

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20592172
 研究課題名 (和文) 破骨細胞のカルシニューリンシグナルをターゲットとした骨吸収性疾患の治療
 研究課題名 (英文) Therapeutic strategies against bone resorption using calcineurin signaling in osteoclast
 研究代表者：
 佐伯 万騎男 (SAEKI MAKIO)
 大阪大学・大学院歯学研究科・講師
 研究者番号：30273692

研究成果の概要 (和文)：骨吸収性疾患の治療において破骨細胞分化を調節する小分子化合物は非常に有望な創薬候補として期待される。破骨細胞分化を調節する新たな小分子化合物を見出すため cell-based のスクリーニングシステムを開発し、harmine という非常に興味深い小分子化合物を発見した。harmine は破骨細胞分化に対し正負に働くシグナル (カルシニューリン-NFAT および id2) を同時に活性化させるという興味深い性質をもつことが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：Small molecular compounds that potently affect osteoclastogenesis could be useful as a chemical probe for elucidating the mechanism of biological phenomena and form the basis for effective therapeutic strategies against bone resorption. To establish a high-throughput screening system for identifying osteoclastogenesis-related compounds using a cell-based sensor, and to identify novel chemical entities regulating signaling pathways in osteoclasts. Harmine activates NFATc1 expression independent of RANKL stimulation, as well as enhanced Id2 expression in osteoclast precursor cells. These multimodal actions of harmine may overall suppress osteoclastogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：破骨細胞、NFATc1、スクリーニング、小分子化合物、harmine、id2

1. 研究開始当初の背景

骨組織は決して静的な組織ではなく、骨芽細胞と破骨細胞によりダイナミックなリモデ

リングを受けている。破骨細胞の機能を制御することにより骨吸収性疾患の治療が可能になることが期待される。特に破骨細胞の分化の理解に関してはその分子メカニズムに

関して近年著しい進展があった。すなわち、c 分化のマスター遺伝子である NFATc1 が同定された。しかしながら破骨細胞分化のマスター遺伝子である NFATc1 の調節メカニズムに関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

破骨細胞分化を調節する小分子化合物をスクリーニングする。特に破骨細胞分化のマスター遺伝子である NFATc1 をターゲットにした小分子化合物のスクリーニングを行う。

3. 研究の方法

カルシニューリン-NFAT を簡便に測定するルシフェラーゼベクターを導入した破骨細胞前駆細胞 RAW264 株を用いた小分子化合物のスクリーニングを行った。スクリーニングには BioMol 社の Orphan Ligand ライブラリーおよび Sigma 社の LOPAC を用いた。NFAT 活性を変化させた薬物について mRNA および蛋白レベルでの NFAT への影響を確認した。ポジティブな結果がでた薬物について破骨細胞分化への影響を検討した。

4. 研究成果

(1)カルシニューリン-NFATを簡便に測定するルシフェラーゼベクターを導入した破骨細胞前駆細胞RAW264株を用いた小分子化合物のスクリーニングを進めた結果、小分子化合物のライブラリーからharmineを見出した。

(2)harmineはNFATのルシフェラーゼ活性を上昇させた。また親株のRAW264細胞においてもmRNAおよび蛋白レベルでNFATc1を上昇させた。しかしながら予想に反し、harmineはRANKLによって誘導される破骨細胞分化を抑制した。他のグループがharmineによってid2が上昇すること、またid2が破骨細胞分化を負に制御することからid2のノックアウトマウスを用いた実験を行ったところ、harmineが破骨細胞分化を促進した。以上の結果からは小分子化合物として非常に興味深い性質を持つことが判明したすなわち、harmineはカルシニューリン-NFAT活性を著明に活性化させるのみならず、id2の発現を上昇させることを見出した。したがってharmineは破骨細胞分化に対し正負に働くシグナル(カルシニューリン-NFATお

よびid2)を同時に活性化させるという興味深い性質をもつことが明らかになった。

(3)harmineのNFATc1活性化メカニズムとしてNFATc1を負に制御するリン酸化酵素dyrkl1aをharmineが抑制することを見出した。

(4)さらなるスクリーニングを行いあらたな創薬候補小分子化合物を多数発見した。またカルシニューリン-NFATを活性化させる化合物がかならずしも破骨細胞の分化を促進しないことを見出した。したがってスクリーニングにおいて新たな評価系を導入することが有用であることが考えられたことから、破骨細胞の分化において重要であることが報告されているNF-kB活性を簡便に測定できるルシフェラーゼベクターを導入した破骨細胞前駆細胞RAW264株を新たに樹立した。

(4) 総括と応用性

以上の結果から、小分子化合物 harmine が破骨細胞分化のマスター遺伝子である NFATc1 を活性化するメカニズムが明らかになった。これらの結果から、harmine が破骨細胞をターゲットとする骨吸収性疾患治療薬の候補となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- ① Egusa H, Doi M, Saeki M, Fukuyasu S, Akashi Y, Yokota Y, Yatani H, Kamisaki Y, The small molecule harmine regulates NFATc1 and Id2 expression in osteoclast progenitor cells, Bone 査読有、in press
- ② Shimada K, Saeki M, Egusa H, Fukuyasu S, Yura Y, Iwai K, Kamisaki Y, RPAP3 enhances cytotoxicity of doxorubicin by impairing NF-Kappa B pathway、Biochem. Biophys. Res. Comm.、査読有、404: 2011、910-914
- ③ Inoue M, Saeki M, Egusa H, Niwa H, Kamisaki Y, PIH1D1, a subunit of R2TP complex, inhibits doxorubicin-induced apoptosis、Biochem. Biophys. Res. Comm.、査読有、403: 2010、340-344
- ④ Nagata M, Wada K, Nakajima A, Nakajima N, Kusayama M, Masuda T, Iida S, Okura M, Kogo M, Kamisaki Y、Role of myeloid cell

leukemia-line cell growth of squamous cell carcinoma, J. Pharmacol. Sci. 査読有、110: 2009、344-353

- ⑤ Ni L, Saeki M, Xu L, Nakahara H, Saijo M, Tanaka K, Kamisaki Y, RPAP3 interacts with Reptin to regulate UV-induced phosphorylation of H2AX and DNA damage, J. Cellular Biochemistry、査読有、106: 2009、920-928
- ⑥ Itsuki Y, Saeki M, Nakahara H, Egusa H, Irie Y, Terao Y, Kawabata S, Yatani H, Kamisaki Y, Molecular cloning of novel Monad binding protein containing tetratricopeptide repeat domains、FEBS Letters、査読有、582: 2008、2365-2370

[学会発表] (計 28 件)

- ① Saeki M, Kamisaki Y, Chemical library screening of orphan ligands for identifying osteoclastogenesis-related small molecular compounds、第 84 回日本薬理学会年会、2011. 3. 22、横浜
- ② 島田佳奈、井上美香、佐伯万騎男、江草宏、由良義明、上崎善規、RNA polymerase II-associated protein3 は NF κ B 活性を抑制しドキシソルピシン誘導性アポトーシスを増強する、第 118 回日本薬理学会近畿部会、2010. 11. 19、大阪
- ③ 成清綾、吉田好紀、佐伯万騎男、井上美香、島田佳奈、江草宏、丹羽均、由良義明、矢谷博文、上崎善規、Monad はヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 細胞の浸潤能を負に制御する、第 118 回日本薬理学会近畿部会、2010. 11. 19、大阪
- ④ 石本俊介、和田孝一郎、大倉正也、古郷幹彦、上崎善規、扁平上皮癌におけるエンドセリン受容体シグナルの役割、第 118 回日本薬理学会近畿部会、2010. 11. 19、大阪
- ⑤ 小浜恵子、和田孝一郎、平英一、上崎善規、口腔扁平上皮ガンにおける細胞接着分子キゼリン/CD146 の発現と役割、第 117 回日本薬理学会近畿部会、2010. 7. 8、徳島
- ⑥ Horiuchi K, Inoue M, Saeki M, Egusa H, Yura T, Kamisaki Y, RPAP3 promotes doxorubicin-induced apoptosis in human breast cancer T-47D cells、第

83 回日本薬理学会年会、2010. 3. 16、大阪

- ⑦ Inoue M, Horiuchi K, Saeki M, Egusa H, Niwa H, Kamisaki Y, Monad binding protein-2 interacts with RPAP3 and regulates doxorubicin-induced apoptosis in U2OS cell、第 83 回日本薬理学会年会、2010. 3. 16、大阪
- ⑧ Kusayama M, Wada K, Okura M, Kogo M, Kamisaki Y, Role of Aquaporin-3 squamous cell carcinoma、第 83 回日本薬理学会年会、2010. 3. 16、大阪
- ⑨ 井上美香、堀内華奈、佐伯万騎男、江草宏、丹羽均、上崎善規、RPAP3 および Monad binding protein2 (MBP2) のアポトーシスにおける役割、第 116 回日本薬理学会近畿部会、2009. 11. 13、大津
- ⑩ 草山守生、和田孝一郎、永田雅英、飯田征二、大倉正也、古郷幹彦、上崎善規、扁平上皮癌における Aquaporin3 の役割、第 116 回日本薬理学会近畿部会、2009. 11. 13、大津
- ⑪ Saeki M, Ni L, Kamisaki Y, Role of Monad binding protein 1 in UV-induced DNA damage、第 82 回日本薬理学会年会、2009. 3. 16、横浜
- ⑫ Nagata M, Wada K, Kusayama M, Iida S, Okura M, Kogo M, Kamisaki Y, Mcl-1 as a target for the therapy of squamous cell carcinoma、第 82 回日本薬理学会年会、2009. 3. 16、横浜
- ⑬ 永田雅英、和田孝一郎、草山守生、大倉正也、古郷幹彦、上崎善規、扁平上皮癌における Myeloid cell leukemia-1 発現抑制による抗癌剤の作用増強、第 114 回日本薬理学会近畿部会、2008. 11. 14、神戸
- ⑭ 永田雅英、和田孝一郎、草山守生、古郷幹彦、上崎善規、口腔扁平上皮癌細胞の増殖における Myeloid cell leukemia-1 の役割、第 50 回歯科基礎医学会学術大会、2008. 9. 23、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 万騎男 (SAEKI MAKIO)
大阪大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：30273692

(2) 研究分担者

上崎 善規 (KAMISAKI YOSHINORI)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：40116017