

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06045

研究課題名(和文) グルタミン酸輸送タンパク質PICK1を標的とした顎骨吸収抑制技術の開発

研究課題名(英文) Development of jaw bone resorption suppression technique targeting glutamate transport protein PICK1

研究代表者

鎌野 優弥 (Kamano, Yuya)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70757260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：重度の骨吸収に対して、骨代謝を調節する因子の探索に基づく新たな治療法の開発は重要な課題である。本研究では、神経伝達物質であるグルタミン酸が骨代謝を調節する作用を有することをに着目し、AMPAグルタミン酸レセプターと結合するPICK1をターゲットとして研究を行った。PICK1の高発現は破骨細胞前駆細胞の破骨細胞分化を有意に促進し、PICK1のPDZドメイン結合阻害薬は破骨細胞分化を有意に抑制した。一方で、PICK1の高発現および骨芽細胞前駆細胞の骨芽細胞分化に影響を与えなかった。

以上のことから、PICK1は骨芽細胞分化に影響せず、破骨細胞分化を調整できることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：For severe bone resorption, the development of new therapeutic methods based on the regulate bone metabolism factors is an important issue. In this study, we focused on glutamate, which is a neurotransmitter that has the role of regulating bone metabolism, so we studied PICK1 which bind to AMPA glutamate receptor.

Over-expression of PICK1 significantly promoted osteoclast differentiation of osteoclast precursor cells and PDZ domain binding inhibitor of PICK1 significantly inhibited osteoclast differentiation. On the other hand, over-expression of PICK1 of osteoblast precursor cells did not affect osteoblast differentiation.

From the above, it is suggested that PICK1 does not affect osteoblast differentiation and regulate osteoclast differentiation.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：骨代謝

1. 研究開始当初の背景

抜歯、歯周病等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うえ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及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、骨吸収を抑制するためには、破骨細胞の働きを抑制するだけでは不十分であり、これに加えて骨代謝の活性化が重要であることが明らかになっている。しかしながら、骨代謝性疾患の治療薬は破骨細胞分化もしくは骨芽細胞分化のどちらか一方のみを調節するものが多く、長期投与による骨代謝機構への副作用が問題となっている。そのため、骨代謝性疾患の新たな治療薬として、骨代謝そのものを調節する新規薬の開発が求められている。また、骨代謝の調節はサイトカインやホルモンに加え、神経系からの調節が重要であることが明らかになってきた。

特に、神経伝達物質の一つであるグルタミン酸は骨芽細胞分化を促進し、破骨細胞分化を抑制することが報告されている。しかしながら、グルタミン酸が単体で十分に骨代謝を改善できるという報告はなく、グルタミン酸の作用を増強する何らかの因子が必要であると考えられる。

骨芽細胞、破骨細胞には共に AMPA 型グルタミン酸レセプターが発現しており、Protein interacting with C kinase (PICK1) は神経細胞内で AMPA 型グルタミン酸レセプターを介するグルタミン酸輸送調節する分子として同定された。また、神経細胞内で産生された PICK1 はオートクライン、パラクライン因子として神経細胞内へのグルタミン酸の取り込みを制御していることが報告されている。

さらに、申請者はこれまでの実験で、破骨細胞前駆細胞株に PICK1 を高発現させ、破骨細胞の分化を著明に促進させることに成功している(右下図)。この作用は、破骨細胞前駆細胞内において発現した PICK1 が、破骨細胞前駆細胞へのグルタミン酸の取り込みを抑制することにより生じた可能性が示唆される。



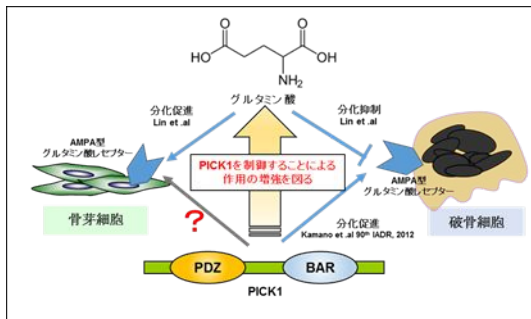
この知見により PICK1 がグルタミン酸による骨代謝機能を調節する候補因子であることが着想されるが、これを明らかにするためには PICK1 による破骨細胞分化に対するさらなる検討と、骨芽細胞分化への影響を検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では PICK1 の破骨細胞分化に対する分化促進のメカニズムの解析を目的とする。

さらに、『骨芽細胞内における PICK1 の発現が、AMPA 型グルタミン酸レセプターを介したグルタミン酸の取り込みを阻害することにより、骨芽細胞分化を抑制している』との作業仮説を提起する。

また、この仮説を証明することにより、グルタミン酸と PICK1 の阻害薬を併用することによって、骨吸収抑制、骨増生治療法の新規アプローチとなる可能性を探索する。



具体的に本研究では以下の項目を明らかにすることを目的とする。

- (1) 骨芽細胞において、PICK1 遺伝子の発現制御により分化の抑制的な制御が可能か否かを明らかにする。
- (2) AMPA 型グルタミン酸レセプターと PICK1 の結合阻害薬による破骨細胞分化および骨芽細胞分化への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PICK1 遺伝子高発現前駆骨芽細胞株の樹立
PICK1 遺伝子のエンタリーベクターをレンチウイルスベクター (plenti 6.2) に gateway cloning を用いてクローニングし、pick1 強制発現レンチウイルスベクターを作製した。作製したレンチウイルスベクターを 293ft 細胞に packaging mix と共にリポフェクタミン 2000 を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入後 48 時間で培養上清を回収し、pick1 遺伝子を強制発現するレンチウイルスを作製した。作製したレンチウイルスを前駆骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞に導入した。薬剤選択 (Blasticidin S) により安定発現株の樹立を行った。樹立に必要なエンタリーベクターは、新潟大学歯科薬理学・佐伯万騎男教授より供与いただいた。安定発現株における PICK1 の発現を確認する

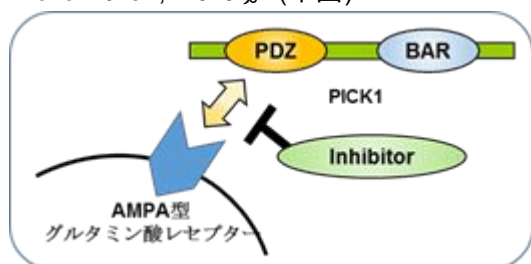
ため、RT-PCR 法を用いた。

(2) 骨芽細胞分化における PICK1 遺伝子の機能を検討

樹立した PICK1 遺伝子高発現前駆骨芽細胞株を当研究室で確立している骨分化誘導法 (Egusa ら, J Biol Chem. 2005) に則り、ハイドロコルチゾン、 β -グリセトフォスフェート、アスコルビン酸含有の培地で 20 日間から 30 日間培養し、骨芽細胞分化能を ALP 染色によって検討した。

(3) 骨代謝調節に対する PICK1 結合阻害分子の作用評価

PICK1 は PDZ ドメインを介して AMPA 型グルタミン酸レセプターと結合しており (Jin ら, J Neurosci, 2006), PICK1 の PDZ ドメインの結合を特異的に阻害する化合物として (E)-ethyl 2-cyano-3-(3,4-dichlorophenyl) acryloyl carbamate (FSC231) が知られている (Bach ら, Org Biomol Chem, 2010)。(下図)



まず FSC231 の骨芽細胞前駆細胞 (MC3T3-E1 細胞) の骨芽細胞分化への影響を検討する目的で、MC3T3-E1 細胞をハイドロコルチゾン、 β -グリセトフォスフェート、アスコルビン酸含有の培地に $100 \mu\text{M}$ の濃度で FSC231 を添加し、20 日間から 30 日間培養した。骨芽細胞分化能を検討するため、ALP 染色を行った。

次に、FSC231 の破骨細胞前駆細胞 (RAW264.7 細胞) の破骨細胞分化への影響を検討する目的で、RAW264.7 細胞を 100 nM の RANKL および FSC231 を培養液中に添加し、破骨細胞分化を誘導した。破骨細胞分化を評価する目的で、破骨細胞分化関連遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて評価した。また、TRAP 染色 (Egusa ら, Bone, 2011) により定量的に破骨細胞数の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞分化における PICK1 遺伝子の機能

作製した PICK1 強制発現レンチウイルスベクターを MC3T3-E1 細胞に導入し、Blasticidin S にて安定発現株を樹立した。

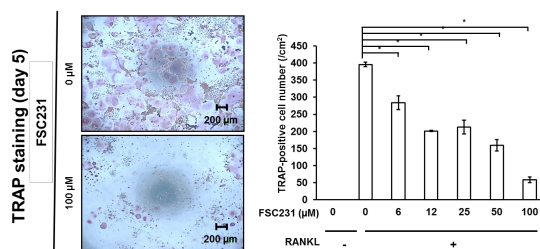
樹立した細胞を上述の通り、21 日間、ハイドロコルチゾン、 β -グリセトフォスフェート、アスコルビン酸含有の培地を用いて骨芽細胞分化誘導し、コントロール株と ALP 染色量を比較した。その結果、PICK1 強制発現とコントロール株では有意な差を認めなかった。

(2) 骨芽細胞分化における FSC231 の機能

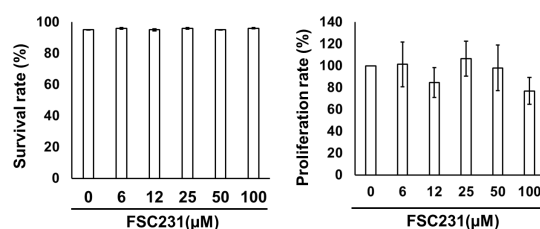
MC3T3-E1 細胞をハイドロコルチゾン、 β -グリセトフォスフェート、アスコルビン酸含有の培地に $100 \mu\text{M}$ の濃度で FSC231 を添加し、21 日間培養した。骨芽細胞分化能を検討する目的で、ALP 染色を行った。その結果、FSC231 添加群と、非添加群において ALP 染色量で有意な差を認めなかった。

(3) 破骨細胞分化における FSC231 の機能

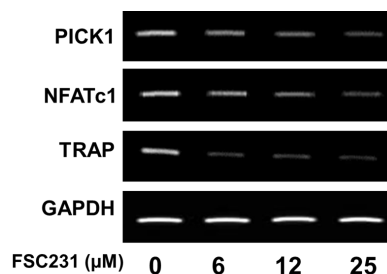
FSC231 の RAW264.7 細胞の破骨細胞分化への影響を検討する目的で、RAW264.7 細胞を 100 nM の RANKL および FSC231 を培養液中に添加し、破骨細胞分化を誘導した。破骨細胞分化への影響を検討する目的で、TRAP 染色を行い、染色された多核の巨細胞数を計測した。その結果、FSC231 は濃度依存的に破骨細胞分化を有意に抑制することが明らかとなった。(下図)



上記の抑制効果が細胞死によるものではないことを検討する目的で、細胞死アッセイを行った。その結果、FSC231 は濃度によらず細胞死および増殖能に影響を及ぼさないことが明らかとなった。(下図)



破骨細胞分化における FSC231 の抑制作用を明らかにする目的で、培養 3 日目における RAW264.7 細胞の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、FSC231 は NFATc1, TRAP といった破骨細胞分化に重要な遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。(下図)



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)

〔雑誌論文〕(計0件)

特記事項なし

〔学会発表〕(計1件)

Kamano Y.

A cell-permeable acryloylcarbamate compound FSC231 inhibits mouse osteoclast differentiation.

Chulalongkorn-Tohoku Joint Symposium in Dental Science 2015 December 9, Bangkok (Thailand)

〔図書〕(計1件)

Zhang M, Niibe K, Kondo T, Kamano Y, Saeki M, Egusa H.

Gene delivery and expression systems in induced pluripotent stem cells.

Interface Oral health Science 2016, Eds: Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N, Springer, Singapore: 121-133, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

特記事項なし

取得状況(計0件)

特記事項なし

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鎌野 優弥 (KAMANO, Yuya)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 70757260

(2)研究分担者

特記事項なし

研究者番号:

(3)連携研究者

特記事項なし

研究者番号:

(4)研究協力者

江草 宏 (EGUSA Hiroshi)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

佐伯 万騎男 (SAEKI Makio)

新潟大学・大学院医歯薬総合研究科・教授