

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24810025

研究課題名(和文)ケミカルジェネティクスに基づいた破骨細胞分化機構の解明と骨疾患治療薬の開発

研究課題名(英文)Functional analysis of osteoclastogenesis inhibitor

研究代表者

笹澤 有紀子(Sasazawa, Yukiko)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：20594922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では、ケミカルバイオロジーの手法を用いて破骨細胞分化抑制化合物を同定し、その作用機序を解明することで、破骨細胞の分化機構を明らかにすることを目的とした。当研究室では、TPh Aが破骨細胞分化抑制活性を示すことを見いだしているため、50種類のTPh A誘導体からより強力な破骨細胞分化抑制化合物を探索した。その結果、最も強い活性をもつ化合物としてSUK-39を見いだした。さらにSUK-39は破骨細胞の融合に必須なDC-STAMPとその転写因子c-fosの遺伝子発現を顕著に抑制した。以上のことから、SUK-39は破骨細胞融合機構の解明に貢献するバイオプローブとなりうることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Bone homeostasis is maintained by both osteoclasts and osteoblasts. Osteoporosis is one of the bone diseases caused by collapse of bone homeostasis. Inhibitors of osteoclast differentiation are expected as new therapeutic agents for osteoporosis. We have found that TPh A inhibits osteoclast differentiation from bone marrow macrophages. We investigated the effects on RANKL-induced osteoclast differentiation of 50 TPh A derivatives in order to obtain a compound that inhibits osteoclastogenesis at a lower concentration than TPh A. We found that SUK-39 is the most potent osteoclastogenesis inhibitor. Moreover, RT-PCR analysis showed that SUK-39 suppressed RANKL-induced DC-STAMP and its transcription factor, c-fos mRNA level. These results indicated that SUK-39 inhibited osteoclast fusion by inhibiting expression of c-fos and subsequent DC-STAMP mRNA expression. SUK-39 would be a bioprobe for understanding the mechanisms of osteoclast fusion.

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー 破骨細胞 骨粗鬆症

## 1. 研究開始当初の背景

骨形成の制御は骨を分解する破骨細胞と骨を作る骨芽細胞のバランスで成り立っている (Karsenty G., et al. *Dev Cell*, 2: 389-406, 2002)。このバランスが崩れ破骨細胞の働きが骨芽細胞の働きより亢進すると骨粗鬆症、リウマチによる骨破壊やがんの骨転移などさまざまな疾患の発症や進行を引き起こす (Rodan GA., et al. *Science*; 289: 1508-14, 2000)。そこで、破骨細胞の活性化を抑制する化合物は有効な骨疾患治療薬となりうるという考えから治療薬開発が進められ、第一選択薬としてビスホスホネート系製剤が臨床で広く用いられている。ビスホスホネート系製剤は pH が低い破骨細胞に対して選択的に取り込まれ、細胞死を誘導する。しかし、近年になり長期投与することで薬剤が骨に蓄積し、顎骨壊死や大腿骨骨折などの重篤な副作用を示すことが報告された (Watts, N. B., et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: 1555-65, 2010)。ビスホスホネート系製剤に替わる新たな作用機序で薬効を示す骨疾患治療薬の開発が求められている。

一方、破骨細胞はマクロファージ系の前駆細胞から分化し破骨細胞へと成熟する。この分化には骨芽細胞が分泌するサイトカイン M-CSF, RANKL が必須であることが明らかとなった (Boyle WJ., et al. *Nature*, 423: 337-342, 2003) が、その下流シグナルの一部は完全には解明されていない。この分化抑制剤は新しいタイプの骨疾患治療薬になりうると思われるため、破骨細胞への分化メカニズムの全容解明が求められている。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、ケミカルバイオロジーの手法を用いて、破骨細胞分化抑制化合物を同定し、その作用機序を解明することで、破骨細胞の分化メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 破骨細胞分化抑制化合物の探索

当研究室では破骨細胞分化抑制物質として TPh A を見いだしている。より強い活性を持つ化合物を探索するために、TPh A の 50 種類の誘導体を用いて、破骨細胞分化抑制試験を行った。8 週齢 ICR マウスの大腿骨からマウス骨髄細胞を採取し、M-CSF 存在下で 72 時間培養し、マウス骨髄由来マクロファージを得た。そこに RANKL とともに化合物 (1-30  $\mu$ M) を添加し、72 時間後の破骨細胞分化の割合を評価した。破骨細胞の検出には TRAP 染色を用い、細胞毒性は MTT assay

により評価した。それぞれの化合物に対し、破骨細胞分化を 50% 阻害する濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。

### (2) 得られた化合物の作用機序解明

破骨細胞分化のどのステップに化合物が作用しているか調べるために、RANKL によって誘導されるさまざまな破骨細胞分化関連遺伝子の発現量を評価した。8 週齢 ICR マウスの大腿骨からマウス骨髄細胞を採取し、M-CSF 存在下で 72 時間培養しマウス骨髄由来マクロファージを得た。そこに RANKL とともに化合物を添加し、24 時間後の各遺伝子の発現量を RT-PCR 用いて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 破骨細胞分化抑制化合物の探索

強い分化抑制活性を有する化合物は、より強力な破骨細胞分化抑制剤になりうることを期待される。そこで、すでに当研究室で破骨細胞分化抑制活性を見いだした TPh A の誘導体から破骨細胞分化抑制活性の強い化合物を探索した。その結果を図 1 に示す。50 種類の TPh A 誘導体の中で、TPh A より強い破骨細胞分化抑制活性を示す化合物を 4 種類見いだした。もっとも強い破骨細胞分化抑制活性を示す化合物は SUK-39 であった。SUK-39 の破骨細胞分化阻害活性を図 2 に示す。また、用いた化合物の中で破骨細胞分化抑制活性を示す濃度で毒性を示すものはなかった。

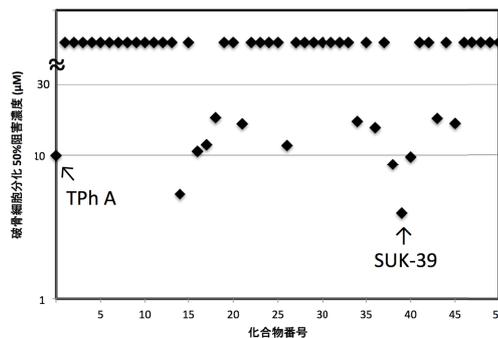


図 1. TPh A 誘導体の破骨細胞分化抑制活性試験結果

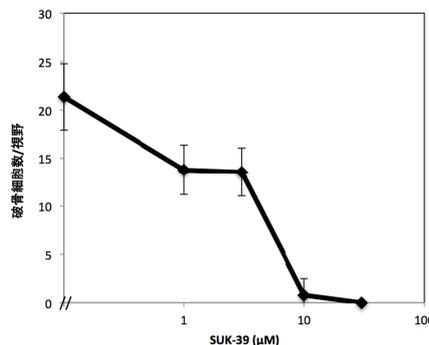


図 2. SUK-39 の破骨細胞分化抑制活性

## (2) SUK-39 の作用機序解明

RANKL 添加によりそのレセプターである RANK が活性化し NF $\kappa$ B, NFATc1, AP-1 などの転写因子により TRAP, Cathepsin K, DC-STAMP などの破骨細胞分化関連遺伝子が発現する。RT-PCR により SUK-39 が破骨細胞分化関連遺伝子の発現に与える影響を評価したところ、SUK-39 の処理により破骨細胞の融合に必須な遺伝子である DC-STAMP の mRNA 量が顕著に減少することが明らかとなった。さらに、SUK-39 は c-fos の発現を抑制した一方で、NFATc1 の発現には影響を与えなかったことから、SUK-39 は c-fos の発現を抑制することで DC-STAMP の発現を抑制し、破骨細胞の融合を阻害することが示唆された。破骨細胞の融合をターゲットとしている薬剤は少ないため、SUK-39 は破骨細胞融合のメカニズム解明に貢献する新規バイオプローブとなりうることを期待される。

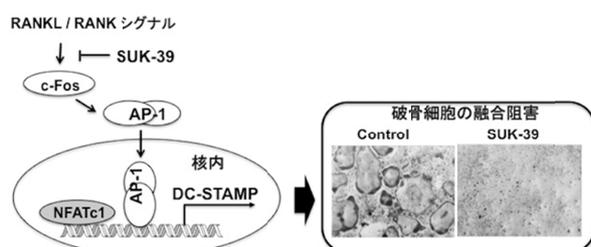


図 3. SUK-39 の破骨細胞分化抑制機構

## 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 2 件)

Ukaji, T., Sasazawa, Y., Umezawa, K. & Simizu, S. Involvement of conserved tryptophan residues for secretion of TIMP-2, *Oncology Letters*, 7, 631-634 (2014) 査読有

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 Letters*, 587, 3656-3660 (2013) 査読有

[学会発表](計 8 件)

笹澤有紀子、梅澤一夫、清水史郎「コノフィリン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、2013 年 12 月 4 日

森下佳典、笹澤有紀子、杉野公美、川谷誠、長田裕之、清水史郎「TPh A 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、横浜、2013 年 11 月 22 日

○Sasazawa, Y., Umezawa, K. & Simizu, S. Neuroprotective effect of conophylline in cellular model of Parkinson's disease. International Symposium on Mitochondria 2013, Tokyo, Nov. 2013

○Shikata, Y., Kanagaki, S., Sasazawa, Y., Tashiro, E., Yoshimaru, T., Komatsu, M., Katagiri, T., Imoto, M. Antitumor activity of xanthohumol, an inhibitor of valosin-containing protein. AACR-NCI-EORTC International conference MOLECULAR TARGETS AND CANCER THERAPEUTICS, Boston, Oct. 2013

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、2013 年 6 月 21 日

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、2013 年 6 月 20 日

○Sasazawa, Y. Functional Analysis of Small Molecules Regulating Autophagy, International Mini Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and

Regulation of Bioactivity, Yokohama, Mar.

2013

笹澤有紀子、金墻周平、田代悦、野川俊彦、室井誠、近藤恭光、長田裕之、井本正哉、「キサントフォームのオートファジー制御機構解析」、文部科学省 科学研究費補助金「新学術領域研究」第 4 回「細胞内ロジスティクス」班会議、仙台、2012 年 6 月 13 日

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

笹澤 有紀子 (SASAZAWA, Yukiko)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：20594922