

機関番号：33910

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580105

研究課題名 (和文) プロテインホスファターゼ 2C による破骨細胞分化の制御

研究課題名 (英文) Regulation of osteoclastogenesis by protein phosphatase 2C

研究代表者

大西素子 (OHNISHI MOTOKO)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号：00312653

研究成果の概要 (和文) : 骨は破骨細胞による破壊と骨芽細胞による新生の繰返しによって絶えず再構築され、その構造と機能を保持しているが、そのバランスが崩れると骨粗鬆症を初め、さまざまな骨疾患が引き起される。そこで本研究では破骨細胞の分化を制御することを目的として、プロテインホスファターゼ 2C (PP2C) を活性化する低分子化合物が破骨細胞分化を抑制することを明らかにし、その作用機序を解析した。

研究成果の概要 (英文) : Bone continuously undergoes remodeling, in which bone resorption by osteoclasts is followed by bone formation by osteoblasts, and maintains its structure and function. An imbalance in the regulation of bone remodeling results in many metabolic bone diseases, such as osteoporosis. Here we show that a low molecular weight compound which specifically activates protein phosphatase 2C (PP2C) suppressed osteoclastogenesis, and how it acts on the RANKL induced osteoclast differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生化学・分子生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：プロテインホスファターゼ、破骨細胞、破骨細胞分化因子、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

骨は破骨細胞による破壊と骨芽細胞による新生の繰返しによって絶えず再構築され、その構造と機能を保持している。この骨吸収と骨形成のバランスは、破骨細胞と骨芽細胞の

カップリングによって保たれており、その制御にはRANKLを初め、副甲状腺ホルモンなどのカルシウム調節ホルモン、BMPやTGF- β 等のサイトカインが関わっていることが知られ

ている (Martin TJ. *et al.* Trends Mol Med. 2005. 11:76-81.)。骨粗鬆症を初め関節リウマチや癌の骨転移など様々な疾患でみとめられる、破骨細胞の過剰な活性化は、骨破壊を引き起こし、しばしば強い痛みを伴う。このような骨破壊を防ぐために破骨細胞を標的とする様々な治療薬が開発されているが、ビスフォスフォネートなど現在臨床の場で用いられている骨吸収抑制剤は、副作用、効果、投与方法およびその期間などにおいて問題点が指摘され (Schindeler A. *et al.* J Pharm Sci. 2007. 96:1872-8.)、新規薬剤の開発が望まれている。

破骨細胞分化因子 (RANKL) は、骨芽細胞やT細胞等に発現される膜貫通型タンパク質であり、遺伝子欠損マウスによる解析から破骨細胞分化の必須因子であることが明らかにされている。RANKLが受容体であるRANKに結合すると、図1のようにTRAF6 からTAK1 を介して、下流のMAPKであるp38 およびJNKや、転写因子であるNF- κ Bが活性化され、最終的には破骨細胞分化のマスター転写因子であるNFATc1 による転写が促進されることがわかってきた (Huang H. *et al.* Cell Death Differ. 2006 13:1879-91.)。また最近ではこのRANKLによるシグナル伝達に加え、免疫グロブリン様受容体を介したシグナル伝達がNFATc1 の活性化に必要であることが報告されるなど、精力的に破骨細胞分化機構の解析が進められている (Takayanagi H. Nat Rev Immunol. 2007. 7:292-304.)

2. 研究の目的

健康な骨は、リモデリングと呼ばれる骨吸収と骨形成の繰り返しによる新陳代謝によって維持されている。骨のリモデリングでは破骨細胞による骨吸収期の後、活性化破骨細胞が消失する細胞逆転期を経て骨芽細胞による骨形成期に移行する。骨粗鬆症を初め

様々な代謝性骨疾患の治療法の開発には骨代謝の制御機構の解明が必要不可欠であるが、破骨細胞分化の抑制機構に関してはほとんど研究が進んでいない。

これまで申請者らは、プロテインホスファターゼ 2C (PP2C) が破骨細胞分化因子 (RANKL) によって誘導されるシグナル伝達系を負に制御し、破骨細胞の分化を抑制することを明らかにしてきた。またその研究過程で、PP2C β および PP2C ϵ 遺伝子の発現が RANKL によって誘導されることを見出した。そこで本研究では、PP2C β および PP2C ϵ による破骨細胞分化の制御メカニズムを明らかにするため、RANKL による PP2C β および ϵ 遺伝子の発現誘導機構を解明し、さらに申請者らが見出した PP2C を活性化する低分子化合物の破骨細胞分化に対する作用を検討し、PP2C の機能に基づく破骨細胞分化の制御を試みる。

3. 研究の方法

(1) PP2C β 遺伝子の転写調節領域における RANKL 応答配列の同定

申請者らは、以前 PP2C β の2種類のプロモーターを含むゲノム DNA をクローニングし、それぞれのプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポータープラスミドを作製した。これをマウスマクロファージ・単球由来で、溶解性 RANKL (sRANKL) により破骨細胞様多核細胞に分化することが知られている RAW264 細胞株に一過性に導入し、sRANKL 添加後のルシフェラーゼ活性を測定することにより検討した。

また、同様に RANKL によって誘導される PP2C ϵ 遺伝子の 5'近接領域をクローニングし、プロモーター領域の同定と発現誘導機構の解析を試みた。

(2) 破骨細胞分化に対する PP2C 活性化物質の影響

PP2C の活性調節物質を探索した結果、申請者らはヒノキ科のサワラ抽出物から PP2C の活性化物質としてピシフェルジオールとピシフェリン酸を精製、同定した（特開 2008-21425 号）。マウス PP2C α 、PP2C β 、PP2C ϵ および PP2C δ の組換えタンパク質をそれぞれ発現、精製し、 α -カゼインを基質としてこれらの活性を測定することにより、PP2C の各アイソフォームに対するピシフェルジオールおよびピシフェリン酸の効果を検討した。

さらに RAW264 細胞およびマウス骨髄細胞に、PP2C 活性化物質を加えて培養し、破骨細胞分化に対する効果を調べた。分化に対する影響は、破骨細胞分化マーカーである酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) の活性と、4 核以上の多核細胞数の計測により行った。

(3) 破骨細胞分化に対する PP2C 活性化物質の作用機序の解析

破骨細胞分化因子によって活性化されるシグナル伝達系の構成因子に対する、ピシフェルジオールの効果をウエスタンブロット法により検討した。

(4) 骨芽細胞に対する PP2C 活性化物質の影響

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞培養系およびマウス骨髄細胞と UAMS-32 細胞の共存培養系を用いて、骨芽細胞の分化および生存に対する PP2C 活性化物質の効果を検討した。分化に対する影響は、骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性の測定により行い、細胞生存率は MTT アッセイにより測定した。

4. 研究成果

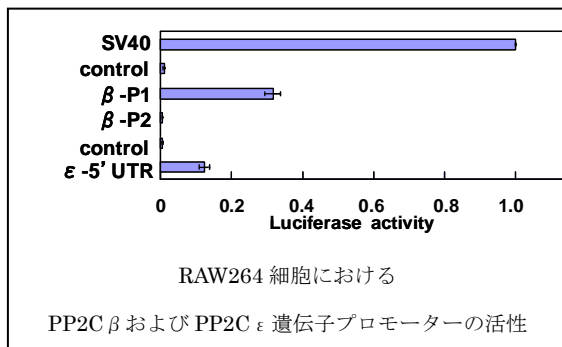
(1) PP2C β および ϵ 遺伝子の転写調節領域における RANKL 応答配列の同定

これまで申請者らは、RANKL により PP2C β の mRNA の発現が一過性に誘導されることを報告してきた。そこで sRANKL による PP2C β 発現誘導機構を解析するため、ルシフェラーゼアッセイによる PP2C β 遺伝子のプロモーター活性の解析を試みた。PP2C β のプロモーターとして、申請者は以前 P1 および P2 の 2 つの領域を同定しているが、今回それらを挿入したルシフェラーゼ発現プラスミドを RAW264 細胞に導入し、活性を測定したところ、P1 にプロモーター活性があることがわかった (図)。しかしながら、sRANKL 添加 30 分後から 3 時間後までルシフェラーゼ活性は時間経過とともに上昇したが、この活性の上昇は RANKL を添加しない場合にも認められ、RANKL によって特異的に誘導される活性は検出できなかった。その原因の 1 つとして、PP2C β とルシフェラーゼの安定性の違いから、ルシフェラーゼが PP2C β に比べて、RANKL によって誘導されるものを凌いで、時間経過とともに細胞内に蓄積される可能性が考えられた。

また、RAW264 細胞から調製したゲノム DNA を用いて、マウス PP2C ϵ 遺伝子 5' 近接領域 2124b を含む約 3.4kb の領域をクローニングし、ルシフェラーゼレポータープラスミドを作製した。その結果、RAW264 細胞において弱いプロモーター活性を確認したものの、sRANKL 添加後 2 4 時間後までルシフェラーゼ活性は、ほとんど上昇しなかった。

以上の結果から、RANKL による PP2C β および ϵ 遺伝子の誘導機構を解析するためには、今回レポータープラスミドに含まれなかったゲノム DNA の領域についても、RANKL に応答する配列が無いかどうか調べる必要

がある。



(2) 破骨細胞分化に対する PP2C 活性化物質の影響

申請者が PP2C 活性化物質として見出したピシフェルジオールの、PP2C α 、 β 、 ϵ および δ の各アイソフォームに対する効果を検討した結果、150 μ M のピシフェルジオールは PP2C α および PP2C β の活性を約 40% 増加したものの、PP2C ϵ の活性にはほとんど影響しなかった。またこれらの結果と異なり、PP2C δ の活性は約 20% 阻害した。このことから、ピシフェルジオールは PP2C のアイソフォームの中でも、 α と β を特異的に活性化する可能性が高いと考えられる。またピシフェルジオールが、癌遺伝子として知られている PP2C δ を活性化しないことから、PP2C の機能を解析するためのバイオプローブとしてのみならず、将来的に治療薬の開発等に活用できる可能性があると考えられる。

これまで申請者らは PP2C β が TAK1 下流のシグナル伝達経路を抑制することにより、破骨細胞分化を負に制御する可能性を示してきた。そこで、PP2C β 活性化物質であるピシフェルジオールが、破骨細胞の分化を抑制するのではないかと考え、RAW264 細胞を用いて、破骨細胞分化に対する影響を検討した。その結果、ピシフェルジオール、ピシフェリン酸または PP2C の活性化効果を持つ多価不飽和脂肪酸のリノレン酸のいずれを加えて培養しても、sRANKL によって誘導される破

骨細胞分化が阻害された。またその際、リノレン酸は細胞生存率をも抑制したものの、ピシフェルジオールおよびピシフェリン酸は細胞生存率を抑制せず、これらの化合物の作用が異なることが示唆された。さらにピシフェルジオールおよびピシフェリン酸は、マウス大腿骨から採取した骨髄細胞に対しても、細胞生存率には影響せず、破骨細胞分化を抑制することが明らかとなった。

(3) 破骨細胞分化に対する PP2C 活性化物質の作用機序の解析

ピシフェルジオールが破骨細胞分化を抑制する作用機序について検討するため、sRANKL によって活性化されるシグナル伝達系に対するピシフェルジオールの影響を検討した。その結果、sRANKL による ERK の活性化には影響を与えないものの、JNK および p38 の活性化を濃度依存的に抑制することがわかった。さらに $I\kappa$ -B のリン酸化も抑制され、NF κ B の活性化が抑制されることが示唆された。またピシフェルジオールは、sRANKL によって誘導される破骨細胞分化のマスター転写因子として知られる NFATc1 の発現を抑制した。

一方 PP2C β は、TAK1 のリン酸化を抑制して活性化を阻害し、その下流の p38 および JNK のリン酸化を抑制する。そこでピシフェルジオールの TAK1 に対する影響を検討したところ、濃度依存的に TAK1 のリン酸化を阻害することが明らかとなった。以上の結果から、ピシフェルジオールの破骨細胞分化抑制作用の一部は、PP2C β の活性を高めることにより、sRANKL によって活性化される TAK1 下流のシグナル伝達経路を抑制することによる可能性が示唆された。

(4) 骨芽細胞に対する PP2C 活性化物質の

影響

骨代謝は、骨吸収と骨形成のバランスによって維持されており、骨芽細胞上の RANKL が破骨前駆細胞上の受容体 RANK に結合すると、破骨細胞分化が促進される。そこでマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞および UAMS-32 細胞とマウス骨髄細胞との共存培養系を用いて pisiferdiol の骨芽細胞に対する検討を行なった。その結果、pisiferdiol は破骨細胞分化を抑制する濃度では、アルカリホスファターゼ活性を指標とした骨芽細胞の分化や細胞生存率には影響しないことが明らかになった。

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 15 件)

- ① Yonezawa T, Hasegawa S, Asai M, Ninomiya T, Sasaki T, Cha BY, Teruya T, Ozawa H, Yagasaki K, Nagai K, Woo JT. Harmine, 2011. a β -carboline alkaloid, inhibits osteoclast differentiation and bone resorption in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol*. 査読有 650(2-3):511-8
- ② Hojo H, Yano F, Ohba S, Igawa K, Nakajima K, Komiyama Y, Kan A, Ikeda T, Yonezawa T, Woo JT, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI. 2010. Identification of oxytetracycline as a chondrogenic compound using a cell-based screening system. *J Bone Miner Metab*. 査読有 28(6):627-33.
- ③ Lee JW, Mase N, Yonezawa T, Seo HJ, Jeon WB, Cha BY, Nagai K, Woo JT. 2010. Palmatine attenuates osteoclast differentiation and function through inhibition of receptor activator of nuclear factor- κ b ligand expression in osteoblast cells. *Biol Pharm Bull*. 査読有 33(10):1733-9.
- ④ Lee JW, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Udagawa N, Takahashi N, Im NK, Seo HJ, Jeon WB,

Yonezawa T, Cha BY, Woo JT. 2010. Alisol-B, a novel phyto-steroid, suppresses the RANKL-induced osteoclast formation and prevents bone loss in mice. *Biochem Pharmacol*. 査読有 80:352-361.

- ⑤ Aburai N., Yoshida M., Ohnishi M., Kimura K., 2010. Pisiferdiol and pisiferic acid isolated from *Chamaecyparispisifera* activate protein phosphatase 2C in vitro and induce caspase-3/7-dependent apoptosis via dephosphorylation of Bad in HL60 cells. *Phytomedicine*. 査読有 17(10):782-788.
- ⑥ Honokiol increases ABCA1 expression level by activating retinoid X receptor beta. Jung CG, Horike H, Cha BY, Uhm KO, Yamauchi R, Yamaguchi T, Hosono T, Iida K, Woo JT, Michikawa M. 2010. *Biol Pharm Bull*. 査読有 33(7):1105-11.
- ⑦ 油井信弘, 大西素子, 木村賢一, 2010. 植物由来のプロテインホスファターゼ 2C 活性制御物質. *バイオサイエンスインダストリー*. 査読無 68(4):256-256
- ⑧ Aburai N, Yoshida M, Ohnishi M, Kimura K. 2010. Sanguinarine as a Potent and Specific Inhibitor of Protein Phosphatase 2C in Vitro and Induces Apoptosis via Phosphorylation of p38 in HL60 Cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 査読有 74(3):548-552.
- ⑨ Hasegawa S, Yonezawa T, Ahn JY, Cha BY, Teruya T, Takami M, Yagasaki K, Nagai K, Woo JT. 2010. Honokiol inhibits osteoclast differentiation and function in vitro. *Biol Pharm Bull*. 査読有 33(3):487-92.
- ⑩ Woo JT, Yonezawa T, Nagai K. 2010. Phytochemicals that stimulate osteoblastic differentiation and bone formation. *J Oral Biosci*. 査読有 52(1):15-21.

- ⑪ Choi SS, Cha BY, Lee YS, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K, Woo JT. 2009. Magnolol enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. *Life Sci*. 査読有 84(25-26):908-14.
- ⑫ Cha BY, Shi WL, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K, Woo JT. 2009. An inhibitory effect of chrysoeriol on platelet-derived growth factor (PDGF)-induced proliferation and PDGF receptor signaling in human aortic smooth muscle cells. *J Pharmacol Sci*. 査読有 110(1):105-10.
- ⑬ Hojo H, Igawa K, Ohba S, Yano F, Nakajima K, Komiyama Y, Ikeda T, Lichtler AC, Woo JT, Yonezawa T, Takato T, Chung UI. 2008. Development of high-throughput screening system for osteogenic drugs using a cell-based sensor. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 376(2):375-9.
- ⑭ Woo JT, Yonezawa T, Cha BY, Teruya T, Nagai K. 2008. Antiresorptive microbial compounds that inhibit osteoclast differentiation, function and survival. *J Pharmacol Sci*. 査読有 106(4):547-554.

〔学会発表〕(計 11 件)

- ①油井信弘. 2010年5月19日. PP2C 活性化物質 pisiferdiol の Ca²⁺シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母に対する作用メカニズムの解析. 第5回ケミカルバイオロジー学会(慶応義塾大学)
- ② 倉地建始. 2010年3月29日. 破骨細胞分化におけるプロテインホスファターゼ 2C ε の機能. 日本農芸化学会 2010 年度大会(東京大学)
- ③ 油井信弘. PP2C 活性化物質 Pisiferdiol と阻害物質 Sanguinarine の癌細胞と遺伝子変異酵母に対する生物活性. 2009年9月10日. The 25th NAITO CONFERENCE ON Chemical

Biology [III] –An Emerging Field Inspired by Natural Product Chemistry- (シャトレゼガトーキングダム札幌)

- ④吉田真実. 2009年3月28日. プロテインホスファターゼ2C活性化化合物の破骨細胞分化抑制機構の解析. 日本農芸化学会2009年度大会(福岡・マリンメッセ福岡)
- ⑤吉田真実. 2008年12月11日. プロテインホスファターゼ2C活性化化合物による破骨細胞分化の抑制. 第31回年会(兵庫・神戸ポートアイランド)
- ⑥Mami Yoshida. 2008. Nov.13th. Suppression of osteoclast differentiation by pisiferdiol, an activator of protein phosphatase 2C. 8th International Conference on Protein Phosphatases. (GUNMA・MAEBASHI TERRSA)
- ⑦ 油井信弘. 2008年5月19日. PP2C活性化作用を有する化合物の構造と機能性. 日本ケミカルバイオロジー学会第3回年会(東京・学術総合センター)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 破骨細胞分化抑制剤
 発明者: 大西素子、永井和夫、禹濟泰、木村賢一
 権利者: 学校法人中部大学、国立大学法人岩手大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2008-219666
 出願年月日: 2008年8月28日
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www3.chubu.ac.jp/faculty/ohnishi_motoko

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 素子 (OHNISHI MOTOKO)
 中部大学・応用生物学部・教授
 研究者番号: 00312653

(2) 研究分担者

禹 濟泰 (WOO JAE-TAE)

中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号：20272693

永井 和夫 (NAGAI KAZUO)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号：00011974