

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09540

研究課題名(和文)炎症性骨破壊および自己免疫疾患におけるアダプター蛋白SH3BP2の機能解析

研究課題名(英文)The function of an adaptor protein SH3BP2 in inflammatory bone destruction and autoimmune diseases

研究代表者

向井 知之 (Mukai, Tomoyuki)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00454421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Poly(ADP-ribose)polymeraseであるTankyrase、およびTankyraseにより発現が調節されるアダプター蛋白SH3BP2に着目し、それら蛋白の骨代謝における役割を検討した。マウス骨髄由来マクロファージ培養での検討で、Tankyrase阻害剤が細胞内SH3BP2の蓄積を誘導し、破骨細胞分化を著明に誘導した。また、骨芽細胞では、Tankyrase阻害剤はSH3BP2蓄積、また他のTankyrase基質の増加を介してWnt阻害作用に拮抗していることが示唆された。マウス個体へのTankyrase阻害剤の投与では、破骨細胞増加を伴い骨量減少が誘導された。

研究成果の概要(英文)：Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase, is reported to degrade an adaptor protein SH3BP2 (SH3 domain-binding protein 2). We have previously shown that SH3BP2 gain-of-function mutation enhances RANKL-induced osteoclastogenesis in murine bone marrow-derived macrophages. Although the interaction between tankyrase and SH3BP2 has been reported, it is not clear whether and how the inhibition of tankyrase affects bone cells and bone mass. Here, we have demonstrated that tankyrase inhibitors enhanced RANKL-induced osteoclast formation and function in murine BMMs through the accumulation of SH3BP2, subsequent nuclear translocation of NFATc1. Tankyrase inhibitors also enhanced osteoblast differentiation and maturation, represented by increased expression of osteoblast-associated genes. Most importantly, pharmacological inhibition of tankyrase in mice significantly decreased tibia and lumbar vertebrae bone volumes in association with increased numbers of osteoclasts.

研究分野：骨免疫学

キーワード：SH3BP2 Tankyrase 破骨細胞 骨代謝 骨芽細胞 NFATc1

## 1. 研究開始当初の背景

アダプタータンパク質 Src Homology 3 Binding Protein2 (SH3BP2)は、免疫担当細胞に広く発現し、細胞内シグナル伝達を調節する。研究協力者である植木らは、顎骨破壊を特徴とするヒト遺伝病 Cherubism の責任遺伝子として SH3BP2 遺伝子変異を同定した (Ueki Y, et al. Nat Genet 2001)。さらに、P416R SH3BP2 cherubism 変異を導入した "Cherubism mouse" の解析から P416R SH3BP2 cherubism 変異は gain-of-function として作用し、マクロファージからの TNF 産生、また破骨細胞分化亢進に寄与していることも報告した (Ueki Y, et al. Cell 2007)。

研究代表者は植木の元、SH3BP2 gain-of-function が NFATc1・Syk の活性化を介して TNF-induced osteoclastogenesis を亢進すること、また human TNF transgenic (hTNF-tg) マウスにおいて炎症性骨破壊を増悪させることを明らかにした (Mukai T, et al. J Bone Miner Res. 29:2618-35, 2014、Mukai T, et al. PLoS One 9:e105518, 2014)。一連の研究により、SH3BP2 が破骨細胞活性化を介して骨量減少に関与することが明らかとなったが、その SH3BP2 の制御機構については十分に明らかとなっていなかった。

## 2. 研究の目的

骨代謝における SH3BP2 制御因子 Tankyrase の役割の解明

SH3BP2 蛋白を制御する因子は同定されていなかったが、poly(ADP-ribose) polymerase である Tankyrase が ADP-ribosylation を介して SH3BP2 蛋白の分解を誘導することで、SH3BP2-mediated pathway を調節することが報告された (Cell 147:1324-39, 2011)。今回の研究では、SH3BP2 発現に着目し Tankyrase が破骨細胞・骨芽細胞に及ぼす影響、またマウス全身骨量における影響を検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 初代培養破骨細胞に対する Tankyrase 阻害剤の効果

マウス骨髄由来マクロファージを用い、Tankyrase 阻害剤 (IWR-1, XAV939, G007-LK) が RANKL 誘導性破骨細胞分化・活性化に及ぼす影響を TRAP 染色・破骨細胞関連遺伝子発現・ミネラル吸収能にて検討した。細胞内シグナルへの影響を評価した

(2) 骨芽細胞に対する Tankyrase 阻害剤の効果

マウス新生仔頭蓋冠由来骨芽細胞を用い、Tankyrase 阻害剤が骨芽細胞分化・石灰化に及ぼす影響をアリザリンレッド染色、骨芽細胞関連遺伝子発現にて検討した。細胞内室ナールへの影響を Western blot 法により評価した。

(3) マウス全身骨量における Tankyrase 阻害剤の効果

7 週齢マウス (C57BL/6) マウスに Tankyrase 阻害剤を 4 週間全身投与し、椎体・脛骨の骨量に及ぼす影響をマイクロ CT および組織学的解析により検討した。

## 4. 研究成果

(1) 研究結果のまとめ

野生型マウス骨髄由来マクロファージにおいて、Tankyrase 阻害剤は TRAP 陽性多核細胞形成、破骨細胞関連遺伝子発現、吸収活性を有意に亢進した。その機序として、SH3BP2 蛋白の増加と Syk のリン酸化亢進および NFATc1 の核内移行亢進が示された。

マウス初代骨芽細胞は、Tankyrase 阻害剤存在下では、SH3BP2、ABL、TAZ、RUNX2 の発現亢進を伴い、分化・石灰化能が亢進した。Tankyrase 阻害剤は Wnt 阻害作用を有するにもかかわらず、骨芽細胞分

化の抑制作用が無く、SH3BP2 蓄積、また他の Tankyrase 基質の増加を介して Wnt 阻害作用に拮抗していることが示された。

野生型マウスに対する 4 週間の Tankyrase 阻害剤の投与により、組織での破骨細胞数の増加を伴い、脛骨及び腰椎の海綿骨量が有意に減少した。

## (2) 得られた成果の位置づけとインパクト

Tankyrase 阻害剤は、AXIN 蛋白の増加作用があり Wnt 阻害剤として抗癌剤、抗線維化薬としての臨床応用が期待されている。Tankyrase 阻害剤が破骨細胞分化促進を介して骨量減少を誘導するという今回の研究成果は、Tankyrase 阻害剤の骨への潜在的副作用を明らかとしたものであり、臨床応用に向けての副作用予防対策や Drug deliver 開発を促すものである。

また、今回の研究は SH3BP2 の蛋白量調節が、骨代謝に多面的に影響することを示している。そのため、SH3BP2 発現量を調節することによる、骨代謝疾患の新規治療戦略の可能性を示している。

## 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)

[雑誌論文](計 14 件)

Fujita S, Mukai T, Mito T, Kodama S, Nagasu A, Kittaka M, Sone T, Ueki Y, Morita Y. Pharmacological inhibition of tankyrase induces bone loss in mice by increasing osteoclastogenesis. *Bone*. 2018;106:156-166. doi: 10.1016/j.bone.2017.10.017. 査読有  
Kittaka M, Mayahara K, Mukai T, Yoshimoto T, Yoshitaka T, Gorski JP, Ueki Y. Cherubism Mice Also Deficient in c-Fos Exhibit Inflammatory Bone

Destruction Executed by Macrophages That Express MMP14 Despite the Absence of TRAP+ Osteoclasts. *J Bone Miner Res*. 2018;33(1):167-181. doi:

10.1002/jbmr.3295. 査読有

Fujita S, Mukai T, Akagi T, Morita Y. Treatment of refractory rheumatoid pleural effusion with abatacept. *BMJ Case Rep*. 2018 Mar 28;2018. doi: 10.1136/bcr-2017-224034. 査読有

Sawachika H, Fujita S, Mukai T, Morita Y. IgG4-related autoimmune pancreatitis complicated by splenic artery pseudoaneurysm. *BMJ Case Rep*. 2018 Mar 5;2018. doi: 10.1136/bcr-2018-224589. 査読有

Akagi T, Nishimura H, Mukai T, Morita Y. Necrosis of the gastrocnemius muscle in microscopic polyangiitis. *BMJ Case Rep*. 2018 Jan 26;2018. doi: 10.1136/bcr-2017-223585. 査読有

Kawahara K, Mukai T, Miyaji Y, Morita Y. Chronic reactive arthritis associated with prostatitis caused by Neisseria meningitidis. *BMJ Case Rep*. 2018 Jan 26;2018. doi: 10.1136/bcr-2017-223537. 査読有

Sawachika H, Kodama S, Mukai T, Morita Y. Mycophenolate mofetil treatment in a patient with recurrent lymphocytic hypophysitis. *BMJ Case Rep*. 2018 Jan 6;2018. doi: 10.1136/bcr-2017-222678. 査読有

Kodama S, Kurose K, Mukai T, Morita Y. Nivolumab-induced polyarthritis. *BMJ Case Rep*. 2017 Dec 2;2017. doi: 10.1136/bcr-2017-223387. 査読有

Innami K, Mukai T, Kodama S, Morita Y. Successful treatment using rituximab in a patient with refractory

polymyositis complicated by scleroderma renal crisis. *BMJ Case Rep.* 2017 Sep 23;2017. doi: 10.1136/bcr-2017-221205. 査読有

Akagi T, Mukai T, Kodama S, Morita Y. POEMS syndrome in a patient with rheumatoid arthritis. *BMJ Case Rep.* 2017 Aug 3;2017. doi: 10.1136/bcr-2017-220875. 査読有

Uchida A, Kidokoro K, Sogawa Y, Itano S, Nagasu H, Satoh M, Sasaki T, Kashihara N. 5-aminolevulinic acid exerts renoprotective effect via Nrf2 activation in murine rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Nephrology (Carlton)*. 2017 Oct 25. doi: 10.1111/nep.13189. 査読有

Sogawa Y, Nagasu H, Iwase S, Ihoriya C, Itano S, Uchida A, Kidokoro K, Taniguchi S, Takahashi M, Satoh M, Sasaki T, Suzuki T, Yamamoto M, Horng T, Kashihara N. Infiltration of M1, but not M2, macrophages is impaired after unilateral ureter obstruction in Nrf2-deficient mice. *Sci Rep.* 2017 Aug 18;7(1):8801. doi: 10.1038/s41598-017-08054-2. 査読有

Itano S, Satoh M, Kadoya H, Sogawa Y, Uchida A, Sasaki T, Kashihara N. Colchicine attenuates renal fibrosis in a murine unilateral ureteral obstruction model. *Mol Med Rep.* 2017;15(6):4169-4175. doi: 10.3892/mmr.2017.6539. 査読有

Kidokoro K, Satoh M, Itano S, Kuwabara A, Sasaki T, Kashihara N. Feasibility of fluorescence energy transfer system for imaging the renoprotective effects of aliskiren in diabetic mice.

*J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2016 23;17(2):1470320315625704. doi: 10.1177/1470320315625704. Print 2016 Apr-Jun. 査読有

[学会発表](計 18 件)

Shunichi Fujita (代表:Tomoyuki Mukai). Pharmacological inhibition of tankyrase induces bone loss in mice by increasing osteoclastogenesis. The 62nd Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology. 2018/4/27

Tomoyuki Mukai. SH3BP2 gain-of-function mutation alleviates lupus phenotypes in B6.MRL-FasIpr mice. The 62nd Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology. 2018/4/27

藤田俊一 (代表:向井知之). Tankyrase 阻害剤は破骨細胞分化を亢進し、骨量を減少させる:潜在的な副作用リスク. 第 35 回日本骨代謝学会学術集会. 2017/7/27

Shunichi Fujita (代表:Tomoyuki Mukai). Tankyrase/Wnt Inhibitor Upregulates Osteoclastogenesis and Osteoblastogenesis via SH3BP2. The 2017 ACR/ARHP Annual Meeting. 2017/11/05

Akiko Nagasu (代表:Tomoyuki Mukai). SH3BP2 Gain-of-Function Mutation Ameliorates Lupus in B6.MRL-FasIpr Mice. The 2017 ACR/ARHP Annual Meeting 2017/11/07

長洲晶子 (代表:向井知之). SH3BP2 の機能獲得型変異がループスプローン (BL6/Ipr) マウスの表現型に与える影響. 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2017/4/21

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

川崎医科大学 リウマチ・膠原病学

研究内容紹介

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/rheumatology/kenkyuute-ma.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

向井 知之 (MUKAI, TOMOYUKI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00454421

### (2)研究分担者

守田 吉孝 (MORITA, YOSHITAKA)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：50346441

佐藤 稔 (SATO, MINORU)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70449891

### (3)連携研究者

無し

### (4)研究協力者

植木 靖好 (UEKI, YASUYOSHI)

米国ミズーリ大学カンザスシティ校・

Associate Professor