

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390393

研究課題名 (和文) 骨吸収抑制剤の開発を目指した破骨細胞形成シグナルの解明

研究課題名 (英文) Elucidation of osteoclastogenic signals in the aim of development of bone-resorption depressants

研究代表者 井上 純一郎 (INOUE JUN-ICHIRO)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70176428

研究成果の概要 (和文)：骨吸収を担う破骨細胞の過度な活性化や分化は骨粗鬆症やリウマチ等の疾患を悪化させる。そこで骨吸収抑制剤の開発を目指し破骨細胞分化シグナルについて解析し受容体 RANK の HCR と呼ぶ部分が分化に必須であることを見出し、さらに HCR に結合して HCR とともに破骨細胞分化 に関与するタンパク質候補を同定した。また、化合物ライブラリーを用いて、これらのタンパク質の機能を阻害することにより骨吸収抑制剤として働く可能性のある薬剤の探索を開始した。

研究成果の概要 (英文)：Excess activation or differentiation of bone-resorbing osteoclasts results in exacerbation of osteoporosis and rheumatoid arthritis. To develop bone-resorption depressants, we analyzed osteoclastogenic signals and found that HCR (Highly Conserved domain in RANK) of the RANK receptor is crucial for differentiation of osteoclasts. We also identified the HCR-binding proteins that may function together with HCR to promote osteoclastogenesis. Moreover, we have already begun to search compounds that could be used as bone-resorption depressants by inhibiting osteoclastogenic signals through HCR using the chemical compound library.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
総 計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：①破骨細胞 ②リウマチ ③骨粗鬆症 ④RANK ⑤創薬

## 1. 研究開始当初の背景

正常な骨形成は、骨を生成する骨芽細胞と骨を分解する破骨細胞との適度なバランスによって成立する。このバランスが崩れることによる疾患（骨粗鬆症、関節リウマチ、癌骨転移等）がヒトにおいても頻繁にみられる。21 世紀半ばにはわが国の 65 歳以上高齢者は全人口の 3 分の 1 にも達する。老化を基盤とする種々の疾患の増加は確実であり、なかでも骨粗鬆症、関節リウマチ等の運動器疾患は

高齢者の quality of life (QOL) を低下させ、寝たきりを招く主因である。骨粗鬆症は骨強度の低下、骨折を臨床的特徴とし、破骨細胞の増大或は機能亢進により骨形成より骨吸収のバランスが大きくなることが原因である。また関節リウマチにおける関節破壊、あるいは癌の骨転移による骨破壊も、破骨細胞が原因である。現在、骨粗鬆症治療薬として骨吸収抑制剤 bisphosphonate が多く用いられるが、bisphosphonate は骨組織に蓄積して

効果を発揮する薬剤である。代謝が極めて緩やかであることから、治療期間が長期にわたる骨粗鬆症や関節リウマチでは有効性、安全性に問題があり、より安全性の高い骨吸収剤の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

不明な点が多い破骨細胞の形成機構を分子レベルで解明するとともに破骨細胞形成を抑制する骨吸収抑制剤のスクリーニング系を確立することが本申請の目的である。具体的に、以下の2項目を目的とする。

### 目的1) RANK-TRAF6 シグナルで誘導される破骨細胞形成特異的シグナルの解明

平成16-17年度及び18-19年度に交付された基盤(B)の成果をさらに発展させ、破骨細胞形成特異的シグナルを誘導する RANK 受容体の特定領域(HCR 領域)の作用機構を明らかにする。

### 目的2) 破骨細胞形成を抑制する骨吸収抑制剤スクリーニング系の確立

骨吸収抑制剤スクリーニングに使用可能なシステムを確立する。

## 3. 研究の方法

1) 酵母ツーハイブリッド法による HCR 結合タンパク質の同定を継続し、同定された場合 RNAi ノックダウンによるシグナルまたは破骨細胞形成への影響の解析を試みる。

2) 精製した HCR 複合体構成タンパク質の構成因子の同定を継続し、同定された場合 RNAi ノックダウンによるシグナルまたは破骨細胞形成への影響の解析を試みる。

3) 精製した RANK/TRAF6 複合体の構成蛋白質の MALDI-TOF-MS によるアミノ酸配列の解析を継続する。申請者の所属する東京大学医科学研究所では共通施設として MALDI-TOF-MS が稼動しているため、それを利用する。さらにプロテインデータベースのサーチからタンパク質を同定し、遺伝子構造を明らかにする。同定された場合 RNAi ノックダウンによるシグナルまたは破骨細胞形成への影響の解析を試みる。

4) TRAF6 標的遺伝子の RNAi ノックダウンによるシグナルまたは破骨細胞形成への影響の解析を試みる。

5) NF- $\kappa$ B 依存性プロモーターに GFP 遺伝子を結合させた plasmid(NF- $\kappa$ B-GFP)を Raw 細胞に導入した。レトロウイルスベクターを用いた遺伝子破壊により破骨細胞形成に関与する遺伝子の解明を試みる。

6) RANK-TRAF6 シグナルの機能を蛍光強度等の物理的な計測によりモニターする系の確立を試みる。さらに小スケール化を行い、ロボットを用いたスクリーニングシステムへの応用を試みる。

## 4. 研究成果

1) 当研究室田口ら(Genes Cells, 2009)が決定した HCR に FLAG タグを結合させたペプチドをレトロウイルスにより破骨前駆細胞に発現させたところ、RANKL 刺激による破骨細胞誘導が顕著に抑制されるとともに NF- $\kappa$ B や NF-ATc1 等 RANKL 刺激依存的な活性化も抑制された。これらの結果は、用いた長さの HCR ペプチドにシグナル伝達に必要なタンパク質が結合している可能性を強く示唆している(論文準備中)。そこで HCR 全体を Bait にした酵母ツーハイブリッド法を実施したが、偽陽性のコロニーが多数出現し条件設定が困難であった。そこで Bait を分割する目的で HCR の N 末端側 21 残基と C 末端側 41 残基に相当するオリゴペプチド(N ペプチド、C ペプチド)をそれぞれ発現させて同様に検討したところ、どちらを発現させても NF- $\kappa$ B/MAPKs の活性化と NFATc1 の発現誘導が顕著に抑制され、形成される破骨細胞数が減少したため、両方のペプチドに分化抑制能が有ることが示唆された。そこで現在 N ペプチドと C ペプチドを別々に Bait にした酵母ツーハイブリッド法実施している。

2) 酵母ツーハイブリッド法と平行して HCR 複合体を精製し、この構成因子を質量分析計により解析するため、TAP タグ付き HCR を恒常的に発現する Raw 細胞を作成した。RANKL 刺激後の HCR 複合体を精製し、この構成因子を質量分析計により解析した。複数に候補因子が同定されたので、それらの破骨細胞形成における役割を現在 RNAi 法等により解析している。

3) RANK 受容体の細胞内局在については、RANK の細胞質内領域に蛍光タンパク質 Venus を融合させたキメラタンパク質を破骨前駆細胞に発現させ、RANKL 刺激することにより RANK が刺激依存的にエンドゾームへ移動することが明らかとなった。現在、HCR を欠損させたキメラタンパク質を同様な実験系を用いてその刺激依存的な挙動を解析している。

4) これまでの成果から HCR 領域は、受容体の細胞内への取り込みを促進することにより、破骨細胞形成に必須は長期継続シグナルを伝達すると考えていた。ところが受容体自身の挙動を解析したところ、HCR 領域を持たない受容体は刺激後迅速に分解されるのに対して HCR 領域を有する受容体は安定に存在することを強く示唆するデータを得た。これらの成果は HCR 領域が受容体のリソゾームによる細胞内分解を制御する機能を有する可能性を示唆しており非常に興味深い。

5) RANK/TRAF6 複合体を CD40/RANK キメラ受容体を刺激後に免疫沈降することで精製した。現在質量分析系で解析中である。

6) TRAF6 標的遺伝子を RANKL 刺激後の細胞

を用いたマイクロアレイを用いて同定し、さらにノーザンブロット法により確認した。現在破骨細胞形成における役割を現在 RNAi 法等により解析している。

7) 骨吸収抑制剤のスクリーニング系については NF- $\kappa$ B の制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーターを Raw 細胞に発現させ、条件検討を行っている。一方 HCR を大腸菌で大量に発現することに成功したので、現在化合物ライブラリーを用いて結合する化合物を質量効果を利用した表面プラズモン共鳴 (SPR) で検出している。

#### 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 19 件)

- ①Ando, K., Hasegawa, K., Shindo, K., Furusawa, T., Fujino, T., Kikugawa, K., Nakano, H., Takeuchi, O., Akira, S., Akiyama, T., Gohda, J., Inoue, J., and Hayakawa, M. Human lactoferrin activates NF- $\kappa$ B through Toll-like receptor 4 (TLR4) pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling. *FEBS Journal* 277, 2051-2066 (2010). 査読有
- ② Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Tasaki, S., Semba, K., Hattori, S., Sugano, S., Inoue, J. and Yamamoto, T. Temporal perturbation of tyrosine-phosphoproteome dynamics reveals the system-wide regulatory networks. *Mol. Cell. Proteomics* 8, 226-231 (2009). 査読有
- ③ Yamamoto, T., Yokota, Y., Mitsuki, Y., Mizukoshi, F., Tsuchiya, T., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K., and Inoue, J. Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. *PLoS Pathogens* 5(1): e1000279 (2009). 査読有

- ④Helmy, M., Gohda, J., Inoue, J., Tomita, M., Tsuchiya, M., and Selvarajoo K. Predicting Novel Features of Toll-Like Receptor 3 Signaling in Macrophages. *PLoS ONE* 4(3): e4661 (2009). 査読有
- ⑤ Konno, H., Yamamoto, T., Yamazaki, K., Gohda, J., Akiyama, T., Semba, K., Goto, H., Kato, A., Yujiri, T., Imai, T., Kawaguchi, Y., Su, B., Takeuchi, O., Akira, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., & Inoue, J. TRAF6 Establishes Innate Immune Responses by Activating NF- $\kappa$ B and IRF7 upon Sensing Cytosolic Viral RNA and DNA. *PLoS ONE*, 4(5): e5674 (2009). 査読有
- ⑥Yamaguchi, N., Ito, T., Azuma, S., Ito, E., Honma, R., Yanagisawa, Y., Nishikawa, A., Kawamura, M., Imai, J., Watanabe, S., Semba, K. and Inoue, J. Constitutive activation of NF- $\kappa$ B is preferentially involved in the proliferation of basal-like subtype breast cancer cell lines. *Cancer Sci.* 100, 1668-1674 (2009). 査読有
- ⑦ Matsumura, T., Kawamura-Tsuzuku, J., Yamamoto, T., Semba, K., and Inoue, J. TRAF-interacting protein with a forkhead-associated domain B (TIFAB) is a negative regulator of the TRAF6-induced cellular functions. *J. Biochem.* 146, 375-381 (2009). 査読有
- ⑧Nishina, T., Yamaguchi, N., Gohda, J., Semba, K. and Inoue, J. NIK is involved in constitutive activation of the alternative NF- $\kappa$ B pathway and proliferation of pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 96-101 (2009). 査読有
- ⑨Taguchi, Y., Gohda, J., Koga, T., Takayanagi, H., and Inoue, J. A unique

domain in RANK is required for Gab2 and PLC  $\gamma$  2 binding to establish osteoclastogenic signals. *Genes Cells* 14, 1331-1345 (2009).  
査読有

⑩ Yamazaki, K., Gohda, J., Kanayama, A., Miyamoto, Y., Sakurai, H., Yamamoto, M., Akira, S., Hayashi, H., Su, B., and Inoue, J.. Two Mechanistically and Temporally Distinct NF- $\kappa$ B Activation Pathways in IL-1 Signaling. *Sci. Signal.* 2, ra66 (2009).  
査読有

⑪ Ishikawa, K., Akiyama, T., Ito, K., Semba, K., and Inoue, J.. Independent stabilizations of polysomal Drg1/Dfrp1 complex and non-polysomal Drg2/Dfrp2 complex in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 552-556 (2009).  
査読有

⑫ Nagatake, T., Fukuyama, S., Kim, D.Y., Goda, K., Igarashi, O., Sato, S., Nochi, T., Sagara, H., Yokota, Y., Jetten, A.M., Kaisho, T., Akira, S., Mimuro, H., Sasakawa, C., Fukui, Y., Fujihashi, K., Akiyama, T., Inoue, J., Penninger, J.M., Kunisawa, J., Kiyono, H. Id2<sup>-</sup>, ROR $\gamma$ t<sup>-</sup>, and LT $\beta$  R-independent initiation of lymphoid organogenesis in ocular immunity. *J Exp Med.* 206, 2351-2364 (2009). 査読有

⑬ Yamaguchi, N., Ito, E., Azuma, S., Honma, R., Yanagisawa, Y., Nishikawa, A., Kawamura, M., Imai, J., Tatsuta, K., Inoue, J., Semba, K., and Watanabe, S. FoxA1 as a lineage-specific oncogene in luminal type breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 365, 711-717 (2008). 査読有

⑭ Yamaguchi, N., Oyama T, Ito E, Satoh H, Azuma S, Hayashi M, Shimizu K, Honma R, Yanagisawa Y, Nishikawa A, Kawamura M, Imai

J, Ohwada S, Tatsuta K, Inoue, J., Semba K, & Watanabe S. NOTCH3 signaling pathway plays crucial roles in proliferation of ErbB2-negative human breast cancer cells.

*Cancer Res.* 68, 1881-1888 (2008). 査読有  
⑮ Miyasaka, T., Morita, M., Ito, K., Suzuki, T., Fukuda, H., Takeda, S., Inoue, J., Semba, K. and Yamamoto, T. Interaction of anti-proliferative protein Tob with the CCR4-NOT deadenylase complex. *Cancer Sci.* 99, 755-761 (2008). 査読有

⑯ Akiyama T., Shimo Y., Yanai H., Qin J., Ohsima, D., Maruyama Y., Asaumi Y., Kitazawa J., Takayanagi H., Penninger JM., Matsumoto M., Nitta T., Takahama Y., and Inoue, J.. The Tumor Necrosis Factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity* 29, 423-437 (2008). 査読有

⑰ Hikosaka Y., Nitta T., Ohigashi I., Yano K., Ishimaru N., Hayashi Y., Matsumoto M., Matsuo K., Penninger JM., Takayanagi H., Yokota Y., Yamada H., Yosikai Y., Inoue, J., Akiyama T., and Takahama Y. The Cytokine RANKL Produced by Positively Selected Thymocytes Fosters Medullary Thymic Epithelial Cells that Express Autoimmune Regulator. *Immunity* 29, 438-450 (2008). 査読有

⑱ Yang Y. J., Chen W., Carrigan S. O., Chen W-M., Roth K., Akiyama T., Inoue, J., Marshall J. S., Berman J. N. and Lin Y-J. TRAF6 specifically contributes to Fc  $\epsilon$  RI-mediated cytokine production but not mast cell degranulation. *J. Biol. Chem.* 283, 32110-32118 (2008). 査読有

- ⑬ Selvarajoo, K, Takada, Y, Gohda, J., Helmy, M., Akira, S., Tomita, M., Tsuchiya, M., Inoue, J. and Matsuo, K. Signaling Flux Redistribution at Toll-like Receptor Pathway Junctions. *PLoS ONE* 3 (10) e3430 (2008). 査読有  
[学会発表] (計 13 件)
- ① 田口祐、合田仁、井上純一郎  
癌骨転移に関与する破骨細胞の新規分化機構の解明  
第 67 回日本癌学会学術総会  
2008 年 10 月 28 日, 名古屋国際会議場
- ② 田口祐、合田仁、古賀貴子、高柳広、井上純一郎  
破骨細胞形成に必須な持続的 RANK シグナルの伝達機構  
BMB2008 (第 31 回 日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)  
2008 年 12 月 11 日~12 日, 神戸ポートアイランド
- ③ 下茂佑輔、大島大輔、箭内洋見、井上純一郎、秋山泰身 A cell autonomous requirement for TRAF6 in the development of naturally occurring regulatory T cells  
The 5<sup>th</sup> International workshop of Kyoto T Cell Conference  
2009 年 6 月 4 日, 京都大学芝蘭会館
- ④ 田口祐、合田仁、井上純一郎  
破骨細胞形成に必須な持続的 RANK シグナル伝達機構  
第 27 回 日本骨代謝学会学術総会  
2009 年 7 月 23 日, 大阪国際会議場
- ⑤ 下茂佑輔、大島大輔、井上純一郎、秋山泰身  
TNF ファミリーシグナルによる胸腺微小環境の制御  
第 39 回日本免疫学会総会・学術集会  
2009 年 12 月 2 日, 大阪国際会議場
- ⑥ 氣駕陽子、田口祐、合田仁、井上純一郎  
Identification of a RANK-derived peptide as a potent inhibitor of osteoclastogenesis  
第 32 回 日本分子生物学会年会  
2009 年 12 月 9 日, パシフィコ横浜
- ⑦ Taguchi, Y., Gohda, J., Kiga, Y., and Inoue, J. A unique cytoplasmic domain in RANK induces long-term signaling required for osteoclastogenesis. Keystone Symposia "NF- $\kappa$ B in Inflammation and Disease"  
2010 年 1 月 8 日, Santa Fe, New Mexico, USA
- ⑧ Inoue, J.  
TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) in auto immunity

第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会  
(第 19 回国際リウマチシンポジウム)  
2010 年 4 月 22 日~25 日, 神戸ポートピアホテル

- ⑨ Gohda, J., Yamazaki, K., and Inoue, J.  
Differential regulation of Lysine 63-linked polyubiquitination catalyzed TRAF6 in IL-1 signaling. 14th International Congress of Immunology  
2010 年 8 月 26 日, 神戸ポートピアホテル
- ⑩ 伊藤拓、山口憲孝、井上純一郎、仙波憲太郎、渡邊慎哉  
乳癌における新規 NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の探索  
第 69 回日本癌学会学術総会  
2010 年 9 月 22 日~24 日, 大阪国際会議場
- ⑪ 山本瑞生、山口憲孝、渡邊慎哉、仙波憲太郎、井上純一郎  
乳癌源細胞における転写因子 NF- $\kappa$ B 活性化の役割  
第 69 回日本癌学会学術総会  
2010 年 9 月 22 日~24 日, 大阪国際会議場
- ⑫ Ito-Kureha, T., Yamaguchi, N., and Inoue, J. Screening of novel NF- $\kappa$ B target genes in breast cancer cells  
KEystone SYMPOSIA "Stem Cells, Cancer and Metastasis"  
2011 年 3 月 6 日~11 日  
アメリカ コロラド州 Keystone Resort
- ⑬ Yamamoto, M., Yamaguchi, N., and Inoue, J. Paracrine role of transcription factor NF- $\kappa$ B in generating breast cancer tumor initiating cells  
KEystone SYMPOSIA "Stem Cells, Cancer and Metastasis"  
2011 年 3 月 6 日~11 日  
アメリカ コロラド州 Keystone Resort

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/BunshiHatsugan/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 純一郎 (INOUE JUN-ICHIRO)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号: 70176428

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し