

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10151

研究課題名（和文）翻訳後修飾系による骨形成制御に関する基礎的研究

研究課題名（英文）The molecular mechanism underlying the regulation of bone formation by post-translational modifications

研究代表者

野崎 中成（Nozaki, Tadashige）

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：90281683

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ポリADP-リボシル化(PAR化)は翻訳後修飾の一つで、様々な分子をPAR化することで標的分子の機能を制御し、細胞情報伝達に関わる。本研究では、ポリ(ADP-リボース)合成酵素であるPARPの阻害薬とポリ(ADP-リボース)分解酵素であるPARGの阻害薬を用いて、骨形成制御機構の解明を目指した。PARP阻害薬は骨芽細胞分化を抑制し、PARG阻害薬は分化を促進することが明らかになった。PARP1/PARGの微調整メカニズムによるPAR化の維持が、骨芽細胞による骨形成の促進に重要である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異所性骨化などの骨関連疾患は、患者のQOLを著しく低下させることが問題の一つであるが、有効な治療法が確立されておらず、新規治療薬の開発が望まれている。そのため、骨形成の機序を探求することには、社会的なニーズがある。本研究は、翻訳後修飾系の一つであるポリADP-リボシル化が骨形成に関わる骨芽細胞分化の制御に寄与することを明らかにした。ポリADP-リボシル化と骨形成制御機構をさらに詳細に解明することで、翻訳後修飾系を標的とした新規の骨関連疾患治療薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Poly ADP-ribosylation (PARylation) is a post-translational modification whereby poly(ADP-ribose) chains are added to target proteins, conferring various biological functions. This study aimed to clarify PARylation-mediated mechanisms regulating bone formation. We evaluated the effects of a PARP inhibitor (a clinically approved anticancer agent) and poly (ADP-ribose)-degrading enzyme (PARG) inhibitor on osteoblast differentiation. The PARP inhibitor suppressed osteoblast differentiation, whereas the PARG inhibitor promoted differentiation in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells, suggesting that maintenance of cellular PARylation is important for osteoblast-mediated bone formation.

研究分野：再生医学

キーワード：翻訳後修飾 PARP1 PARG ポリ(ADP-リボース) PARP阻害薬 PARG阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) リン酸化やポリ ADP-リボシル化(PAR 化)など翻訳後修飾は、細胞情報伝達で重要な役割を担う。PAR 化を触媒する酵素であるポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ 1(PARP1)は NAD⁺を基質として細胞内の様々な標的タンパク質にポリ(ADP-リボース)を付加する。タンパク質に付加したポリ(ADP-リボース)は、ポリ(ADP-リボース)分解酵素である PARG により ADP-リボースへと分解される。PARP1 や PARG により標的タンパク質へのポリ(ADP-リボース)の合成・付加と分解が調節されること(PAR 化サイクル)により、DNA 修復、細胞死、転写制御、炎症応答などの多岐に渡る生命現象が制御されている。

(2) 研究代表者らは、PARP1 ノックアウトマウスの切歯象牙質に異所性骨形成が認められることを報告した (Fujihara H, Nozaki T *et al.* Cells 2019)。骨形成の細胞情報伝達経路は、PAR 化を正と負に制御する主要な酵素 PARP1 と PARG によって微調整されるという報告はあるが、PAR 化を制御することで骨関連疾患の病態を改善できるという報告はない。また、PAR 化サイクルと骨形成の関連性についても詳細には解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、PAR 化サイクルの骨形成における役割を解明し、異常な骨リモデリングにより発症する骨関連疾患の病態を改善するための基礎的研究を行う。抗がん薬として臨床承認されている PARP 阻害薬 olaparib の転用を視野に入れて、PAR 化を制御することで、これら病態を改善できるかという、学術的「問い」に対する答えを探求していくために、次の 2 点を本研究の目的とする。

PARP1/PARG の微調整メカニズムが骨形成にどのような役割を担うか解明する。
翻訳後修飾系の 1 つである PAR 化を調節する薬剤の有効性を検討する。

3. 研究の方法

(1) PARP 阻害薬および PARG 阻害薬による骨芽細胞分化への影響

骨芽細胞前駆細胞 MC3T3-E1 は、培地に 1%アスコルビン酸、0.2%ヒドロコルチゾン、2%β-グリセロリン酸を添加することにより骨芽細胞分化を誘導した。PARP 阻害薬 olaparib、PARG 阻害薬 PDD00017273 存在下において、分化誘導前と誘導 7, 14, 21, 28 日後の細胞を用いて解析を行った。Olaparib、PDD00017273 による細胞内ポリ(ADP-リボース)集積は anti-PAR 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により評価した。細胞毒性は CCK アッセイにより評価した。骨芽細胞の分化度を評価するために、qRT-PCR により骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現レベルを解析した。また、石灰化レベルはアリザリンレッド S 染色後、5% ギ酸により色素を溶出し、415 nm の吸光度を測定することにより定量化し、評価した。

(2) PARP 阻害薬による骨芽細胞分化抑制機序の解析

MC3T3-E1 は、olaparib 存在下または非存在下において分化誘導し、分化誘導 21 日後の細胞から低分子 RNA を調製し、small RNA-sequence 解析を行った。microRNA(miRNA)の発現変動は、olaparib 処理と未処理細胞の比較し、2 倍以上発現変動を示した miRNA に対して pathway 解析を行った。

4. 研究成果

(1) PARP および PARG 機能阻害下における骨芽細胞分化への影響

PAR 化サイクルに関わる酵素 PARP1 および PARG が、骨芽細胞分化過程に及ぼす影響を明らかにするために、PARP 阻害薬 olaparib と PARG 阻害剤 PDD00017273 を用いて骨芽細胞分化の評価を行った。まず、MC3T3-E1 における olaparib および PDD00017273 による細胞

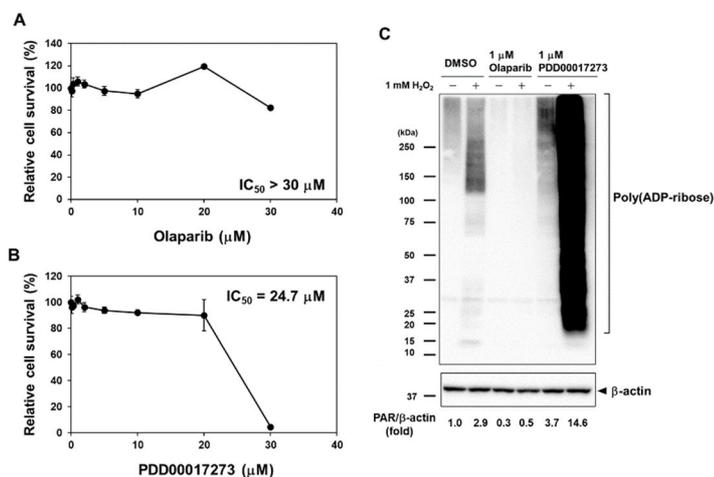


図1 MC3T3-E1 細胞における olaparib および PDD00017273 による細胞生存率、ポリ(ADP-リボース)集積への影響

毒性を評価した。Olaparib、PDD00017273 の IC₅₀ 値はそれぞれ >30 μM、24.7 μM (図 1 A, B) であったことから、本研究では細胞毒性の影響を受けない 1 μM で各阻害薬を用いることにした。

次に、各阻害薬存在下で細胞内ポリ(ADP-リボース)集積量を解析した。ポリ(ADP-リボース)集積量は未処理と比較して、olaparib で 0.3 倍に低下した。一方、PDD00017273 で 3.7 倍に増加した (図 1 C)。これらの結果より、MC3T3-E1 において、olaparib と PDD00017273 は、各標的分子である PARP1 と PARG の酵素活性を阻害したと考えられた。

各阻害薬が骨芽細胞分化に与える影響を解析した。MC3T3-E1 は、olaparib および PDD00017273 存在下または非存在下で分化誘導した。分化誘導 14、21、28 日後にアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を測定し、分化度を評価した。ALP 活性は、分化誘導 14 日後未処理と比較して olaparib で有意に低下し、PDD00017273 でわずかに上昇した (図 2)。さらに、アリザリンレッド S 染色を行い、石灰化レベルを評価した。石灰化レベルは、分化誘導 21 日、28 日後に未処理および PDD00017273 と比較して olaparib で有意に低下した (図 3A, B)。

骨芽細胞分化に関わる因子の mRNA 発現に与える Olaparib および PDD00017273 の影響を解析した。分化誘導 28 日後に *Ocn*、*Bsp* の mRNA 発現レベルは、未処理および PDD00017273 と比較して olaparib で有意に低下した。一方、未処理および olaparib と比較して PDD00017273 で有意に上昇した (図 4A)。骨芽細胞分化には、転写因子 *Runx2*、*Osx*、*Atf4* の関与が報告されていることから、これら転写因子について解析した。*Osx* および *Atf4* の mRNA 発現レベルは、未処理と比較して olaparib で有意に低下したが、*Runx2* の mRNA 発現レベルは、未処理と比較して olaparib および PDD00017273 で変動は認められなかった (図 4B)。olaparib および PDD00017273 は、各標的分子である *Parp1* と *Parg* の発現レベルに影響しないことを確認した (図 4C)。

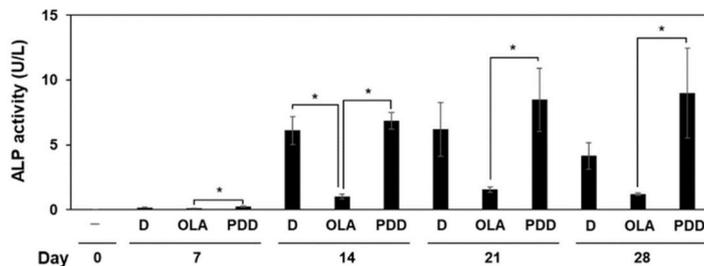


図 2 olaparib および PDD00017273 が ALP 活性に与える影響

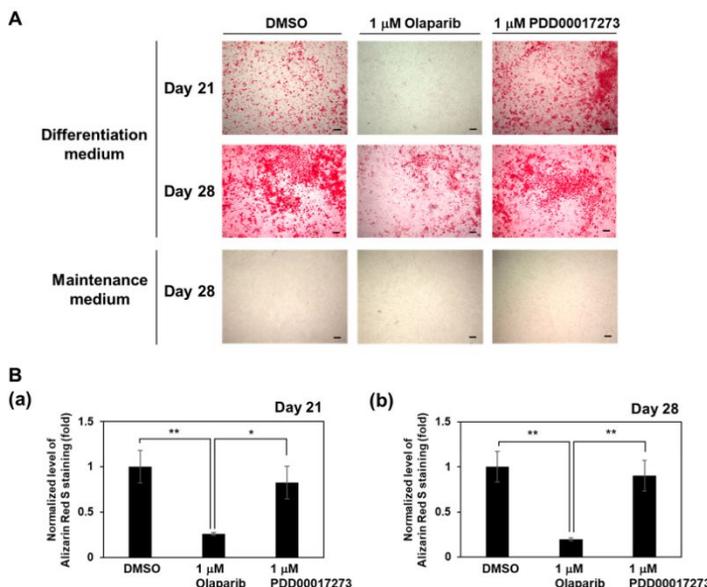


図 3 olaparib および PDD00017273 が石灰化レベルに与える影響

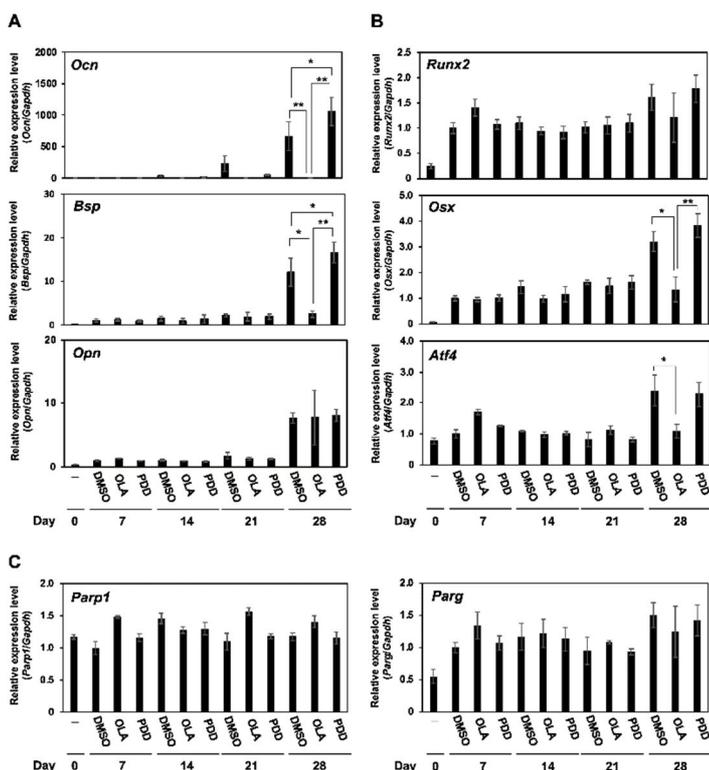


図 4 Olaparib および PDD00017273 が骨芽細胞分化に関わる因子の mRNA 発現に与える影響

以上をまとめると、olaparib による PARP1 機能阻害下で骨芽細胞分化が抑制すること、一方 PDD00017273 による PARG 機能阻害下で骨芽細胞分化を促進する傾向が認められた。このことから細胞内ポリ(ADP-リボース)の増加が、MC3T3-E1 における骨芽細胞分化の促進に寄与することが示唆された。

(2) PARP 阻害薬 olaparib による miRNA の網羅的発現解析

olaparib による骨芽細胞分化の抑制機序を解析するために、small RNA-sequence 解析を行い、miRNA の発現変動を網羅的に解析した。その結果、olaparib により 2 倍以上発現上昇した miRNA は 161 種類、発現低下した miRNA は 229 種類であった。Pathway 解析を行った結果、Wnt シグナル経路を含む複数の細胞内経路に変動が認められ、骨芽細胞分化の抑制に寄与する可能性のある miRNA の候補を抽出した。今後は、これらの miRNA をさらに解析して、骨芽細胞分化に特定の miRNA を介して PAR 化サイクルがどのように寄与するかを解明する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sasaki Yuka, Nakatsuka Ryusuke, Inouchi Takuma, Masutani Mitsuko, Nozaki Tadashige	4. 巻 23
2. 論文標題 Inhibition of Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase Accelerates Osteoblast Differentiation in Preosteoblastic MC3T3-E1 Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23095041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木由香、中塚隆介、井内拓磨、益谷美都子、野崎中成
2. 発表標題 MC3T3-E1細胞におけるPARG阻害剤PDD00017273およびPARP阻害剤olaparibが骨芽細胞分化へ及ぼす影響
3. 学会等名 第39回分子病理学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木由香、中塚隆介、野崎中成、益谷美都子
2. 発表標題 PARP阻害薬olaparibは骨芽細胞の分化を抑制する
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中塚 隆介 (Nakatsuka Ryusuke) (90454561)	大阪歯科大学・歯学部・講師 (34408)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	佐々木 由香 (Sasaki Yuka) (50823332)	大阪歯科大学・歯学部・講師 (34408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関