

博士学位論文審査要旨

2023年1月14日

論文題目： TRAF6 を標的とした新規破骨細胞分化制御分子の開発

学位申請者： 安西 聖敬

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

副査： 生命医科学研究科 教授 野口 範子

副査： 生命医科学研究科 教授 池川 雅哉

要旨：

骨恒常性は、骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞の機能的バランスにより保たれている。加齢によるホルモンバランスの変化や局所炎症などの要因により、破骨細胞が過剰になると、骨粗鬆症や関節リウマチなどといった骨破壊性疾患を発症する。従って、骨破壊疾患の治療には、破骨細胞の分化を適切に制御することが重要である。

破骨細胞の分化は、骨髄前駆細胞上の RANK が、リガンドである RANKL を受容することで開始する。RANK はアダプター分子である TNF 受容体関連因子 6 (TRAF6) を活性化し、その後、NF- κ B 経路や MAPK 経路が活性化し、破骨細胞分化マスター転写因子である NFATc1 が発現誘導され、多核化した破骨細胞への分化が誘導される。本研究では、TRAF6 を標的として結合し、RANK と TRAF6 の相互作用を阻害することにより、強力な破骨細胞分化阻害能を発揮するペプチド性化合物を開発することを目的とする

研究項目 1) では、多価型ペプチドライブラリー法を用いて、高親和性 TRAF6 結合ペプチドを複数個取得した。このうち、膜透過性を付与した 2 種の分子 (CR4-WHD-tet, CR4-RRK-tet) が、強力に破骨細胞分化を阻害することを見出した。

研究項目 2) では、マウス骨破壊誘導モデルを用い、大腿骨の骨密度減少に対する阻害効果を検討した。その結果、CR4-WHD-tet が有効な阻害効果を示すことを見出した。

研究項目 3) では、破骨細胞分化には後期過程特異的なシグナル経路が存在すること、そこには p38 が密接に関与していること、CR4-WHD-tet はこの経路を阻害することにより強い分化抑制能を発揮していること、を見出した。CR4-WHD-tet を用いることにより、より特異性に優れた骨破壊疾患治療薬の開発が可能になると期待できる。

よって、本論文は、博士 (理学) (同志社大学) の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2023年1月14日

論文題目： TRAF6 を標的とした新規破骨細胞分化制御分子の開発

学位申請者： 安西 聖敬

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 西川 喜代孝

副査： 生命医科学研究科 教授 野口 範子

副査： 生命医科学研究科 教授 池川 雅哉

要旨：

総合試験は、2023年1月13日午後5:00から、口頭発表(45分)、質疑応答・口頭試問(30分)の構成で実施した。申請者は総合試験において、骨破壊疾患領域、細胞生物学領域、タンパク質構造領域等様々な方面からの質問に関する的確に回答しており、幅広い分野で十分な専門知識を有していることが確認できた。また、各実験について、その目的、意義、研究全体の中での位置付けが十分に理解できていること、各々が慎重に組み合わせられて結論が導き出されていること、等博士に相応しい研究スタイルを習得していることが確認できた。さらに、得られた実験結果をベースとして、これまでの文献情報に習熟した上で説得力のある独自性の高いモデルへと発展させる能力を備えていることが確認できた。特に、現在治療に使用されている抗RANKL抗体はRANKL下流シグナルの全てを阻害してしまうが、この問題に答えるべく、ペプチドをベースとした新たな阻害薬を開発することに成功し、さらに新たな創薬コンセプトの創出へと発展させた点は高く評価できる。

申請者は、博士課程(後期課程)入学時の語学試験(英語)に合格していることから、十分な語学能力を有していると判断される。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

Abstract of Doctoral Dissertation

論文題目： TRAF6 を標的とした新規破骨細胞分化制御分子の開発

Title of Doctoral Dissertation

氏名： 安西 聖敬

Name

要旨：

Abstract

骨恒常性は、骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞の機能的バランスにより保たれている。加齢によるホルモンバランスの変化や局所炎症などの要因により、破骨細胞が過剰になると、骨粗鬆症や関節リウマチなどといった骨破壊性疾患を発症する。従って、骨破壊疾患の治療には、破骨細胞の分化を適切に制御することが重要である。現在治療薬としてビスホスホネート系薬剤が主に使用されているが、時に顎骨壊死や非定型骨折などの副作用を引き起こすため、新しい作用機序を持つ薬剤が求められている。

破骨細胞の分化は、骨髄に存在する単球・マクロファージ系の前駆細胞上の RANK が、リガンドである RANKL を受容することで開始する。RANK はアダプター分子である TNF 受容体関連因子 6 (TRAF6) を活性化し、その後、NF- κ B 経路や MAPK 経路が活性化し、破骨細胞分化マスター転写因子である NFATc1 が発現誘導され、多核化した破骨細胞への分化が誘導される。この時、RANK と TRAF6 は互いに 3 量体を形成して結合するが、この多価対多価の結合は 1:1 の結合と比較して親和性が著しく亢進することが知られており、クラスター効果と呼ばれている。

この RANK と TRAF6 の相互作用は破骨細胞分化の中心的役割を果たしており創薬標的として優れている。しかしながら、低分子化合物スクリーニング等の従来技術では、原理的に 1:1 の相互作用にしか対応できず、両者のクラスター効果に基づく強い相互作用を阻害し、強力な破骨細胞分化阻害活性を示す分子の開発例はない。本研究では、TRAF6 を標的として結合し、RANK と TRAF6 の相互作用を阻害することにより、強力な破骨細胞分化阻害能を発揮するペプチド性化合物を開発することを目的とする。

1) TRAF6 に結合し強力な破骨細胞分化阻害能を示す 4 価型ペプチドの同定

これまでに、RANK と TRAF6 の相互作用には、RANK に存在する Pro-X-Glu-X-X-(aromatic/acidic residue)モチーフと、TRAF6 の C 末端ドメイン (TRAF-C) との結合が重要であることが示されている。そこで、このモチーフを含む、RANK の TRAF-C 結合部位由来配列 (RQMPTEDEY) を 4 価で有する化合物 (RANK-tet)、並びにそのモノマー型 (RANK-mono) を作成した。その結果、RANK-tet は高親和性で TRAF-C に結合すること、一方で RANK-mono は極めて弱い結合活性しか示さないこと、を見出した。さらに RANK との結合が示唆されている TRAF-C 上の複数のアミノ酸に変異を導入した一連の変異 TRAF-C を作成し、RANK-tet との結合を検討したところ、いずれの変異体でも結合活性が著減すること、中でも TRAF-C の R392 が最も結合に重要な役割を果たしていることを見出した。そこで、ポリ Arg を付加することで膜透過性を持たせた RANK-tet (CR4-RANK-tet) を作成し、マウス骨髄由来前駆細胞から RANKL

刺激による破骨細胞分化に対する効果を検討したところ、高い分化阻害能を発揮することを見出した。

以上の結果は、RANK-tet はクラスター効果を発揮して TRAF-C の RANK 結合部位に特異的に結合することで機能することを示している。そこで、RANK-tet よりも阻害活性に優れた分子を開発するため、多価型ペプチドライブラリー法（特許第 5897178 号、特許第 6422046 号）を用い、R392 依存的に TRAF-C に高親和性結合活性を示す 4 価型ペプチドの取得を試み、11 種の候補分子を取得した。このうちの 2 種（WHD-tet, RRK-tet）が TRAF-C に高親和性結合活性を示すこと、さらに膜透過性を付与した分子（CR4-WHD-tet, CR4-RRK-tet）が、CR4-RANK-tet よりも強力に破骨細胞分化を阻害することを見出した。

2) CR4-WHD-tet のマウス骨破壊モデルでの効果

マウス腹腔へ RANKL を投与することにより骨破壊を誘導するモデルを用い、大腿骨の骨密度減少に対する CR4-WHD-tet、CR4-RRK-tet の阻害効果を検討した。その結果、CR4-WHD-tet のみが有効な阻害効果を示すことを見出した。そこで、両者の個体での作用が異なる機構を解明するため、1) マウス体内での排出速度の相違、2) 骨送達能の相違、について検討を行った。まず、両者の ¹²⁵I 標識体を作成し、マウス腹腔投与後の体内から尿中への排出速度を検討したところ、むしろ CR4-WHD-tet の方が速い傾向にあることが示された。その一方で、投与 6 時間後の各臓器への分布を調べたところ両者に相違が観察され、特に CR4-WHD-tet は CR4-RRK-tet よりも骨組織に対する分布が亢進していることを見出した。これまでにタンパク質中の酸性アミノ酸の高度なクラスターは骨への親和性を亢進させることが知られている。CR4-WHD-tet は、その機能モチーフ中に酸性アミノ酸のクラスター（DDEE）があり、これを 4 価で持つ。この高度な酸性アミノ酸のクラスターが CR4-WHD-tet の生体での高い骨破壊抑制効果に寄与していると考えられた。

3) CR4-WHD-tet の作用機構の解明

マウス骨髄由来前駆細胞を破骨細胞へ分化させるには、24 時間ごとに 3 回の RANKL 刺激（計 72 時間）が必要である。これまで CR4-WHD-tet は RANKL と同時に 3 回投与していたが、3 回目の投与（1 回目刺激後 48-72 時間）のみでも強い分化抑制能を発揮できることを見出した。この時、分化マスター転写因子である NFATc1 の mRNA の発現量は RANKL 刺激 48 時間の段階でピークに達しその後維持されるが、その発現量に CR4-WHD-tet は全く影響を及ぼさなかった。一方、1 回目みの投与（0-24 時間）では CR4-WHD-tet の分化抑制能は顕著に減弱し、NFATc1 の発現量にも影響しない。このことから、1 回目と 3 回目の RANKL 刺激では TRAF6 下流のシグナルが異なっており、CR4-WHD-tet は 3 回目に特異的かつ分化に必須のシグナルを抑制することで強い分化抑制能を発揮していると考えられた。そこで、1 回目と 3 回目の RANKL 刺激で発現誘導される mRNA を次世代シーケンサーによって網羅的に解析したところ、3 回目の RANKL 刺激において、複数の破骨細胞分化関連因子、に発現上昇が見られ、その中から、特に 3 回目の刺激に特異的に誘導され、かつ CR4-WHD-tet 処理により発現が低下するものに p38（MAPK11）が存在することを見出した。さらに、3 回目の RANKL 刺激で誘導される細胞内シグナルに対する CR4-WHD-tet の効果を検討したところ、RANKL による p38 の活性化が顕著

に抑制されていること、一方NF- κ Bの活性化はほとんど影響を受けないことが明らかとなった。さらに、3回目のRANKL刺激をp38阻害剤存在下で行ったところ、強く分化が抑制されることを見出した。このことから、3回目のRANKL刺激には特異的な分化誘導シグナル経路が存在すること、そこにはp38が密接に関与していること、CR4-WHD-tetはこの経路を阻害することにより強い分化抑制能を発揮していることが示された。

分化の最終段階では、既に発現しているNFATc1の活性により、破骨細胞分化を決定づける複数の遺伝子が発現する。そこで、これらの発現に対するCR4-WHD-tetの効果を、qPCR法を用いて検討した。その結果、CR4-WHD-tetは、破骨細胞分化が最終段階にある事を示すCathepsin K、OC-STAMPの発現誘導を強力に抑制すること、破骨細胞の分化を抑制するCALCRの発現を顕著に増強することを見出した。

次に、NFATc1の発現量に影響がないにもかかわらず、その下流遺伝子の一部の発現が影響を受ける機構について検討した。これまでに、活性化したp38は核内に移行し、NFATc1をリン酸化することでその活性を正に制御することが知られている。そこで、CR4-WHD-tet存在あるいは非存在下で3回目のRANKL刺激を行い、NFATc1およびp38の核局在化に対する効果を検討した。その結果、3回目のRANKL刺激24時間後において、NFATc1の核への局在に対して、CR4-WHD-tetは影響を与えなかった。一方で、3回目のRANKL刺激1時間後において、CR4-WHD-tet非存在下では、p38の明瞭な核内移行が観察されるのに対し、CR4-WHD-tet存在下ではこの移行が強力に阻害されることを見出した。すなわち、CR4-WHD-tetはp38の活性化を抑制し、その結果p38の核内移行が阻害され、核内に存在するNFATc1の十分な活性化が起らないために、下流遺伝子の発現が影響を受ける、と考えられた。

総括

これまで、RANKL刺激は分化完了まで継続的に必要であることが知られていたが、そのシグナル経路の解析はほとんどが分化初期段階に限られていた。本研究で、CR4-WHD-tetを使用することで初めて、分化段階特異的なシグナル経路が存在すること、その制御により効率よく破骨細胞分化の制御が可能であること、を示すことができた。現在治療に使用されている抗RANKL抗体はRANKL下流シグナルの全てを阻害してしまう。CR4-WHD-tetを用いることにより、より特異性に優れた分化制御法の開発が可能になると期待できる。