

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15552

研究課題名(和文) 網羅的タンパク結合スクリーニングを駆使したステロイド性骨壊死予防法の開発

研究課題名(英文) Development of the prevention method for steroid-induced osteonecrosis using screening system of cell-free technology for protein analyses

研究代表者

今井 祐記 (Imai, Yuuki)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：10423873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：難病である特発性大腿骨頭壊死症の病態を明らかにすることを目的に、ステロイド受容体であるグルココルチコイド受容体(GR)の作用メカニズムを明らかにするため、愛媛大学独自技術である無細胞合成タンパク質による網羅的スクリーニング方法(2万種タンパク質)を用いて、GRと結合するタンパク質の同定を試みた。その結果、300を超えるタンパク質との結合が認められ、GRとの結合が既報であるタンパク質以外にも、転写因子やオートファジー関連タンパク質が含まれていた。このことから、ステロイド誘発性大腿骨頭壊死症の病態には、グルココルチコイドによるタンパク質分解のnon-genomic actionの関与が推察された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of the onset and progress of steroid-induced osteonecrosis of femoral head, we tried to identify the proteins interacting with Glucocorticoid Receptor (GR) using screening system of cell-free technology for protein analysis. As the results, we successfully identified more than 300 proteins, which interact with GR including not only reported proteins but also non-reported proteins relate to autophagy. This result indicates that steroid-induced osteonecrosis can be partly caused by protein degradation of non-genomic GR action as well as genomic actions.

研究分野：整形外科学

キーワード：特発性大腿骨頭壊死 ステロイド グルココルチコイド

1. 研究開始当初の背景

多くの自己免疫疾患治療に際し、抗炎症効果を目的としてプレドニンをはじめとした副腎皮質ステロイドホルモンであるグルココルチコイドによる治療が行われている。グルココルチコイドによる抗炎症作用は、主にT細胞を標的としたリンパ球の増殖抑制であるが、様々な副作用が認められ、特発性大腿骨頭壊死症が極めて日常生活動作を阻害する有害事象として広く知られている。このようなステロイド性骨壊死症の原因は未だ明確ではなく有効な予防法の確立は十分ではないものの、これまでの本邦整形外科領域の連綿たる研究から、肝臓や脂肪組織、血管内皮がその主な有害事象発症の原因組織であろうと考えられる。

グルココルチコイドは、その受容体である核内受容体グルココルチコイド受容体 (GR) を介してその作用を発揮する。GR は、リガンド依存的な転写因子としての分子機能を有するため、グルココルチコイドの標的細胞における標的遺伝子の遺伝子発現を調節している。遺伝子発現調節は、GRをはじめとした転写因子単独では行われず、様々は細胞種特異的な転写共役因子とともに緻密な分子メカニズムのもと、行われていることが分かりつつある。

以上のことから、グルココルチコイドの主要作用であるT細胞におけるGRの転写共役因子と、副作用発揮の場である肝細胞・脂肪細胞・血管内皮細胞などにおけるGRの転写共役因子との差異を網羅的に明らかにし、副作用を担う転写共役因子を同定する事が出来れば、ステロイド性骨壊死症をはじめとした有害事象予防の分子標的および低分子化合物の発見に繋がるのではと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

特発性大腿骨頭壊死症をはじめとしたステロイド治療による有害事象を回避するた

めの戦略として、これまでのグルココルチコイドが作用した結果生じる生物学的現象に対するアプローチとは異なり、副作用を起こす細胞におけるグルココルチコイド受容体 (GR) 機能の選択的制御への挑戦はこれまでにない斬新なアプローチであると考え、本研究の着想に至った。本研究の遂行により、GR と結合可能なタンパク質を、無細胞タンパク合成技術を駆使して網羅的に解析し、Big Data の活用により組織特異性を見出すことで、副作用のみを抑制可能な低分子化合物のスクリーニングが可能となる。これにより、ステロイド治療を避ける事が出来ない原疾患の治療は妨げず、副作用のみを回避する低分子化合物の発見に繋がる事が期待される。

3. 研究の方法

当研究センターにて独自に開発されたコムギ胚を用いた無細胞タンパク質合成技術 (Takai et al. Nature Protocol 2010) を応用して合成されたおよそ2万個のタンパク質とグルココルチコイド受容体 (GR) とのタンパクタンパク結合スクリーニングを行う。

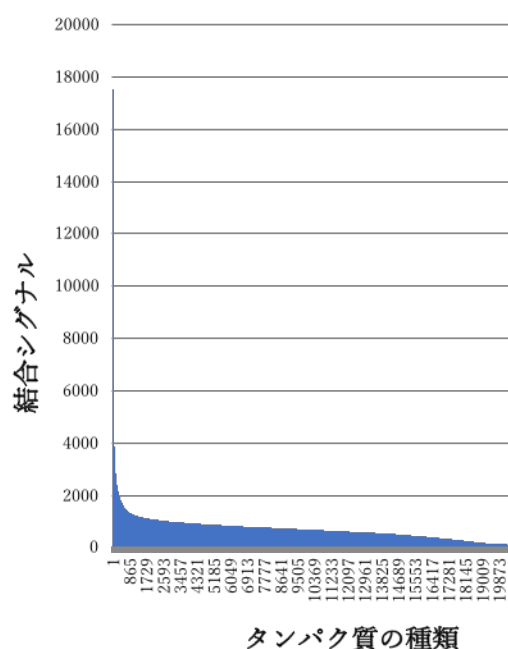
- 1) 当研究センター保有の遺伝子ライブラリーを用いて、無細胞タンパク (ビオチン標識) を合成する。
- 2) 合成されたタンパク質の機能評価を、GR に結合する事が既知である p300/CBP を結合のポジティブコントロールとして、結合確認実験を免疫沈降反応により行う。この系で結合が確認できなかった場合には、GR 自身がホモダイマーを形成する事から GR 自身をポジティブコントロールとして利用する。
- 3) FLAG-Tag を N 末端に付加した GR を同様の技術で合成し、タンパク同士の結合により発光するアルファスク

リーンシステムとマイクロプレートリーダーを用いて、網羅的なタンパク結合スクリーニングを行う。結合タンパク質の数および強度が低い等で実験が上手くいかない場合には、反応系に様々な濃度のグルココルチコイドを付加して、結合を強化する。

上記により、GR と直接的に結合するタンパク質を同定する。

4. 研究成果

当研究センター保有の遺伝子ライブラリーを用いて、無細胞タンパク合成（ビオチン標識）を網羅的に行う。合成されたタンパク質の機能評価を、GR 自身がホモダイマーを形成する事から GR 自身をポジティブコントロールとして利用する。FLAG-Tag を N 末端に付加した GR を同様の技術で合成し、タンパク同士の結合により発光するアルファスクリーンシステムとマイクロプレートリーダーを用いて、網羅的なタンパク結合スクリーニングを行った。その結果、300 を越える蛋白質との明らかな結合シグナルを認めた（右図）。これらの蛋白質には、GR との結合が既報である蛋白質とともに、1) これまでには報告の無い転写因子群、2) これまでに報告の無い蛋白質分解系蛋白質 が含まれていた。中でも、これまでに報告されていないオートファジーに関連した分子との結合が、もっとも強いシグナルを認めた。当該分子との直接結合も確認できたことから、グルココルチコイドによるタンパク質分解の non-genomic action の一部が存在することが推察された。



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 8 件) 全て査読有

1. Sakaue T, Sakakibara I, Fujisaki A, Uesugi T, Nakashiro K, Hamakawa H, Kubota E, Joh T, Imai Y, Izutani H, Higashiyama S. The CUL3-SPOP-DAXX axis is a novel regulator of VEGFR2 expression in vascular endothelial cells. **Sci Rep.** 2017 Feb 20;7:42845. doi: 10.1038/srep42845.
2. Mamoto K, Ohta Y, Ichikawa K, Imai Y, Minoda Y, Takaoka K, Nakamura H. Co-administration of Systemic Zoledronate Promotes Osteogenesis Induced by a Local Co-delivery of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 and B-tricalcium Phosphate in the Bone Marrow of the Rabbit Femur **J Musculoskelet Res.** 2017 Jan 31;19(3):1650015. DOI:// 10.1142/S0218957716500159
3. Ichikawa K, Ohta Y, Mamoto K, Mizokawa S, Minoda Y, Imai Y, Takaoka K, Nakamura H.

- Local co-application of zoledronate promotes long-term maintenance of newly formed bone induced by recombinant human bone morphogenetic protein 2. **Biochem Biophys Res Commun.** 2016 Nov 18;480(3):314-320. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.034
4. Omata Y, Nakamura S, Koyama T, Yasui T, Hirose J, Izawa N, Matsumoto T, Imai Y, Seo S, Kurokawa M, Tsutsumi S, Kadono Y, Morimoto C, Aburatani H, Miyamoto T, Tanaka S. Identification of Nedd9 as a TGF- β -Smad2/3 Target Gene Involved in RANKL-Induced Osteoclastogenesis by Comprehensive Analysis **PLoS One.** 2016 Jun 23;11(6):e0157992. doi: 10.1371/journal.pone.0157992. eCollection 2016.
 5. Haraguchi R, Kitazawa R, Mori K, Tachibana R, Kiyonari H, Imai Y, Abe T, Kitazawa S. sFRP4-dependent Wnt signal modulation is critical for bone remodeling during postnatal development and age-related bone loss. **Sci Rep.** 2016 Apr 27;6:25198. doi: 10.1038/srep25198.
 6. Ito R, Shimada H, Yazawa K, Sato I, Imai Y, Sugawara A, Yokoyama A. Hydroxylation of Methylated DNA by TET1 in Chondrocyte Differentiation of C3H10T1/2 Cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2016 March 5:134-140.
 7. Inoue K and Imai Y. Fatostatin, an SREBP inhibitor, prevented RANKL-induced bone loss by suppression of osteoclast differentiation. **BBA-Molecular Basis of Disease.** 2015 Nov;1852(11):2432-41. doi:10.1016/j.bbadis.
 8. Omata Y, Yasui T, Hirose J, Izawa N, Imai Y, Matsumoto T, Masuda H, Tokuyama N, Nakamura S, Tsutsumi S, Yasuda H, Okamoto K, Takayanagi H, Hikita A, Imamura T, Matsuo K, Saito T, Kadono Y, Aburatani H, Tanaka S. Genome-wide comprehensive analysis reveals critical cooperation between Smad and c-Fos in RANKL-induced osteoclastogenesis. **J Bone Miner Res.** 2015 May;30(5):869-77. doi: 10.1002/jbmr.2418.
- 〔学会発表〕(計 6 件)
1. Yuuki Imai, Kazuki Inoue. Chromatin remodeling during osteoclast differentiation determined by DNase-seq. 第 38 回日本分子生物学会年会/第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015, 12 月 1~4 日, 神戸ポートピアホテル, 兵庫県神戸市
 2. 今井祐記 DNase-seq による破骨細胞分化を制御する新規転写因子の同定 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015, 10 月 22~23 日, 富山市民プラザ, 富山県富山市
 3. 今井祐記 骨粗鬆症の病態生理と治療標的探索の試み 第 25 回日本病態生理学会, 2015, 7 月 31~8 月 2 日, 愛媛大学南加記念ホール, 愛媛県松山市
 4. 今井祐記 Big data 解析を用いた細胞分化制御因子の同定 第 33 回日本骨代謝学会学術集会, 2015, 7 月 23~25 日, 京王プラザホテル, 東京都新宿区

5. 井上和樹、今井祐記
DNase-seq による破骨細胞分化を制御
する新規転写因子の同定
第1回日本骨免疫学会，2015，6月
30~7月2日，ホテルブリーズベイマ
リーナ，沖縄県宮古市
6. Kazuki Inoue, Yuuki Imai. Inhibition of a
cholesterol regulator, Srebp2, prevents
RANKL-induced bone loss. 4th Joint
Meeting ECTS and IBMS，April 25-28，
2015，Congress Centre De Doelen,
Rotterdam, The Netherlands

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/index.php>

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/imailab>

6. 研究組織

(1)研究代表者

今井 祐記 (IMAI, Yuuki)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・
教授
研究者番号：10423873

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

澤崎 達也 (SAWASAKI, Tatsuya)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・
教授
研究者番号：50314969

(4)研究協力者

()