

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19592152

研究課題名（和文） 骨疾患における創薬のターゲットとなりうるプロテアーゼの作用機序の解明

研究課題名（英文） Mechanism of action for proteinase as drug target in bone diseases

研究代表者

岡元 邦彰 (OKAMOTO KUNIAKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10311846

研究成果の概要：アスパラギン酸プロテアーゼ（カテプシンE）の欠損マウスを用いて、破骨細胞形成および活性化におけるカテプシンEの役割を調べ、創薬にむけた骨疾患の治療薬開発の基礎的な実験を行った。マウス大腿骨より採取した骨髄細胞より破骨細胞を作製したところ、カテプシンE欠損型マウスで有意な破骨細胞数の減少が認められた。そこで、破骨細胞形成および活性化に必要な因子についてメッセージレベルでの解析を行ったが、両者で明らかな差は認められなかった。また、細胞内情報伝達においても明らかな差は認められなかった。次にタンパク質レベルでの違いを調べたところ、破骨細胞の分化・活性化の指標であるカテプシンKは経時的に増加が認められたが、カテプシンE欠損マウスでは野生型と比べてその発現量の減少が認められた。これは、カテプシンE欠損マウスの破骨細胞数の減少によるものと考えられた。主に破骨細胞増殖に関与しているといわれる *c-fms* の発現を調べたところ、カテプシンE欠損マウスに発現の減少が認められた。そこで、細胞増殖能を調べたところ、カテプシンE欠損マウスで細胞増殖率の減少が認められた。つまり、破骨細胞前駆細胞の増殖を抑制していることが破骨細胞の分化・活性化を抑制している原因の1つであることが示唆された。リアルタイムPCRの結果では、*c-fms* のメッセージレベルでの発現には有意な差は認められなかったため、細胞膜への輸送あるいはタンパク質としての機能面での障害の可能性が考えられる。また、両破骨細胞のコラーゲン分解能を DQ-コラーゲンを用いて調べたところ、明らかに欠損型において分解能の低下が認められた。このことより、破骨細胞のコラーゲン分解能におけるカテプシンEの関与が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
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, 骨粗鬆症, プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞とプロテアーゼとの関連性を示すものとして、システインプロテアーゼのカテプシンKとメタロプロテアーゼのMMP-9があげられる。カテプシンKについては、波状縁に分泌され、コラーゲンを分解することがあきらかと報告され、ノックアウトマウスによる解析も行われた (Saftig et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13453-13458, 1998; Gowen M., et al., *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 1654-1663, 1999)。ヒトにおいてもカテプシンKの欠損が骨格系に異常をきたすことが報告されている (Ho N., et al., *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 1649-1653, 1999) また、MMP-9についても、骨との関連性がし報告されている (Vu T. H., et al., *Cell*, **93**, 411-422, 1998)。その他のプロテアーゼについては、細胞内でのエンドソーム・リソソーム系によるエンドサイトーシスにより取り込んだ骨基質の分解に関与している可能性が示唆されている。我々は以前から、宿主由来のプロテアーゼとして細胞内アスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシンDとEについて研究を行ってきた。すでに、カテプシンDのノックアウトマウスに関しては、ドイツ・ゲッチンゲン大学の P. Saftig らの供与により入手していたので、これらのノックアウトマウスを用いて、破骨細胞の分化における細胞内プロテアーゼの関与を検討したところ、カテプシンDの影響はほとんど認められなかった。おそらく他のプロテアーゼの代償作用が働いたものと考えられる。カテプシンEに関しては、Yoshimine らが活性化された破骨細胞の波状縁にカテプシンEの強い免疫反応を報告している (Yoshimine et al., *Cell Tissue Res.*, **281**, 85-91, 1995) もの、その機能についてはほとんど知られていない。そこで、我々はカテプシンEの阻害薬であるペプスタチンAを破骨細胞形成時に作用させたところ、ペプスタチンAの濃度依存的に破骨細胞形成が抑制された (Yoshida H., Okamoto K. (corresponding author), et al., *J. Biochem.* **139**, 583-590, 2006)。

我々は、以前よりカテプシンEのノックアウトマウスの作製を行っており、この酵素がアレルギー性疾患に関係していることを明らかとしている (Tsukuba T., Okamoto K. (equally contribute), et al., *J. Biochem.* **134**, 893-902, 2003)。また、最近では、この酵素のノックアウトマウスが *P. gingivalis* を含む様々な細菌の感染に非常に感受性が高いことも明らかとされ、本酵素の生体内での役

割の重要性が指摘されるようになって来た。

2. 研究の目的

近年、破骨細胞への分化・活性化において RANK (Receptor Activator of NF- κ B)/RANKL (RANK Ligand) と OPG (Osteoprotegerin) の系がこれらを厳密に制御している機構の一つであることが明らかとされた。そこで、我々はカテプシンEのノックアウトマウスの大腿骨より骨髓細胞を採取し、RANK/RANKL の系を利用して破骨細胞を作成した。一般に、骨髓細胞に Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) と RANKL を作用させると、3日目まで単核の破骨細胞が形成され、さらに5、6日目には多核の破骨細胞が出現する。今回野生型とノックアウトマウスにおいて破骨細胞数を24穴のプレートで計測したところ、3日目、6日目ともにノックアウトマウスにおける破骨細胞数の有意な減少が認められた (測定は破骨細胞に特異的なマーカーである酒石酸耐性酸性アルカリフォスファターゼで染色後細胞数を計測した)。このことは、細胞数を変化 (1×10^6 と 2×10^6) させても同じであった。すなわち、カテプシンDと比較して、カテプシンEは骨の形成および破骨細胞への活性化に重要な働きをしている可能性が示唆された。そこで今回カテプシンEの破骨細胞形成および活性化に及ぼす影響を調べ、そのメカニズムを解明することにより、新たな骨疾患の治療薬開発の足がかりになることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨髓細胞の採取および破骨細胞作製方法

生後4～8週のカテプシンE野生型および欠損型マウスの大腿骨から骨髓細胞を採取し、直径100mmのプレートにまく。50ng/mlのM-CSFを添加した α -MEM/10%FCSで1日間培養後、浮遊細胞を回収する。再び直径100mmのプレートにまき直し (1×10^7 cell)、今度は50ng/mlのM-CSFを添加した α -MEM/10%FCSで3日間培養後、付着細胞を回収する (破骨細胞作製法1)。

(2) RT-PCR法を用いた破骨細胞活性化因子の発現

生後4～8週のカテプシンE野生型および欠損型マウスの大腿骨から骨髓細胞を採

取し、直径60mmのプレートにまく (1×10^6 cell)。10ng/mlのM-CSF, 50ng/mlのRANKLを添加した α -MEM/10%FCSで3日および5日培養した破骨細胞より、total RNAを採取し、これをテンプレートにしてReverse Transcriptional Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)を行う。プライマーには破骨細胞形成および活性化に必要な因子、RANK, RANKL, OPG, M-CSF, NFATc1などについて解析を行う。場合によっては、Real Time RT-PCRを用いて、定量的に各因子の発現を調べる。RANKに関しては、破骨細胞膜受容体であるので、mRNAレベルで変化が認められなくてもタンパク質の輸送システムに違いがある可能性があるため、FACS SCANで膜表面の発現を調べる。

(2) 細胞内情報伝達経路の解析

破骨細胞作製法1に従って回収した細胞を、細胞数計測後12穴のプレートにまき、M-CSF (30ng/ml)で1日間培養した細胞 (Bone Marrow Macrophage; BMM)、あるいはM-CSF (30ng/ml)とRANKL (50ng/ml)で5日間培養し形成した多核の成熟破骨細胞 (OCL)を用いて、RANKLの刺激による細胞内情報伝達を調べる。まず血清、M-CSF、RANKLを除いた α -MEMのみの培地で1時間培養後、細胞にRANKL (50ng/ml)で刺激を加える。0, 5, 15, 30, 60分後、cell lysis bufferを用いて細胞を回収する。その細胞を -80°C で凍結してから、 4°C で1時間振動させ、15,000回転、5分遠心後、上清を回収する。これを細胞内タンパク質抽出物として使用する。電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、RANKの下流のシグナル分子に特異的な抗体 (リン酸化-IKK α , -I κ B, -ERK1/2, -p38, -JNK)を用いてカテプシンEの野生型と欠損型で比較を行い、どの経路を抑制しているのかを解析する。

(3) DQ-コラーゲンの分解

破骨細胞形成法1に従って回収した細胞の細胞数を計測後 2×10^5 cell ずつ96穴プレートにまき、M-CSF (30ng/ml)とRANKL (50ng/ml)で24時間培養した細胞を用いて、DQコラーゲンの取り込みおよび分解を調べ、カテプシンEの野生型と欠損型で比較を行う。

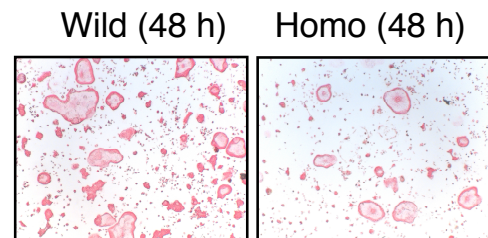
(4) 細胞増殖能の解析

破骨細胞形成法1に従って回収した細胞の細胞数を計測後 2×10^5 cell ずつ96穴プレートにまき、M-CSF (30ng/ml)とRANKL (50ng/ml)で24時間培養後、Cell Counting Kitを用いて細胞増殖能を調べる。

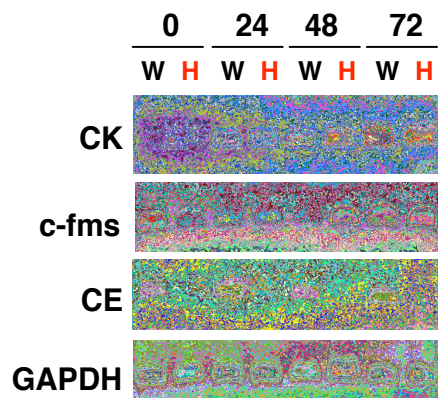
4. 研究成果

(1) 破骨細胞形成および RT-PCR 法を用いた破骨細胞活性化因子の発現

カテプシンEの破骨細胞における働きを明らかにするために、生後4~8週のカテプシンE野生型および欠損型マウスの大腿骨から骨髄細胞を採取し、直径100mmのプレートにまいた。50ng/mlのM-CSFを添加した α -MEM/10%FCSで1日間培養後、浮遊細胞を回収する。再び直径100mmのプレートにまき直し (1×10^7 cell)、今度は50ng/mlのM-CSFを添加した α -MEM/10%FCSで3日間培養後、付着細胞を回収した (破骨細胞作製法1)。24, 48, 72時間後、多核の破骨細胞の形成を破骨細胞のマーカである酒石酸耐性アルカリフォスファターゼ染色により確認したところ、カテプシンE野生型と比べ、欠損型マウスで有意な破骨細胞数の減少が認められた (図はRANKL添加48時間後のTRAP染色像を示す)。

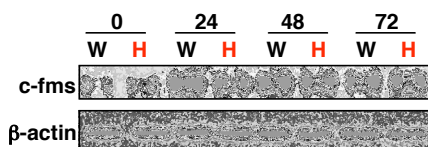


次に、同じく骨髄細胞形成後、破骨細胞形成および活性化に必要な因子、RANK, RANKL, OPG, M-CSF, NFATc1などについてRT-PCR解析を行ったが、両者で差は認められなかった。破骨細胞に特異的に発現しているカテプシンKは両者とも経時的に発現の上昇が認められているものの、両者の比較においてはカテプシンE欠損型において発現の低下が認められた。一方、細胞増殖に関連しているといわれるc-fmsは0, 24時間でカテプシンE欠損型において発現の現象が認められた (図はカテプシンK、c-fms、カテプシンEの経時変化を示す)。



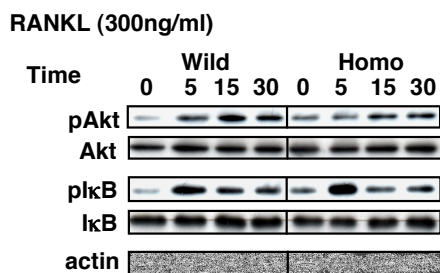
(2) タンパク質の発現

破骨細胞の分化・活性化の指標であるカテプシンKは経時的に増加が認められたが、カテプシンE欠損マウスではその発現量の減少が認められた。これは、カテプシンE欠損マウスの破骨細胞数の減少によるものと考えられた。このことは前述の RT-PCR と一致している。また、膜表面タンパク質である c-fms を調べたところ、RANKL 添加後 24 時間でカテプシン E 欠損型にやや発現の低下が認められるもののその後は明らかな差が認められなかった (図は c-fms の経時的变化を示す)。



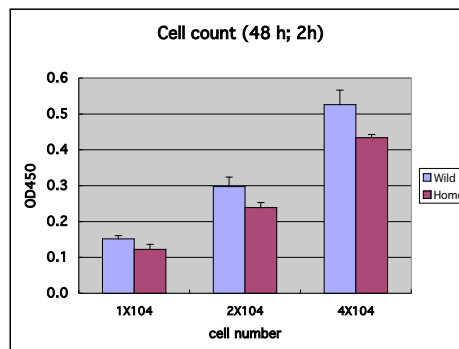
(3) 細胞内情報伝達経路の解析

破骨細胞形成後、RANKL の刺激による細胞内情報伝達を調べた。電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、RANK の下流のシグナル分子に特異的な抗体 (リン酸化-IKKα, -IκB, -ERK1/2, -p38, -JNK) を用いてカテプシン E の野生型と欠損型で比較を行ったところ、細胞内情報伝達においても明らかな差は認められなかった (図は Akt と IκB を示す)。



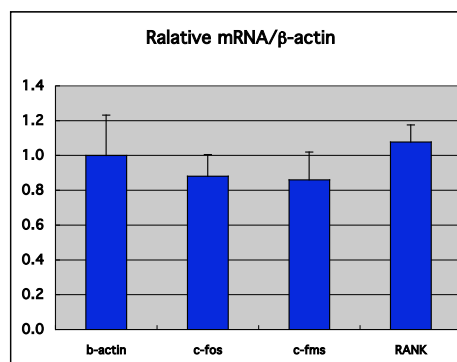
(4) 細胞増殖能の解析

RANKL 添加後 24 時間でカテプシン E 欠損マウスに c-fms の発現の低下が認められた。c-fms は主に破骨細胞増殖に関与しているといわれるので、細胞増殖能を cell counting kit で調べたところ、カテプシン E 欠損マウスで細胞増殖率の減少が認められた。つまり、破骨細胞前駆細胞の増殖を抑制していることが破骨細胞の分化・活性化を抑制している原因の 1 つであることが示唆された (図は RANKL 添加後 48 時間での Cell Counting Kit の結果を示す)。



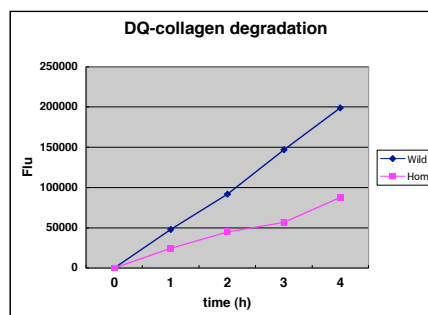
(5) リアルタイム PCR 解析

破骨細胞形成時には破骨細胞形成因子である c-fms, RANK 等の mRNA レベルに差は認められなかったが、今回破骨細胞前駆細胞の段階での mRNA レベルの解析をリアルタイム PCR を用いて定量的解析を行った。しかしながら、ゲル電気泳動と同様に、c-fms, RANK, c-fos 等、mRNA の発現に有意な差は認められなかった (図は RANKL 添加後 24 時間での発現を示す)。



(6) DQ-コラーゲンの分解

両破骨細胞のコラーゲン分解能を DQ-コラーゲンを用いて調べた。時間の経過とともに、培養上清に分泌されるカテプシン E 野生型および欠損型両方からの破骨細胞において、DQ-コラーゲンの量が上昇しているのが認められたが、明らかに欠損型において分解能の低下が認められた (図は RANKL 添加後 24 時間での DQ-コラーゲンの分解量を示す)。



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 3 件)

- ① Kawakubo T., Okamoto K., Iwata J., Shin M., Okamoto Y., Yasukochi A., Nakayama K-I., Kadowaki T., Tsukuba T. and Yamamoto K.: Cathepsin E Prevents Tumor Growth and Metastasis by Catalyzing the Proteolytic Release of Soluble TRAIL from Tumor Cell Surface. **Cancer Res.** **67**, 10869-10878 (2007) 審査有
- ② Hu J-P., Nishishita K., Sakai E., Yoshida H., Kato Y., Tsukuba T. and Okamoto K.: Berberine inhibits RANKL-induced osteoclast formation and survival through suppression of nuclear factor kB and Akt pathways. **Eur. J. Pharmacol.** **580**, 70-79 (2008) 審査有
- ③ Shigematsu N., Fukuda T., Yamamoto T., Nishioku T., Yamaguchi T., Himeno M., Nakayama K-I., Tsukuba T., Kadowaki T., Okamoto K., Higuchi S. and Yamamoto K.: Association of cathepsin E deficiency with the increased territorial aggressive response of mice. **J. Neurochem.**, **105**, 1394-1404 (2008) 審査有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 坂井詠子, 福本 敏, 胡 錦萍, 西下一久, 佛坂齊社, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 成熟破骨細胞の延命と脂質ラフト形成におけるリセドロネートおよび D-PDMP の作用, 第 49 回歯科基礎医学会学術大会, 札幌 (2007)
- ② 胡 錦萍, 西下一久, 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: ベルベリンによる破骨細胞生存の抑制機構の解明, 第 49 回歯科基礎医学会学術大会, 札幌 (2007)
- ③ 筑波隆幸, 柳川三千代, 岡元邦彰, 門脇知子, 山本健二: カテプシン E 欠損によるミトコンドリア機能異常と酸化ストレス亢進, 第 49 回歯科基礎医学会学術大会, 札幌 (2007)
- ④ 岡元邦彰, 石田 豊, 坂井詠子, 西下一久, 山本健二, 筑波隆幸: 赤血球におけるカテプシン E の役割, 第 49 回歯科基礎医学会学術大会, 札幌 (2007)
- ⑤ Tomoyo Kawakubo, Atsushi Yasukochi, Kuniaki Okamoto, Yoshiko Okamoto, Tomoko Kadowaki, Takayuki Tsukuba, Kenji Yamamoto: ASSOCIATION OF CATHEPSIN E WITH HOST DEFFENCE AGAINST TUMOR CELLS,

5th General Meeting of the International Proteolysis Society, Greece (2007)

- ⑥ Takayuki Tsukuba, Kuniaki Okamoto, Tomoko Kadowaki, Kenji Yamamoto: CONTROL OF THE ENDOSOME/LYSOSOME SYSTEM OF MACROPHAGES BY CATHEPSIN E, 5th General Meeting of the International Proteolysis Society, Greece (2007)
- ⑦ 坂井詠子, 嶋田めぐみ, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸, 中山浩次: RANKL 誘導性破骨細胞分化における鉄結合蛋白の関与, 第 50 回歯科基礎医学会学術大会, 東京 (2008)
- ⑧ 筑波隆幸, 柳川三千代, 岡元邦彰, 門脇知子, 山本健二: カテプシン E 欠損による遊走能および細胞接着能の低下, 第 50 回歯科基礎医学会学術大会, 東京 (2008)
- ⑨ 門脇知子, 岡元邦彰, 山本健二, 筑波隆幸: カテプシン E 欠損マウスにおける高脂血症および脂肪肝の誘導, 第 50 回歯科基礎医学会学術大会, 東京 (2008)
- ⑩ 岡元邦彰, 川久保友世, 山本健二, 筑波隆幸: カテプシン E 遺伝子発現に関与する転写因子 Sp1, 第 50 回歯科基礎医学会学術大会, 東京 (2008)
- ⑪ 岡本美子, 岡元邦彰, 山本健二, 荒牧弘範: カテプシン E 遺伝子発現に関する転写因子 Sp1, 第 31 回日本分子生物学会/第 81 回日本生化学会合同大会, 神戸 (2008)
- ⑫ 筑波隆幸, 柳川三千代, 岡元邦彰, 岡本美子, 門脇知子, 山本健二: カテプシン E 欠損はマクロファージの膜蛋白質輸送異常とミトコンドリア機能異常を起こす, 第 31 回日本分子生物学会/第 81 回日本生化学会合同大会, 神戸 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡元 邦彰 (OKAMOTO KUNIAKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号: 103118446

(2) 研究分担者

西下 一久 (NISHISHITA KAZUHISA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号: 20237697
坂井 詠子 (SAKAI EIKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号: 10176612
胡 錦萍 (HU JINGPING) 平成 19 年度
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
外国人客員研究員
研究者番号: 30420631