The 90th IADR General Session, 2012 年 6 月 20 日 (Iguacu Falls, Brazil).

[その他]

受賞

- (1) 江草 宏. 大阪大学功績賞, 2011 年 8 月 1 日.
- (2) 江草 宏. 国際歯科研究学会 (IADR) Distinguished Scientist Award (Young Investigator Award), 2012 年 6 月 20 日.
- (3) 鎌野優弥. Finalist, IADR Arthur R. Frechette 若手歯科補綴学研究者賞, 2012 年 6 月 21 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

明石 喜裕 (AKASHI YOSHIHIRO)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：60571049

(2) 研究分担者

江草 宏 (EGUSA HIROSHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30379078

(3) 研究協力者

鎌野 優弥 (KAMANO YUYA)

大阪大学・大学院歯学研究科・大学院生