

## 61. タンパク質品質管理による骨粗鬆症治療戦略の開発

今泉 和則

Key words : 骨粗鬆症, 小胞体ストレス, 低分子化合物,  
タンパク質品質管理, 分子シャペロン

宮崎大学 医学部 解剖学講座  
分子細胞生物学分野

### 緒 言

タンパク質の品質管理は細胞の機能発現に欠かすことのできない重要な細胞内イベントである。このシステムに障害が起こると様々な疾患に結びつくことが明らかにされている。特に異常タンパク質が蓄積して生じる神経変性疾患や糖尿病などではタンパク質品質管理の中心となる小胞体機能障害（小胞体ストレス）が原因で細胞死を伴う細胞傷害を起こす<sup>1-3)</sup>。骨組織はダイナミックにタンパク質代謝が行われる典型的な組織であり、タンパク質の品質管理も厳密に制御される組織でもある。しかしながら脳疾患などの研究とは異なり、タンパク質品質管理の視点に立った骨疾患発症機序の解析は全く行われていなかった。

筆者らはタンパク質品質管理を促進し、骨組織のタンパク質代謝を亢進する化合物の探索を試み、新規化合物 BIX の開発に成功した。本研究では化合物 BIX の骨粗鬆症治療薬としての可能性を見極めるために、*in vitro*レベルでの骨代謝促進効果ならびに細胞死抑制効果について検討した。

### 方 法

1. 化合物 BIX の作用機序の解析：小胞体分子シャペロン BiP のプロモーター領域 132bp を pGL3 ベクターに組み込み、293 細胞に導入してレポーター活性を測定した。
2. mRNA 発現解析：神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞に対して 5  $\mu$ M の BIX を 6 時間処理した後、細胞から total RNA を抽出し、それを鋳型として cDNA を作成した。この cDNA を用いて各種小胞体ストレス関連遺伝子 (*BiP*, *XBPI*, *ERdj4*, *EDEM*, *p58IPK*, *CHOP*, *ASNS*) について半定量的 RT-PCR 解析を行った。
3. 細胞死アッセイ：SK-N-SH 細胞の培養液に 5  $\mu$ M の BIX もしくは DMSO を添加し、12 時間培養した。続いて、培養液をフレッシュな培養液に全交換し、0.5  $\mu$ g/ml のツニカマイシンを添加した。ツニカマイシン添加後、12, 24, 36, および 48 時間経過した細胞を固定し、生細胞とアポトーシス細胞を計測し、細胞死を起こした比率を定量化した。
4. 骨基質分泌に対する BIX の効果：初代培養骨芽細胞の培養上清中に 5  $\mu$ M の BIX を添加後、12, 16, 24 時間の培養液を回収し、ELISA 法にて骨基質タンパク質である osteopontin の分泌量を定量した。

### 結 果

#### 1. 化合物のスクリーニング

約 20,000 種類のケミカルライブラリーから BiP プロモーター活性を上昇させる化合物をレポーターアッセイによりスクリーニングした。その結果、5 つの候補化合物を見出すことに成功した。そのうち、レポーター活性を最も上昇させる機能をもつ BIX (BiP Inducer X, 図 1 - A) について検討を加えた。

#### 2. 化合物 BIX の作用機序

化合物 BIX を培養細胞の培養上清に加え、12 時間後の小胞体分子シャペロン BiP mRNA の発現を検討した。その結果、BIX の濃度依存的に BiP mRNA の発現上昇が認められた (図 1 - B)。BiP 以外の小胞体ストレス関連遺伝子については BIX の投与により発現変動がみられなかった。このことから、BIX は小胞体ストレスを誘発することなく、小胞体分子シャペロン BiP のみを特異的に発現上昇させることが明らかになった。

### 3. 化合物 BIX の小胞体ストレス誘導性細胞死に対する効果

培養細胞の培養上清中に化合物 BIX を添加し、12 時間後に小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン (Tm) を 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で添加し、細胞死の程度を溶媒のみを添加した時と比較した。その結果、化合物 BIX を添加した細胞では Tm 誘導性の細胞死に対して抵抗性が亢進していた。この結果から BIX は小胞体ストレスから回避し、細胞に保護的に作用することがわかった (図 2)。

### 4. 骨基質分泌に対する BIX の効果

マウスの頭蓋骨から採取した骨芽細胞を 14 日間培養した。培養上清中に 5  $\mu\text{M}$  の BIX を添加後、12, 16, 24 時間目に培養上清を回収して osteopontin の分泌量を測定した。BIX を添加した群では、有意に osteopontin の分泌が亢進していた (図 3)。

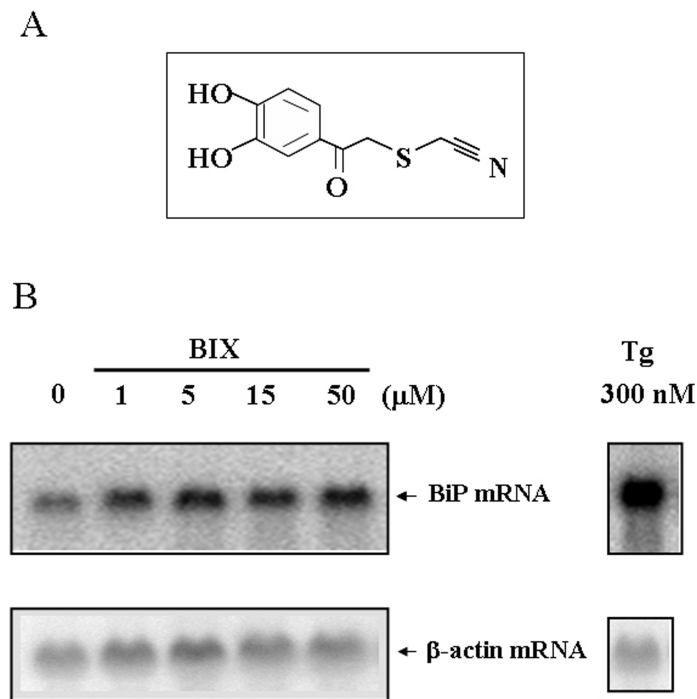


図 1. 化合物 BIX の構造と BiP mRNA の誘導.

(A) BIX の化学構造, (B) BIX による BiP mRNA の誘導. SK-N-SH 神経芽細胞に 0-50 $\mu\text{M}$  の濃度で BIX を投与し、6 時間後にトータル RNA を抽出後、BiP mRNA の発現レベルをノーザンブロットングにより解析した。ポジティブコントロールとして 300nM サプシガルジンを 6 時間処理したものを用いた。BIX は BiP を誘導することが明らかとなった。

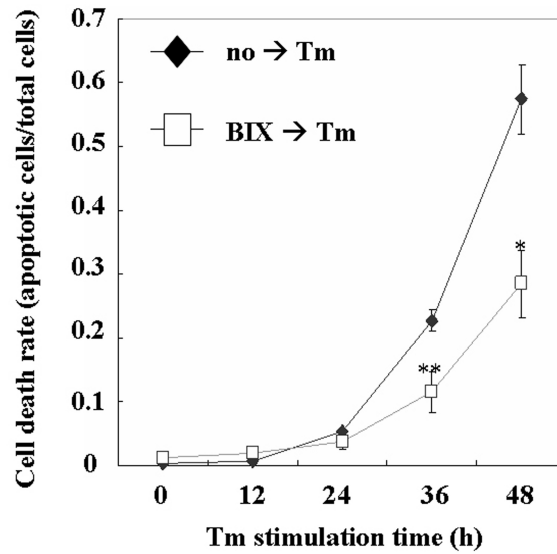


図 2. 化合物 BIX は小胞体ストレス誘導性細胞死を救済する.  
SK-N-SH 細胞に  $5\mu\text{M}$  の濃度で BIX を投与し、12 時間後に  $0.5\mu\text{g/ml}$  のツニカマイシン (Tm) を添加した. 経時的にヘキスト染色を行い、細胞死数をカウントした. 3 回の実験を行い、有意差検定を行った(\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , T-test).

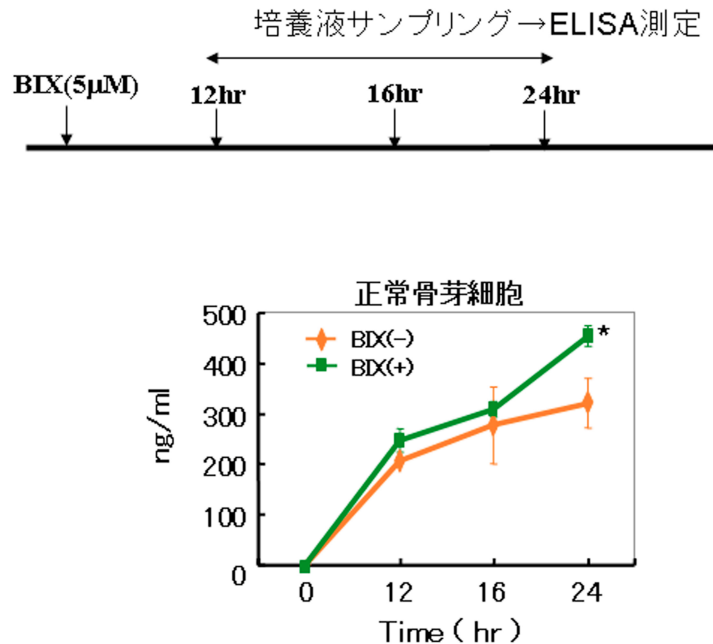


図 3. 化合物 BIX は osteopontin の分泌を促進する.  
初代培養骨芽細胞に BIX を投与し、培養上清中に分泌される osteopontin の量を ELISA 法により検討した. BIX の投与により osteopontin の分泌が有意に亢進した(\*:  $p < 0.05$ , T-test).

## 考 察

骨粗鬆症の発症に骨芽細胞における小胞体機能異常が関連する可能性が指摘されている。小胞体内タンパク質品質管理を改善し小胞体機能を回復できれば、骨形成を活性化し骨粗鬆症治療につながる。筆者らが発見した化合物 BIX は小胞体分子シャペロンを特異的に発現誘導し、小胞体ストレスから回避する効果を有する。初代培養骨芽細胞の培養上清に BIX を添加し、培養上清中に分泌される osteopontin の量を測定したところ、有意に osteopontin の分泌が亢進していた。このことは分子シャペロン BiP が発現誘導されたことで小胞体内タンパク質品質管理が効率的に行われ、分泌型タンパク質の産生分泌が亢進したことによると考えられる。以上の成果から、BIX は骨基質形成を促進させる新規の骨粗鬆症治療薬として期待がもてる。今後はモデルマウスに投与して薬効を *in vivo* で検討する必要がある。さらに薬物動態および代謝の解析や投与方法の検討、急性毒性および慢性毒性等の情報を得る必要がある。

## 文 献

- 1) Katayama, T., Imaizumi, K., Sato, N., Miyoshi, K., Kudo, T., Hitomi, J., Morihara, T., Yoneda, T., Gomi, F., Mori, Y., Nakano, Y., Takeda, J., Tsuda, T., Itoyama, Y., Murayama, O., Takashima, A., St. George-Hyslop, P., Takeda, M. & Tohyama, M. : Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.*, **1**: 479-485, 1999.
- 2) Kondo, S., T. Murakami, K. Tatsumi, M. Ogata, S. Kanemoto, K. Otori, K., Iseki, A. Wanaka & K. Imaizumi. : OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signaling in astrocytes. *Nat. Cell Biol.*, **7**: 186-194, 2005.
- 3) Kondo, S., Saito, A., Hino, S-I., Murakami, T., Ogata, M., Kanemoto, S., Nara, S., Yamashita, A., Yoshinaga, K., Hara, H. & Imaizumi, K. : BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of ER stress transducer. *Mol. Cell. Biol.*, **27**: 1716-1729, 2007.