

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750373

研究課題名(和文)ケミカルジェネティクスに基づいた骨疾患治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of a therapeutic drug for bone-related diseases based on chemical genetics

研究代表者

笹澤 有紀子(Sasazawa, Yukiko)

順天堂大学・医学部・特任研究員

研究者番号：20594922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規骨疾患治療薬を見いだすべく破骨細胞分化阻害剤の探索を行った結果、SUKU-1を見出した。さらに、SUKU-1誘導体を用いたスクリーニングにより、SUKU-33を最も強い破骨細胞分化阻害剤として同定した。SUKU-33の処理によりRANKLにより誘導される破骨細胞分化関連遺伝子が減少した。さらに、SUKU-33はUridineの取り込みを阻害した。

以上の結果よりSUKU-33はヌクレオシドトランスポーターを阻害することにより、mRNAの発現を抑制し破骨細胞分化抑制効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to identify a new therapeutic drug for bone-related diseases, we screened for small-molecules that inhibit osteoclast differentiation. We found that a novel compound, SUKU-1, suppressed RANKL-induced osteoclastogenesis. We also synthesized 38 derivatives of SUKU-1 and identified SUKU-33 as a most potent inhibitor. We found SUKU-33 suppressed RANKL-induced expression of osteoclast-related genes. By measuring the uptake of [3H]-uridine, we found that SUKU-33 inhibited transport of nucleoside via both equilibrative nucleoside transporters and concentrative nucleoside transporters. These results suggest that SUKU-33 inhibits osteoclastogenesis by suppressing nucleoside transporters.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルジェネティクス 骨粗鬆症 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた我が国において骨粗鬆症の患者数は増加の一途を辿り、1000万人を超える。骨粗鬆症は骨折やそれに伴い寝たきりを引き起こすことから、患者の QOL に大きく関わる疾患であり、その病態解明・適切な治療が求められる。

骨粗鬆症の原因は破骨細胞の活性化である。骨形成は骨を分解する破骨細胞と骨を作る骨芽細胞で制御される(karsenty G, et al. *Dev. Cell*, 2: 389-406, 2002)。骨粗鬆症では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ことで骨がもろくなり発症する。そこで、破骨細胞の活性化を抑制する化合物は有効な骨粗鬆症治療薬となりうるとの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薬剤が臨床で広く用いられている。ビスホスホネート系薬剤は pH の低い骨吸収場の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、ビスホスホネート系薬剤の多くは吸収効率が非常に低く、起床空腹時に服用することや服用後に横たわることを禁止されるなど、特に高齢者には服用が負担となる場合がある。さらに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ている(Watts, N. B., et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: 1555-65, 2010)。このビスホスホネート系薬剤が抱える問題を解決すべく、新たな作用機序で薬効を示す骨粗鬆症治療薬の開発が求められている。

本研究課題では、破骨細胞の分化に着目した。破骨細胞はマクロファージ系前駆細胞から RANKL などのサイトカインにより分化し成熟する。この過程を阻害する物質は破骨細胞の働きを抑えることができ、ビスホスホネート系薬剤に替わる新規骨粗鬆症治療薬となりうると思われる。また、破骨細胞の活性化は骨粗鬆症だけでなく、リウマチによる骨破壊やがん骨転移などさまざまな骨疾患の発症や進行を引き起こす(Rodan GA., et al. *Science*, 289: 1508-14, 2000)ことから、得られた化合物は多くの骨疾患に有効である可能性が考えられる。さらに、破骨細胞の分化メカニズムは解明されていない点が残されており、同定した化合物の分子機構を明らかにすることで、破骨細胞の新たな分化機構が明らかになる可能性もある。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究課題ではビスホスホネート系薬剤に替わる新規骨疾患治療薬を見出すべく、破骨細胞分化を抑制する化合物の同定、同化合物の作用機序解明を目的とした。

3. 研究の方法

8週齢 ICR マウスの大腿骨から骨髓細胞を採取し、M-CSF 存在下で 72 時間培養し、マウス骨髓細胞由来マクロファージ(BMM)を得た。さらに RANKL を添加し 72 時間培養し破骨細胞に分化させた。破骨細胞の検出には TRAP 染色を用い、細胞毒性は MTT assay で評価した。また、同定した化合物がタンパク質リン酸化に与える影響はウエスタンブロット法で、破骨細胞分化関連遺伝子の発現量に与える影響は RT-PCR で評価した。RNA 合成阻害活性は、 ^3H -Uridine を 1 時間細胞内に取り込ませ、TCA 固定後の放射活性を測定した。ヌクレオシド取り込み活性は、 ^3H -Uridine を 5 分間細胞内に取り込ませ、細胞内放射活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞分化阻害活性物質の探索

RANKL が誘導する破骨細胞の分化を阻害する物質を探索した。BMM に RANKL を添加すると同時に化合物を処理し、72 時間後に TRAP 染色により破骨細胞分化阻害活性を評価した。その結果、破骨細胞分化阻害物質として SUKU-1 を見出した。(図 1)。その IC_{50} 値は $10.4 \mu\text{M}$ だった。

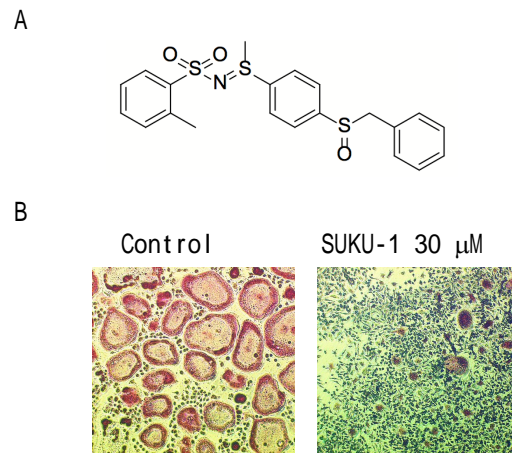
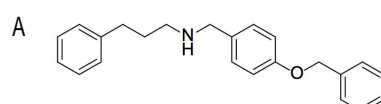


図 1 A. SUKU-1 の構造式 B. TRAP 染色による SUKU-1 の破骨細胞分化阻害活性の評価 (赤く染色される巨大細胞が破骨細胞)

(2) SUKU-1 誘導体を用いた破骨細胞分化阻害物質の探索

SUKU-1 誘導体 38 種類 (SUKU-2~SUKU39) を用いて、より強い破骨細胞分化阻害活性を探索した結果、SUKU-33 を見出した (図 2A)。SUKU-33 は IC_{50} 値 $4.17 \mu\text{M}$ で破骨細胞の分化を阻害した (図 2B)。一方で SUKU-33 は細胞毒性を示さなかった (図 2C)。



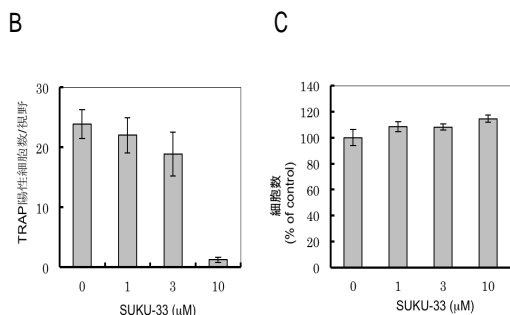


図 2 A. SUKU-33 の構造式 B. TRAP 染色による SUKU-33 の破骨細胞分化阻害活性の評価 C. MTT assay による SUKU-33 の細胞増殖阻害活性評価

(3) SUKU-33 が破骨細胞分化関連遺伝子の発現に与える影響

RANKL 刺激により、そのレセプターである RANK が活性化し、NFκB や ERK, p38, JNK など kinase が活性化し、NFATc1, TRAP, DC-STAMP などの破骨細胞分化関連遺伝子が発現する。

まず、SUKU-33 がタンパク質リン酸化に与える影響を評価した。BMM に SUKU-33 を 1 時間前処理し RANKL 処理後 15 分後のタンパク質のリン酸化をウエスタンブロット法で評価した。その結果、RANKL により p38, ERK, JNK はリン酸化されるが、SUKU-33 は影響を与えなかった。また、NFκB シグナルに与える影響をその阻害タンパク質 IκB の分解を指標に評価した。その結果、RANKL 処理により IκB は分解され NFκB シグナルは活性化されるが、SUKU-33 は IκB の分解にも影響を与えないことが明らかとなった。(図 3)

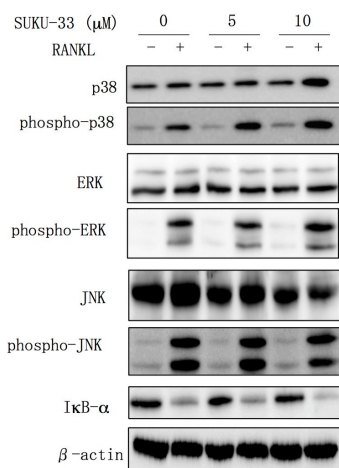


図 3 SUKU-33 が RANKL により誘導されるタンパク質リン酸化に与える影響

さらに、RT-PCR により NFATc1, TRAP, DC-STAMP の発現に与える影響を評価した。BMM に SUKU-33 を 1 時間前処理し RANKL 処理

後 24 時間後の遺伝子発現を評価した。その結果、SUKU-33 は破骨細胞の分化を阻害した濃度で RANKL により誘導された TRAP, NFATc1, DC-STAMP の発現を抑制することが明らかとなった(図 4)。

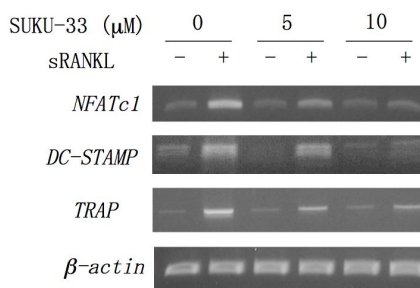


図 4 SUKU-33 が破骨細胞分化関連遺伝子の発現に与える影響

(4) SUKU-33 がヌクレオシド取り込みに与える影響

SUKU-33 が破骨細胞分化関連遺伝子の発現を抑制したことから、SUKU-33 が RNA 合成に与える影響を評価した。RAW264 細胞に [³H]-Uridine を取り込ませ、高分子画分の放射活性を測定した結果、SUKU-33 は破骨細胞分化を阻害した濃度で Uridine の取り込みを阻害した(図 5A)。

RNA 合成が阻害される原因として、転写の過程が阻害されることと、ヌクレオシドの取り込み自体が阻害されることが考えられる。ヌクレオシドトランスポーターとして、concentrative nucleoside transporter (CNT) と equilibrative nucleoside transporter (ENT) が報告されている。そこで、CNT, ENT とともに発現が報告されている RAW264 細胞および BeWo 細胞において、Uridine の取り込み活性を測定した。その結果、SUKU-33 は Uridine の取り込みを完全に阻害したことから、CNT と ENT をともに阻害していることが明らかとなった(図 5B,C)。

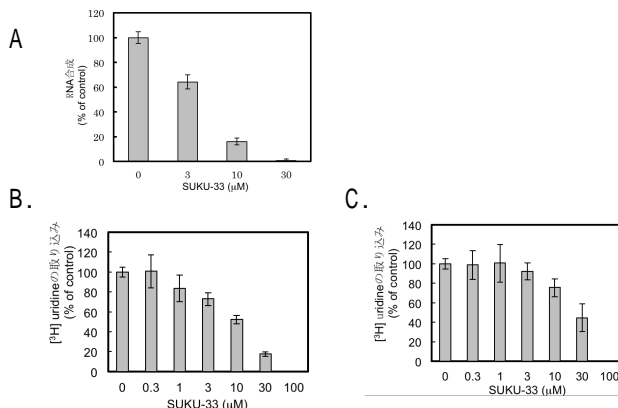


図 5 A. SUKU-33 による RNA 合成阻害活性 (RAW264 細胞) B, C. SUKU-33 によるヌクレオシド取り込み阻害活性 (B, RAW264 細胞; C,

(5)結論

- ・破骨細胞分化阻害活性物質 SUKU-33 を同定した。
- ・SUKU-33 は CNT および ENT を阻害することにより、破骨細胞分化関連遺伝子の発現を抑制し破骨細胞の分化を阻害した(図 6)。

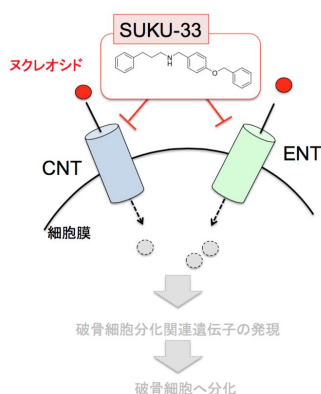


図 6 SUKU-33 の作用機構

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 9 件)

1. Miyazaki, S., Sasazawa, Y., Mogi, T., Suzuki, T., Yoshida, K., Dohmae, N., Takao, K. & Simizu, S. Identification of seco-clavilactone B as a novel small-molecule actin polymerization inhibitor. *FEBS Lett.* 590, 1163-73 (2016) 査読有
doi: 10.1002/1873-3468.12154.
2. Katsuyama, S., Sugino, K., Sasazawa, Y., Nakano, Y., Aono, H., Morishita, K., Kawatani, M., Umezawa, K., Osada, H. & Simizu, S. Identification of a novel compound that inhibits osteoclastogenesis by suppressing nucleoside transporters. *FEBS Lett.* 590, 1152-62 (2016) 査読有
doi: 10.1002/1873-3468.12146.
3. Sasazawa, Y., Sato, N., Suzuki, T., Dohmae, N. & Simizu, S. C-mannosylation of thrombopoietin receptor (c-Mpl) regulates thrombopoietin-dependent JAK-STAT signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468, 262-8 (2015) 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.116.
4. Iwasaki, A., Ohno, O., Katsuyama, S., Morita M., Sasazawa, Y., Dan, S., Simizu, S., Yamori, T. & Suenaga, K. Identification of a Molecular Target of Kurahyne, an Apoptosis-inducing Lipopeptide from Marine Cyanobacterial Assemblages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25,

5295-8 (2015) 査読有

doi: 10.1016/j.bmcl.2015.09.044.

5. 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.
 6. 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.
 7. Kiga, M., Nakayama, A., Shikata, Y., Sasazawa, Y., Murakami, R., Nakanishi, T., Tashiro, E., & Imoto, M. SMK-17, a MEK1/2-specific inhibitor, selectively induces apoptosis in β -catenin-mutated tumors. *Sci. Rep.* 5, 8155 (2015) 査読有
doi: 10.1038/srep08155.
 8. 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, 879-885 (2014) 査読有
doi: 10.1016/j.fob.2014.10.004.
 9. Ukaji, T., Sasazawa, Y., Umezawa, K. & Simizu, S. Involvement of conserved tryptophan residues for secretion of TIMP-2, *Oncol. Lett.* 7, 631-634 (2014) 査読有
- [学会発表](計 23 件)
1. Katsuyama, S., Sugino, K., Sasazawa, Y., Nakano, Y., Aono, H., Kawatani, M., Osada, H. & Simizu, S. “A novel osteoclast inhibitor targeting nucleoside transporters.” The 10th Korea-Japan Chemical Biology Symposium. (パシフィックホテル沖縄; 沖縄県那覇市) 2016/01/18 - 01/20
 2. 笹澤有紀子、王子悠、斉木臣二、服部信孝「パーキンソン病モデル細胞におけるメタボローム解析」第 9 回オートファジー研究会(淡路夢舞台国際会議場; 兵庫県淡路市) 2015/11/15-11/18
 3. Shimizu, E., Komai, K., Sasazawa, Y. & Simizu, S. “Pirin regulates protein level of oncogenic transcription factor Ets1.” 第 74 回日本癌学会学術総会 (名古屋国際会議場; 愛知県名古屋市) 2015/10/08-10/10
 4. 勝山俊、杉野公美、笹澤有紀子、川谷誠、長田裕之、清水史郎「小分子化合物 SUK-14 による破骨細胞分化抑制メカニズムの解析」日本農芸化学会 2015 年度関東支部大会 (お茶の水女子大学; 東京都文京区) 2015/09/26
 5. Sato, N., Sasazawa, Y., Suzuki, T., Dohmae, N. & Simizu, S. “Glycosylation of c-MPL

affects JAK/STAT signaling pathway.” GLYCO
23 XXIII International Symposium on
Glycoconjugates (Split, Croatia)
2015/09/15-09/20

6. Sato, N., Sasazawa, Y., Suzuki, T., Dohmae, N.
& Simizu, S. “The role of
C-mannosylation on c-mpl.” 第34回日本糖質
学会年会（東京大学; 東京都文京区）
2015/07/31-08/02
7. 松木葵、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
と標的タンパク質の同定」第19回学術集会
日本がん分子標的治療学会（松山全日空ホ
テル; 愛媛県松山市）2015/06/10-06/12
8. Komai, K., Niwa, Y., Sasazawa, Y. & Simizu,
S. “Pirin downregulates E-cadherin gene
expression and contributes to EMT.”
EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular
Targets and Cancer Therapeutics (Barcelona,
Spain) 2014/11/18-11/21
9. 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
10. 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

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹澤 有紀子 (Sasazawa, Yukiko)
順天堂大学・医学部・特任研究員
研究者番号: 26750373