

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310167

研究課題名(和文) Pirin阻害剤による骨疾患薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel drug for bone-related diseases using Pirin inhibitors

研究代表者

清水 史郎 (Simizu, Siro)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：30312268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨関連疾患数はわが国でも増加しており、ビスホスホネート製剤などの薬剤が使用されているが、これらの薬剤は副作用も報告されている。新規の骨疾患治療薬としてPirin阻害剤のTPh Aに着目し実験を行った結果、細胞毒性が発揮されない濃度において複数のTPh A誘導体がPirin阻害とは独立してRANKLにより誘導される破骨細胞の分化を阻害した。これら化合物は、RANKLによるMAPKsのリン酸化などは阻害せずに、c-FosやDC-STAMPの発現を抑制したことから、新しい機構で作用する薬剤のシードの可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The number of bone-related disease patients is increasing in Japan. At present, bisphosphonates are widely used for these diseases, but their severe side effects are impossible to ignore.

We focused on TPh A, a Pirin inhibitor, as a novel drug for such diseases. We assayed many derivatives of TPh A and found that 2 compounds inhibited RANKL-induced osteoclastogenesis on Pirin-independent manner without cytotoxicity. These compounds did not suppress phosphorylation of MAPKs, although its inhibited expression of c-Fos and DC-STAMP. Therefore, it is suggested that the compounds we found might be candidates for drugs of bone-related diseases.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：骨関連疾患 Pirin 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

我が国では骨粗鬆症などの骨疾患患者が1,000万人以上いると推測されており、大きな社会問題となっている。骨粗鬆症は、主に高齢者が発症し、骨折やそれに伴う寝たきり状態による認知症の進行を促進させることもある。現在ではビスホスホネート系薬剤が主に使用されているが、投薬により、顎の骨の骨折や歯の治療の制限を受けるなどの問題もある。

2. 研究の目的

現在の第一選択薬であるビスホスホネート系薬剤は、破骨細胞にアポトーシスを誘導することで骨粗鬆症を改善させようとしたものである。現行の薬剤では上記のような問題もあるため、本研究では新たな骨関連疾患治療薬の開発を目的として実験に着手した。報告者の実験室では、先行研究として Pirin 阻害剤の TPh A 処理で、RANKL により誘導される破骨細胞分化が阻害されることが分かっていた。そこで、破骨細胞分化における Pirin の役割、および新たな骨関連疾患治療薬の取得を目的に実験を行った。

3. 研究の方法

マウスより初代培養の破骨細胞前駆細胞を摘出した。M-CSF 存在下で Bone marrow-derived macrophage (BMM) を得て、さらに報告者の研究室で作製した RANKL を処理することにより破骨細胞へと分化させた。またルシフェラーゼ・レポーターアッセイでは遺伝子導入効率が BMM よりも良い培養細胞である RAW264 細胞を使用した。

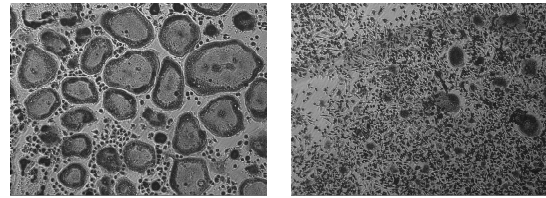
種々の薬剤は RANKL と共に添加し、タンパク質の発現やリン酸化状態、または各種遺伝子の発現を RT-PCR 法で確認した。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞分化における Pirin の役割：Pirin 阻害剤である TPh A が RANKL で誘導される破骨細胞への分化を抑制したことから、Pirin と分化との関連性について検討を行った。しかし、Pirin に対する RNAi によりノックダウンをした状態でも、細胞は RANKL により破骨細胞へと完全に分化した。さらに、この状況下でも TPh A による分化抑制効果は観察されたことから、Pirin は破骨細胞分化とは独立しており、TPh A の作用は Pirin とは異なる分子である可能性が考えられた。

(2) 新規破骨細胞分化阻害剤の創製：TPh A のよる分化抑制効果はあったものの、使用濃度は比較的高かったため、より阻害活性の高い新規分化誘導阻害剤の開発を試みた。化合物の構造は TPh A を基として約 50 種の薬剤を合成し、TPh A の時と同じアッセイを行った。その結果、2 つの化合物において TPh A

よりも阻害活性の高い化合物を取得することに成功した。(下図：左が RANKL 処理で破骨細胞へと分化した様子。右が阻害剤存在処理により巨大な成熟破骨細胞数が減少している様子。)



(3) 新規分化阻害剤の作用機序：破骨細胞への分化には、RANKL 刺激により様々な分化必須遺伝子の発現が誘導される。新規阻害剤を使用してこれら遺伝子の発現・活性化に与える影響を検討した。その結果、化合物は ERK などの MAPKs のリン酸化には影響を及ぼさなかったが、c-Fos や DC-STAMP の発現を抑制した。(2)で示した図や MTT アッセイのデータからも化合物が細胞毒性を発揮した結果、分化を抑制したわけではないことが明らかとなっている。また、標的タンパク質を明らかにする目的で、アフィニティピーズを用いて結合タンパク質の解析を行ったが、特異的に結合してくるタンパク質を充分量得ることができなかった。さらに、ルシフェラーゼ・レポーターアッセイの結果、AP-1 や NF- κ B 経路を阻害している可能性が考えられたことより、今後は転写に与える影響などを検討していく。

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. Komai, K., Niwa, Y., Sasazawa, Y. & Simizu, S. Pirin regulates the epithelial to mesenchymal transition independently of Bcl3-Slug signaling. FEBS Lett. 589, 738-43 (2015) 査読有
doi: 10.1016/j.febslet.2015.01.040
2. Sasazawa, Y., Sato, N., Umezawa, K. & Simizu, S. Conophylline protects cells in cellular models of neurodegenerative diseases by inducing mammalian target of rapamycin (mTOR)-independent autophagy. J. Biol. Chem. 290, 6168-78 (2015) 査読有
doi: 10.1074/jbc.M114.606293
3. Noma, N., Asagiri, M., Takeiri, M., Ohmae, S., Takemoto, K., Iwaisako, K., Minato, N., Maeda-Yamamoto, M., Simizu, S. & Umezawa, K. Inhibition of MMP-2-mediated mast cell invasion by NF- κ B inhibitor DHMEQ in mast cells. Int. Arch. Allergy Immunol. 166, 84-90 (2015) 査読有
4. Kuboki, M., Ito, A., Simizu, S. & Umezawa, K. Activation of apoptosis by

- caspase-3-dependent specific RelB cleavage in anticancer agent-treated cancer cells: Involvement of positive feedback mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456, 810-4 (2015) 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.024
5. Uematsu, S., Goto, Y., Suzuki, T., Sasazawa, Y., Dohmae, N. & Simizu, S. *N*-glycosylation of extracellular matrix protein 1 (ECM1) regulates its secretion, which is unrelated to lipoid proteinosis. *FEBS Open Bio* 4, 879-85 (2014) 査読有
doi: 10.1016/j.fob.2014.10.004
 6. Goto, Y., Niwa, Y., Suzuki, T., Uematsu, S., Dohmae, N. & Simizu, S. *N*-glycosylation is required for secretion and enzymatic activity of human hyaluronidase1. *FEBS Open Bio* 4, 554-9 (2014) 査読有
doi: 10.1016/j.fob.2014.06.001
 7. Goto, Y., Niwa, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., Umezawa, K. & Simizu, S. *C*-mannosylation of human hyaluronidase 1: Possible role for secretion and enzymatic activity. *Int. J. Oncol.* 45, 344-50 (2014) 査読有
doi: 10.3892/ijo.2014.2438
 8. Matsui, C., Ikeda, Y., Inuma, H., Kushida, N., Kunisada, T., Simizu, S. & Umezawa, K. Isolation of a novel paxilline analog pyrapaxilline from fungus that inhibits LPS-induced NO production. *J. Antibiot.* 67, 787-90 (2014) 査読有
doi: 10.1038/ja.2014.63
 9. Ukaji, T., Sasazawa, Y., Umezawa, K. & Simizu, S. Involvement of conserved tryptophan residues for secretion of TIMP-2. *Oncol. Lett.* 7, 631-4 (2014) 査読有
 10. Kuroda, M., Funasaki, S., Saitoh, T., Sasazawa, Y., Nishiyama, S., Umezawa, K. & Simizu, S. Determination of topological structure of ARL6ip1 in cells: identification of the essential binding region of ARL6ip1 for conophylline. *FEBS Lett.* 587, 3656-60 (2013) 査読有
doi: 10.1016/j.febslet.2013.09.017
 11. Ogasawara, A., Simizu, S., Ito, A., Kawai, T., Saisho, Y., Takei, I. & Umezawa, K. Inhibition of NO-induced β -cell death by novel NF- κ B inhibitor (-)-DHMEQ via activation of Nrf2-ARE pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 433, 181-7 (2013) 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.062
 12. Arai, Y., Inuma, H., Ikeda, Y., Igarashi, M., Hatano, K., Kinoshita, N., Ukaji, T., Simizu, S. & Umezawa, K. Migracins A and B, new inhibitors of cancer cell migration, produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* 66, 225-30 (2013) 査読有
doi: 10.1038/ja.2012.112
 13. Niwa, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., Umezawa, K. & Simizu, S. Determination of cathepsin V activity and intracellular trafficking by *N*-glycosylation. *FEBS Lett.* 586, 3601-7 (2012) 査読有
doi: 10.1016/j.febslet.2012.08.001
 14. Niwa, Y., Matsui, C., Sukumwang, N., Inuma, H., Ikeda, Y., Koyano, T., Kovitayakorn, T., Simizu, S. & Umezawa, K. Inhibition of lysenin-induced hemolysis by all-*E*-lutein derived from the plant *Dalbergia latifolia*. *Planta Med.* 78, 957-61 (2012) 査読有
doi: 10.1055/s-0031-1298538
 15. Yasukagawa, T., Niwa, Y., Simizu, S. & Umezawa, K. Suppression of cellular invasion by glybenclamide through inhibited secretion of platelet-derived growth factor in ovarian clear cell carcinoma ES-2 cells. *FEBS Lett.* 586, 1504-9 (2012) 査読有
doi: 10.1016/j.febslet.2012.04.007
- 〔学会発表〕(計 38 件)
1. 茂木 拓馬、吉田 圭佑、高尾 賢一、宮崎 奏、笹澤 有紀子、清水 史郎「クラビラクトン類縁体の合成」日本化学会 第 95 春季年会 (日本大学 ; 千葉県・船橋市) 2015/03/26-03/29
 2. Siro Simizu 「Identification of a compound that regulates autophagy in cells」International Mini Symposium on Chemical Biology of Natural Products (Keio University; Yokohama; Japan) 2015/03/24 (招待講演)
 3. Kuniya Komai, Yuki Niwa, Yukiko Sasazawa, Siro Simizu 「Pirin downregulates E-cadherin gene expression and contribute to EMT」EORTC-NCI-AACR International Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics (Barcelona; Spain) 2014/11/18-11/21
 4. 丹羽 祐貴、清水 史郎「Human DPY19L3 is a *C*-mannosyltransferase for R-spondin1 and regulates R-spondin1 secretion」第 73 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜 ; 神奈川県・横浜市) 2014/09/25-09/27
 5. 植松 史帆、後藤 祐貴、笹澤 有紀子、清水 史郎「Secretion of Extracellular matrix protein 1 is regulated by *N*-glycosylation」第 73 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜 ; 神奈川県・横浜市) 2014/09/25-09/27
 6. 駒井 邦哉、丹羽 祐貴、笹澤 有紀子、清水 史郎「Pirin regulates EMT by downregulating E-cadherin gene expression」第 73 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜 ; 神奈川県・横浜市) 2014/09/25-09/27
 7. 土屋 みゆ、丹羽 祐貴、清水 史郎「*N*-glycosylation regulates R-spondin1 functions」第 73 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜 ; 神奈川県・横浜市) 2014/09/25-09/27
 8. 丹羽 祐貴、清水 史郎「*C*-mannosylation による R-spondin1 の機能制御」第 23 回 日

- 本がん転移学会学術集会・総会（金沢市文化ホール；石川県・金沢市）2014/07/10-07/11
9. Shiho Uematsu, Yuki Goto, Takehiro Suzuki, Yukiko Sasazawa, Naoshi Dohmae, Siro Simizu 「N-linked glycan which attached Asn354 regulate secretion of Extracellular matrix protein 1」15th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society (Heidelberg; Germany) 2014/06/28-07/01
 10. Miyu Tsuchiya, Yuki Niwa, Siro Simizu 「R-spondin1 functions are regulated by N-glycosylation」15th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society (Heidelberg; Germany) 2014/06/28-07/01
 11. 後藤 祐貴、丹羽 祐貴、堂前 直、清水 史郎「N型糖鎖修飾がHYAL1機能に与える影響」日本がん分子標的治療学会 第18回学術集会（仙台市情報・産業プラザ；宮城県・仙台市）2014/06/25-06/27
 12. 佐藤 夏実、笹澤 有紀子、梅澤 一夫、清水 史郎「Conophyllineの抗ハンチントン病作用」日本ケミカルバイオロジー学会 第9回年会（大阪大学；大阪府・豊中市）2014/06/11-06/13
 13. 笹澤 有紀子、森下 佳典、杉野 公美、川谷 誠、長田 裕之、清水 史郎「破骨細胞分化阻害剤の作用機構解析」日本ケミカルバイオロジー学会 第9回年会（大阪大学；大阪府・豊中市）2014/06/11-06/13
 14. Siro Simizu 「Regulation of Wnt signaling by glycosylation」Universiti Sains Malaysia 招待講演（Penang; Malaysia) 2014/03/17
 15. 笹澤 有紀子、梅澤 一夫、清水 史郎 「conophyllineによる神経保護効果の解析」第36回日本分子生物学会年会（神戸ポートアイランド；兵庫県・神戸市）2013/12/03-12/06
 16. 森下 佳典、笹澤 有紀子、杉野 公美、川谷 誠、長田 裕之、清水 史郎「TPhA誘導体の破骨細胞分化に及ぼす影響と構造活性相関解析」日本農芸化学会関東支部会2013年度大会（慶應義塾大学；神奈川県・横浜市）2013/11/22
 17. 森田 真布、大野 修、矢守 隆夫、丹羽 祐貴、清水 史郎、末永 聖武「海洋産マクロリド Biselyngbyaside 類の構造と生物活性」日本農芸化学会関東支部会2013年度大会（慶應義塾大学；神奈川県・横浜市）2013/11/22
 18. Yukiko Sasazawa, Kazuo Umezawa, Siro Simizu 「Neuroprotective effect of conophylline in cellular model of Parkinson's disease」International Symposium on Mitochondria 2013 (Tokyo; Japan) 2013/11/06-11/07
 19. Yuki Niwa, Siro Simizu 「Secretion of R-spondin1 is regulated by C-mannosylation」AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics (Boston, MA; USA) 2013/10/19-10/23
 20. 宇梶 珠未、竹入 雅敏、伊藤 あゆみ、清水 史郎、梅澤 一夫「Induction of NF-kappa B and induction of selective apoptosis by novel alkylglutarimide compounds in adult T-cell leukemia cells」第72回日本癌学会学術総会（パシフィコ横浜；神奈川県・横浜市）2013/10/03-10/05
 21. 後藤 祐貴、丹羽 祐貴、清水 史郎「Role of glycosylation on Hyaluronidase1 functions」第72回日本癌学会学術総会（パシフィコ横浜；神奈川県・横浜市）2013/10/03-10/05
 22. 丹羽 祐貴、清水 史郎「Regulation of R-spondin1 secretion by C-mannosylation」第72回日本癌学会学術総会（パシフィコ横浜；神奈川県・横浜市）2013/10/03-10/05
 23. 清水 史郎「細胞内ロジスティクス研究におけるケミカルバイオロジーの役割」新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」終了シンポジウム（淡路夢舞台；兵庫県・淡路島）2013/09/17-09/18（招待講演）
 24. 丹羽 祐貴、清水 史郎「R-spondin1の機能に与えるC-mannosylationの役割」第22回日本がん転移学会学術集会・総会（ホテルブエナビスタ 松本；長野県・松本市）2013/07/11-07/12
 25. 田中 敦史、近藤 恭光、清水 史郎、斎藤 臣雄、長田 裕之、野田 健司、吉森 保「オートファジーを制御する新規化合物の探索」第65回日本細胞生物学会大会（ウインクあいち；愛知県・名古屋市）2013/06/19-06/21
 26. 黒田 将広、宇梶 珠未、笹澤 有紀子、清水 史郎「Conophylline 標的タンパク質 ARL6ip1の小胞体におけるトポロジー解析」日本ケミカルバイオロジー学会 第8回年会（東京医科歯科大学；東京都）2013/06/19-06/21
 27. 笹澤 有紀子、梅澤 一夫、清水 史郎「Conophyllineによるオートファジー誘導」日本ケミカルバイオロジー学会 第8回年会（東京医科歯科大学；東京都）2013/06/19-06/21
 28. 野間 成人、清水 史郎、梅澤 一夫「NF-κB阻害剤(-)-DHMEQはMMP-2依存性のマスト細胞浸潤を抑制する」日本がん分子標的治療学会 第17回学術集会（国立京都国際会館；京都府・京都市）2013/06/12-06/14
 29. Siro Simizu, Yuki Goto, Yuki Niwa 「Involvement of glycosylation in hyaluronidase1 functions」9th International Conference on Hyaluronan (Oklahoma City, OK; USA) 2013/06/02-06/07
 30. Siro Simizu, Yuki Goto, Yuki Niwa, and Kazuo Umezawa 「Hyaluronidase1 activity and secretion are regulated by C-mannosylation」9th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association (Maui, HI; USA) 2013/02/21-02/25
 31. Yuki Goto, Yuki Niwa, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Kazuo Umezawa, Siro Simizu

「Regulation of hyaluronidase1 enzymatic activity by C-mannosylation」
EORTC-NCI-AACR International Symposium
on Molecular Targets and Cancer Therapeutics
(Dublin; Ireland) 2012/11/06-11/09

32. 後藤 祐貴、丹羽 祐貴、梅澤 一夫、清水 史郎「Role of C-mannosylation on hyaluronidase1 functions」第71回日本癌学会学術総会（ロイトン札幌；北海道・札幌市）2012/09/19-09/21
33. 伊藤 あゆみ、清水 史郎、梅澤 一夫「DTCM-glutarimideによる成人T細胞白血病細胞におけるRelBの分解とアポトーシス誘導」第71回日本癌学会学術総会（ロイトン札幌；北海道・札幌市）2012/09/19-09/21
34. Yuki Niwa, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Kazuo Umezawa, Siro Simizu「N-glycosylation regulates cathepsin L2 functions」14th International Biennial Congress of the Metastasis Research Society (Brisbane; Australia) 2012/09/02-09/05
35. 清水 史郎「がん分子標的研究の今昔」理研セミナー（理化学研究所；埼玉県・和光市）2012/07/13（招待講演）
36. 丹羽 祐貴、清水 史郎「カテプシン L2の機能に与えるN-glycosylationの役割」第21回日本がん転移学会学術集会・総会（オリエンタルホテル広島；広島県・広島市）2012/07/12-07/13
37. 舟崎 慎太郎、宇梶 珠未、Kulrawee Sidthipong、清水 史郎、梅澤 一夫「植物性アルカロイド conophyllineによる癌細胞薬剤耐性の軽減と標的タンパク質の結合解析」日本がん分子標的治療学会 第16回学術集会（西日本総合展示場；福岡県・北九州市）2012/06/27-06/29
38. 村橋 将崇、眞井 絵里佳、清水 史郎、梅澤 一夫「免疫抑制剤デオキシスパーガリンの標的分子の探索」日本ケミカルバイオロジー学会 第7回年会（京都大学；京都府・京都市）2012/06/07-06/09

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.applc.keio.ac.jp/~simizu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 史郎 (Simizu, Siro)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：30312268

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

梅澤 一夫 (Umezawa, Kazuo)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70114402