

博士學位論文

TRAF6を標的とした 新規破骨細胞分化制御分子の開発

同志社大学大学院 生命医科学研究科
医生命システム専攻 博士課程（後期課程）
分子生命化学研究室
1414202001 安西 聖敬

指導教員 西川 喜代孝 教授

目次

第1章 序論	4
第2章 TRAF6 結合配列を有する多価型ペプチド RANK-tet の開発	12
2-1 本章の概要	12
2-2 実験試薬	12
2-3 実験方法	16
2-3-0 タンパクおよびペプチドの合成および調整	16
2-3-1 RANK-tet と TRAF-C ドメインの結合の評価	16
2-3-2 RANK-tet が破骨細胞分化に与える影響の検討	17
2-4 結果	18
2-4-1 RANK-tet と TRAF-C ドメインの結合の評価	18
2-4-2 RANK-tet が破骨細胞分化に与える影響の検討	19
2-5 考察	19
2-6 図表	21
第3章 新規 TRAF6 高親和性ペプチド RRK-tet・WHD-tet の開発	27
3-1 本章の概要	27
3-2 実験試薬	27
3-3 実験方法	29
3-3-1 新規骨細胞分化制御ペプチドがマウス骨髄細胞の生存に与える影響の検討	29
3-3-2 新規骨細胞分化制御ペプチドが破骨細胞分化に与える影響の検討	30
3-3-3 新規ペプチドの性状解析	30
3-4 結果	31
3-4-1 新規骨細胞分化制御ペプチドがマウス骨髄細胞の生存に与える影響の検討	31
3-4-2 新規骨細胞分化制御ペプチドが破骨細胞分化に与える影響の検討	31
3-4-3 新規ペプチドの性状解析	31
3-5 考察	32
3-6 図表	33
第4章 CR4-WHD-tet のマウス骨破壊モデルでの効果	42
4-1 本章の概要	42
4-2 実験試薬	42

4-3 実験方法	43
4-3-1 CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の骨破壊モデルに対する治療効果	43
4-3-2 CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の体内分布	43
4-4 結果	44
4-4-1 CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の骨破壊モデルに対する治療効果	44
4-4-2 CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の体内分布	44
4-5 考察	45
4-6 図表	47
第 5 章 CR4-WHD-tet が制御する破骨細胞分化後期特異的シグナルの同定	55
5-1 本章の概要	55
5-2 実験試薬	55
5-3 実験方法	58
5-3-1 WHD-tet と内在性 TRAF6 の結合の評価	58
5-3-2 NFATc1 発現に CR4-WHD-tet が与える影響	59
5-3-3 CR4-WHD-tet の作用する破骨細胞分化段階の同定	59
5-3-4 NFATc1 の発現に CR4-WHD-tet が破骨細胞分化後期において与える影響	60
5-3-5 CR4-WHD-tet が制御する破骨細胞分化後期特異的シグナルの同定	60
5-3-6 CR4-WHD-tet が制御する破骨細胞分化シグナルに与える影響	61
5-4 結果	61
5-4-1 WHD-tet と内在性 TRAF6 の結合の評価	61
5-4-2 NFATc1 の発現に CR4-WHD-tet が与える影響	62
5-4-3 CR4-WHD-tet の作用する破骨細胞分化段階の同定	62
5-4-4 NFATc1 の発現に CR4-WHD-tet が破骨細胞分化後期において与える影響	62
5-4-5 CR4-WHD-tet が制御する破骨細胞分化後期特異的シグナルの同定	62
5-4-6 CR4-WHD-tet が制御する破骨細胞分化シグナルに与える影響	63
5-5 考察	63
5-6 図表	66
第 6 章 破骨細胞分化最終段階に CR4-WHD-tet が与える影響の検討	77
6-1 本章の概要	77
6-2 実験試薬	77
6-3 実験方法	79

6-3-1 CR4-WHD-tet が制御する破骨細胞分化後期特異的遺伝子の同定	79
6-3-2 CR4-WHD-tet が NFATc1 の核移行に与える影響の検討	80
6-3-3 CR4-WHD-tet が p38 の核移行に与える影響の検討.....	80
6-4 結果	81
6-4-1 CR4-WHD-tet が制御する破骨細胞分化後期特異的遺伝子の同定	81
6-4-2 CR4-WHD-tet が NFATc1 の核移行に与える影響の検討	81
6-4-3 CR4-WHD-tet が p38 の核移行に与える影響の検討.....	81
6-5 考察	81
6-6 図表	83
第 7 章 結論	87
謝辞	89
引用文献.....	92
図表目録.....	96

第1章 序論

骨破壊疾患の現状

骨破壊疾患は、高齢者に好発し、その生活の質を著しくさげる要因である。疾患を骨粗鬆症に限っても、患者数は1000万人以上にのぼり、特に70代以上の女性では、その3人に1人が発症するというほど高頻度に見られる疾患である^{1,2} (Fig. 1)。骨粗鬆症では、椎体、前腕骨、大腿骨近位部などの骨折が生じやすく、日常の軽微な打撲や転倒をきっかけにこれらの骨折を生じ、寝たきりを招くなど、高齢者の運動機能を大きく損なう原因となる。超高齢化を迎えた日本社会において、その対策は医療のみならず社会的にも重要な課題となっている。

骨恒常性維持と骨破壊疾患治療の現状

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 (Fig. 2)^{3,4}。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^{4,5}。したがって、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をはじめとして、抗 RANKL 抗体、活性型ビタミン D 製剤、副甲状腺ホルモン薬など種々の作用機序をもつ薬剤が実用化されている⁶。しかしながら、骨破壊疾患の責任細胞である破骨細胞を直接の標的として作用する薬剤は、最も治療に効果的であると考えられるにも関わらず、ビスホスホネート系薬剤および抗 RANKL 抗体に限られている。これらの薬剤は有効であるものの、時に顎骨壊死や非定型骨折などの重大な副作用を引き起こすため、新しい作用機序を持つ破骨細胞分化阻害剤が求められている。

骨恒常性と骨破壊疾患の発症機構

骨髄系前駆細胞からの破骨細胞形成は、骨芽細胞や Th17 細胞などが呈示する同族リガンド (RANKL) による Receptor activator of NF- κ B (RANK) の刺激に依存する⁷⁻¹¹。RANKL 刺激にともない、RANK は 3 量体構造を取り、その細胞質側ドメインに 3 量体構造を取った腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体関連因子 6 (TRAF6) が結合する。TRAF6 は E3 リガーゼであり、RANK との相互作用により、自己をユビキチン化する¹²。このユビキチン鎖はユビキチンの一次構造中の 63 番目の Lys 残基を介して形成される K63 鎖と呼ばれるものであり、TRAF6 のプロテアソームへの輸送を誘導せず、他のシグナル分子が招集されるための足場としてはたらき、破骨細胞形成に必要な NF- κ B や AP-1 の活性化など様々

な下流シグナルを伝達する¹³⁻¹⁶。その後、破骨細胞分化マスター転写因子である Nuclear factor of activated T cells c1 (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 (Fig. 3)。RANK と TRAF6 は共にホモ三量体構造を持ち、RANK の Pro-X-Glu-X-X- (芳香族/酸性) モチーフと TRAF6 の C 末端ドメイン (TRAF-C) の間で多価の相互作用を形成する (Fig. 4) が、このときの結合親和性は 1:1 の結合と比較して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 の相互作用は下流シグナルのハブとして、破骨細胞分化に中心的な役割を果たしており創薬標的として優れている¹⁷⁻¹⁹。

創薬標的としての TRAF6

この事実に基づいて、細胞透過性を高めるための疎水性配列 (16 アミノ酸) と、RANK 由来の TRAF-C 結合領域 (18 アミノ酸) からなる合成ペプチド、L-T6DP-1 がこれまでに開発された (Fig. 5)。L-T6DP-1 は 30 μM の用量で RANKL を介した NF- κ B の活性化と破骨細胞の分化を阻害する¹⁹。しかしながら、L-T6DP-1 の TRAF-C 結合モチーフの結合親和性 (Kd 値) は 78 μM に過ぎない。これは、単量体ペプチド構造を持つモチーフが TRAF-C と多価の相互作用を形成してその結合親和性を高めることができないためであると考えられる。近年、TRAF-C を標的として、インシリコスクリーニングに基づいて、低分子化合物 (TRI4) が開発されたが、TRAF-C 結合の Kd 値は 35 μM と低い一方で、破骨細胞分化阻害の IC50 値は 200 μM 以上と、L-T6DP-1 に比べてはるかに大きい²⁰ (Fig. 5)。このように、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ない。そのため、RANK と TRAF6 の間の、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は得られていない。

TRAF6 を標的とした破骨細胞分化の制御戦略

これまでに我々は、標的分子と多価の相互作用を形成することで機能するマルチサブユニット分子に結合して制御する一連の 4 価ペプチドを同定する方法を開発した。これらの分子には、腸管出血性大腸菌の主要な病原因子である志賀毒素 (Stx) や、A 型インフルエンザウイルスのウイルスコートタンパク質であるヘマグルチニン (HA) など、様々な病原性分子が含まれる。Stx や HA を標的とした 4 価ペプチドは、*in vitro* および *in vivo* でこれらの分子の病原性を阻害することに成功している²¹⁻²⁸。この事実をもとに、①同様のコア構造を用いて、RANK の TRAF6 結合モチーフを 4 価で有するペプチドを開発し、RANK と TRAF6 の相互作用を競合的に阻害し破骨細胞分化を阻害する分子として確立することを目指した。さらに、本研究室ではこれまでに、独自技術である多価型ペプチドライブラ

リースクリーニング法を確立している^{27,29-32}。本法は、RANK-TRAF6 の間に見られるような多価型相互作用に基づく強固な結合を阻害する分子を同定できる唯一の手法である。そこで、②多価型ペプチドライブラリースクリーニング法を用いて、TRAF6 高親和性モチーフを 0 ベースから同定し、破骨細胞分化を阻害するオリジナル分子を新規骨破壊疾患治療薬として確立することを着想した。

以上 2 つの戦略を基軸として、新規破骨細胞分化制御ペプチドを開発し、その作用メカニズムを詳細に明らかにすることを本研究の目的とする。

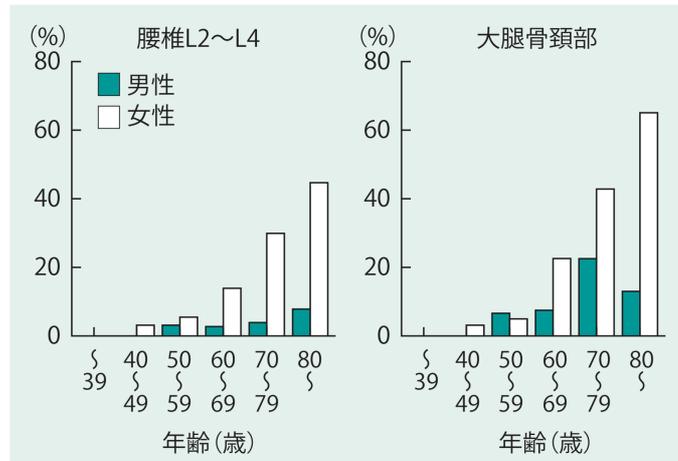


Fig. 1 骨粗鬆症の年代別有病率

骨粗鬆症の有病率は、年齢に相関して上昇する。特に発症は女性に顕著であり、特に70歳以上の女性では30%を超える。(文献²より図表を引用)

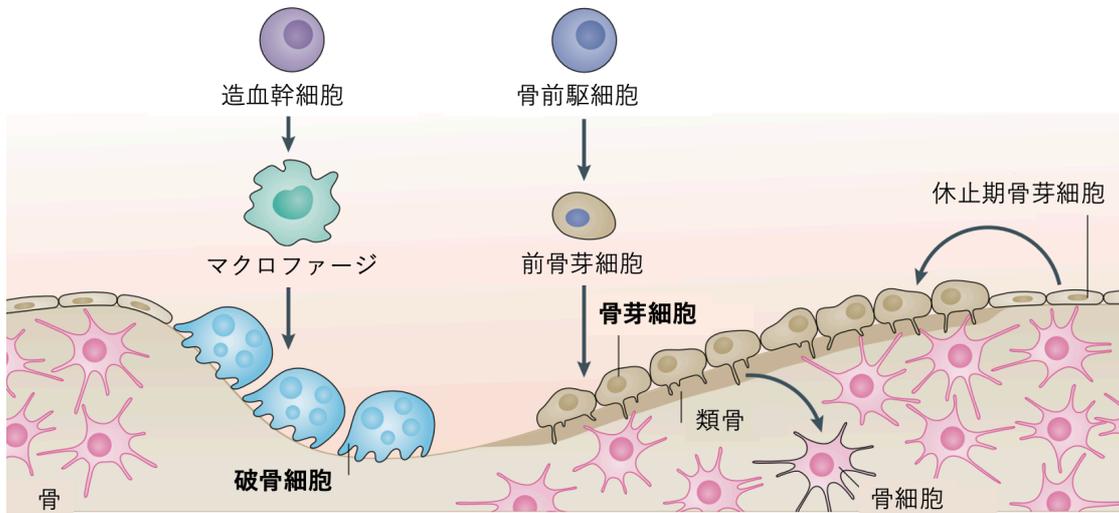


Fig. 2 骨恒常性維持における破骨細胞と骨芽細胞の機能的平衡

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、骨破壊性疾患を発症する。(文献³より図表を改変)

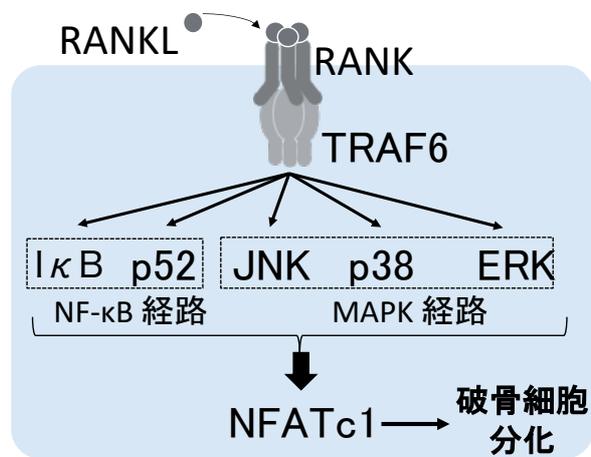


Fig. 3 破骨細胞分化シグナルの概要

骨髄系前駆細胞からの破骨細胞形成は、骨芽細胞や Th17 細胞などが呈示する RANKL による刺激に依存する。刺激に伴い、その受容体である RANK は三量体構造を取り、その細胞質側に、三量体構造をとった TRAF6 が、3 対 3 の多価型構造をとりながら結合する。TRAF6 の相互作用は下流シグナルのハブとして、破骨細胞分化に中心的な役割を果たしており、破骨細胞形成に必要な NF- κ B や AP-1 の活性化など様々な下流シグナルを伝達する。その後、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。

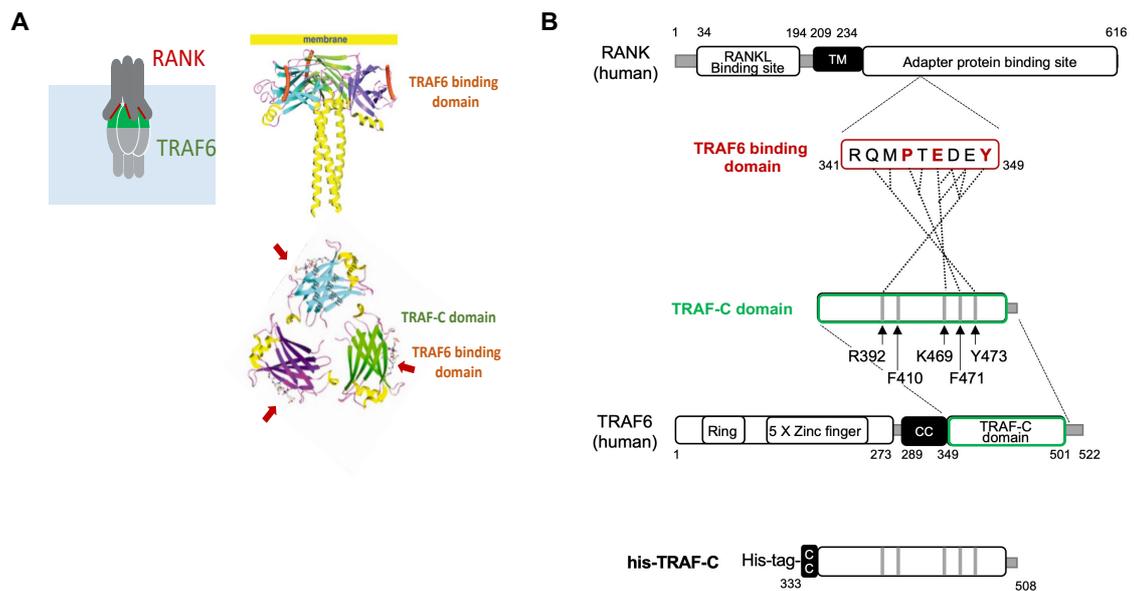


Fig. 4 RANK と TRAF6 との相互作用の模式図

(A) RANK および TRAF6 は互いに三量体構造をとりながら多価型の相互作用を発揮する。(B) RANK は C 末端側のアダプタータンパク結合サイトに含まれる RQMPT EDEY を介して TRAF6 と結合する。このうち、Pro-X-Glu-X- (芳香族/酸性) モチーフは TRAF6 と相互作用する分子に共通するコンセンサス配列であり、図中に赤字で示している。N 末端側は細胞外に露出し、RANKL を受容する。TRAF6 は C 末端側の TRAF-C domain を介して RANK と結合し、特に R392, F410, K469, F471, Y473 が、その結合に重要とされている。また、このドメインと coiled coil ドメイン(CC)の一部を含むリコンビナントタンパク質 his-TRAF-C を作成した。N 末端側は自己リン酸化を誘導する E3 リガーゼ活性を有する。

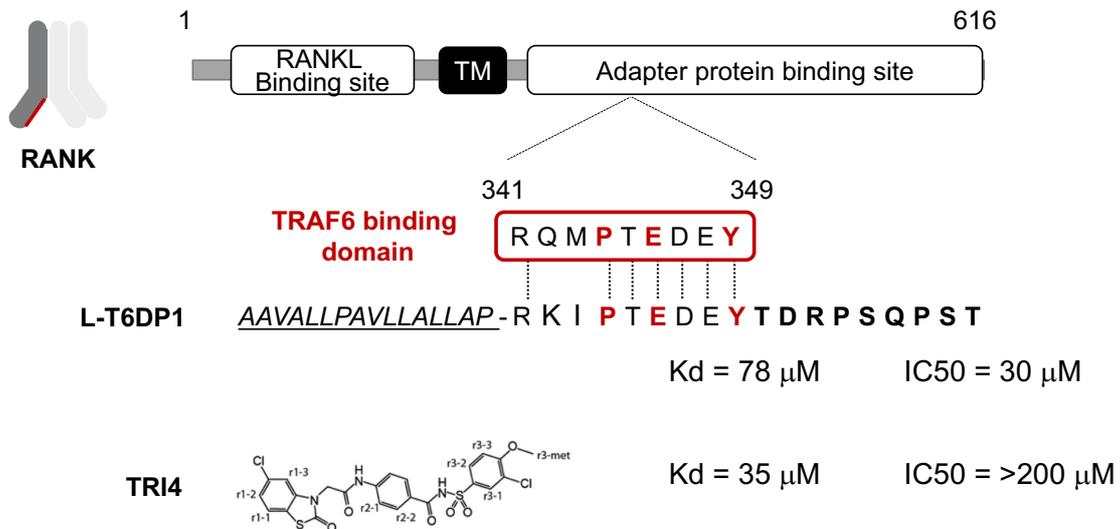


Fig. 5 TRAF6 を標的とした既存の破骨細胞分化阻害剤

RANK の TRAF6 binding domain の配列をもとに 2 つの破骨細胞分化阻害薬が開発された。L-T6DP-1 は RANK 由来の TRAF-C 結合領域 (18 アミノ酸) からなる合成ペプチドである。TRAF6 と相互作用する分子に共通するコンセンサス配列は、赤字で示している。TRAI4 は TRAF-C を標的として、インシリコスクリーニングに基づいて開発された低分子化合物である。いずれの化合物も Kd 値、IC50 値ともに、それほど優れたものとは言えない。これは、単量体分子では、多価型構造をとることができず、RANK と多価の相互作用を形成している TRAF6 に対して強力に干渉することができないためと考えられる。

第2章 TRAF6 結合配列を有する多価型ペプチド RANK-tet の開発

2-1 本章の概要

破骨細胞の分化を阻害することは、骨粗鬆症や関節リウマチの治療法として有望視されている。破骨細胞の分化に必須な分子である RANK は、TRAF6 と相互作用して下流のシグナルを伝達している。RANK と TRAF6 は共にホモ三量体構造を持ち、RANK の Pro-X-Glu-X- (芳香族/酸性) モチーフと TRAF6 の C 末端ドメイン (TRAF-C) の間で多価の相互作用を形成し、結合親和性を著しく増大させる。そこで、RANK の TRAF-C 結合モチーフを含む 4 価のペプチド、RANK-tet を設計し (Fig. 6)、RANK-tet が高い親和性で TRAF-C に結合することを明らかにした。一方、同じ TRAF-C 結合モチーフを持つ単量体 (RANK-mono) は TRAF-C に結合しなかったことから、TRAF-C への高親和性結合には多価の相互作用が必要であることが明らかとなった。RANK-tet は、RANK 結合領域のアミノ酸を置換した一連の TRAF-C 変異体には結合しなかったことから、RANK-tet は TRAF-C の RANK 結合領域を特異的に標的にしていることが示された。さらに、TRAF-C 結合モチーフの各 C 末端に poly-Arg 残基を有する細胞透過性の RANK-tet は、RANK リガンド (RANKL) による骨髄細胞の破骨細胞への分化を効率よく阻害した。

2-2 実験試薬

TRAF-C の精製

- ・ 発現ベクター pET-28b (+) 《his-TRAF-C》 (井上純一郎教授より供与された)
- ・ 大腸菌 BL21 (λ DE3) (Thermo Fisher Scientific)
- ・ isopropyl- β -d-1-thiogalactopyranoside (富士フィルム和光純薬)
- ・ polymyxin B (富士フィルム和光純薬)
- ・ potassium chloride (富士フィルム和光純薬)
- ・ sodium chloride (富士フィルム和光純薬)
- ・ sodium hydrogen phosphate (富士フィルム和光純薬)
- ・ His-Bind resin (Novagen)
- ・ Nickel(II) Sulfate Hexahydrate (富士フィルム和光純薬)
- ・ Hydrochloric Acid (富士フィルム和光純薬)
- ・ Imidazole (富士フィルム和光純薬)
- ・ NAP-5 カラム (GE ヘルスケア)
- ・ 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (富士フィルム和光純薬)

ペプチド合成

- ・ Fmoc 保護基を有する各種アミノ酸誘導体 (渡辺化学工業)
- ・ N, N-Dimethylformamide (富士フイルム和光純薬)
- ・ N-methylpyrrolidone (富士フイルム和光純薬)
- ・ 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-benzotriazolium 3-Oxide Hexafluorophosphate (同仁化学研究所)
- ・ Chloroform (富士フイルム和光純薬)
- ・ Piperidine (富士フイルム和光純薬)
- ・ Trifluoroacetic acid (富士フイルム和光純薬)
- ・ 1,2-Ethanedithiol (Sigma Aldrich)
- ・ Triisopropylsilane (富士フイルム和光純薬)
- ・ Thioanisole (渡辺化学工業)
- ・ Phenol (富士フイルム和光純薬)
- ・ *t*-Butyl Methyl Ether (ナカライテスク)

ペプチド

全て本研究室において合成した。

- ・ ビオチン標識 RANK-tet : biotin- MA-RQMPTEDEY-A
- ・ ビオチン標識 RANK-mono : biotin- MA-RQMPTEDEY-A
- ・ RANK-tet : MA-RQMPTEDEY-A
- ・ NR2-RANK-tet : MA-RR-RQMPTEDEY-A-U
- ・ NR3-RANK-tet : MA-RRR-RQMPTEDEY-A-U
- ・ NR4-RANK-tet : MA-RRRR-RQMPTEDEY-A-U
- ・ CR2-RANK-tet : MA-RQMPTEDEY-A-RR-U
- ・ CR3-RANK-tet : MA-RQMPTEDEY-A-RRR-U
- ・ CR4-RANK-tet : MA-RQMPTEDEY-A-RRRR-U

TRAF-C と RANK-tet の結合評価 (ELISA 法)

- ・ ウシ血清アルブミン (フラクシオン V) (富士フイルム和光純薬)
- ・ マウス抗 6×His-tag IgG 抗体 (クローン: 9C11) (富士フイルム和光純薬)
- ・ HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology)
- ・ Streptavidin-HRP (Dako)
- ・ *o*-Phenyldiamine (富士フイルム和光純薬)

- Potassium dihydrogenphosphate (富士フィルム和光純薬)
- dipotassium hydrogenphosphate (富士フィルム和光純薬)
- sodium hydrogen phosphate (富士フィルム和光純薬)
- Citric acid monohydrate (富士フィルム和光純薬)
- 30% hydrogen peroxide (富士フィルム和光純薬)

TRAF-C と RANK-tet の結合評価 (AlphaScreen 法)

- OptiPlate384 (PerkinElmer)
- nickel chelate acceptor beads (PerkinElmer)
- streptavidin donor beads (PerkinElmer)
- Control Buffer (PerkinElmer)
- Tween20 (Sigma Aldrich)

GST-RANKL の精製

- GST-RANKL を発現する大腸菌 (東京大学医科学研究所 井上純一郎教授より供与された)
- Glutathione Sepharose 4B (Sigma Aldrich)
- 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (富士フィルム和光純薬)
- 2Na(EDTA · 2Na) (同仁化学研究所)
- Polyoxyethylene(10) Octylphenyl Ether (富士フィルム和光純薬)
- Dithiothreitol (富士フィルム和光純薬)
- Reduced Glutathione (富士フィルム和光純薬)
- Sodium Chloride (富士フィルム和光純薬)
- Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Columns (Thermo)
- BCA Regent A and B (Thermo)

M-CSF の調整

- Mouse M-CSF を発現する CMG14-12 細胞 (東京大学医科学研究所 井上純一郎教授より供与された)
- D-MEM (Gibco)
- FETAL BOVINE SERUM (ニチレイ)
- G418 (Sigma Aldrich)
- 10 cm dish (Falcon)

- 75 cm² Cell-Culture Flask (Corning)
- Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized) (ナカライテスク)
- Minimum Essential Medium Alpha Medium [α -MEM] (GIBCO)
- 0.2 μ m ボトルトップフィルター (Thermo)

破骨細胞分化

- 実験用マウス：系統 C57BL/6 (♂, 6w) (清水実験材料)
- Minimum Essential Medium Alpha Medium [α -MEM] (GIBCO)
- Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized) (ナカライテスク)
- FETAL BOVINE SERUM (ニチレイ)
- 23G ニードル (TERUMO)
- 2.5mL シリンジ (TERUMO)
- 6cm dish (FALCON)
- Cell Strainer (FALCON)
- 24well plate (IWAKI)
- M-CSF (研究室にて調整)
- GST-RANKL (研究室にて調整)
- Paraformaldehyde (富士フイルム和光純薬)
- Acetone (ナカライテスク)
- Ethanol (富士フイルム和光純薬)
- Naphtol AS-MX phosphate disodium salt (Sigma Aldrich)
- N-N dimethyl form amide (富士フイルム和光純薬)
- Fast Red Violet LB salt (Sigma Aldrich)
- Sodium acetate (富士フイルム和光純薬)
- Sodium (+) - Tartrate Dihydrate (富士フイルム和光純薬)
- DAPI solution (同仁化学研究所)
- Dimethyl sulfoxide (Sigma Aldrich)

細胞生存評価

- Minimum Essential Medium Alpha Medium [α -MEM] (GIBCO)
- Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized) (ナカライテスク)
- HBSS (ナカライテスク)
- FETAL BOVINE SERUM (ニチレイ)

2-3 実験方法

2-3-0 タンパクおよびペプチドの合成および調整

ペプチド合成

4 価および 1 価のペプチドは、N- α -Fmoc で保護されたアミノ酸と標準的な BOP/HOB カップリングを使用して合成した。合成されたペプチドの品質は、autoflexII TOF/TOF システム (Bruker Daltonics) を用いた質量分析により確認した。

TRAF-C の精製

TRAF6 の His タグ付き TRAF-C ドメイン (TRAF-C-WT) またはその変異体 (TRAF-C-R392A) をコードする発現ベクター pET-28b (+) で大腸菌 BL21 (λ DE3) 細胞をコンピテントトランスフェクションした³³。前培養細胞を 1 mM IPTG (isopropyl- β -d-1-thiogalactopyranoside) で 15°C、24 時間処理した。回収した細胞を 1 mg/mL polymyxin B を含む PBS で溶解し、超音波処理した。遠心分離後、上清を Ni²⁺電荷を持つ His-Bind resin と 4°Cで一晩インキュベートした。ビーズを洗浄バッファー (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 60 mM imidazole, pH7.9) で洗浄した後、溶出バッファー (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole, pH7.9) を用いて、TRAF-C-WT または TRAF-C-R392A をビーズから分離させた。溶出後、NAP-5 カラムを用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより脱塩を行った。

2-3-1 RANK-tet と TRAF-C ドメインの結合の評価

ELISA 法による固相条件での検討

TRAF-C-WT または TRAF-C-R392A (10 μ g/mL) を 96 ウェル ELISA プレートの各ウェル上にアプライし、一晩インキュベートした。ブロッキング後、プレートに種々の濃度のビオチン化 RANK-tet または RANK-mono をアプライし、室温で 1 時間インキュベートした。結合したペプチドは、HRP 標識ストレプトアビジンを用いて検出した。

RANK-tet (1 μ g/mL) を 96 ウェル ELISA プレートの各ウェルに塗布し、24 時間一晩インキュベートした。ブロッキング後、プレートに種々の濃度の his-TRAF-C-WT または his-TRAF-C-R392A を加えて、室温で一晩インキュベートした。結合した his-TRAF-C-WT または his-TRAF-C-R392A は、マウスモノクローナルマウス抗 6 \times His-tag IgG 抗体および HRP コンジュゲートウマ抗マウス IgG 抗体を用いて検出した。

AlphaScreen assay による可溶条件での検討

種々の濃度のビオチン標識 RANK-tet を、OptiPlate-384 のウェル中で his-TRAF-C-WT または his-TRAF-C-R392A (10 µg/mL) と、室温で 1 時間インキュベートした。次に、サンプルをニッケルキレートアクセプタービーズ (20 µg/mL) と 30 分間インキュベートし、続いてストレプトアビジンドナービーズ (20 µg/mL) と室温、暗所で 1 時間インキュベートした。その後、プレートを 680 nm で励起し、ウェルからの発光は、EnVision システム (Perkin Elmer) を用いて 615 nm で検出した。データは、シグナル強度の任意単位 (AU) として得た。

2-3-2 RANK-tet が破骨細胞分化に与える影響の検討

GST-RANKL の精製

RANKL を形質転換した大腸菌は、東京大学医科学研究所より供与された。大腸菌を培養し、超音波処理によって菌体破碎後、18000 G で遠心分離し、上清に Glutathione Sepharose 4B (Sigma Aldrich) を添加して、4°C で 24 時間ローテーションした。翌日、beads を GST-wash buffer (20 mM Tris, 1mM EDTA, 1 % TritonX, 1 mM dithiothreitol, pH7.8) で 5 回洗浄したのち、High Salt Elution Buffer (20 mM Reduced Glutathione, 100 mM Tris, 120 mM NaCl, pH7.8) を 1 mL 加え、4°C で 10 分間ローテーションすることで、GST-RANKL を溶出した。溶出ステップは 2 回繰り返す、合計 2 mL の画分を得た。得られた画分は、Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Columns (Thermo) で処理した。得られた溶液を、透析によって脱塩した。得られた GST-RANKL は、SDS-PAGE および BCA assay (Thermo) によって、純度と濃度を確定した。比活性は、種々の濃度で GST-RANKL を添加して破骨細胞を培養した際の分化具合によって決定し、66 ng/mL で用いることにした。

M-CSF の調整

Mouse M-CSF をトランスフェクションした CMG14-12 細胞は、東京大学医科学研究所より供与された。細胞は D-MEM (10% ウシ胎児血清および 400 µg/mL G418 含有) を用いて、10 cm dish で培養した。十分に細胞が増殖した後、細胞を回収し、75 cm² Cell-Culture Flask に 5×10^6 cells で播種した。このときから、細胞は 10 % ウシ胎児血清、400 µg/mL G418 を含んだ α -MEM で培養された。翌日、培地をアスピレートし、細胞に 40 mL の α -MEM を添加した。翌日、全ての培養上清を回収し、4 °C で保存した後、改めて細胞に α -MEM を 40 mL 添加した。これを 3 日間繰り返す、得られた培養上清を均一化したのち、0.2 µm ボトルトップフィルターを用いて濾過滅菌した。比活性は破骨細胞の分化具合によ

って決定し、1:50 希釈で用いる事に決定した。

破骨細胞分化

6 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨から調製した骨髄細胞を、10 %ウシ胎児血清、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin、および M-CSF を添加した α -MEM を用いて、24 well plate で 24 時間培養し、単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞を得た。前駆細胞を、M-CSF (1/50 希釈) および 66 ng/mL GST-RANKL を含む培地において、種々の濃度のペプチドまたは DMSO (コントロール、最終 0.2 %) の存在下で培養した。培養液は、M-CSF、GST-RANKL、およびペプチドを含む同じ培地で 24 時間ごとに交換した。3 日後、細胞を固定し、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色および DAPI 染色を施した。3 個以上の核を含む TRAP 陽性細胞の数を評価した。

生細胞数の比較

6 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨から調製した骨髄細胞を、10 %ウシ胎児血清、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin、および M-CSF を添加した α -MEM を用いて、96 well plate で 24 時間培養し、単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞を得た。前駆細胞を、M-CSF (1/50 希釈) を含む培地において、種々の濃度のペプチドまたは DMSO (コントロール、final 0.2 %) の存在下で培養した。培養液は、M-CSF およびペプチドを含む同じ培地で 24 時間ごとに交換した。3 日後、培地を生細胞数計測キット (ナカライテスク) を添加した α MEM と入れ替え、4 時間の培養を行った。4 時間後、450 nm の吸光度を測定し、コントロールに対する生細胞数の比を算出した。

2-4 結果

2-4-1 RANK-tet と TRAF-C ドメインの結合の評価

ビオチン標識した RANK-tet および RANK-mono の、his-TRAF-C-WT との結合を ELISA 法で評価したところ、RANK-tet の結合親和性は、RANK-mono に比べて極めて大きいことが明らかになった。RANK-tet は、TRAF-C に効率よく結合し、Kd 値は 2.3 μ M であった (Fig. 7)。

これまでに、TRAF6 の Arg392, Phe410, Leu457, Ala458, Lys469, Phe471, Tyr473 は RANK 由来のペプチド (342-349 残基) と相互作用することが結晶構造解析で示されており¹⁹、本研究室においてもそれが確かめられ^{29,34}、RANK-tet と TRAF-C の結合には、TRAF-C の R392 が特に重要な役割を果たすことがわかっている。そこで、R392 を Ala 置

換した his-TRAF-C-R392A および WT の、RANK-tet との量依存的結合を、ELISA 法を用いて固相条件で、AlphaScreen 法を用いて可溶条件で、比較した。その結果、TRAF-C の RANK-tet への量依存的な結合は、いずれの条件においても his-TRAF-C-R392A で完全に消失した (Fig. 8)。

2-4-2 RANK-tet が破骨細胞分化に与える影響の検討

RANK-tet が RANKL による骨髄細胞の破骨細胞への分化を阻害できるかどうかを、初代培養マウス骨髄細胞を用いた *in vitro* 破骨細胞分化系を利用して検討した。その結果、RANK-tet は十分な破骨細胞分化抑制能を示さなかった。その一因として、RANK の 346Glu-347Asp-348Glu に対応する酸性アミノ酸のクラスターがペプチドの膜透過性を妨げたことが考えられた。そこで、塩基性アミノ酸のクラスターを持つペプチドが、任意の化合物に細胞透過性を付与するという既報^{21,35-37}に基づいて、Arg をクラスター化した一連の RANK-tet 誘導体を合成し (Fig. 9)、それらの破骨細胞分化抑制能を評価した。その結果、導入された Arg の数に応じて RANK-tet の破骨細胞形成阻害活性が増強し、導入する位置は機能モチーフの N 末端側よりも C 末端側が優れていることが明らかになった (Fig. 10)。中でも、C 末端に 4 つの Arg を有するペプチド (CR4-RANK-tet) は、破骨細胞形成を特に顕著に抑制し、その IC₅₀ 値は 0.54 μ M であった。また、CR4-RANK-tet は、検討した全ての濃度で、骨髄細胞の生存率には影響を及ぼさなかった (Fig. 11)

2-5 考察

RANK 由来のペプチド (341-349 残基, RQMPTDEY) を機能モチーフとする 4 価ペプチド (RANK-tet) が TRAF-C に高い親和性 (見かけの K_d = 2.3 μ M) で結合することを見出した。しかし、RANK-tet の単量体である RANK-mono の結合力は弱く、TRAF-C への高親和性結合には多価の相互作用が必要であることが示された。これらの結果は、TRAF6 に存在する TRAF-C の三量体構造のそれぞれが、RANK 三量体の各 TRAF-C 結合ドメインと相互作用して結合親和性を高めているという結晶構造解析と一致する^{18,19}。これまでに、単量体ペプチドであるマウス RANK 由来の TRAF6 結合モチーフ (残基 337-345, RKIPTDEY) は、RANK-tet のそれよりもはるかに高い 78 μ M という TRAF-C 結合に対する K_d 値を持つことが示されており¹⁹、RANK-tet と TRAF-C 間の多価の相互作用が重要であることがさらに確かめられた。

RANK-tet は、TRAF-C の表面ポケットのうち、Arg392、Phe410、Lys469、Phe471、Tyr473 を含む RANK 結合領域を特異的にターゲットにしており、これらの残基を Ala 置換

すると、RANK-tet と TRAF-C の結合が十分に減少することが示された³⁴。特に、Arg392 の Ala 置換は、RANK-tet と TRAF-C の結合を完全に消失させ、Arg392 が結合に不可欠な役割を果たしていることが示された。これまで、TRAF-C と RANK 由来のペプチド (341-349 残基 ; RQMPTEDEY) との正確な分子間相互作用が解明されており、Arg392 は 347Asp、348Glu および Tyr349 と、Lys469 は 346Glu、347Asp および 348Glu と、Phe471 は 344Pro および 345Thr と、Tyr473 は 342Gln および 343Met12 と相互作用していることが明らかにされている¹⁹。このように、RANK-tet は Arg392、Phe410、Lys469、Phe471、Tyr473 などの複数の残基を介して TRAF-C に結合する独特の結合様式を持つことから、RANK-tet が RANK と TRAF6 の相互作用を効率的に阻害して破骨細胞形成を阻害する理由が理解できる。

これまでに開発された合成ペプチド L-T6DP-1 は、カポジ線維芽細胞増殖因子シグナルペプチド (16 アミノ酸) とマウス RANK 由来の TRAF-C 結合モチーフ (337-354 残基、RKIPTEDEYTD RPSQPST) を細胞透過性に配列したもので、30 μ M で 64% の破骨細胞形成を阻害することが示されている¹⁹。これに対し、RANK-tet の最も効率的な細胞透過性形態 (機能モチーフの C 末端側に 4 つの Arg 残基を有する CR4-RANK-tet) は、IC₅₀ 値が 0.54 μ M とはるかに強力に破骨細胞形成を阻害することが判明した。この結果は、RANK の短い機能モチーフが、細胞透過性モチーフを持つ 4 価のコア構造と組み合わせることで、効率的な破骨細胞形成を十分に阻害可能であることを示している。我々は、4 残基の Arg を含む機能性モチーフ (PPRRRR) を同じコア構造と組み合わせた Stx 阻害性 4 価ペプチドが高い膜透過性を有し、既に細胞内に取り込まれた Stx を効率的に阻害することを既に発見しており²¹、CR4-RANK-tet の高い細胞透過性に Arg 4 残基が重要であることが更に確かめられた。このように、CR4-RANK-tet は、最小限の必須構造で機能する有効な破骨細胞分化阻害薬となり得る。

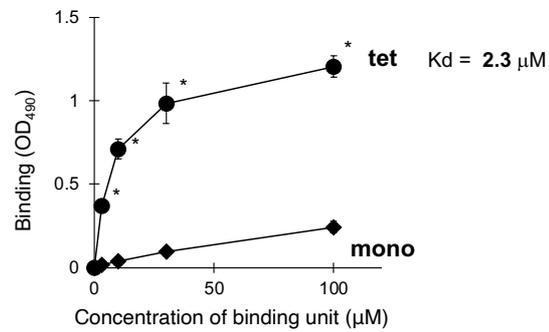


Fig. 7 RANK-tet はクラスター効果を発揮して TRAF-C に結合する

ELISA plate に TRAF-C を 10 μg/mL の濃度で固相化し、各濃度のビオチン標識 RANK-tet ならびにビオチン標識 RANK-mono との結合活性を、Streptavidin-HRP を用いた ELISA 法で検出した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。*p < 0.05 (by Student's t-test).

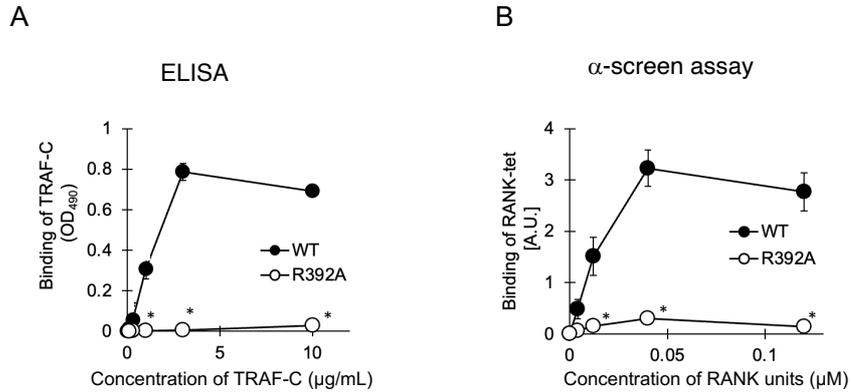


Fig. 8 RANK-tet は R392 特異的に TRAF-C に結合する

(A) ELISA plate に RANK-tet を 1 µg/mL の濃度で固相化し、各濃度の TRAF-C あるいは TRAF-C-R392A との結合活性を、マウス抗 6×His-tag IgG 抗体および HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗体を用いた ELISA で検出した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。* $p < 0.05$ (by Student's *t*-test). (B) 種々の濃度のビオチン化 RANK-tet と、his-TRAF-C-WT または his-TRAF-C-R392A (10 µg/mL) との結合を、ニッケルキレートアクセプタービーズ (20 µg/mL) およびストレプトアビジンドナービーズ (20 µg/mL) とを用いた AlphaScreen 法で検出した。データは、シグナル強度の任意単位 (AU) として得た。WT のグラフは独立した 5 回、R392A は独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。* $p < 0.05$ (by Student's *t*-test).

name	Z		
RANK-tet	MA-	RQMPTDEY	-A
NR2-RANK-tet	RR-MA-	RQMPTDEY	-A
NR3-RANK-tet	RRR-MA-	RQMPTDEY	-A
NR4-RANK-tet	RRRR-MA-	RQMPTDEY	-A
CR2-RANK-tet	MA-	RQMPTDEY	-A-RR
CR3-RANK-tet	MA-	RQMPTDEY	-A-RRR
CR4-RANK-tet	MA-	RQMPTDEY	-A-RRRR

Fig. 9 Arg による膜透過修飾を施した RANK-tet 誘導体

膜透過性の付与し、RANK-tet の破骨細胞分化能を増強することを目的として、RANK-tet の機能モチーフの N 末端側あるいは C 末端側に複数の Arg を導入した 4 価型ペプチドを作成した。

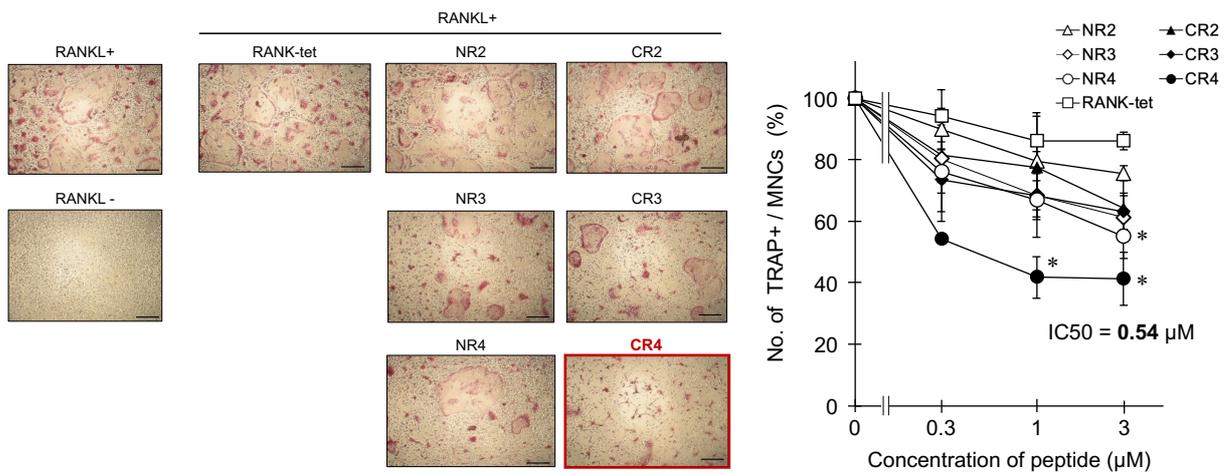


Fig. 10 各種膜透過型 RANK-tet が破骨細胞分化に与える影響

破骨細胞を種々の濃度の CR4-RANK-tet 存在下で培養した。ペプチドは RANKL と同時に 3 回添加し、RANKL 刺激開始から 3 日後、細胞を固定し、TRAP 染色陽性かつ核を 3 つ以上含む細胞を計量した。破骨細胞数はペプチド非存在下における破骨細胞数の数を 100% として表示した。グラフは独立した 3~4 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。(Scale bar = 250 μm) *p < 0.05 (by Dunnet's test, compared with RANK-tet)

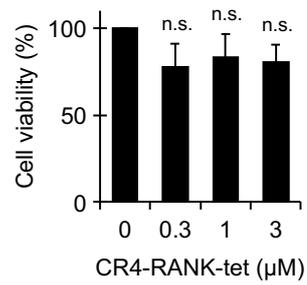


Fig. 11 CR4-RANK-tet がマウス骨髄細胞の生存に与える影響

マウス骨髄細胞を、種々の濃度の CR4-RANK-tet 存在下において培養した。培養開始から 4 日後、生細胞数測定キット SF を用いて、細胞生存数を計測した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。n.s = not significant (by Dunnet's test)

第3章 新規 TRAF6 高親和性ペプチド RRK-tet・WHD-tet の開発

3-1 本章の概要

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、優れた破骨細胞分化阻害効果を示した。しかしながら、その機能モチーフは、RANK の TRAF6 binding domain 由来の配列をそのまま用いており、必ずしも最適な高親和性結合モチーフであるとは限らない。そこで、我々はこれまでに、RANK-tet よりも阻害活性に優れた分子を開発することを目指し、多価型ペプチドライブラリー法^{38,39}を用い、TRAF-C に対して R392 依存的に高親和性結合活性を示す四価型ペプチドの取得を試み、11種の候補分子を取得している²⁹ (Fig. 13, Fig. 14)。これらの四価型ペプチドが有する破骨細胞分化阻害効果を、*in vitro*で検証することで、特に優れた破骨細胞分化抑制効果を発揮する2種の四価型ペプチド (CR4-WHD-tet, CR4-RRK-tet) を同定した。これらのペプチドは TRAF-C に対して、高い親和性を発揮し、前章で得た CR4-RANK-tet よりも有意に強い破骨細胞分化阻害効果を発揮した。

3-2 実験試薬

ペプチド

全て本研究室において合成した

- ・ RRH-tet : MA- RRDHTDF -A-U
- ・ RRR-tet : MA- RRDRTDF -A-U
- ・ RRQ-tet : MA- RRDQTFDF -A-U
- ・ RRP-tet : MA- RRDPTDF -A-U
- ・ RRK-tet : MA- RRDTTDF -A-U
- ・ RRT-tet : MA- RRDTTDF -A-U
- ・ WDE-tet : MA- WDDTDF -A-U
- ・ DFD-tet : MA- DFDDTDF -A-U
- ・ WHD-tet : MA- WHDDEEF -A-U
- ・ RHD-tet : MA- HRDDEEF -A-U
- ・ HRD-tet : MA- RHDDEEF -A-U

- ・ CR4-RRH-tet : MA- RRDHTDF -A-RRRR-U
- ・ CR4-RRR-tet : MA- RRDRTDF -A-RRRR-U

- CR4-RRQ-tet : MA- RRDQTDF -A-RRRR-U
- CR4-RRP-tet : MA- RRDPTDF -A-RRRR-U
- CR4-RRK-tet : MA- RRDTTDF -A-RRRR-U
- CR4-RRT-tet : MA- RRDTTDF -A-RRRR-U
- CR4-WDE-tet : MA- WDDDETDF -A-RRRR-U
- CR4-DFD-tet : MA- DFDDTDF -A-RRRR-U
- CR4-WHD-tet : MA- WHDDEEF -A-RRRR-U
- CR4-RHD-tet : MA- HRDDEEF -A-RRRR-U
- CR4-HRD-tet : MA- RHDDEEF -A-RRRR-U

下記ペプチドは外注によって大量合成を行った。

- CR4-WHD-tet : MA- WHDDEEF -A-RRRR-U (Synpeptide Co., Ltd)
- CR4-RRK-tet : MA- RRDTTDF -A-RRRR-U (Synpeptide Co., Ltd)

破骨細胞分化

- 実験用マウス：系統 C57BL/6 (♂, 6w) (清水実験材料)
- Minimum Essential Medium Alpha Medium [α -MEM] (GIBCO)
- Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized) (ナカライテスク)
- FETAL BOVINE SERUM (ニチレイ)
- 23G ニードル (TERUMO)
- 2.5mL シリンジ (TERUMO)
- 6cm dish (FALCON)
- Cell Strainer (FALCON)
- 24well plate (IWAKI)
- M-CSF (研究室にて調整)
- GST-RANKL (研究室にて調整)
- Paraformaldehyde (富士フィルム和光純薬)
- Acetone (ナカライテスク)
- Ethanol (富士フィルム和光純薬)
- Naphtol AS-MX phosphate disodium salt (Sigma Aldrich)
- N-N dimethyl form amide (富士フィルム和光純薬)
- Fast Red Violet LB salt (Sigma Aldrich)
- Sodium acetate (富士フィルム和光純薬)

- Sodium (+) - Tartrate Dihydrate (富士フィルム和光純薬)
- DAPI solution (同仁化学研究所)
- Dimethyl sulfoxide (Sigma Aldrich)

細胞生存評価

- Minimum Essential Medium Alpha Medium [α -MEM] (GIBCO)
- Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized) (ナカライテスク)
- HBSS (ナカライテスク)
- FETAL BOVINE SERUM (ニチレイ)
- 生細胞数測定試薬 SF (ナカライテスク)

TRAF-C と RANK-tet の結合評価 (ELISA 法)

- ウシ血清アルブミン (フラクシオン V) (富士フィルム和光純薬)
- マウス抗 6×His-tag IgG 抗体 (クローン: 9C11) (富士フィルム和光純薬)
- HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology)
- o-Phenyldiamine (富士フィルム和光純薬)
- Potassium dihydrogenphosphate (富士フィルム和光純薬)
- dipotassium hydrogenphosphate (富士フィルム和光純薬)
- sodium hydrogen phosphate (富士フィルム和光純薬)
- Citric acid monohydrate (富士フィルム和光純薬)
- 30% hydrogen peroxide (富士フィルム和光純薬)

3-3 実験方法

3-3-1 新規骨細胞分化制御ペプチドがマウス骨髄細胞の生存に与える影響の検討

スクリーニングによって得られた機能モチーフの C 末端側に 4 つの Arg を導入して膜透過性を付加した 11 種の 4 価型ペプチド (CR4-X-tet) をペプチド合成機によって合成した (Fig. 14)。6 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨から調製した骨髄細胞を、10 %ウシ胎児血清、100 units/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin、および M-CSF を添加した α -MEM を用いて、96 well plate で 24 時間培養し、単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞を得た。前駆細胞を M-CSF (1/50 希釈) を含む培地において、膜透過処理 (C 末に 4 個の Arg を付加) を施した種々の濃度 (0.1~3 μ M) のペプチドまたは DMSO (コントロール、final 0.2%) の存在下で培養した。培養液は、M-CSF およびペプチドを含む同じ培地で 24 時間

ごとに交換した。3日後、培地を生細胞数計測キット（ナカライテスク）を添加した α MEM と入れ替え、4時間の培養を行った。4時間後、450 nm の吸光度を測定し、コントロールに対する生細胞数の比を算出した。

3-3-2 新規骨細胞分化制御ペプチドが破骨細胞分化に与える影響の検討

スクリーニングによって得られた機能モチーフの C 末端側に 4 つの Arg を導入して膜透過性を確保した 11 種の 4 価型ペプチド（CR4-X-tet）をペプチド合成機によって合成した（Fig. 14）。6 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨から調製した骨髄細胞を、10 % ウシ胎児血清、100 units/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin、および M-CSF を添加した α -MEM を用いて、24 well plate で 24 時間培養し、単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞を得た。前駆細胞を、M-CSF（1/50 希釈）および 66 ng/mL GST-RANKL を含む培地において、0.3 μ M および 3 μ M のペプチドまたは DMSO（コントロール、final 0.2 %）の存在下で培養した。培養液は、M-CSF、GST-RANKL、およびペプチドを含む同じ培地で 24 時間ごとに交換した。3日後、細胞を固定し、TRAP 染色および DAPI 染色を施した。3個以上の核を含む TRAP 陽性細胞の数を評価した。

同様に破骨細胞を培養し、得た前駆細胞を、M-CSF（1/50 希釈）および 66 ng/mL GST-RANKL を含む培地において、種々の濃度の CR4-WHD-tet、CR4-RRK-tet、CR4-RANK-tet または DMSO（コントロール、final 0.2 %）の存在下で培養した。培養液は、M-CSF、GST-RANKL、およびペプチドを含む同じ培地で 24 時間ごとに交換した。3日後、細胞を固定し、TRAP 染色および DAPI 染色を施した。3個以上の核を含む TRAP 陽性細胞の数を評価した。

3-3-3 新規ペプチドの性状解析

TRAF6 高親和性モチーフを有する各種ペプチド（X-tet）（1 μ g/mL）を 96 ウェル ELISA プレートの各ウェルに塗布し、一晩インキュベートした。ブロッキング後、プレートに種々の濃度の his-TRAF-C-WT または his-TRAF-C-R392A を加えて、室温で一晩インキュベートした。結合した his-TRAF-C-WT または his-TRAF-C-R392A は、マウスモノクローナルマウス抗 6 \times His-tag IgG 抗体および HRP コンジュゲートウマ抗マウス IgG 抗体を用いて検出した。

3-4 結果

3-4-1 新規骨細胞分化制御ペプチドがマウス骨髄細胞の生存に与える影響の検討

スクリーニングによって得られたペプチドは、親水性残基を多く持ち、膜透過性に乏しいことが懸念されたため、全ての4価型ペプチドの機能モチーフのC末端側に4つのArgを導入したペプチドを合成し (Fig. 14)、それらに対して、評価を行った。評価に際しては、ペプチド非存在下での生細胞数を100%として、各種ペプチド存在下での細胞の生存率を算出した。結果、0.1 μM から 0.3 μM の濃度範囲で、全てのペプチドはマウス骨髄細胞の生存に影響を与えなかった。一方で、3 μM ではCR4-RRH-tet、CR4-RRR-tet、CR4-RRQ-tet、CR4-RRK-tet、CR4-RRT-tetが、1 μM ではCR4-RRR-tetが、細胞の生存を阻害した (Fig. 15)。

3-4-2 新規骨細胞分化制御ペプチドが破骨細胞分化に与える影響の検討

各種ペプチドが、RANKLによる破骨細胞分化に与える影響を検討した。まず、全てのペプチドがマウス骨髄細胞の生存に影響を与えない、最も高い濃度である0.3 μM において検討した。すると、全てのペプチドが破骨細胞分化を顕著に阻害した。特に、I系統に属するCR4-RRK-tetは特に強い破骨細胞分化抑制効果を発揮した (Fig. 16)。次に、ペプチドがマウス骨髄細胞の生存に与える影響を確認した最大濃度である3 μM において、細胞生存に影響を与えない6つのペプチドを対象に、同様の検討を行った。すると、II系統に属するCR4-WHD-tetが特に強い破骨細胞分化抑制効果を発揮した (Fig. 17)。以上の結果より、スクリーニングの方法が異なる2系統から、それぞれ強力な破骨細胞分化抑制能を有する1つずつのペプチドを選定することができた。

続いて、CR4-RRK-tetおよびCR4-WHD-tetが破骨細胞分化に与える影響の、0.1~0.3 μM の範囲における量依存性を、CR4-RANK-tetと比較した。結果、0.3 μM 、1 μM 、3 μM において、CR4-RRK-tetおよびCR4-WHD-tetは、CR4-RANK-tetに対して、有意に高い破骨細胞分化抑制効果を発揮した。それぞれのIC₅₀値は、CR4-RRK-tetでは0.20 μM 、CR4-WHD-tetでは0.23 μM であり、いずれもCR4-RANK-tetの0.54 μM よりも優れていた (Fig. 18)。

3-4-3 新規ペプチドの性状解析

スクリーニングで得られた機能モチーフを多価型構造に組み込んだペプチドを固相化し、ELISA法を用いてTRAF-Cとの結合を量依存的に検討した。その結果、ペプチドとTRAF-Cとの結合力には、ペプチド間で大きく異なることが明らかになり、中でも、RRR-tet、RRK-tet、WHD-tetはTRAF-Cに対して高い親和性を示すことが明らかになった。Argを

付加することで高い破骨細胞分化抑制効果を示す RRK-tet および WHD-tet の見かけの Kd 値は、それぞれ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、この値は RANK-tet の 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と同等であった (Fig. 19)。一方で、RRQ-tet、RRP-tet、RRT-tet は TRAF-C に対する親和性をほとんど示さなかった。続けて、CR4-WHD-tet、CR4-RRK-tet、CR4-RANK-tet に対して、同様の検討を行った。その結果、WHD-tet、RRK-tet は共に、C 末端側 Arg 付加の有無に関わらず、RANK-tet と同様の強い結合活性を示すことが明らかとなった。(Fig. 20)。

3-5 考察

多価型ペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって、複数の TRAF-C ドメイン高親和性ペプチドを得ることができ、これらに Arg 付加によって膜透過性を付加したペプチドは強力に破骨細胞分化を阻害することを見出した。中でも、CR4-RRK-tet と CR4-WHD-tet は、特に優れた量依存的な破骨細胞分化抑制能を有しており、その IC50 値はいずれも CR4-RANK-tet よりも優れていた。このことから、多価型結合を発揮することで機能する分子を得ることができるという多価型ペプチドライブラリー法の長所は十分に発揮され、TRAF-C への高親和性結合に最適化された多価型ペプチドを得ることができたと考えられる。以上のことから、CR4-RRK-tet および CR4-WHD-tet を、新規 TRAF6 高親和性破骨細胞分化抑制分子の有力な候補として位置づけた。これらのペプチドは、C 末端側 4 つの Arg 付加の有無にかかわらず、RANK-tet と同等レベルの親和性を発揮できることが、ELISA 法を用いた解析によって明らかになった。さらに、RRK-tet および WHD-tet において同定された機能モチーフ (RRK ; RRDTTDF、WHD ; WHDDEEF) を、RANK-tet の機能モチーフ (RQMPTEDEY) と比較すると、C 末側に、酸性アミノ酸に続く、芳香族アミノ酸、が共通して存在していた。これらは、RANK にみられるモチーフのうち、TRAF-C の R392 と相互作用すると知られている部位である¹⁹ (Fig. 4) ことから、R392 に特異的な結合を発揮する分子が得られていることが確認できる。その一方で、TRAF6 結合分子が有するコンセンサスモチーフ (Pro-X-Glu-X- (芳香族/酸性) モチーフ) は既に見られなくなっている。すなわち、これらの新たな機能モチーフは、天然の RANK 配列からは予想できない配列であること、分化阻害能力に優れ、かつより短いモチーフであることから、より優位性の高いモチーフであるということが理解される。

以上から、多価型ペプチドライブラリースクリーニング法を用いて、TRAF6 高親和性モチーフをゼロベースから同定し、破骨細胞分化を阻害する全くの新規分子を得ることに成功したと言える。

3-6 図表

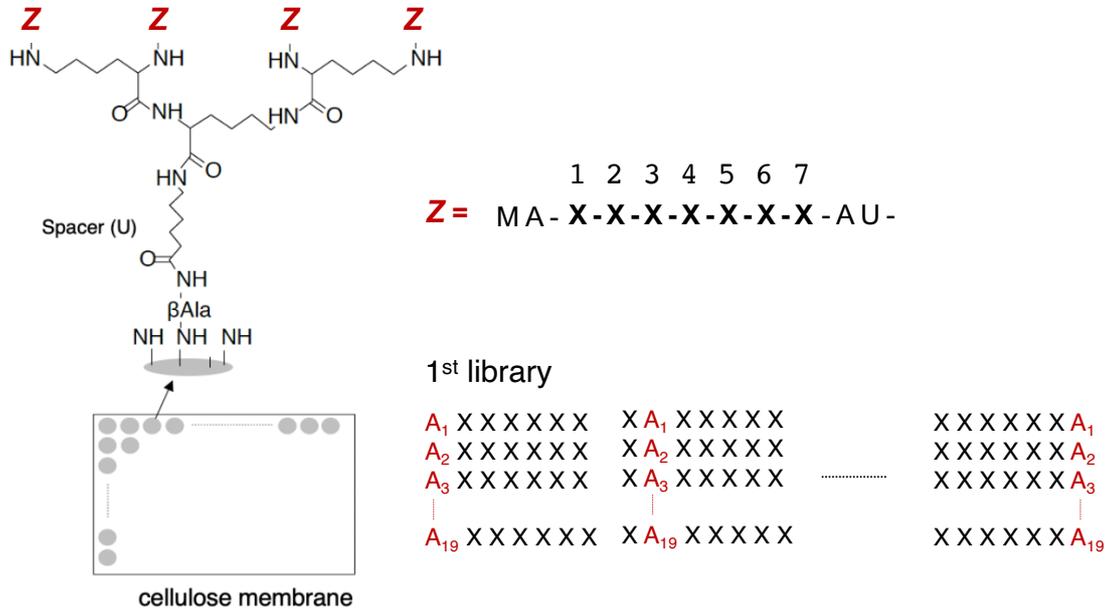
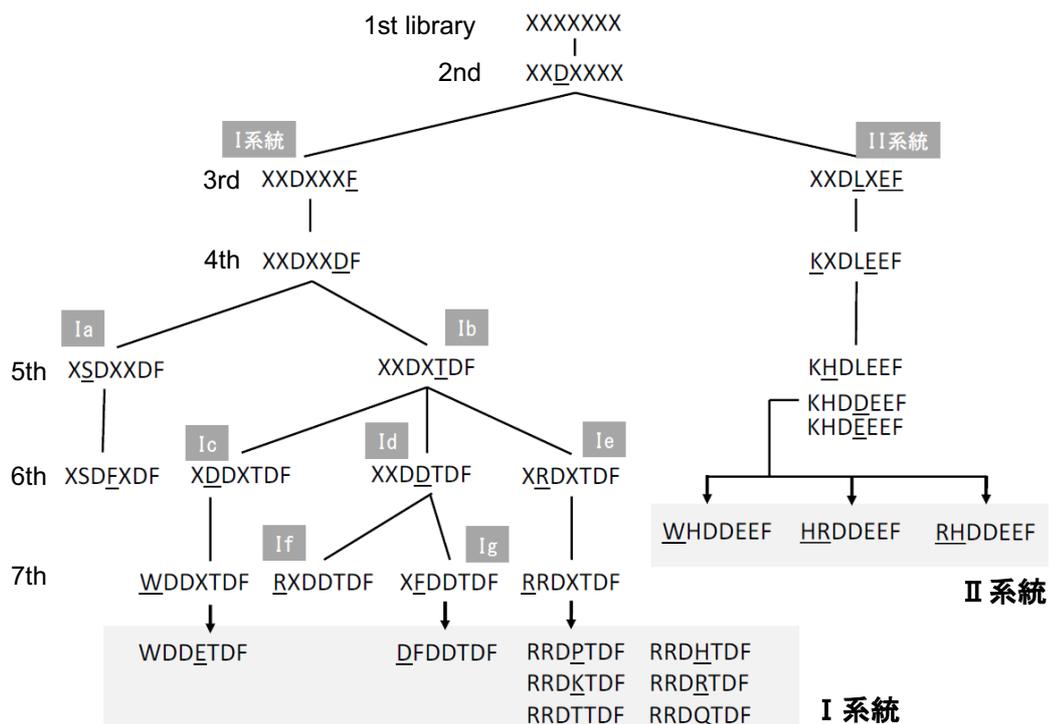


Fig. 12 多価型ペプチドライブラリーシートスクリーニング法の概要

多価型ペプチドシートスクリーニングの概略図を示す。3つの Lys から構成される核構造に、6アミノヘキサン酸 (U) をスペーサーとしてランダムペプチドライブラリーが等価に4本結合した構造をとる。XはCysを除く19種類のアミノ酸のミクスチャーであることを示している。本ライブラリーをスポット合成したセルロースシートを his-TRAF-C-WT (WT) および his-TRAF-C-R392A (R392A) でプロットした。WT への結合力と、R392A への結合特異性の両方を担保するために、WT で検出したシグナルとシグナル比 WT/R392A の積を算出し、各ペプチドの結合力の指標とした。



(修士論文, 安西, 同志社大, 2018)

Fig. 13 多価型ペプチドライブラリーのスクリーニングの様子

7つのXから構成される一次ライブラリーに対して、先に示した結合力の指標を用いて、1アミノ酸ずつ、最適な種類とポジションを決定し、その情報を次のライブラリーに組み込んだ。複数の候補の結合指標が近く、選択が困難な場合、その両方を別系統として採用した。7回のスクリーニングを経て、8種類のモチーフを同定した（I系統）。また、指標の高い複数のアミノ酸とポジションを、次のライブラリーに一度に組み込んだ系統も用意し、同様にして3種類のモチーフを決定した（II系統）。

	name	Z
I 系統	CR4-RRH-tet	MA- RRDHTDF - A - RRRR - Ahx
	CR4-RRR-tet	MA- RRDRTDF - A - RRRR - Ahx
	CR4-RRQ-tet	MA- RRDQTDF - A - RRRR - Ahx
	CR4-RRP-tet	MA- RRDPTDF - A - RRRR - Ahx
	CR4-RRK-tet	MA- RRDKTDF - A - RRRR - Ahx
	CR4-RRT-tet	MA- RRDRTDF - A - RRRR - Ahx
	CR4-WDE-tet	MA- WDDTDF - A - RRRR - Ahx
	CR4-DFD-tet	MA- DFDDTDF - A - RRRR - Ahx
II 系統	CR4-WHD-tet	MA- WHDDEEF - A - RRRR - Ahx
	CR4-HRD-tet	MA- HRDDEEF - A - RRRR - Ahx
	CR4-RHD-tet	MA- RHDDEEF - A - RRRR - Ahx

Fig. 14 スクリーニングによって得られた新規 4 価型ペプチド

2 系統のスクリーニングで得られたモチーフを 4 価の核構造に入れ込み、その C 末端側に 4×Arg を導入することで膜透過性を付与し、薬剤候補分子群とした。

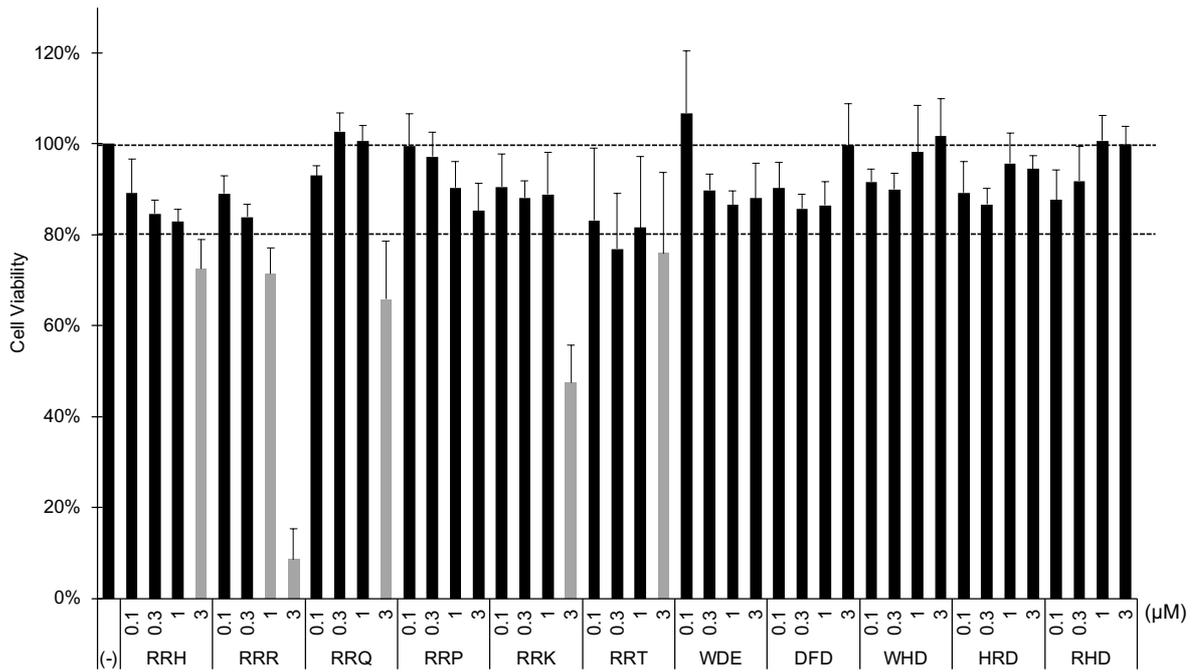


Fig. 15 新規ペプチドがマウス骨髄細胞の生存に与える影響

マウス骨髄細胞を各濃度の膜透過型ペプチド存在下において 3 日間培養し、細胞生存率の測定を行った。グラフは独立した 3~4 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。

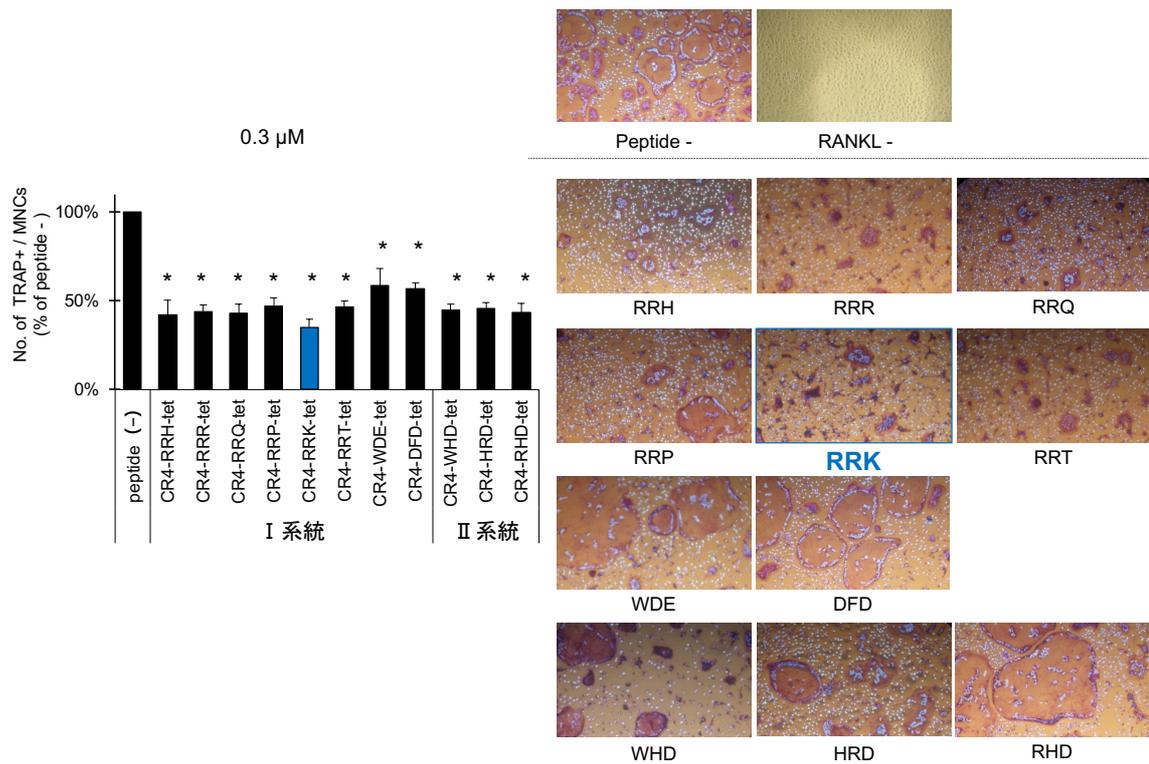


Fig. 16 新規ペプチド (0.3 μM) が破骨細胞分化に与える影響

破骨細胞を 0.3 μM のペプチド存在下で培養した。ペプチドは RANKL と同時に 3 回添加し、RANKL 刺激開始から 3 日後、細胞を固定し、TRAP 染色陽性かつ核を 3 つ以上含む細胞を計量した。破骨細胞数はペプチド非存在下における破骨細胞数の数を 100%として表示した。グラフは独立した 3~6 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。画像は代表的データである。* $p < 0.05$ (by Dunnet's test, compared with peptide (-))

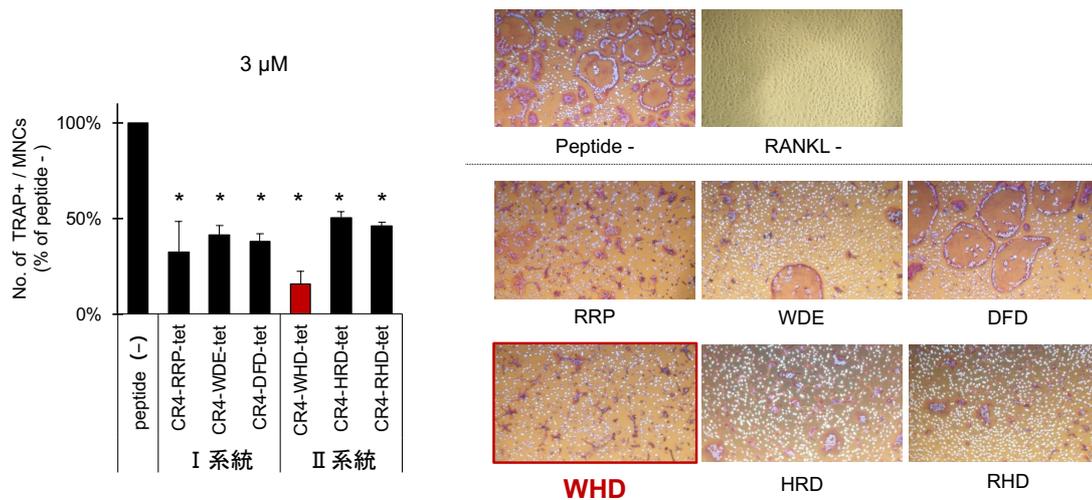


Fig. 17 新規ペプチド (3 μM) が破骨細胞分化に与える影響

破骨細胞を 3 μM のペプチド存在下で培養した。ペプチドは RANKL と同時に 3 回添加し、RANKL 刺激開始から 3 日後、細胞を固定し、TRAP 染色陽性かつ核を 3 つ以上含む細胞を計量した。破骨細胞数はペプチド非存在下における破骨細胞数の数を 100% として表示した。グラフは独立した 3~6 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。画像は代表的データである。* $p < 0.05$ (by Dunnet's test, compared with peptide (-))

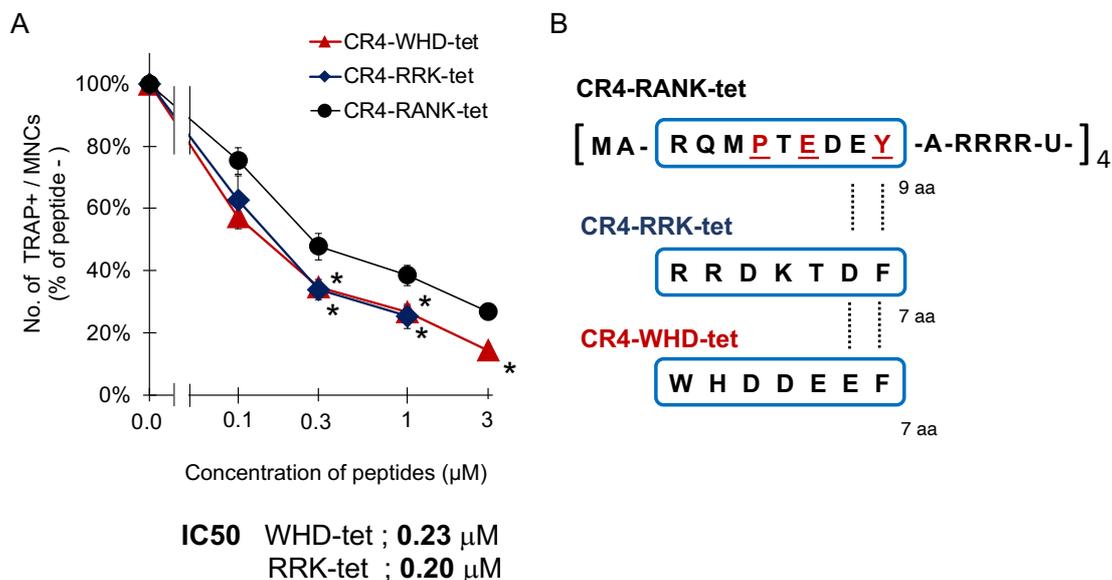


Fig. 18 CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet は、CR4-RANK-tet と比較して有意に強く破骨細胞分化を阻害する

(A) 破骨細胞を種々の濃度のペプチド存在下で培養した。ペプチドは RANKL と同時に 3 回添加し、RANKL 刺激開始から 3 日後に細胞を固定し、TRAP 染色陽性かつ核を 3 つ以上含む細胞を計量した。破骨細胞数はペプチド非存在下における破骨細胞数の数を 100% として表示した。グラフは独立した 4~7 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。* $p < 0.05$ (0.1~1μM ; by Dunnet's test, compared with peptide(-), 3μM ; by Student's t-test) (B) RRK-tet および WHD-tet において同定された機能モチーフ (RRK ; RRDTTDF, WHD ; WHDDEEF) を、RANK-tet の機能モチーフ (RQMPTED EY) と比較すると、C 末側に、酸性アミノ酸に続く、芳香族アミノ酸、が共通して存在している。その一方で、RANK に含まれる TRAF6 結合コンセンサスモチーフ (図中に枠内において下線を付した配列) は見られなくなっている。

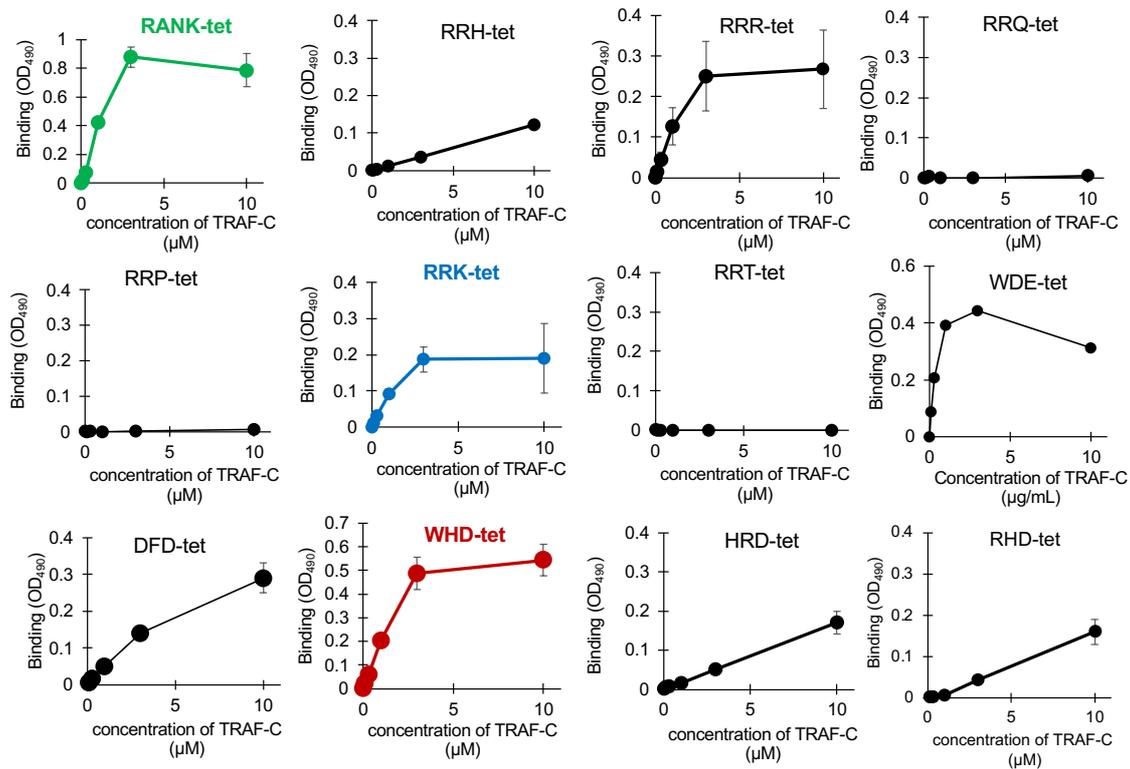


Fig. 19 新規ペプチドの TRAF-C への結合親和性

ELISA plate にペプチドを 1 μg/mL の濃度で固相化し、各濃度の TRAF-C-WT あるいは TRAF-C-R392A との結合活性を、マウス抗 6×His-tag IgG 抗体および HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗体を用いて検出した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。WDE-tet については 1 回の実験値を表している。

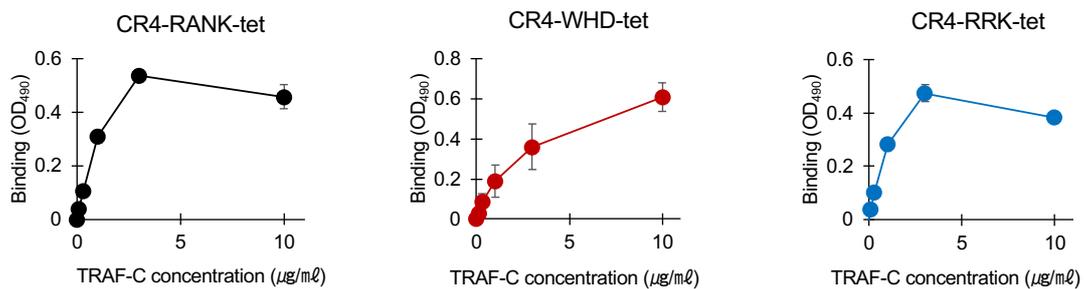


Fig. 20 膜透過型ペプチドの TRAF-C への結合親和性

ELISA plate にペプチドを 1 μg/mL の濃度で固相化し、各濃度の TRAF-C-WT あるいは TRAF-C-R392A との結合活性を、マウス抗 6×His-tag IgG 抗体および HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗体を用いて検出した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。

第4章 CR4-WHD-tet のマウス骨破壊モデルでの効果

4-1 本章の概要

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 の治療効果を検討した。その結果、CR4-WHD-tet は有効な治療効果を示す一方で、CR4-RRK-tet は効果を示さないことを見出した。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、マウス体内での排出速度の相違、骨送達能の相違、について検討を行った。まず、両者の ^{125}I 標識体を作成するため、各々の機能モチーフの N 末端に Tyr を導入し、Iodogen 法により ^{125}I 標識を行った。取得した ^{125}I 標識体を用い、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。

4-2 実験試薬

ペプチド

- ・ Y-CR4-WHD-tet : Y-MA- WHDDEEF -A-RRRR-U (本研究室にて合成)
- ・ Y-CR4-RRK-tet : Y-MA- RRDTTDF -A-RRRR-U (本研究室にて合成)
- ・ CR4-WHD-tet : MA- WHDDEEF -A-RRRR-U (Synpeptide Co., Ltd)
- ・ CR4-WDE-tet : MA- WDDDETDF -A-RRRR-U (Synpeptide Co., Ltd)

CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の骨破壊モデルに対する治療効果

- ・ C57BL/6 (♀, 7w) (清水実験材料)
- ・ GST-RANKL (研究室にて調整)
- ・ D-PBS (ナカライテスク)
- ・ 1 mL シリンジ (TERUMO)
- ・ 27G 注射針 (TERUMO)

CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の体内分布

- ・ C57BL/6 (♀, 7w) (清水実験材料)
- ・ GST-RANKL (研究室にて調整)
- ・ D-PBS (ナカライテスク)

・ 1mL シリンジ	(TERUMO)
・ 27G 注射針	(TERUMO)
・ Iodin-125	(PerkinElmer)
・ Iodogen	(Thermo Fisher Scientific)
・ NAP5 カラム	(GE ヘルスケア)
・ Isoflurane	(富士フイルム和光純薬)

4-3 実験方法

4-3-1 CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の骨破壊モデルに対する治療効果

マウスの体重を測定し、マウスの体重に対して GST-RANKL 3 mg/kg とペプチドを混合し、C57BL/6 (♀, 7w) に対して腹腔投与した。マウスの体重に対して、CR4-RRK-tet では 120 mg/kg、CR4-WHD-tet では 150 mg/kg のペプチドを投与した。投与後のマウスを 50 時間飼育したあと、体重を測定してから安楽死させ、両脚の大腿骨を採取した。骨量計測にはマイクロフォーカス X 線 CT を用いた。両脚大腿骨に対して撮像を行い、RATOC 社の骨立体解析用ソフト ConeCT および TRI Bone を用いて、立体解析および骨塩量測定を行った。解析はマウス大腿骨近位端の二次海綿骨領域に対して行い、二次海綿骨領域は成長板より 0.1 mm 遠位側から起算して遠位方向に厚さ 1mm の領域と定義した。海綿骨閾値には L=300 を指定し、骨密度や骨質を評価する各種指標を算出した。撮像および各種指標の算出は両側の大腿骨に対して行い、その平均値を用いた。

4-3-2 CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の体内分布

¹²⁵I 標識ペプチドの調整

100 µg の CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet を、500 mL の PBS に溶解した。これらの溶液を 2 µL の NaI 溶液 (¹²⁵I) と混合し、Iodogen を乾固させたガラスチューブに添加し、室温で静置した。15 分後溶液を回収し、NAP5 カラムを用いてゲル濾過カラムクロマトグラフィを行い、遊離の NaI と標識ペプチドを分離した。溶出には 1400 µL の PBS を用いて、溶出液は 25 µL ずつの画分にわけた。得られた画分の線量を全て計測し、2 回現れる線量ピークのうち、先に現れた画分をペプチド画分を放射標識ペプチドを含む画分として回収した。回収した画分は BCA assay によって濃度を決定した。

CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の体内分布

マウスの体重を測定し、マウスの体重に対して 70 mg/kg の CR4-RRK-tet あるいは CR4-

WHD-tet を PBS に溶解し、C57BL/6 (♀, 7w) に対して腹腔投与した。この際、¹²⁵I で標識した Y-CR4-RRK-tet および Y-CR4-WHD-tet が 1,000,000 cpm 程度含まれるようにペプチドを調整した。腹腔投与後、マウスを絶飲水条件下でメタボリックケージを用いて飼育した。腹腔投与から 3 時間あるいは 6 時間経過時点で、マウスを麻酔、開腹し、大動脈より全血を採取した。採血後、全臓器を摘出し、各々の臓器および血中・尿中の放射線量をガンマカウンターによって定量した。各々の臓器および血中・尿中から検出された線量を、投与ペプチドの線量で除することで、各所でのペプチドの存在量を概算した。さらに、各々の臓器から検出された線量を、各臓器で検出された線量の合計（各臓器への分布前と見なせる血液、および分布を終えて排出中と見なせる腎臓での検出線量を除いた）で除することにより、体内に残存したペプチドの分布を概算した。

4-4 結果

4-4-1 CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の骨破壊モデルに対する治療効果

RANKL 腹腔投与による骨破壊モデルマウスを用いて、*In vitro* で高い破骨細胞抑制効果を示した CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の骨破壊治療効果を検討した。CR4-WHD-tet を RANKL と共投与した群では、RANKL 単独投与群と比較して、骨密度 BV/TV に有意な回復が見られた (Fig. 21)。一方で、CR4-RRK-tet には骨破壊治療効果が全く見られなかった。

そこで、CR4-WHD-tet 群およびコントロール群のサンプルに対して、海綿骨の立体構造を詳細に解析したところ、Tb.N (骨梁数)、Tb.Sp (骨梁間距離)、Tb.Spac (骨梁中心間距離) にも有意な回復が見られた。また、標準品の X 線吸収量をもとに、骨管腔に含まれる骨塩量を推定し単位骨管腔体積に対する骨塩量 BMC/TV を算出したところ、この指標でも CR4-WHD-tet は有意な治療効果を発揮した (Fig. 22)。

なお、実験前後においてマウスの体重には有意な差はみられず、両ペプチドは個体に対する急性毒性を有さないと考えられた (Fig. 23)。

4-4-2 CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の体内分布

CR4-WHD-tet と CR4-RRK-tet の N 末端にチロシン残基を導入したペプチド (Y-CR4-WHD-tet、Y-CR4-RRK-tet) を合成した。これら 2 種のペプチドについて、ELISA 法を用いて TRAF-C との結合親和性を確認した (3-3-3 新規ペプチドの性状解析 参照) と、Y を導入しないペプチドと同様の結合活性が見られたため、これらに対してヨウ素標識を施し、続く実験を行った (Fig. 24)。

CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet は、いずれもマウス体内から速やかに消失し、その速度は CR4-WHD-tet の方が速いこと、その分尿中に多く排泄されていること、が明らかになった(Fig. 25)。そこで、投与3時間後の各臓器への分布を比較したところ、両者の組織分布は異なっており、特に脛骨では、CR4-WHD-tet が CR4-RRK-tet と比較して有意に集積していることが明らかになった (Fig. 26)。この傾向は、6時間後でも同様に観察された (Fig. 27)。

また、CR4-RRK-tet、CR4-WHD-tet 共に、6時間後でも体内残存量の 1/5 以上が骨組織に存在していること、CR4-WHD-tet ではその傾向がより強いことが示された(Fig. 28)。

4-5 考察

哺乳類の骨管腔内に存在する豊富な二次海綿骨（骨幹端部の軟骨内骨化部）は、体内の環境によって比較的柔軟に吸収・形成され、卵巣摘出ラットではこの領域が急速に吸収されることから、骨粗鬆症の標的構造であると言える。マウスに可溶性 RANKL を腹腔投与すると、破骨細胞分化が過剰に誘導され、50 時間以内に海綿骨密度の著しい減少が観察される⁴⁰。 *In vitro*において優れた破骨細胞分化抑制効果を示した CR4-WHD-tet は、RANKL と同時に投与することによって、RANKL 誘導性の骨密度 BV/TV の減少を有意に治療した。このことは、CR4-WHD-tet が個体内環境においても *in vitro* で観察されたのと同様に破骨細胞分化阻害効果を発揮したことを示している。海綿骨の立体構造を表す複数の指標（Tb.N、Tb.Sp、Tb.Spac）にも有意な回復が見られたことから、RANKL によって誘導される骨組織のマクロな再編成を CR4-WHD-tet が有効に阻害したことがわかる。特に、RANKL 誘導性の BMC/TV の減少は、破骨細胞の活性による骨組織からのカルシウム流出を直接的に反映している。CR4-WHD-tet はこの減少を軽減しており、このことから CR4-WHD-tet により骨組織が保護されたことがわかる。

その一方で、*In vitro*において CR4-WHD-tet 同様の破骨細胞分化抑制効果を発揮した CR4-RRK-tet は、個体においては全く効果を示さなかった。この違いは、ペプチド分子の体内動態の違いに由来すると考えられた。そのため、ペプチドの放射標識を行い、両ペプチドの分布と排出を検討した。一般に、分子量の小さいペプチドは腎臓において原尿中に流出し、尿中排泄されることが知られており、これはペプチド性医薬品の体内安定性に対する障壁の1つである⁴¹。CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet はいずれも尿を介して素早く体外に排出されたことから、ペプチド性化合物の一般的な挙動を示したといえ、評価系は機能していると判断できた。両ペプチドの体内分布をグラフ化すると、各々の特徴は異なっていたが、共に骨組織に高い親和性を示し、一部の骨組織においては、CR4-WHD-

tet は RRK-tet と比較して有意に高い親和性を示した。即ち、CR4-WHD-tet は、体内に残存したごく僅かな分子が骨組織に効率よく集積したといえ、このことにより破骨細胞に効果的に作用することができたと考えられる。これまでに、骨組織の主要な有機成分である、骨シアロプロテインや、オステオポンチンには、酸性アミノ酸クラスターに非常に富んだ配列が含まれること、そのため骨の主成分であるヒドロキシアパタイトに親和性を示し、骨組織に留まりやすいことが示されており、その性質は低分子化合物等を骨組織に送達するための手段としても用いられている^{42,43}。RRK-tet と WHD-tet のモチーフ中の配列には、共に複数の酸性アミノ酸が含まれているが、WHD-tet は機能モチーフの7アミノ酸のうち、4個が酸性アミノ酸で占められており、4価構造では16個の酸性アミノ酸を含んでいる。この酸性アミノ酸の高度な集積が CR4-WHD-tet の骨への集積度を上げることに貢献し、その結果、高い骨破壊抑制作用が見られるようになったと考えられる。

以上のことから、CR4-WHD-tet は、投与後短時間で効果を発揮し、体内から素早く排出され、骨組織のみに集積し機能を発揮するという、薬剤として極めて優れた複数の性質を併せて有すると考えられた。

4-6 図表

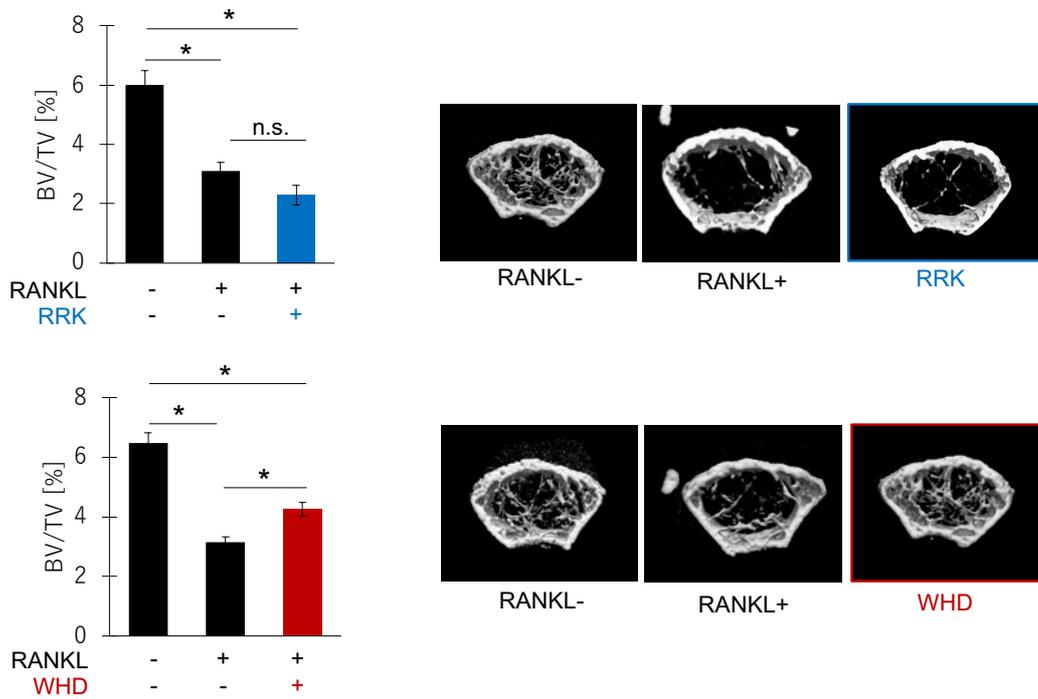


Fig. 21 CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の骨破壊モデルマウスに対する治療効果

C57BL/6 マウスに対して、RANKL 腹腔投与によって骨破壊を誘導したモデルマウスに対する各ペプチドの効果を示す。大腿骨頭部位をマイクロフォーカス X 線 CT によって撮像し、大腿骨近位端の成長板より 0.1 mm 遠位側から起算して遠位方向に厚さ 1mm の領域に含まれる海綿骨に対して立体解析を行った。海綿骨閾値には L=300 を指定した。グラフは 6~7 匹のマウスから得られた実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。画像は代表的データである。* $p < 0.05$ (by Tukey's test).

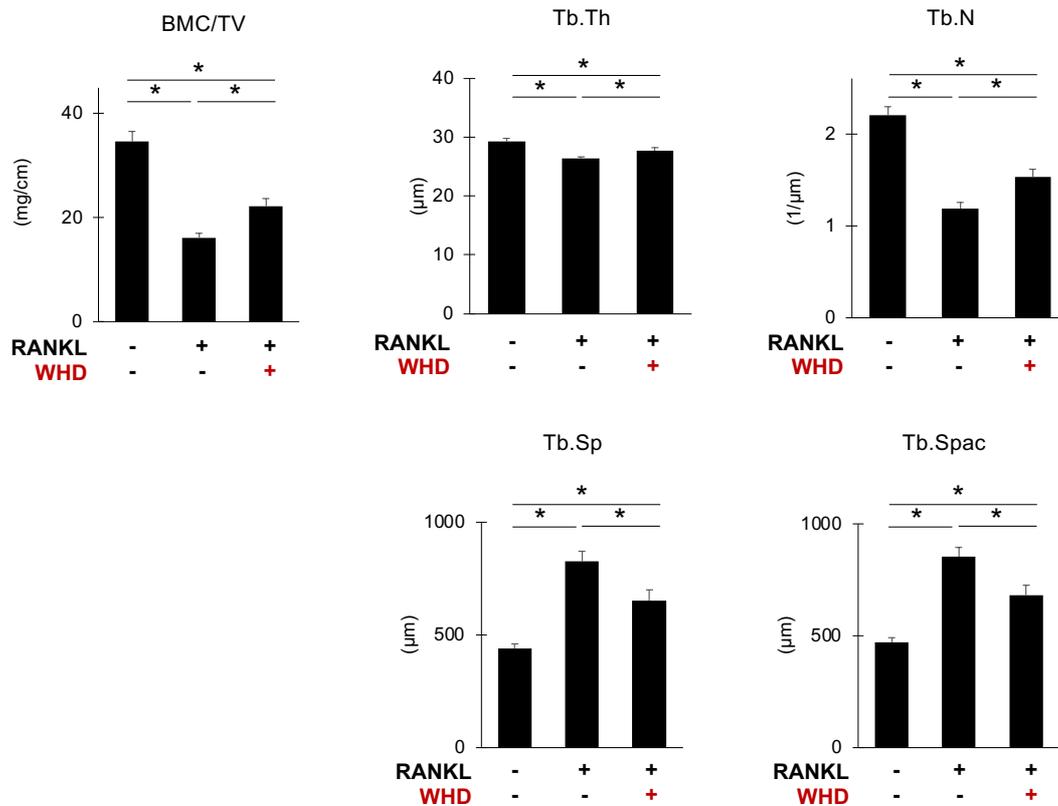


Fig. 22 骨破壊モデルマウスの海綿骨立体構造指標に CR4-WHD-tet が与える影響

C57BL/6 マウスに対して、RANKL 腹腔投与によって骨破壊を誘導したモデルマウスに対する各ペプチドの効果を示す。大腿骨頭部位をマイクロフォーカス X 線 CT によって撮像し、大腿骨近位端の成長板より 0.1 mm 遠位側から起算して遠位方向に厚さ 1mm の領域に含まれる海綿骨に対して立体解析および含有塩量の定量を行った。海綿骨閾値には L=300 を指定した。グラフは 6~7 匹のマウスから得られた実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。* $p < 0.05$ (by Tukey's test).

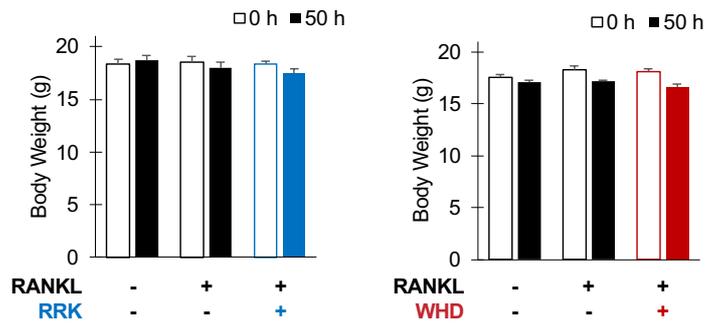


Fig. 23 CR4-RRK-tet および CR4-WHD-tet を投与されたマウスの体重変化

C57BL/6 マウスに対して、RANKL および各ペプチドを腹腔投与した際の体重変動を示す。腹腔投与実施前(0h)および安楽死直前(50h)において体重を測定した。グラフは 6~7 匹のマウスから得られた実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。

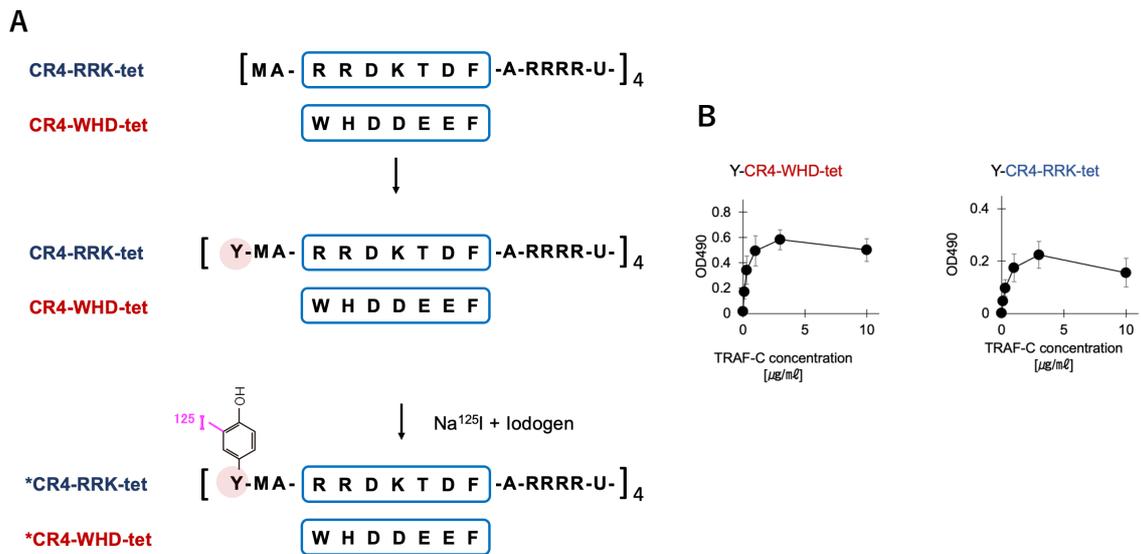


Fig. 24 CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の ¹²⁵I 標識

(A) CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet に Tyr を導入して、Iodogen 法を用いて ¹²⁵I 標識した。(B) Y-CR4-WHD-tet および Y-CR4-RRK-tet は ELISA 法を用いて、TRAF-C 親和性を確認された。ELISA plate にペプチドを 1 μg/mL の濃度で固相化し、各濃度の TRAF-C-WT あるいは TRAF-C-R392A との結合活性を、マウス抗 6×His-tag IgG 抗体および HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗体を用いて検出した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。

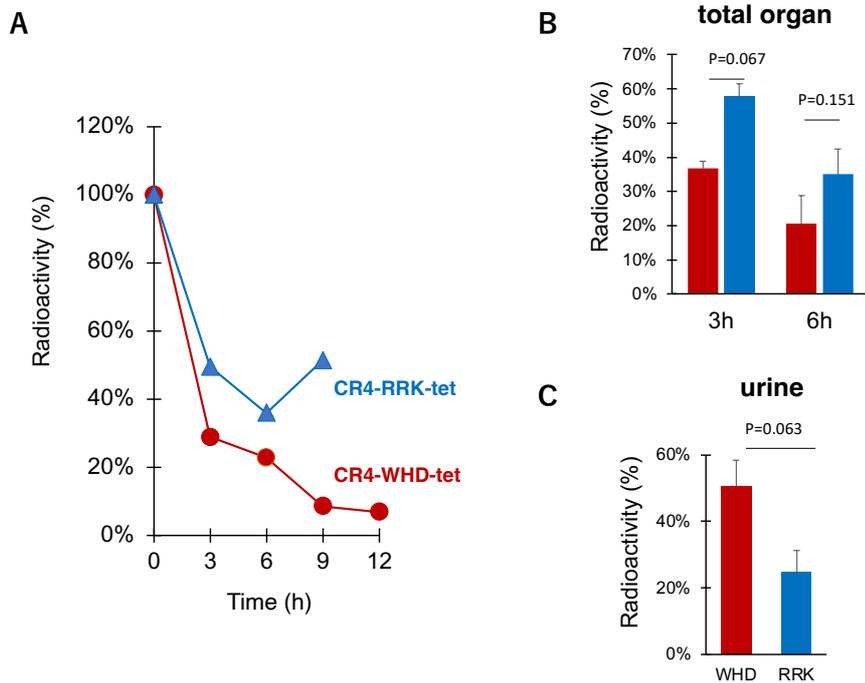


Fig. 25 CR4-RRK-tet および CR4-WHD-tet の排出と体内残存量

(A) ^{125}I で標識された Y-CR4-RRK-tet および Y-CR4-WHD-tet をマウスに腹腔投与し、メタボリックケージで尿を回収しながら、様々な時間飼育してから安楽死した。続けてマウスを解剖し、各臓器の線量合計を投与線量で除することで、投与ペプチドに対する体内残存量の比を算出した。(B) 特に腹腔投与から3時間あるいは6時間経過時点での投与量に対する体内残存量の比を表示した。グラフは3匹のマウスから得られた実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。(C) 腹腔投与から3時間あるいは6時間経過時点での、尿中に排出されたペプチドの投与量に対する比を表示した。グラフは3匹のマウスから得られた実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。(by Student's t-test)

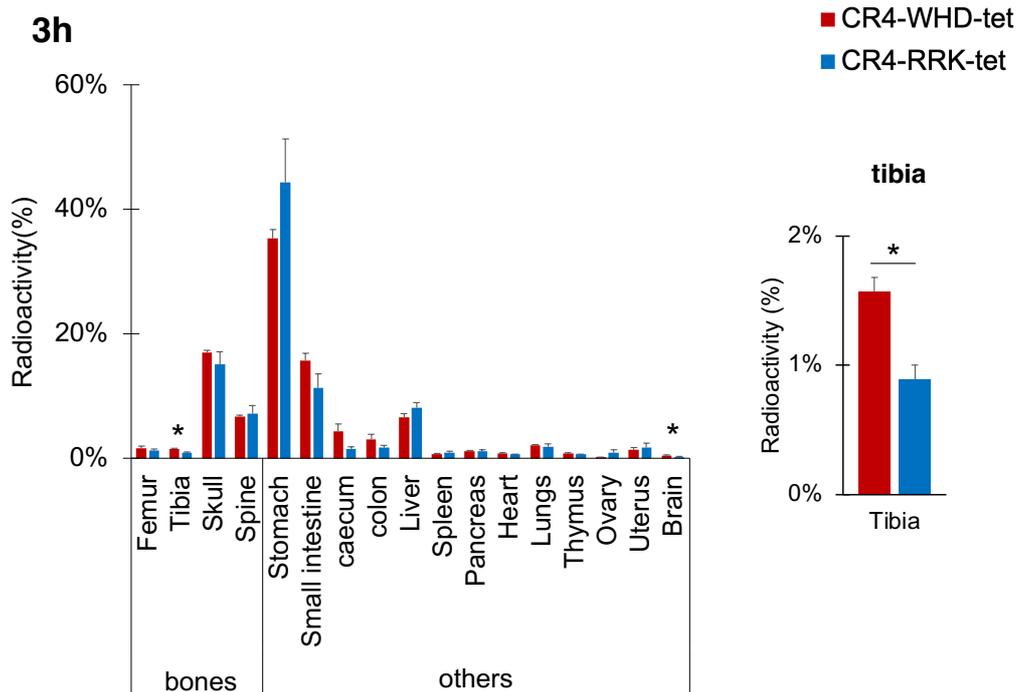


Fig. 26 CR4-RRK-tet および CR4-WHD-tet の投与 3 時間後にお

¹²⁵I で標識された Y-CR4-RRK-tet および Y-CR4-WHD-tet をマウスに腹腔投与し、投与後 6 時間経過後に安楽死、解剖し、各臓器における線量を測定した。各臓器の線量を、腎臓および血液を除く全臓器の合計線量で除することにより、体内残存ペプチドの分布を算出した。右のグラフは、特に脛骨の棒グラフを抜き出して表示したものである。グラフは 3 匹のマウスから得られた実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。* $p < 0.05$ (by Student's t-test)

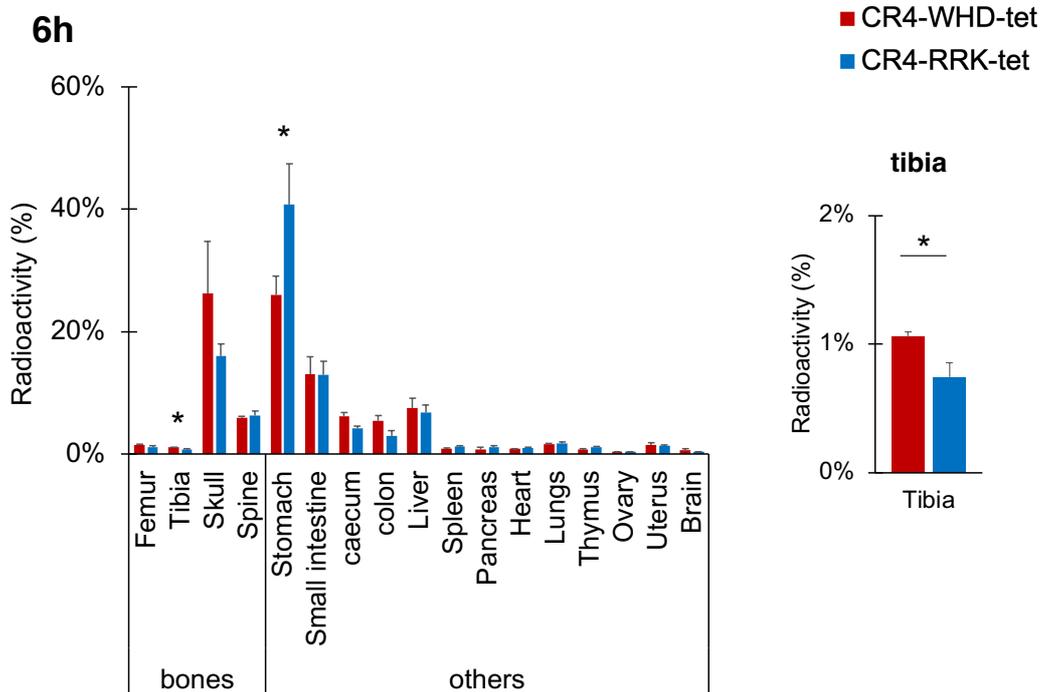


Fig. 27 CR4-RRK-tet および CR4-WHD-tet の投与 6 時間後における体内分布

^{125}I で標識された Y-CR4-RRK-tet および Y-CR4-WHD-tet をマウスに腹腔投与し、投与後 6 時間経過後に安楽死、解剖し、各臓器における線量を測定した。各臓器の線量を、腎臓および血液を除く全臓器の合計線量で除することにより、体内残存ペプチドの分布を算出した。右のグラフは、特に脛骨の棒グラフを抜き出して表示したものである。グラフは 3 匹のマウスから得られた実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。* $p < 0.05$ (by Student's t-test)

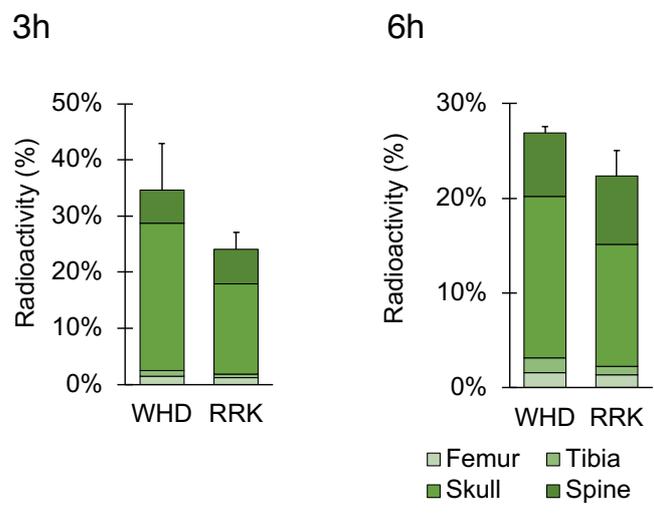


Fig. 28 CR4-RRK-tet および CR4-WHD-tet の骨組織への集積

¹²⁵I で標識された Y-CR4-RRK-tet および Y-CR4-WHD-tet をマウスに腹腔投与し、投与後 3 時間あるいは 6 時間経過後に安楽死、解剖し、各臓器における線量を測定した。骨組織において観測された線量の合計を、腎臓および血液を除く全臓器の合計線量で除することにより、体内残存ペプチドの骨組織への分布を算出した。グラフは 3 匹のマウスから得られた実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。

第5章 CR4-WHD-tet が制御する破骨細胞分化後期特異的シグナルの同定

5-1 本章の概要

CR4-WHD-tet は細胞レベルで破骨細胞分化を強力に阻害し、骨破壊モデルマウスに対しても治療効果を発揮した。しかしながら、CR4-WHD-tet の生化学的特性に関する情報は、TRAF-C に対して R392 依存的に強力に結合するという事に限られた。そこで、CR4-WHD-tet が破骨細胞分化に与える影響に関する詳細な解析を試みた。まず、全長 TRAF6 に対する CR4-WHD-tet の結合を検出することを試みた。続けて、*in vitro* における破骨細胞の分化には、24 時間後と 3 回 (計 72 時間) の継続した RANKL 刺激が必要であるが、CR4-WHD-tet が作用する段階はこのうち最後の 24 時間の中に存在することを見出した。しかしながら、破骨細胞の分化段階を区別して解析を行った例はほとんどないため、total RNA の網羅的解析をもとに、CR4-WHD-tet が作用するイベントを同定することを試みた。結果、破骨細胞分化の最終段階を推進する NFATc1 の発現とは異なる経路が存在すること、そこには p38 が重要な役割を果たしていること、CR4-WHD-tet はその経路を阻害して強力な破骨細胞分化抑制効果を発揮していることを見出した。

5-2 実験試薬

破骨細胞分化

- ・ 実験用マウス：系統 C57BL/6 (♂, 6w) (清水実験材料)
- ・ Minimum Essential Medium Alpha Medium [α -MEM] (GIBCO)
- ・ Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized) (ナカライテスク)
- ・ FETAL BOVINE SERUM (ニチレイ)
- ・ 23G ニードル (TERUMO)
- ・ 2.5mL シリンジ (TERUMO)
- ・ 6cm dish (FALCON)
- ・ Cell Strainer (FALCON)
- ・ 6well plate (IWAKI)
- ・ M-CSF (研究室にて調整)
- ・ GST-RANKL (研究室にて調整)
- ・ Paraformaldehyde (富士フイルム和光純薬)
- ・ Acetone (ナカライテスク)
- ・ Ethanol (富士フイルム和光純薬)

- Naphtol AS-MX phosphate disodium salt (Sigma Aldrich)
- N-N dimethyl form amide (富士フイルム和光純薬)
- Fast Red Violet LB salt (Sigma Aldrich)
- Sodium acetate (富士フイルム和光純薬)
- Sodium (+) - Tartrate Dihydrate (富士フイルム和光純薬)
- DAPI solution (同仁化学研究所)
- Dimethyl sulfoxide (Sigma Aldrich)
- SB203580 (富士フイルム和光純薬)
- CR4-WHD-tet : MA- WHDDEEF -A-RRRR-U (Synpeptide Co., Ltd)

RNA 抽出と逆転写

- Sepasol I (®)-RNA I Super G (ナカライテスク)
- Chloroform (ナカライテスク)
- Isopropanol (富士フイルム和光純薬)
- Ethanol (富士フイルム和光純薬)
- DEPC 処理水 (ナカライテスク)

細胞培養

- RAW264.7 細胞 (ATCC)
- D-MEM (Gibco)
- FETAL BOVINE SERUM (ニチレイ)
- Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized) (ナカライテスク)

Peptide Fishing

- アビジンアガロース (Sigma Aldrich)
- ビオチン標識 WHD-tet : biotin-MA- WHDDEEF -A-U (本研究室にて合成した)
- 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (富士フイルム和光純薬)
- Sodium Chloride (富士フイルム和光純薬)
- Glycerol (富士フイルム和光純薬)
- NP-40 (Sigma Aldrich)
- 2Na(EDTA · 2Na) (同仁化学研究所)
- EGTA (富士フイルム和光純薬)
- Sodium Fluoride (富士フイルム和光純薬)

- Sodium pyrophosphate (Alfa Aesar)
- Sodium Orthovanadate(V) (富士フイルム和光純薬)
- Sodium Dodecyl Sulfate (富士フイルム和光純薬)
- Protease Inhibitor Cocktail(EDTA free)(100x) (ナカライテスク)

Western Blotting

- 抗体
 - マウス抗 NFATc1 抗体 sc-7294 (SantaCruz)
 - ウサギ抗リン酸化 p38 抗体 #9211 (Cell Signaling Technology)
 - ウサギ抗リン酸化 I κ B 抗体 #2859 (Cell Signaling Technology)
 - ウサギ抗 p38 抗体 #9212 (Cell Signaling Technology)
 - ウサギ抗 I κ B 抗体 #4812 (Cell Signaling Technology)
 - ウサギ抗 TRAF6 抗体 #67591 (Cell Signaling Technology)
 - ウサギ抗 β actin 抗体 PM053 (MBL International)
 - HRP 標識ウマ抗マウス IgG 抗体 #7076 (Cell Signaling Technology)
 - HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 #7074 (Cell Signaling Technology)
- Sodiim Chloride (富士フイルム和光純薬)
- Glycerol (富士フイルム和光純薬)
- NP-40 (Sigma Aldrich)
- 2Na(EDTA · 2Na) (同仁化学研究所)
- EGTA (同仁化学研究所)
- Sodium Fluoride (富士フイルム和光純薬)
- Sodium pyrophosphate (Alfa Aesar)
- Sodium Orthovanadate(V) (富士フイルム和光純薬)
- Sodium Dodecyl Sulfate (富士フイルム和光純薬)
- Dithiothreito (富士フイルム和光純薬)
- Glycerol (富士フイルム和光純薬)
- Bromophenol blue (富士フイルム和光純薬)
- Acrylamide-bis (富士フイルム和光純薬)
- Methylene-bis-acrylamide (富士フイルム和光純薬)
- N,N,N',N'-tetramethyl ethane-1,2-diamine (富士フイルム和光純薬)
- Glycine (富士フイルム和光純薬)
- Methanol (富士フイルム和光純薬)

- Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer)
- Immunostar LD (富士フイルム和光純薬)
- Protease Inhibitor Cocktail(EDTA free)(100x) (ナカライテスク)

RNA 抽出と逆転写

- Sepasol I (®)-RNA I Super G (ナカライテスク)
- Chloroform (ナカライテスク)
- Isopropanol (富士フイルム和光純薬)
- Ethanol (富士フイルム和光純薬)
- DEPC 処理水 (ナカライテスク)
- ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO)
- 0.2mL PCR シングルチューブ Flat1000 (NIPPON Genetics)

rtPCR

- THUNDERBIRD® SYBR® qPCR RT Next (TOYOBO)
- PCR 用 96well プレート (INA-OPTIKA)
- PlateSeal (INA-OPTIKA)
- プライマー

gene		primer Sequence (5'→3')	manufacturer
<i>Nfatc1</i>	Forward	CAAGTCTCACCACAGGGCTCACTA	eurofin
	Reverse	GCGTGAGAGGTTTCATTCTCCAAGT	
<i>Mapk11</i> (p38α)	Forward	GGAGGACATACCGTGAGCTG	invitrogen
	Reverse	GGTCGTCACGAGGTACACTT	
<i>Mapk14</i> (p38β)	Forward	CCGAACGATACCAGAACCTGTC	invitrogen
	Reverse	ACGCAACTCTCGGTAGGTCCTT	
<i>Gapdh</i>	Forward	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	eurofin
	Reverse	TTGCTGTGAAGTCGVAGGAG	

5-3 実験方法

5-3-1 WHD-tet と内在性 TRAF6 の結合の評価

アビジンアガロースビーズを PBS で洗浄し、ビオチン標識 WHD-tet を加えて 4°C で 1 時間反応させた。反応終了後、ビーズを 1% Skim milk でブロッキングした。培養した RAW264.7 細胞を Lysis Buffer (20mM Tris-HCl (pH7.0) , 150mM NaCl, 10% Glycerol, 1% NP-40, 10mM EDTA, 1mM EGTA, 10mM NaF, 10mM NaPPI, 200μM Sodium

Orthovanadate (V)、プロテアーゼ阻害剤カクテル含有) によって溶解し、超音波破碎を施した後、1000g で5分間遠心分離し、遠心上清を 1 mg/mL に調整してセルライセートとした。500 μ L のセルライセートに対して、ペプチドを固相化したビーズおよび未反応のビーズを 20 μ L ずつ添加し、4°Cで一晩ローテーションした。翌日、ビーズを lysis buffer で 5回、PBS で3回洗浄し、1 \times SDS Sample Buffer (50 mM Tris-HCl (pH6.8)、100 mM DTT、2%SDS、0.1% Bromophenol blue、10% glycerol) を 3 μ L を加えて、95°Cで5分ボイルした。得られたサンプルに対しウェスタンブロッティングを行い、TRAF6 を検出した。

5-3-2 NFATc1 発現に CR4-WHD-tet が与える影響

6 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨から調製した骨髓細胞を、10 %ウシ胎児血清、100 units/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin、および M-CSF を添加した α -MEM を用いて、6 well plate で 24 時間培養し、単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞を得た。前駆細胞を、M-CSF (1/50 希釈) および 66 ng/mL GST-RANKL を含む培地において、3 μ M の CR4-WHD-tet または DMSO (コントロール、final 0.2 %) の存在下で 72 時間培養した。培地は 24 時間ごとに交換した。24 時間ごとに細胞を Lysis Buffer (プロテアーゼ阻害剤含有) で溶解し、回収した。細胞溶解液は超音波破碎を施した後、4°C・1000 g で 5 分間遠心分離し、上清を 5 \times SDS Sample Buffer (250 mM Tris-HCl、500 mM DTT、10% SDS、0.5% Bromophenol blue、50% glycerol、pH6.8) で処理した。全てのサンプルは、抗 NFATc1 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって解析された。

5-3-3 CR4-WHD-tet の作用する破骨細胞分化段階の同定

6 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨から調製した骨髓細胞を、10 %ウシ胎児血清、100 units/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin、および M-CSF を添加した α -MEM を用いて、24 well plate で 24 時間培養し、単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞を得た。前駆細胞を、M-CSF (1/50 希釈) および 66 ng/mL GST-RANKL を含む培地において、種々の濃度のペプチドまたは DMSO (コントロール、final 0.2 %) の存在下で培養した。培養液は、M-CSF、GST-RANKL、およびペプチドを含む同じ培地で 24 時間ごとに交換した。ペプチドは、RANKL 刺激開始時を基準に、0~72 時間/24~72 時間/48~72 時間/54~72 時間/60~72 時間/66~72 時間 の間に存在させた。72 時間後、細胞を固定し、TRAP 染色および DAPI 染色を施した。3 個以上の核を含む TRAP 陽性細胞の数を評価した。さらに、RANKL 刺激開始時を基準に、0~24 時間/24~48 時間/48~72 時間の間にペプチドを存在させた条件での検討を、同様の手続きによって実施した。

5-3-4 NFATc1 の発現に CR4-WHD-tet が破骨細胞分化後期において与える影響

6 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨から調製した骨髄細胞を、10 %ウシ胎児血清、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin、および M-CSF を添加した α -MEM を用いて、6 well plate で 24 時間培養し、単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞を得た。その後、培養液を M-CSF (1/50 希釈) および 66 ng/mL GST-RANKL を含む培地に入れ替え培養した。培地は 24 時間ごとに交換した。RANKL 刺激開始後 48 時間経過した時点で、3 µM の CR4-WHD-tet または DMSO (コントロール、final 0.2 %) を含む培地 (M-CSF (1/50 希釈) および 66 ng/mL GST-RANKL を含む) に培養液を置換した。RANKL 刺激開始から 72 時間後に、細胞をセパゾール (ナカライテスク) で溶解し total RNA を、Lysis Buffer (プロテアーゼ阻害剤含有) で溶解し total protein を回収した。セパゾールに回収された RNA サンプルから、製品説明書に従って RNA を抽出し、1 µg の total RNA を逆転写し、4 倍に希釈して cDNA サンプル (25 µg/mL) とした。得られた cDNA に対して、複数のプライマーセットを用いて rtPCR を行い、遺伝子発現量を定量した。遺伝子発現量は、GAPDH の mRNA 発現量で標準化して表した。細胞溶解液は超音波破碎を施した後、4°C・1000 g で 5 分間遠心分離し、上清を 5×SDS Sample Buffer で処理してサンプルとした。全てのサンプルを、抗 NFATc1 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって解析した。

5-3-5 CR4-WHD-tet が制御する破骨細胞分化後期特異的シグナルの同定

サンプルの回収

6 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨から調製した骨髄細胞を、10 %ウシ胎児血清、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin、および M-CSF を添加した α -MEM を用いて、6 well plate で 24 時間培養し、単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞を得た。その後、培養液を M-CSF (1/50 希釈) および 66 ng/mL GST-RANKL を含む培地に入れ替え、RANKL 刺激の前の細胞、および最初の RANKL 刺激から 3 時間経過後に、D-PBS で細胞を洗浄し、セパゾール (ナカライテスク) を用いて細胞を回収した。別の前駆細胞は、M-CSF および GST-RANKL を含む培地において培養し、培地は 24 時間ごとに交換した。RANKL 刺激開始後 48 時間経過した時点で、3 µM の CR4-WHD-tet または DMSO (コントロール、final 0.2 %) を含む培地 (M-CSF (1/50 希釈) および 66 ng/mL GST-RANKL を含む) に培養液を置換した。3 時間経過後、D-PBS で細胞を洗浄し、セパゾール (ナカライテスク) を用いて細胞を回収した。回収されたサンプルから、製品説明書に従って RNA を抽出後、大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センターゲノム解析室に依頼し、total RNA を解析した。

データ解析

得られたデータに対し、FPKM 値で 1 未満の発現量である遺伝子を除外し、残った遺伝子に対して、3 回目の RANKL 刺激によってその発現量が 1.25 倍以上上昇した遺伝子を選抜した。これらの遺伝子に対して、DAVID を用いてパスウェイ解析を行った。続けて、破骨細胞分化に関わる遺伝子を抽出し、1 回目の RANKL 刺激後と比較して、3 回目の RANKL 刺激後の発現量が 1.25 倍以上増加している遺伝子を、8 個取得した。さらに、分化 48 時間後から 3 時間の CR4-WHD-tet 処理によって、発現量が 1.25 倍レベル以下に低下するものを選抜した。

5-3-6 CR4-WHD-tet が制御する破骨細胞分化シグナルに与える影響

6 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨から調製した骨髓細胞を、10 %ウシ胎児血清、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin、および M-CSF を添加した α -MEM を用いて、6 well plate で 24 時間培養し、単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞を得た。前駆細胞を、M-CSF (1/50 希釈) および 66 ng/mL GST-RANKL を含む培地において培養した。培養液は、M-CSF、GST-RANKL、およびペプチドを含む同じ培地で 24 時間ごとに交換した。RANKL 刺激開始後、48 時間経過した時点で、30µM CR4-WHD-tet あるいは 2% DMSO を 1 well あたり 200 µL 追加 (final 3 µM あるいは 0.2 %) して 30 分培養した後、660 ng/mL GST-RANKL を 200 µL 追加 (final 66 ng/mL) して培養を継続した。RANKL を添加してから、0~120 分間で細胞を回収した。細胞は PBS で洗ってから、200 µL/well の Lysis Buffer を用いて溶解し回収した。回収された破砕液は、超音波破砕処理を行った後、4°C/1000g で 5 分間遠心分離し、上清のみを回収し、濃度を決定後に、5× SDS Sample Buffer で処理して 95°C でボイルした。得られたサンプルに対して、各種抗体を用いてウェスタンブロッティングをおこない、各種タンパク質の発現量およびリン酸化の度合いを半定量した。

5-4 結果

5-4-1 WHD-tet と内在性 TRAF6 の結合の評価

RANKL 刺激によって破骨細胞へと分化する性質を有する RAW264.7 細胞の破砕液に含まれる内在性の TRAF6 と、WHD-tet の結合を確かめた。細胞のライセートをビオチン標識 WHD-tet 存在下でインキュベート後、アビジンアガロースビーズを用いて fishing を行った。その結果、ビオチン標識 WHD-tet は TRAF6 を効率よく沈降させること、即ち、WHD-tet は細胞内で TRAF6 に結合しうることが示された。(Fig. 29)。

5-4-2 NFATc1 の発現に CR4-WHD-tet が与える影響

CR4-WHD-tet 非存在下において、NFATc1 の発現量は、RANKL 刺激に伴って分化までの 72 時間で経時的に上昇した。一方、CR4-WHD-tet 存在下における培養では、NFATc1 の発現は CR4-WHD-tet 非存在下と同様に経時的に上昇し、各時間においてペプチドの有無による差は見られなかった (Fig. 30)。

5-4-3 CR4-WHD-tet の作用する破骨細胞分化段階の同定

CR4-WHD-tet の効果は、RANKL 刺激開始後 60 時間目以降に添加した場合には、有意に減弱した (Fig. 31)。加えて、1 回目の RANKL 刺激 (刺激開始 0 時間目) から分化終了まで継続的に CR4-WHD-tet を存在させた場合と、3 回目の RANKL 刺激 (刺激開始後 48 時間目) から分化終了までの間のみ CR4-WHD-tet を存在させた場合では、CR4-WHD-tet の効果に有意な差は見られなかった。一方で、CR4-WHD-tet は、RANKL 刺激開始後 0~24 時間目のみ、あるいは 24~48 時間目のみに存在させた場合は、その効果が減弱した (Fig. 32)。

5-4-4 NFATc1 の発現に CR4-WHD-tet が破骨細胞分化後期において与える影響

CR4-WHD-tet 非存在下において、RANKL 刺激に伴って、NFATc1 の発現量は分化までの 72 時間で経時的に上昇した。RANKL 刺激開始後 48 時間目から CR4-WHD-tet を存在させた場合に、ペプチドは NFATc1 の発現に全く影響を与えなかった (Fig. 33)。

5-4-5 CR4-WHD-tet が制御する破骨細胞分化後期特異的シグナルの同定

3 回目の RANKL 刺激を行う直前と、刺激 3 時間後を比較して、1.25 倍以上発現が上昇する遺伝子を探索したところ、1220 遺伝子が得られた。これらの遺伝子群に対して、パスウェイ解析を行ったところ、破骨細胞分化に関わる遺伝子群、破骨細胞分化に特に重要とされる NF- κ B・MAPK のシグナル分子群が多く含まれていることがわかった (Fig. 34AB)。これら 28 遺伝子から、1 回目の RANKL 刺激後と比較して、3 回目の RANKL 刺激後の発現量が 1.25 倍以上増加している遺伝子を探索すると、8 個の遺伝子が見出された。この 8 個の中から、分化 48 時間後から 3 時間の CR4-WHD-tet 処理によって、その発現量が 1.25 倍レベル以下に低下する遺伝子として、*mapk11* および *nox1* を取得した (Fig. 34C)。これらの遺伝子のうち、3 回目の刺激前後における発現量がより大きい、即ち、破骨分化により深く関わっていると考えられる、*mapk11* に着目した。*mapk11* は MAPK に属する p38 の 4 つのサブタイプの 1 つである p38 β をコードしており、p38 は破骨細胞分化に重

要な働きをもつことが知られている。そこで、qPCR によって、3 回目の RANKL 刺激後の p38 β の発現変動を検討したところ、RNAseq における結果と同様に、RANK 刺激で増加し、WHD 処理で減少することが確認できた。また、p38 のサブタイプのうち、破骨細胞において最もその発現量が多く、機能的にも p38 β と類似しているとされている、p38 α の発現変動も確認したところ、同様の変動の傾向が見られた (Fig. 34 D)。

5-4-6 CR4-WHD-tet が制御する破骨細胞分化シグナルに与える影響

3 回目の RANKL 刺激で誘導される p38 の活性化に対する、CR4-WHD-tet の効果をウェスタンブロッティングによって検討した結果、RANKL 刺激の後、p38 は素早く活性化し、その活性化は CR4-WHD-tet によって顕著に減弱することが示された (Fig. 35)。その一方で、1 回目の RANKL 刺激で誘導される p38 の活性化には、CR4-WHD-tet は全く影響しないことを見出した。そこで、p38 阻害剤を分化誘導後 48 時間後に作用させたところ、CR4-WHD-tet には劣るものの、やはり分化阻害効果を示した (Fig. 35)。そこで次に、もう一つの TRAF6 下流シグナルである、NF- κ B 経路に対する、CR4-WHD-tet の効果を検討したところ、CR4-WHD-tet は、1 回目の RANKL 刺激および 3 回目の RANKL 刺激に続く NF- κ B 経路の活性化に対し、いずれの場合でもほとんど影響を与えなかった (Fig. 36, Fig. 37)。

5-5 考察

CR4-WHD-tet は、TRAF-C を用いた試験の際と同様に、内在性の全長 TRAF6 とも結合しうることが確かめられ、ペプチドの破骨細胞分化抑制効果は TRAF6 への相互作用に起因すると考えられた (Fig. 29)。

続いて、CR4-WHD-tet の破骨細胞分化抑制効果の分子メカニズムを明らかにするために、破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 の発現⁴⁴をウェスタンブロッティング法によって検討したところ、CR4-WHD-tet は、RANKL 刺激に伴う NFATc1 の発現上昇に全く影響しなかった (Fig. 30)。このことから、CR4-WHD-tet が影響を与える破骨細胞分化に重要なイベントは、NFATc1 の発現が十分に起こったあと、即ち分化後期段階に存在することが推測された。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) が必要であるが、それまで CR4-WHD-tet は RANKL と同時に 3 回添加していた。そこで、ペプチドの存在する期間を順次短縮してゆくと、ペプチドの効果は RANKL 刺激開始後 60 時間目以降に添加した場合に有意に減弱し、48 時間目 (3 回目の RANKL 刺激) からの存在で十分な効果が発揮された (Fig. 31)。

加えて、CR4-WHD-tet は、RANKL 刺激開始後 0~24 時間目のみ、あるいは 24~48 時間目のみに存在させた場合は、その効果が減弱した (Fig. 32) ことから、CR4-WHD-tet は破骨細胞分化に必要な TRAF6 を起点とする分化最終段階に特有のイベントに対して作用することで、破骨細胞分化を抑制していると考えられた。なお、このときも CR4-WHD-tet は NFATc1 発現に影響を与えない (Fig. 33)。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。これは、この間にマスター転写因子である NFATc1 の発現が顕著に誘導されることに起因する。したがって、既存の知見からは本結果を説明することができず、破骨細胞分化の最終段階を推進している NFATc1 の発現とは異なる経路が存在しており、CR4-WHD-tet はその経路を阻害して強力な破骨細胞分化抑制効果を発揮していることが推測された。

そこで、CR4-WHD-tet が作用する経路を同定するために、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によって網羅的に解析した。その結果、1 回目と 3 回目では誘導される mRNA のパターンが大きく異なること、3 回目の RANKL 刺激のあとも、破骨細胞分化に重要な遺伝子群の発現が特異的に上昇していることを見出した (Fig. 34AB)。CR4-WHD-tet の効果は、3 回目の RANKL 刺激と同時に添加すると十分に発揮され、1 回目の RANKL 刺激と同時に添加しても発揮されない。このことから、3 回目の RANKL 刺激に対する WHD-tet の効果を同様に検討したところ、3 回目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 が存在することを見出した (Fig. 34CD)。p38 は、RANKL 刺激に伴って、TRAF6 下流において活性化する MAPK の一群に含まれ、その活性化は破骨細胞の分化に不可欠であるとされている^{45,46}。破骨細胞分化を制御する分子標的としても有力である一方で、その阻害剤は副作用が大きく、治療薬としての利用はこれまで難しかった⁴⁷。

そこで、3 回目の RANKL 刺激で誘導される p38 シグナルに対する CR4-WHD-tet の効果を、タンパクレベルでも確認できるかどうかを、ウェスタンブロッティングを用いて検討したところ、RANKL による p38 の活性化は顕著に抑制される事を見出した (Fig. 35)。さらに、3 回目の RANKL 刺激を p38 阻害剤(SB203580)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 (Fig. 36)。このことから 3 回目の RANKL 刺激には分化後期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、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。その一方で、1 回目の RANKL 刺激で誘導される p38 シグナルに対しては、CR4-WHD-tet は全く影響せず (Fig. 35)、このことは CR4-WHD-tet を RANKL 刺激開始後 0~24 時間目のみに存在させたときに、十分な破骨細胞分化抑制能を示さないことと一致する (Fig. 32)。

加えて、p38 が破骨細胞分化の段階的制御に関与するという既報とも合致した⁴⁸。さらに、もう1つの TRAF6 下流シグナルである、NF- κ B 経路に対する、CR4-WHD-tet の効果を検討したところ、CR4-WHD-tet は、1 回目の RANKL 刺激および3 回目の RANKL 刺激に続く NF- κ B 経路の活性化に対し、いずれの場合でもほとんど影響を与えなかった(Fig. 37、Fig. 38)。以上の結果から、分化後期においては NF- κ B 経路の寄与は少なく、p38 経路が重要な役割を果たしていること、CR4-WHD-tet は、この p38 経路を特異的に阻害する事で、分化の最終段階を抑制していることが示された (Fig. 39)。

5-6 図表

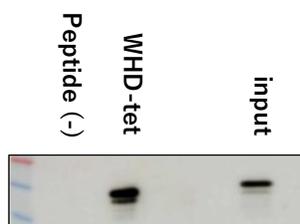


Fig. 29 ビオチン標識 WHD-tet は内在性 TRAF6 と直接的に結合する

RAW264.7 細胞を溶解・破碎した遠心上清に含まれる内在性 TRAF6 を、アビジンアガロースビーズにチャージされたビオチン標識 WHD-tet で沈降し、両者の結合を検出した。サンプル中の TRAF6 は特異的抗体を用いたウェスタンブロッティング法によって検出した。

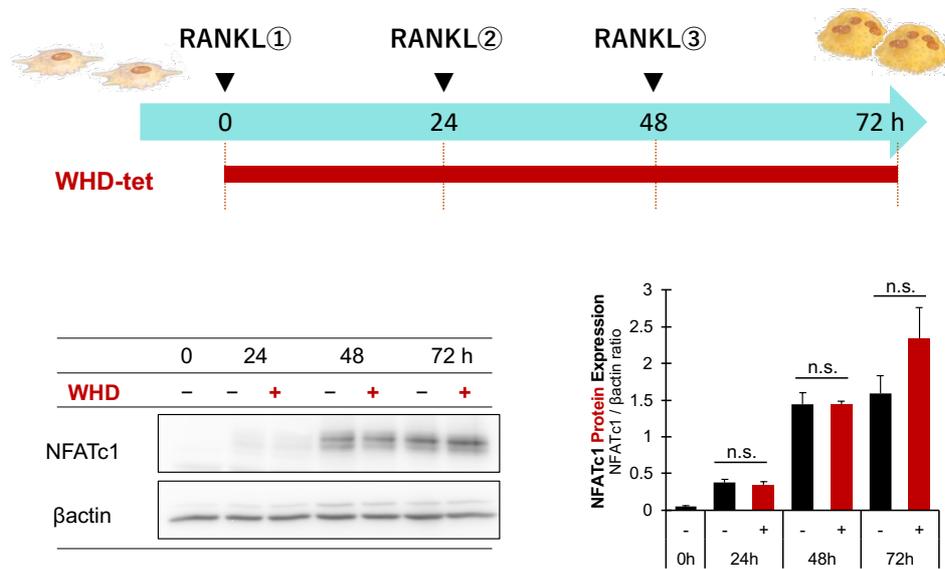


Fig. 30 CR4-WHD-tet は NFATc1 の発現に影響しない

C57BL/6 マウスから採取した骨髄細胞を RANKL 存在下で 72 時間培養し、破骨細胞を誘導した。RANKL 刺激と同時に CR4-WHD-tet を添加し、ペプチド存在・非存在下で培養を行った。細胞が分化するまでの間、24 時間ごとに細胞を回収して、サンプル中の NFATc1 および β actin の量をそれぞれの特異的抗体を用いて検出・定量した。バンド強度はピクセル値をもとに定量し、 β actin のバンド強度で補正した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。n.s = not significant (by Student's *t*-test)

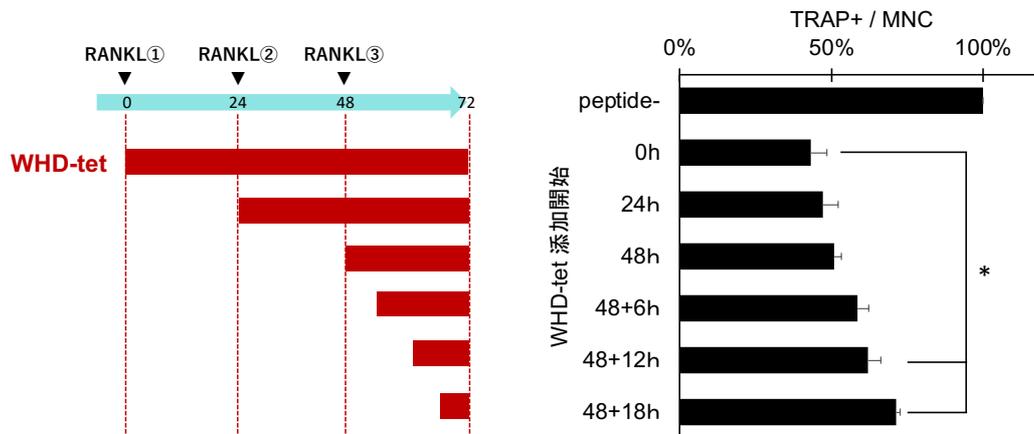


Fig. 31 CR4-WHD-tet は破骨細胞分化後期に作用する

C57BL/6 マウスから採取した骨髄細胞を RANKL 存在下で 72 時間培養し、破骨細胞を誘導した。ペプチドは図に示した期間のみ存在させた。RANKL 刺激開始から 72 時間後、細胞を固定し、TRAP 染色陽性かつ核を 3 つ以上含む細胞を計量した。破骨細胞数はペプチド非存在下における破骨細胞数の数を 100%として表示した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。* $p < 0.05$ (by Dunnet's test, compared with 0h)

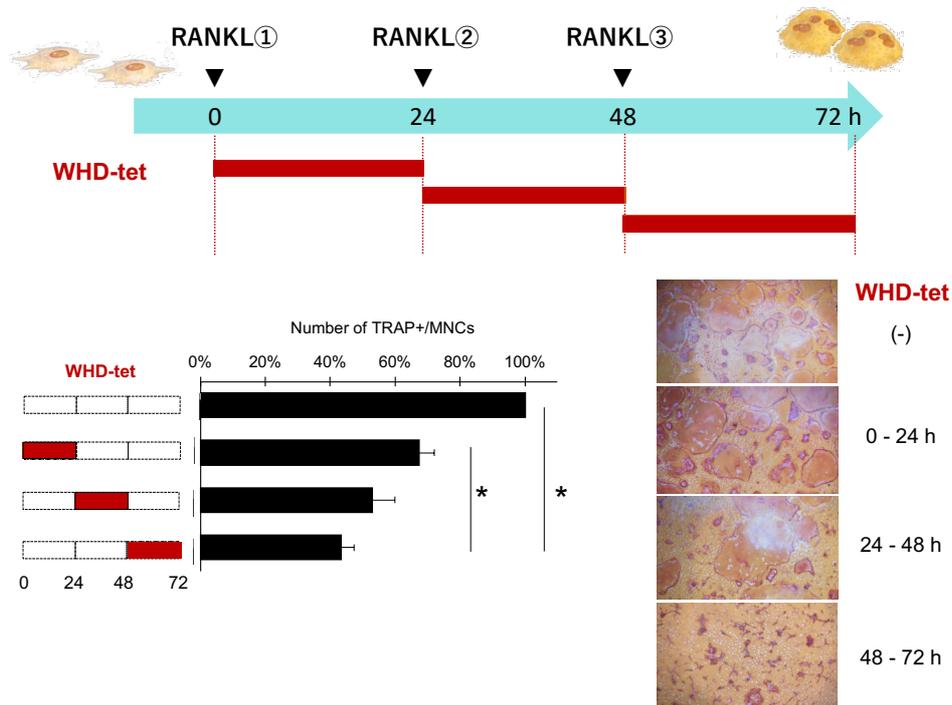


Fig. 32 CR4-WHD-tet は破骨細胞分化前期・中期には作用しない

C57BL/6 マウスから採取した骨髄細胞を RANKL 存在下で 72 時間培養し、破骨細胞を誘導した。ペプチドは図に示した期間のみ存在させた。RANKL 刺激開始から 72 時間後、細胞を固定し、TRAP 染色陽性かつ核を 3 つ以上含む細胞を計量した。破骨細胞数はペプチド非存在下における破骨細胞数を 100%として表示した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。画像は代表的データである。
* $p < 0.05$ (by Dunnet's test, compared with 0h)

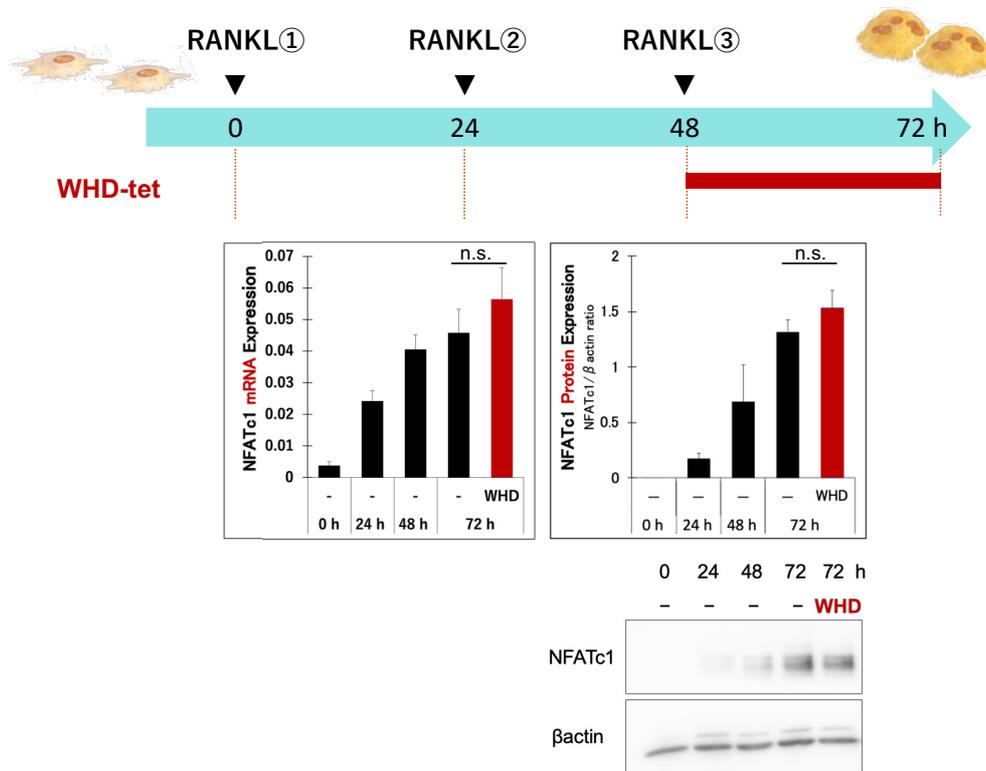


Fig. 33 分化後期において CR4-WHD-tet は NFATc1 発現に影響しない

C57BL/6 マウスから採取した骨髓細胞を RANKL 存在下で 48 時間培養したあと、CR4-WHD-tet の存在・非存在下で 24 時間培養した。細胞が分化するまでの間、24 時間ごとに細胞を回収した。(左) サンプルから total RNA を回収し、逆転写後、NFATc1 および GAPDH 特異的プライマーを用いた rtPCR によって、転写量を検出、定量した。NFATc1 の発現量は、GAPDH の発現量で補正した。(右) サンプル中の NFATc1 および β actin の量をそれぞれの特異的抗体を用いて検出・定量した。バンド強度はピクセル値をもとに定量し β actin のバンド強度で補正した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。n.s = not significant (by Student's *t*-test)

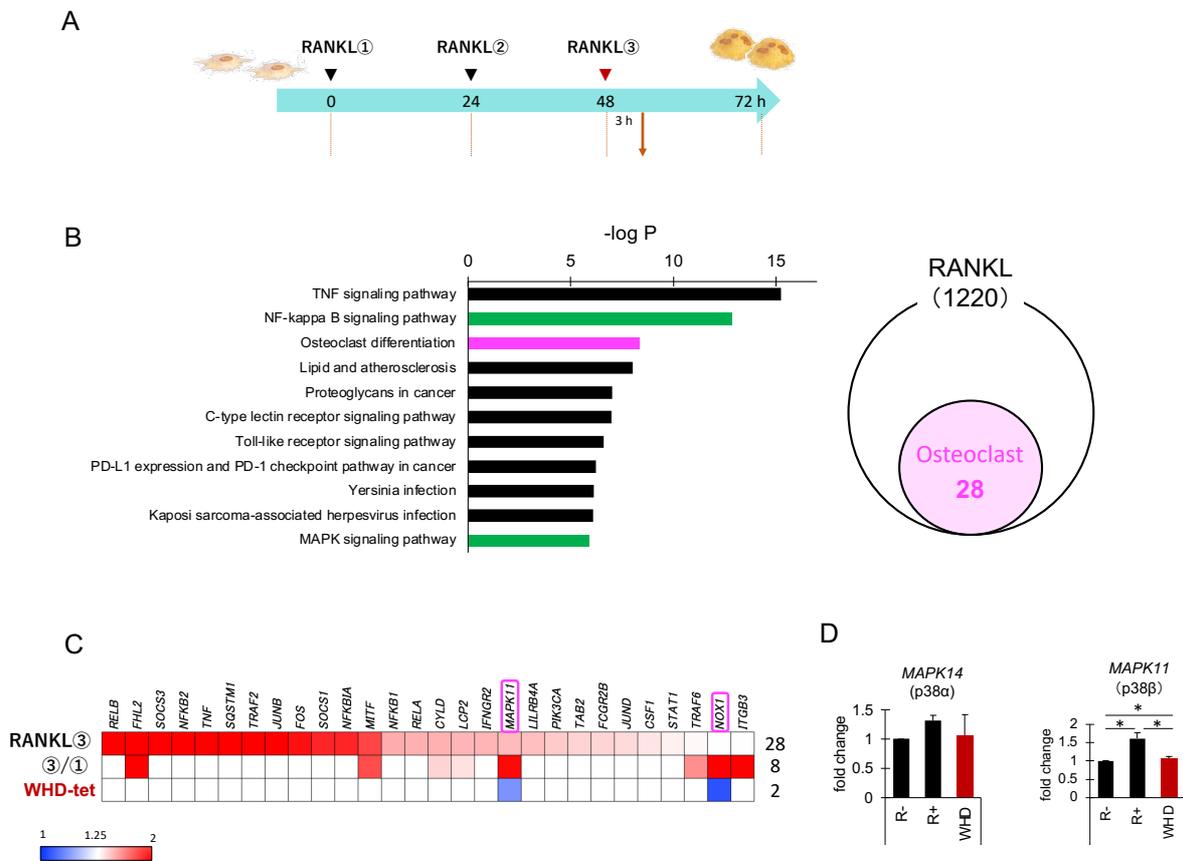


Fig. 34 分化後期特異的に発現が上昇、CR4-WHD-tet によってそれが抑制される破骨細胞分化関連因子の探索

(A) C57BL/6 マウスから採取した骨髄細胞を RANKL 存在・非存在下で 3 時間培養した後、細胞を回収した。また、RANKL 存在下で 48 時間培養したあと、CR4-WHD-tet の存在・非存在下で 3 時間培養後、細胞を回収した。回収されたサンプルから、total RNA を抽出し、全ての RNA 発現を比較した。RNA 発現量は GAPDH の発現量で補正した。(B) 3 回目の RANKL 刺激によってその発現量が 1.25 倍以上上昇した遺伝子を選抜し、パスウェイ解析を行った。(C) この中から破骨細胞分化に関わる遺伝子を抽出し、1 回目の RANKL 刺激後と比較して、3 回目の RANKL 刺激後の発現量が 1.25 倍以上増加している遺伝子を、8 個取得し、分化 48 時間後から 3 時間の CR4-WHD-tet 処理によって、発現量が 1.25 倍レベル以下に低下するものを選抜した。(D) 網羅解析と同じタイムテーブルで取得したサンプルから total RNA を回収し、逆転写後、MAPK14 (p38 α)、MAPK11 (p38 β)、GAPDH 特異的プライマーを用いた rtPCR によって、転写量を検出、定量した。MAPK14 (p38 α)、MAPK11 (p38 β) の発現量は、GAPDH の発現量で補正した。*p < 0.05 (by Tukey's test)

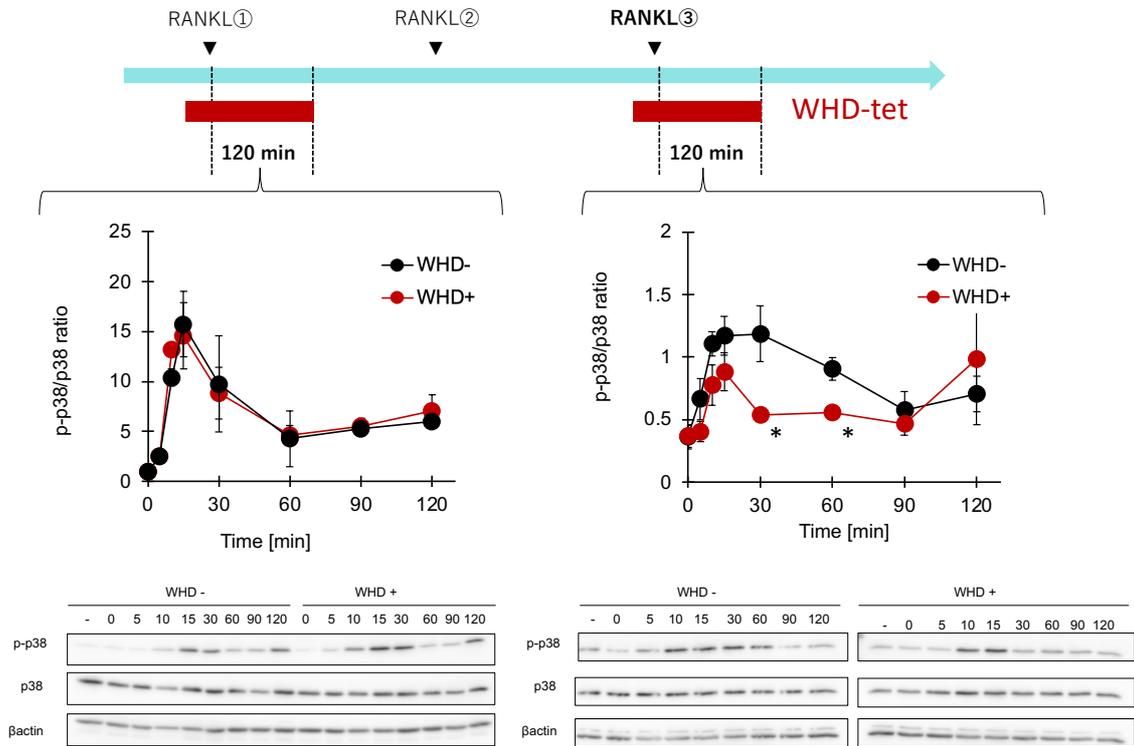


Fig. 35 CR4-WHD-tet は 3 回目の RANKL 刺激に続く p38 の活性化を特異的に阻害する
 C57BL/6 マウスから採取した骨髄細胞を RANKL 存在下で 48 時間培養したあと、CR4-WHD-tet の存在・非存在下で 30 分培養した。その後、RANKL を添加して 0、5、10、15、30、60、90、120 分後に細胞を回収した。サンプル中のリン酸化 p38、p38、 β actin の量をそれぞれの特異的抗体を用いて検出・定量した。バンド強度はピクセル値をもとに定量し、p38 のバンド強度で補正した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。* $p < 0.05$, n.s = not significant (by Student's *t*-test)

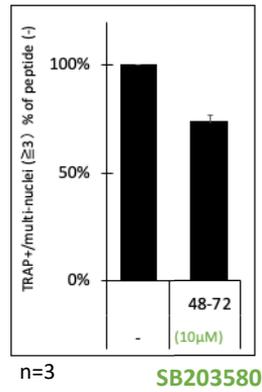
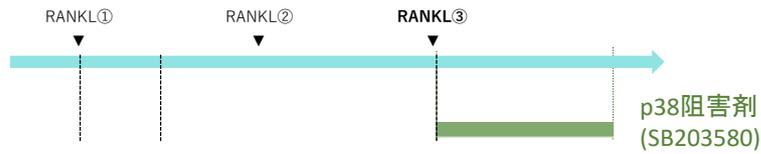


Fig. 36 p38 阻害剤は分化後期に投与しても破骨細胞分化を阻害する

C57BL/6 マウスから採取した骨髄細胞を RANKL 存在下で 48 時間培養したあと、p38 阻害剤 (SB203580) の存在・非存在下で 24 時間培養した。RANKL 刺激開始から 72 時間後、細胞を固定し、TRAP 染色陽性かつ核を 3 つ以上含む細胞を計量した。破骨細胞数はペプチド非存在下における破骨細胞数の数を 100%として表示した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。

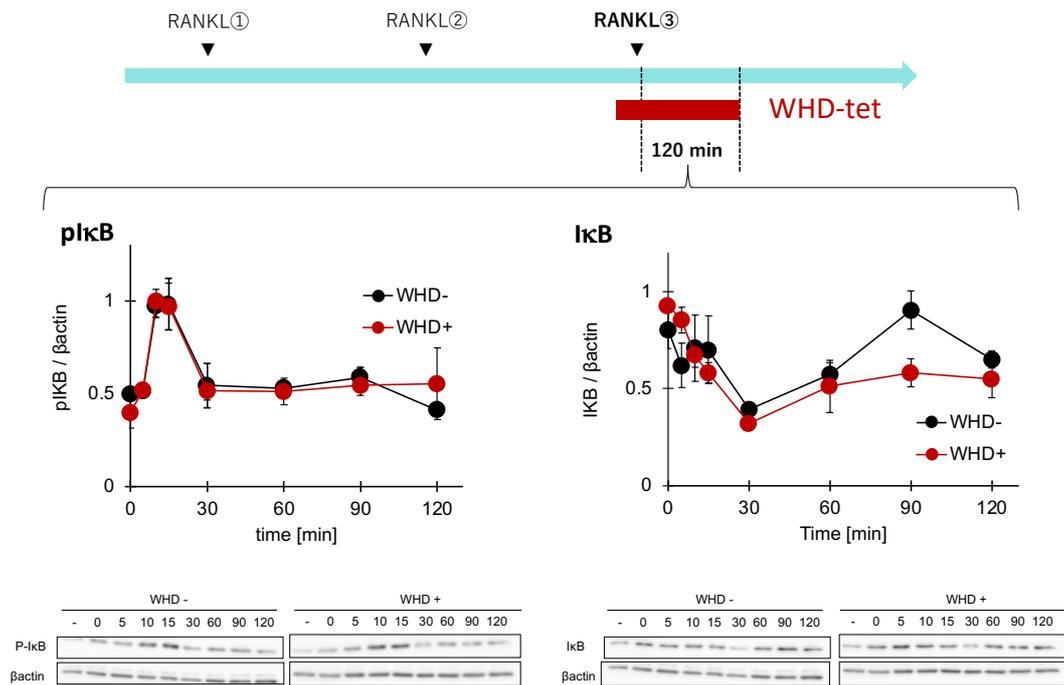


Fig. 37 CR4-WHD-tet は3回目の RANKL 刺激に続く NF- κ B 経路の活性化には影響しない

C57BL/6 マウスから採取した骨髄細胞を RANKL 存在下で 48 時間培養したあと、CR4-WHD-tet の存在・非存在下で 30 分培養した。その後、RANKL を添加して 0、5、10、15、30、60、90、120 分後に細胞を回収した。サンプル中のリン酸化 I κ B、I κ B、 β actin の量をそれぞれの特異的抗体を用いて検出・定量した。バンド強度はピクセル値をもとに定量し、 β actin のバンド強度で補正した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。(by Student's t-test)

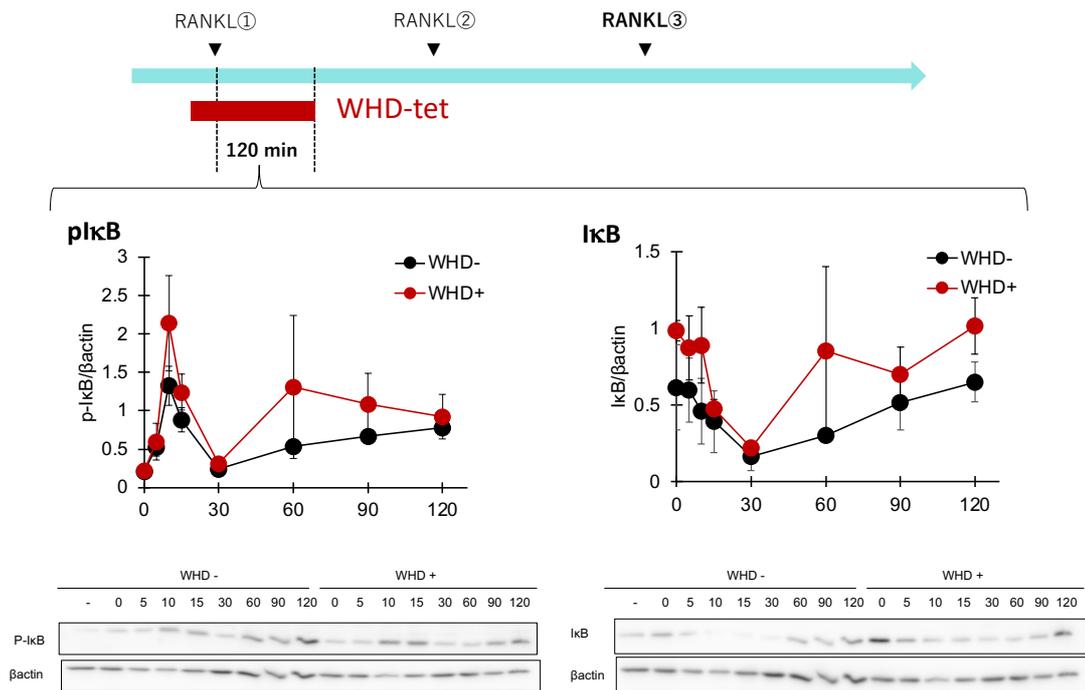


Fig. 38 CR4-WHD-tet は1回目のRANKL刺激に続くNF-κB経路の活性化には影響しない

C57BL/6 マウスから採取した骨髄細胞を CR4-WHD-tet の存在・非存在下で 30 分培養した。その後、RANKL を添加して 0、5、10、15、30、60、90、120 分後に細胞を回収した。サンプル中のリン酸化 IκB、IκB、β actin の量をそれぞれの特異的抗体を用いて検出・定量した。バンド強度はピクセル値をもとに定量し、β actin のバンド強度で補正した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。(by Student's *t*-test)

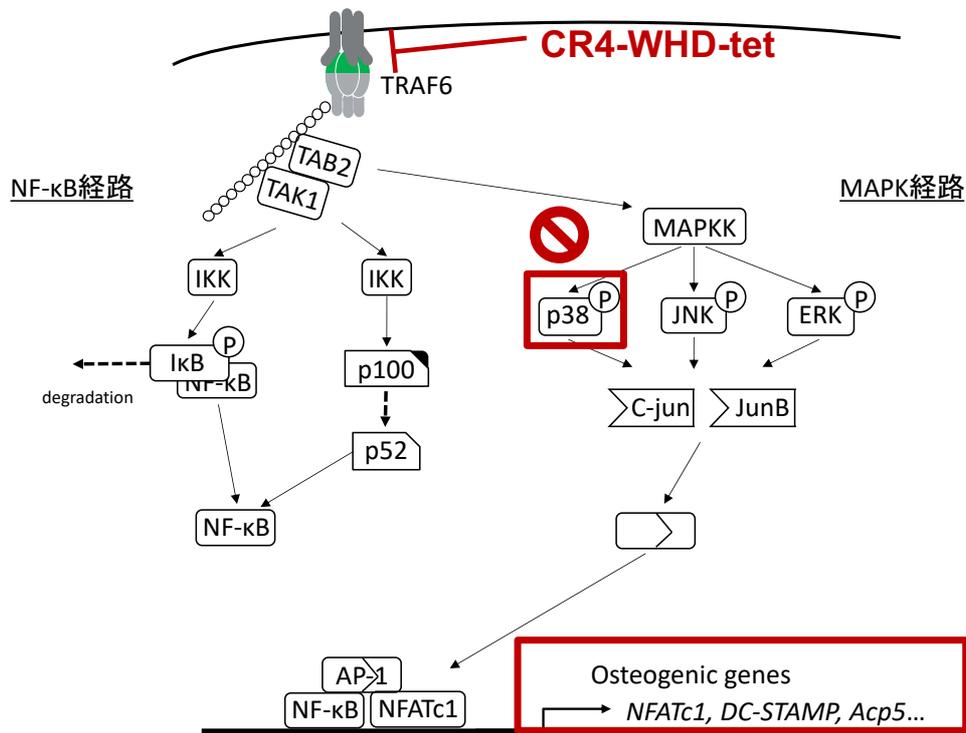


Fig. 39 CR4-WHD-tet の作用スキームの概要

CR4-WHD-tet は破骨細胞分化に必要な TRAF6 を起点とする分化最終段階に特有のイベントに対して作用することで、破骨細胞分化を抑制していると考えられた。このことから、破骨細胞分化の最終段階を推進している NFATc1 の発現とは異なる経路が存在すること、そこには p38 が重要な役割を果たしていること、CR4-WHD-tet はその経路を阻害することで強力な破骨細胞分化抑制効果を発揮していること、が推定された

第6章 破骨細胞分化最終段階に CR4-WHD-tet が与える影響の検討

6-1 本章の概要

CR4-WHD-tet は、破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 の発現量に全く影響を与えなかった一方で、破骨細胞分化を顕著に阻害した。また、分化の最終段階においては、既に発現している NFATc1 の活性により、NFATc1 自身を含む、DC-STAMP、Acp5 のような遺伝子群の発現が制御されることが知られている。以上のことから、CR4-WHD-tet は、p38 経路を介して分化の最終段階を推進する遺伝子群のうち、いずれかの遺伝子の発現に影響を与えたと推測した。そこで、複数の NFATc1 下流遺伝子の発現に対して CR4-WHD-tet が与える影響を、qPCR 法を用いて検討した。その結果、CR4-WHD-tet は、3 回目の RANKL 刺激による、カテプシン K、OC-STAMP の発現誘導を強力に抑制すること、カルシトニンレセプター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が CR4-WHD-tet によって影響を受けるメカニズムについて検討を行った。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ことから、p38 の核内移行に CR4-WHD-tet が与える影響を検討した。その結果、CR4-WHD-tet 非存在下では明瞭な核内移行が観察されるのに対し、CR4-WHD-tet はこの移行を強力に阻害していることを見出した。

6-2 実験試薬

破骨細胞分化

- ・ 実験用マウス：系統 C57BL/6 (♂, 6w) (清水実験材料)
- ・ Minimum Essential Medium Alpha Medium [α -MEM] (GIBCO)
- ・ Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized) (ナカライテスク)
- ・ FETAL BOVINE SERUM (ニチレイ)
- ・ 23G ニードル (TERUMO)
- ・ 2.5mL シリンジ (TERUMO)
- ・ 6cm dish (FALCON)
- ・ Cell Strainer (FALCON)
- ・ 24 well plate (IWAKI)
- ・ 6 well plate (IWAKI)
- ・ M-CSF (研究室にて調整)

· GST-RANKL	(研究室にて調整)
· Paraformaldehyde	(富士フイルム和光純薬)
· Acetone	(ナカライテスク)
· Ethanol	(富士フイルム和光純薬)
· Naphtol AS-MX phosphate disodium salt	(Sigma Aldrich)
· N-N dimethyl form amide	(富士フイルム和光純薬)
· Fast Red Violet LB salt	(Sigma Aldrich)
· Sodium acetate	(富士フイルム和光純薬)
· Sodium (+) - Tartrate Dihydrate	(富士フイルム和光純薬)
· DAPI solution	(同仁化学研究所)
· Dimethyl sulfoxide	(Sigma Aldrich)
CR4-WHD-tet : MA- WHDDEEF -A-RRRR-U	(Synpeptide Co., Ltd)

免疫蛍光染色

· マイクロスライドグラス	(松波硝子工業株式会社)
· マイクロカバーグラス 丸形 13 mm	(松波硝子工業株式会社)
· D-PBS	(ナカライテスク)
· Paraformaldehyde	(富士フイルム和光純薬)
· Polyoxyethylene(10) Octylphenyl Ether [Triton X-100]	(富士フイルム和光純薬)
· マウス抗 NFATc1 モノクローナル抗体	(abcam)
· ラビット抗 p38 モノクローナル抗体	(Cell Signaling Technology)
· Alexa Fluor 546 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体	(Thermo Fischer Scientific)
· Alexa Fluor 546 標識ヤギ抗ラビット IgG 抗体	(Thermo Fischer Scientific)
· DAPI	(同仁化学研究所)
· Calcium Chloride	(富士フイルム和光純薬)
· Magnesium Chloride	(富士フイルム和光純薬)
· ウシ血清アルブミン (フラクション V)	(富士フイルム和光純薬)

RNA 抽出と逆転写

· Sepasol I [®] -RNA I Super G	(ナカライテスク)
· Chloroform	(ナカライテスク)
· Isopropanol	(富士フイルム和光純薬)
· Ethanol	(富士フイルム和光純薬)

- DEPC 処理水 (ナカライテスク)
- ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO)
- 0.2mL PCR シングルチューブ Flat1000 (NIPPON Genetics)

rtPCR

- THUNDERBIRD® SYBR® qPCR RT Next (TOYOBO)
- PCR 用 96well プレート (INA-OPTIKA)
- PlateSeal (INA-OPTIKA)
- プライマー

gene		primer Sequence (5'→3')	manufacturer
<i>Nfatc1</i>	Forward	CAAGTCTCACCACAGGGCTCACTA	eurofin
	Reverse	GCGTGAGAGGTTTCATTTCTCCAAGT	
<i>acp5</i>	Forward	TTGCGACCATTGTTAGCCACATA	eurofin
	Reverse	TCAGATCCATAGTGAAACCGCAAG	
<i>Mmp9</i>	Forward	CCTGTGTGTTCCCGTTCATCT	invitrogen
	Reverse	CGCTGGAATGATCTAAGCCCA	
<i>Cathepsin K</i>	Forward	GGAAGAAGACTCACCAGAAGC	invitrogen
	Reverse	GCTATATAGCCGCTCCACAG	
<i>Oc-stamp</i>	Forward	TGGGCCCTCCATATGACCTCGAGTAG	invitrogen
	Reverse	TCAAAGGCTTGTAATTTGGAGGAGT	
<i>Dc-stamp</i>	Forward	TCCTCCATGAACAAACAGTTCCAA	eurofin
	Reverse	AGACGTGGTTTAGGAATGCAGCTC	
<i>Integrin α5</i>	Forward	GTGTGTGGCCATGTCCTATCTC	invitrogen
	Reverse	GCATAGCCACAGGTTTCATGGTTC	
<i>Integrin β3</i>	Forward	GCAGGTAGCTCTGTTCCCGTTC	invitrogen
	Reverse	AAGGCGCGTAAGCAATTTCAA	
<i>Oscar</i>	Forward	CCTCCAGACTCCACCAGATA	invitrogen
	Reverse	GGAAATAAGGCACAGGAAGG	
<i>Calsr</i>	Forward	GCAACGCTTTCACTTCTGAGA	invitrogen
	Reverse	GTTCCTGCTGCATGTCCACA	
<i>Gapdh</i>	Forward	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	eurofin
	Reverse	TTGCTGTTGAAGTCGVAGGAG	

6-3 実験方法

6-3-1 CR4-WHD-tet が制御する破骨細胞分化後期特異的遺伝子の同定

6 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨から調製した骨髓細胞を、10 % ウシ胎児血清、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin、および M-CSF を添加した α-MEM を用いて、6 well plate で 24 時間培養し、単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞を得た。前駆細胞を、M-CSF (1/50 希釈) および 66 ng/mL GST-RANKL を含む培地において培養し

た。培養液は、M-CSF および GST-RANKL を含む同じ培地で 24 時間ごとに交換した。RANKL 刺激開始後 48 時間経過した時点で、3 μ M の CR4-WHD-tet または DMSO（コントロール、final0.2 %）を含む培地（M-CSF（1/50 希釈）および 66 ng/mL GST-RANKL を含む）に培養液を置換した。24 時間経過後、D-PBS で細胞を洗浄し、セパゾール（ナカライテスク）を用いて細胞を回収した。回収されたサンプルから、製品説明書に従って RNA を抽出し、1 μ g の total RNA を逆転写してから、4 倍に希釈し cDNA サンプル(25 μ g/mL)とした。得られた cDNA に対して、複数のプライマーセットを用いて rtPCR を行い、遺伝子発現量を定量した。遺伝子発現量は、GAPDH の mRNA 発現量で標準化して表した。

6-3-2 CR4-WHD-tet が NFATc1 の核移行に与える影響の検討

24 well plate に滅菌処理した丸形カバーガラスを入れ、その上に、6 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨から調製した骨髄細胞を、10 %ウシ胎児血清、100 units/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin を添加した α -MEM を用いて M-CSF 存在下で 24 時間培養し、単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞を得た。前駆細胞を、M-CSF（1/50 希釈）および 66 ng/mL GST-RANKL を含む培地において培養した。培地は、M-CSF、GST-RANKL、および CR4-WHD-tet を含む同じ培地で 24 時間ごとに交換した。RANKL 刺激開始後 48 時間経過した時点で、3 μ M CR4-WHD-tet あるいは 0.2% DMSO を含有する α -MEM（66 ng/mL GST-RANKLM-CSF 含有）に培地を入れ替え、培養を継続した。それから 24 時間経過した時点で培地を除去し、PBS で細胞を洗浄してから、4% PFA で室温・10 分間の細胞固定処理を行った。続けて、PBS で洗浄したのち、0.1% Triton X-100 で室温・10 分間の膜透過処理を行った。1% BSA（PBS+）によるブロッキングの後、一次抗体反応を室温で 1 時間行った。続けて、二次抗体反応と DAPI 染色を同時に室温で 1 時間行った。全ての処理を終えたカバーガラスを超純水ですすぎ、スライドガラスに接着し、観察用プレパラートとし、共晶点顕微鏡によって蛍光像を得た。

6-3-3 CR4-WHD-tet が p38 の核移行に与える影響の検討

24 well plate に滅菌処理した丸形カバーガラスを入れ、その上に、6 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨から調製した骨髄細胞を、10 %ウシ胎児血清、100 units/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin を添加した α -MEM を用いて M-CSF 存在下で 24 時間培養し、単球/マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞を得た。前駆細胞を、M-CSF（1/50 希釈）および 66 ng/mL GST-RANKL を含む培地において培養した。培地は、M-CSF、GST-RANKL、および CR4-WHD-tet を含む同じ培地で 24 時間ごとに交換した。RANKL 刺激開始後 48

時間経過した時点で、培地を 100 μ L 除去し、 α -MEM で希釈した 30 μ M CR4-WHD-tet (final 3 μ M) あるいは 2% DMSO (final 0.2%) を 50 μ L 添加し、30 分間培養した。続けて、 α -MEM で希釈した 660 ng/mL の RANKL を 50 μ L 添加した (final 66 ng/mL)。1 時間経過した時点で培地を除去し、PBS で細胞を洗浄してから、4% PFA で室温・10 分間の細胞固定処理を行った。続けて、PBS で洗浄したのち、0.1% Triton X-100 で室温・10 分間の膜透過処理を行った。1% BSA (PBS+) によるブロッキングの後、一次抗体反応を室温で 1 時間行った。続けて、二次抗体反応と DAPI 染色を同時に室温で 1 時間行った。全ての処理を終えたカバーガラスを超純水ですすぎ、スライドガラスに接着し、観察用プレパラートとし、共焦点顕微鏡によって蛍光像を得た。

6-4 結果

6-4-1 CR4-WHD-tet が制御する破骨細胞分化後期特異的遺伝子の同定

NFATc1 下流遺伝子の発現に対して CR4-WHD-tet が与える影響を、qPCR 法を用いて検討した。その結果、CR4-WHD-tet は、3 回目の RANKL 刺激による、カテプシン K、OC-STAMP の発現誘導を強力に抑制すること、その一方で、カルシトニンレセプター (CACLR) の発現を顕著に増強することを見出した (Fig. 40)。

6-4-2 CR4-WHD-tet が NFATc1 の核移行に与える影響の検討

CR4-WHD-tet 存在あるいは非存在下で 3 回目の RANKL 刺激を行い、24 時間後の NFATc1 の核局在に対する効果を検討した。その結果、CR4-WHD-tet は強く分化を抑制するものの、NFATc1 の核局在化には全く影響しないことが明らかになった (Fig. 41)。

6-4-3 CR4-WHD-tet が p38 の核移行に与える影響の検討

3 回目の RANKL 刺激 1 時間後の p38 の核内移行を検討したところ、CR4-WHD-tet 非存在下では明瞭な核内移行が観察された。その一方、CR4-WHD-tet の存在下では、3 回目の RANKL 刺激に伴う p38 の核移行は強力に抑制された。即ち、CR4-WHD-tet は 3 回目の RANKL 刺激に伴う p38 の核移行を強力に阻害することで、破骨細胞分化抑制効果を発揮していることを見出した (Fig. 42)。

6-5 考察

分化の最終段階では、既に発現している NFATc1 の活性により、NFATc1 自身を含む、DC-STAMP、Acp5 のような遺伝子群の発現が制御されることが知られている¹¹。そこで、

これらの NFATc1 下流遺伝子の発現に対する、CR4-WHD-tet の効果を qPCR 法を用いて検討した。その結果、3 回目の RANKL 刺激によるカテプシン K、OC-STAMP の発現誘導を、CR4-WHD-tet は強力に抑制すること、その一方で、カルシトニンレセプターの発現を顕著に増強することを見出した(Fig. 40)。OC-STAMP は、単核破骨細胞が多核化して高い骨吸収活性を発揮するための細胞融合に関わっており、また、カテプシン K は骨吸収に際してコラーゲン繊維を分解する酵素で、両者はともに、破骨細胞の分化が最終段階にあることを示す遺伝子である。また、カルシトニンレセプターは破骨細胞の分化を抑制するホルモンであるカルシトニンの受容体であり、その発現増強は破骨細胞分化を抑制する方向にはたらくと考えられる。これらの結果は、CR4-WHD-tet が分化後期に作用するという前章の結果とよく合致している。

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が CR4-WHD-tet によって影響を受けるメカニズムについて検討を行った。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⁴⁶。そこでまず、CR4-WHD-tet 存在あるいは非存在下で 3 回目の RANKL 刺激を行い、24 時間後の NFATc1 の核局在に対する効果を検討した。その結果、CR4-WHD-tet は強く分化を抑制するものの、NFATc1 の核局在化には全く影響しないことが示された(Fig. 41)。続けて、p38 の核内移行に対する CR4-WHD-tet の効果を検討した。その結果、3 回目の RANKL 刺激 1 時間後の p38 の核内移行を検討したところ、CR4-WHD-tet 非存在下では明瞭な核内移行が観察されるのに対し、CR4-WHD-tet はこの移行を強力に阻害していることを見出した(Fig. 42)。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こらないために、下流遺伝子の発現に影響を受ける、と考えられた (Fig. 43)。

6-6 図表

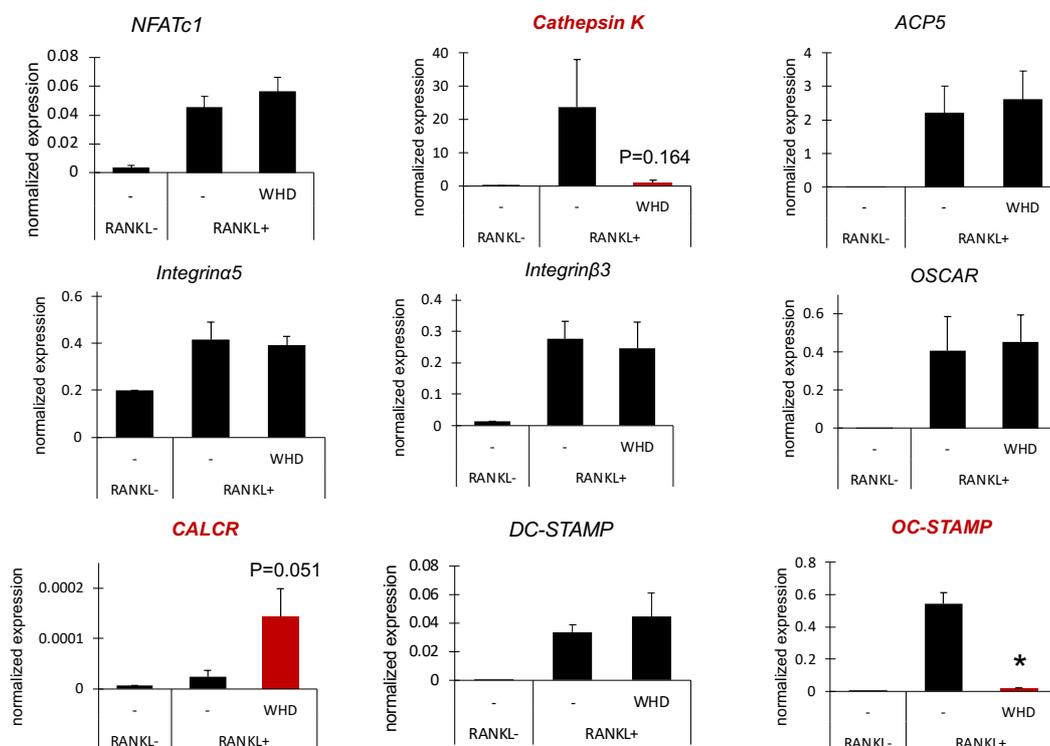


Fig. 40 CR4-WHD-tet は破骨細胞分化の最終段階を誘導する複数の遺伝子の発現に影響を与える

C57BL/6 マウスから採取した骨髄細胞を RANKL 存在下で 48 時間培養したあと、RANKL 存在条件のもと、CR4-WHD-tet の存在・非存在下で 24 時間培養し、サンプルから total RNA を回収し、逆転写後、各遺伝子の mRNA 特異的プライマーを用いた rtPCR によって、転写量を検出、定量した。発現量は GAPDH の発現量で補正した。グラフは独立した 3 回の実験値の平均を、エラーバーはその標準誤差 (S.E.) を表している。* $p < 0.05$ (by Student's *t*-test)

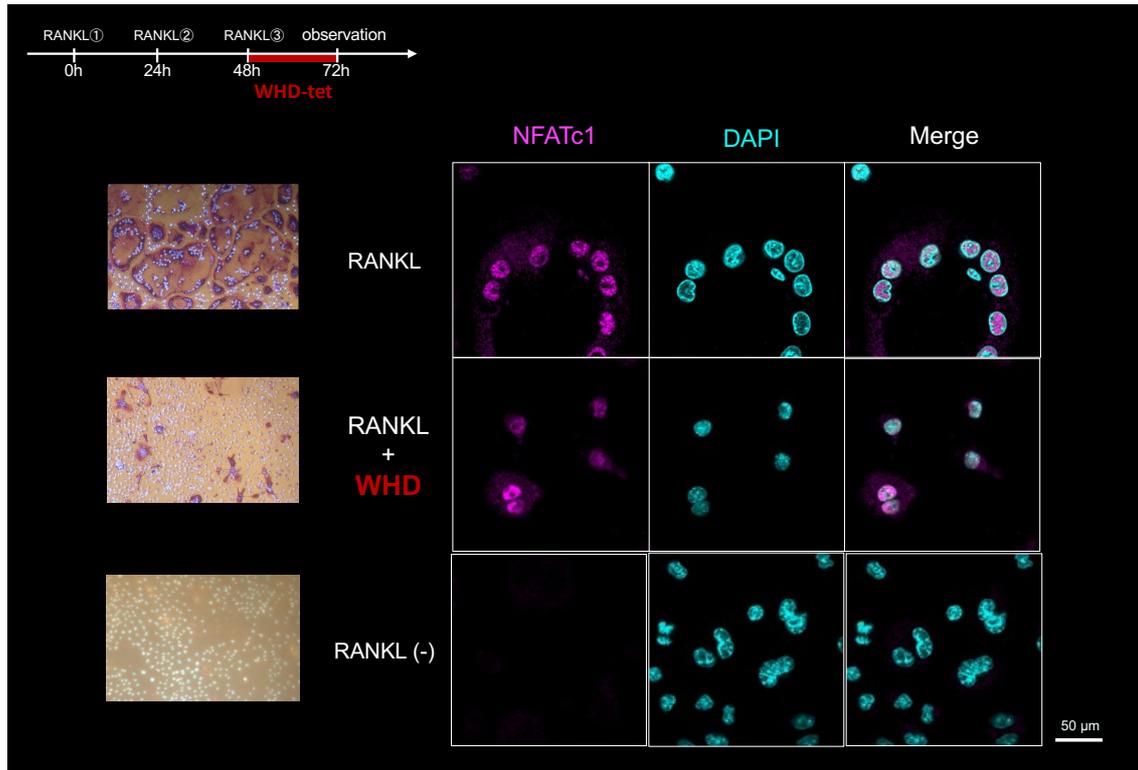


Fig. 41 CR4-WHD-tet は NFATc1 の活性化に伴う核移行には影響を与えない

24 well plate の底に沈めたカバーガラスに破骨細胞を播種し、RANKL 存在下で 48 時間培養し、その後 CR4-WHD-tet 存在あるいは非存在下でさらに 24 時間培養した。PFA 固定、膜透過処理、およびブロッッキング処理を行った後、NFATc1 特異的抗体を用いて、NFATc1 の核への移行を免疫蛍光染色法により可視化した。(Scale bar = 50 μm)

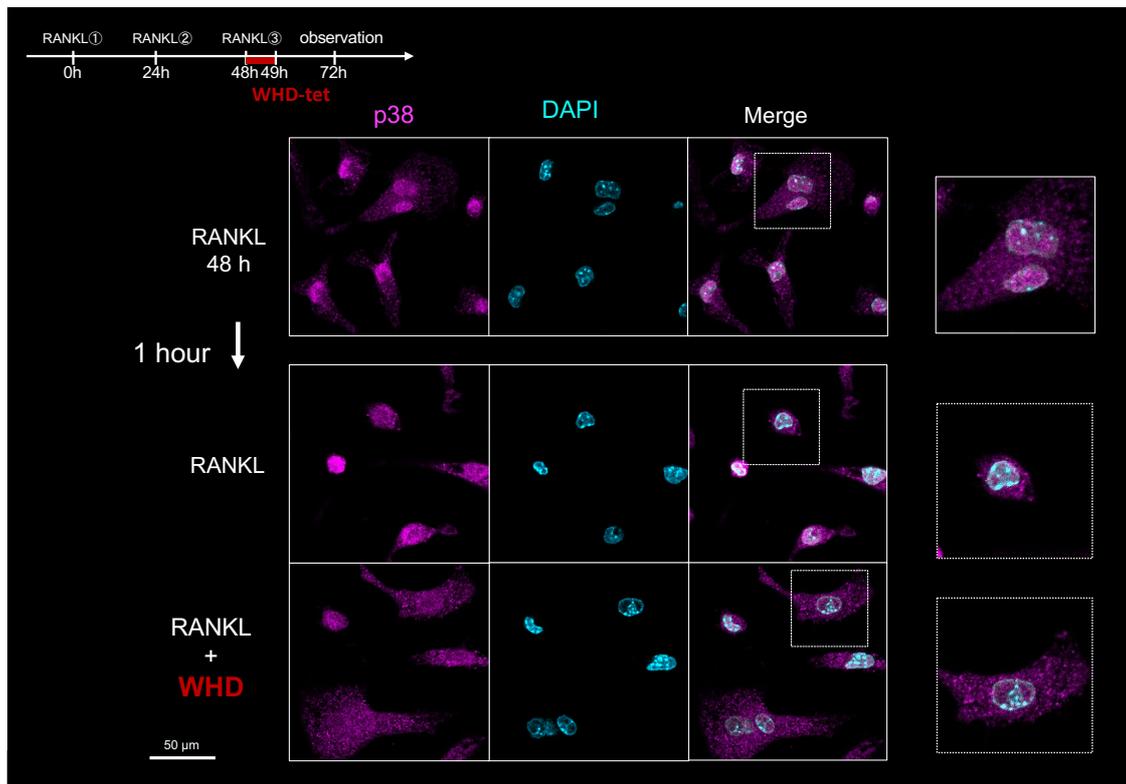


Fig. 42 CR4-WHD-tet は RANKL 刺激に伴う p38 の核移行を阻害する

24 well plate の底に沈めたカバーガラスに破骨細胞を播種し、RANKL 存在下で 48 時間培養後、CR4-WHD-tet あるいは DMSO (final 0.2%) を添加してさらに 30 分経過した後、RANKL (final 66 ng/mL) を加えて 60 分インキュベートした。PFA 固定、膜透過処理、およびブロッキング処理を行った後、p38 特異的抗体を用いて、p38 の核への移行を免疫蛍光染色法により可視化した。(Scale bar = 50 μ m)

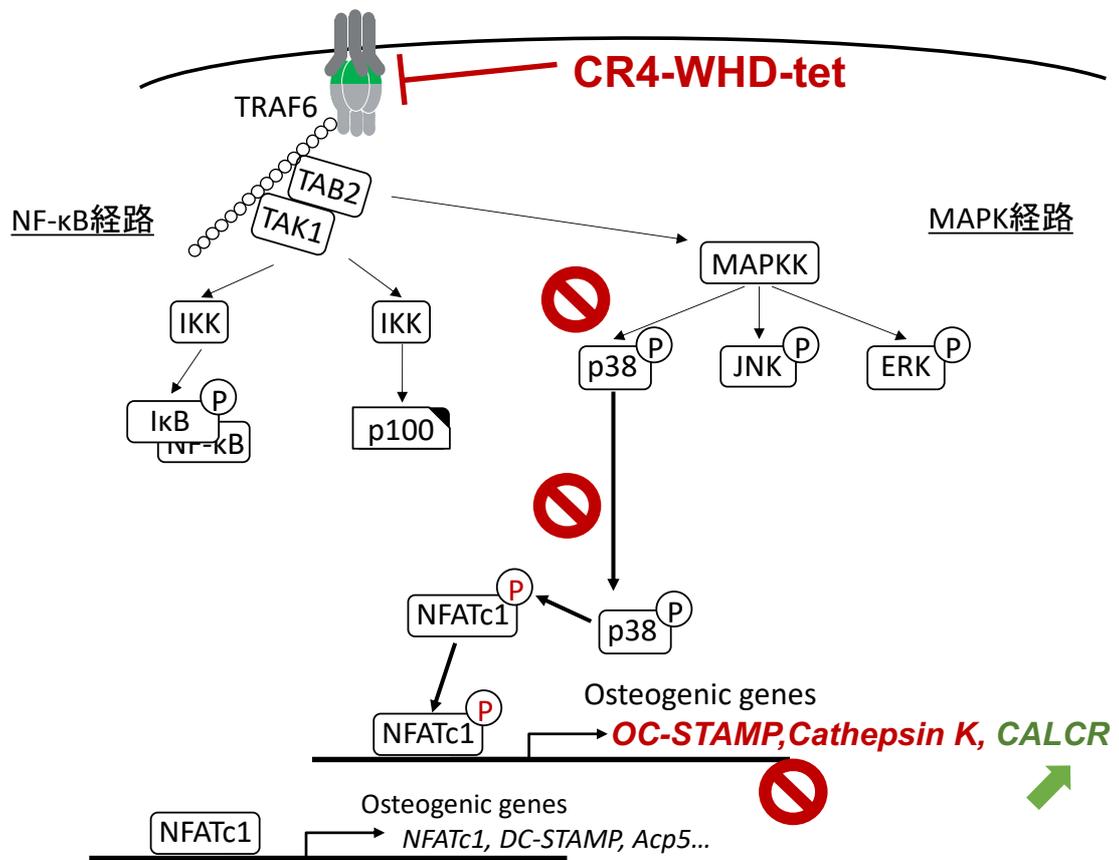


Fig. 43 破骨細胞分化後期に特異的な p38 経路と CR4-WHD-tet の作用スキーム

CR4-WHD-tet は TRAF6 に相互作用する。そのことが、分化後期における p38 の活性化を特異的に抑制し、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こらないために、下流遺伝子の発現が影響を受ける。

第7章 結論

本研究では既存薬とは異なる作用機構を有する新規破骨細胞分化阻害薬の創製を目的として、①RANK の TRAF6 結合モチーフを 4 価で有するペプチドの開発、②多価型ペプチドライブラリースクリーニング法を用いた新規 TRAF6 高親和性 4 価型ペプチドの開発、という 2 つのアプローチを行った。結果、いずれのアプローチにおいても、TRAF6 を標的に破骨細胞分化を制御する既存の分子を遙かに超える性能を有する 4 価型ペプチドを得ることができ、これらの新規四価型ペプチドを有効な破骨細胞分化制御の手段として確立することができた。

①RANK 由来の TRAF6 結合モチーフを 4 価で有するペプチドの開発

今回、TRAF6 が破骨細胞分化に際して担う重要な役割と、その機能を発揮する際に RANK-TRAF6 の間に発揮される多価型結合に着目し、阻害分子の開発を行った。これまでに、RANK-TRAF6 間の結合を標的として破骨細胞分化を阻害しようとする分子の開発例が報告されているが、両者の間に発揮される多価型結合を念頭に置いて開発されてはならず、TRAF6 への結合親和性と破骨細胞分化抑制効果は高くなかった^{19,20}。一方で、本研究において開発した RANK-tet は、TRAF6 に多価型結合することで親和性を大きく向上し、破骨細胞分化を強力に阻害した初めての例である。このことは、TRAF6 と RANK の間に発揮されている多価型結合がそのシグナル伝達に特に重要であることを示しており、その制御のためには制御分子が多価型結合を発揮することが特に有効であることを明瞭に示した。さらにこの結合は、TRAF-C の R392 に特に大きく依存していた。また、この戦略により、既報の分子 (L-T6DP1)¹⁹ と比べて、その機能モチーフを短縮できた。このように、CR4-RANK-tet は、最小限の必須構造で、従来の薬剤を大きく上回る薬理活性を発揮する有効な破骨細胞分化阻害薬となり得る。

②多価型ペプチドライブラリースクリーニング法を用いた新規 TRAF6 高親和性 4 価型ペプチドの開発

多価型結合の発揮が TRAF6 の制御に極めて重要であること、RANK-tet の結合は TRAF-C の R392 に強く依存しているという①における知見をもとに、多価型ペプチドライブラリースクリーニング法を用いて、TRAF6 に対して高い親和性を発揮して破骨細胞分化を阻害する分子、CR4-RRK-tet および CR4-WHD-tet を同定することができた。このうち、CR4-WHD-tet は個体レベルでも十分な骨破壊抑制効果を発揮した。CR4-WHD-tet の作用の解析から、破骨細胞分化では、分化後期 (RANKL 刺激開始後 48 時間目以降) に特異的な未知の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、

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明らかになった。更なる研究により、これまで存在が知られていなかった、破骨細胞分化後期特異的なシグナル経路を解明し、その経路に重要な役割を果たしている分子群を同定することが期待できる。

p38 経路は破骨細胞分化制御のための標的として有力とされてきたが、これまでの阻害剤はその組織非特異性から強い副作用を示し、治療薬としての開発は困難だった。一方で、CR4-WHD-tet は、分化後期という限定的な状態にある破骨細胞の、しかも p38 シグナルのみを特異的に制御できること、体内から速やかに排出されながらも骨への集積する性質を有すること、から、従来の p38 阻害剤が有する課題を打破できる可能性を有する。

また、CR4-WHD-tet の TRAF6 への結合は、下流のシグナルのうち p38 が関与する特定経路のみに対して阻害効果を示すという、極めてユニークな性質を持つことを独自に見出した。これまで TRAF6 下流の複数のシグナルの発生を個別に制御する分子の開発例はない。CR4-WHD-tet の解析から得られた「最上流の分子 (RANK-TRAF6 相互作用) を標的とした場合でも、その下流のシグナルのうち特定経路を阻害することが可能である」、という知見は「シグナル伝達の fine tuning」という新たな創薬コンセプトの創出へと展開することが期待でき、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実現できると期待できる。

謝辞

本論文の執筆にあたり、多くの方々にご指導ご鞭撻を賜りました。

同志社大学生命医科学部 西川喜代孝 教授には、6年間にわたり、数え切れないほどのご指導を頂きました。研究に関してのみならず、1人の人間としてあるべき姿にいたるまで、ありとあらゆるご指導を賜りました。省みれば、これまでの私はあまりにも拙く、言ってもわからず何をするにも一度失敗をはさむ、見ていて大変もどかしい学生であったと思います。先生に対して失礼な態度をとってしまったこともままあったと思います。それでも先生は、私を決して見放さず、その時の私に必要な事を説き続けてくださいました。試行錯誤のもとに失敗を積み重ねながら結果を出して前に進んでゆくということをあまり経験せずにきた私にとって、辛かった時期もありましたが、先生の下でそれを経験し、自らの成果を形にするにまで至れたことは、大変な自信と人間的成長に繋がりました。分子生命化学研究室で学んだこと、身につけた哲学は全て、他ならぬ先生の下であったからこそ、得ることのできたものであり、生涯忘れることはありません。ここに深く感謝いたします。

同志社大学生命医科学部 高橋美帆 助教には、配属当初から現在に至るまで、終始的確なご指導を頂きました。決して追いつくことのできない偉大な背中を見せ続ける父のような西川先生に対して、私に寄り添ってくださる母のような高橋先生の存在は、大きな支えでありました。研究の遂行にあたって道に迷ってしまった際にも、先生が助言やちょっとしたお声かけをくださったおかげで、なんとか最後まで自分の脚で立って研究活動が続けることができました。心より感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、同志社大学生命医科学部 西川恵三 教授には、先生が同志社大学にいらっしゃる以前から、骨破壊モデルのご紹介およびその実験解析の手技指導をはじめ、研究遂行にかかわる数々のご助言を頂きました。その他にも、研究にかかわるご相談など様々なことに日頃から快くご協力くださいました。先生との出会いとご厚意なくして、本研究を遂行することは不可能でありました。厚く御礼申し上げます。

同志社大学生命医科学部 和久剛 准教授には、網羅的遺伝子発現解析にかかわる手法、および分子生物学的実験について、先生ご自身の豊富なご経験に基づく数多くのアドバイスを頂きました。先生のご協力あってこそ、私の研究の根幹をなす重要な発見を見出すことができました。厚く御礼申し上げます。

本研究の中で必須の材料であった TRAF-C リコンビナントタンパク、GST-RANKL、M-CSF 産生細胞については、東京大学医科学研究所 井上純一郎 先生、田口祐 先生にご供与いただきました。ここに御礼申し上げます。

本実験で用いたペプチドの合成では、同志社女子大学薬学部 川崎清史 教授、西原冴佳 助教の多大なご協力を賜りました。心より感謝申し上げます。

国立感染症研究所 島崎健太郎氏、東京大学薬学研究科 近江純平氏、東京大学薬学研究科 佐藤和佳氏は、在学当初より、博士学生・研究者としてかくあるべきという姿を私に常に見せてくださりました。みなさんの背中を見ながら分子生命化学研究室で研究を行うことができたことは大変心強く、私にとって、大変幸せなことであったと思います。深く御礼申し上げます。

分子生命化学研究室の皆様には、常日頃から多くのご支援を賜りました。本研究の基礎となる材料および知見を見出し、多大な成果として私に残してくださった水野紗緒里氏、川端宏氏には、はじめに厚く御礼申しあげます。さらに、至らぬ面の多い私と共に研究に勤しみ、実りあるディスカッションを繰り返してくださったグループの皆さん（島崎健太郎氏、中村友美氏、田上萌恵氏、小塚大揮氏、武智啓吾氏、檜原花織氏、増田悠里氏、平井友基氏）には、厚く感謝申し上げます。博士後期課程の間、特に最後の 1 年は、自身のやるべきことに追われ、皆さんに冷たい態度をとってしまう時期もあったと思います。それでも私を温かく支えてくださった先輩・同期の皆さん、慕ってくれた後輩の皆さん、本当にありがとうございました。そして、博士学生として誰よりも近い立場から寄り添い、支えてくださった佐藤和佳氏、濱信一郎氏の両名には、一層深く感謝申し上げます。

家族のみなさん、3 年前、ようやく就職先が決まったかと安心したであろうところに、突然博士後期課程への進学を口にしました私には、驚いたことと思います。それでも私の決断を受け入れ、暖かく見守り支援し続けてくださり、ありがとうございました。その協力があったからこそ、私はここまで来ることができました。

この文章を綴るにあたり、今まで自分があまりにも多くの方々のご厚意とご好意に支えられてきたことを強く実感し、感涙にむせぶ思いであります。私は大変な幸せ者であると思います。みなさまのご厚意に少しでも報いることができたならば、至上の喜びであります。

最後に、この 6 年間、私の健全な精神を支えてくれたたくさんのスクールアイドルたち、健康な身体を支えてくれた地球規模のラーメン屋さんに感謝いたします。これからも応援しております。そして、誰よりも親身に僕を支えてくれたとある同級生に深い感謝を述べるとともに、今後とも変わらぬお付き合いをお願いし、謝辞の文章といたします。

※本研究は、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム、および、科学研究費助成事業の支援を受けたものです。

引用文献

1. Yoshimura, N. *et al.* Trends in osteoporosis prevalence over a 10-year period in Japan: the ROAD study 2005-2015. *J. Bone Miner. Metab.* **40**, 829–838 (2022).
2. 骨粗鬆症財団骨粗鬆症学会 日本骨代謝学会. 2015年骨粗鬆症治療ガイドライン. (日本骨代謝学会, 2015).
3. Salhotra, A., Shah, H. N., Levi, B. & Longaker, M. T. Mechanisms of bone development and repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 696–711 (2020).
4. Al-Bari, A. A. & Al Mamun, A. Current advances in regulation of bone homeostasis. *FASEB Bioadv* **2**, 668–679 (2020).
5. Song, S., Guo, Y., Yang, Y. & Fu, D. Advances in pathogenesis and therapeutic strategies for osteoporosis. *Pharmacol. Ther.* **237**, 108168 (2022).
6. Reid, I. R. & Billington, E. O. Drug therapy for osteoporosis in older adults. *Lancet* **399**, 1080–1092 (2022).
7. Park, J. H., Lee, N. K. & Lee, S. Y. Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation. *Mol. Cells* **40**, 706–713 (2017).
8. Dougall, W. C. *et al.* RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.* **13**, 2412–2424 (1999).
9. Kong, Y. Y. *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**, 315–323 (1999).
10. Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 292–304 (2007).
11. Ono, T. & Nakashima, T. Recent advances in osteoclast biology. *Histochem. Cell Biol.* **149**, 325–341 (2018).
12. Walsh, M. C., Kim, G. K., Maurizio, P. L., Molnar, E. E. & Choi, Y. TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NFkappaB and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL. *PLoS One* **3**, e4064 (2008).
13. Deng, L. *et al.* Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351–361 (2000).
14. Wang, C. *et al.* TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346–351 (2001).
15. Kobayashi, N. *et al.* Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J.* **20**, 1271–1280 (2001).

16. Mizukami, J. *et al.* Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 992–1000 (2002).
17. Darnay, B. G., Ni, J., Moore, P. A. & Aggarwal, B. B. Activation of NF- κ B by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF- κ B-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J. Biol. Chem.* **274**, 7724–7731 (1999).
18. Chung, J. Y., Park, Y. C., Ye, H. & Wu, H. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J. Cell Sci.* **115**, 679–688 (2002).
19. Ye, H. *et al.* Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* **418**, 443–447 (2002).
20. Moriya, J. *et al.* Structure-Based Development of a Protein-Protein Interaction Inhibitor Targeting Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6. *J. Med. Chem.* **58**, 5674–5683 (2015).
21. Nishikawa, K. *et al.* A multivalent peptide library approach identifies a novel Shiga toxin inhibitor that induces aberrant cellular transport of the toxin. *FASEB J.* **20**, 2597–2599 (2006).
22. Stearns-Kurosawa, D. J., Collins, V., Freeman, S., Tesh, V. L. & Kurosawa, S. Distinct physiologic and inflammatory responses elicited in baboons after challenge with Shiga toxin type 1 or 2 from enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **78**, 2497–2504 (2010).
23. Nishikawa, K. Recent progress of Shiga toxin neutralizer for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Arch. Immunol. Ther. Exp* **59**, 239–247 (2011).
24. Tsutsuki, K., Watanabe-Takahashi, M., Takenaka, Y., Kita, E. & Nishikawa, K. Identification of a peptide-based neutralizer that potently inhibits both Shiga toxins 1 and 2 by targeting specific receptor-binding regions. *Infect. Immun.* **81**, 2133–2138 (2013).
25. Kato, M., Watanabe-Takahashi, M., Shimizu, E. & Nishikawa, K. Identification of a wide range of motifs inhibitory to shiga toxin by affinity-driven screening of customized divalent peptides synthesized on a membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 1092–1100 (2015).

26. Mitsui, T. *et al.* Affinity-Based Screening of Tetravalent Peptides Identifies Subtype-Selective Neutralizers of Shiga Toxin 2d, a Highly Virulent Subtype, by Targeting a Unique Amino Acid Involved in Its Receptor Recognition. *Infect. Immun.* **84**, 2653–2661 (2016).
27. Omi, J. *et al.* The inducible amphisome isolates viral hemagglutinin and defends against influenza A virus infection. *Nat. Commun.* **11**, 162 (2020).
28. Watanabe-Takahashi, M. *et al.* Identification of a peptide motif that potently inhibits two functionally distinct subunits of Shiga toxin. *Commun Biol* **4**, 538 (2021).
29. 西川喜代孝、高橋美帆、安西聖敬、川端宏、水野紗緒利、井上純一郎、田口祐. 破骨細胞分化制御ペプチド、および、破骨細胞分化に関連する疾患の含有する治療薬. 特許 7156635、出願人；学校法人同志社、国立大学法人東京大学、2022 年 10 月 19 日
30. 西川喜代孝、高橋美帆、島崎健太郎、長田雅也、丸義朗、塚原富士子、内藤幹彦、柴田識人. p210 PH 結合ペプチドおよび慢性骨髄性白血病治療薬. 特願 2018-210822、出願人；学校法人同志社、学校法人東京女子医科大学、2019 年 10 月 31 日
31. 佐藤和佳. APP の細胞内輸送および代謝制御による新規アミロイド β 産生抑制法の確立. (同志社大学大学院, 2022).
32. 西川喜代孝、高橋美帆、近江純平、濱信一郎. ヘマグルチニン結合ペプチド、および、これを含むインフルエンザウイルス感染症の予防・治療薬. 特許 6910043、出願人；学校法人同志社、2021 年 07 月 28 日
33. 水野紗緒里. NF- κ B シグナル分子 (TRAF6) を標的とした抗炎症薬の開発. (同志社大学, 2014).
34. Anzai, M. *et al.* A tetravalent peptide that binds to the RANK-binding region of TRAF6 via a multivalent interaction efficiently inhibits osteoclast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **636**, 178–183 (2022).
35. Derossi, D., Chassaing, G. & Prochiantz, A. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* **8**, 84–87 (1998).
36. Futaki, S. *et al.* Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* **276**, 5836–5840 (2001).
37. Wadia, J. S. & Dowdy, S. F. Protein transduction technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 52–56 (2002).
38. 西川喜代孝、高橋美帆、加藤美帆子. Stx1 毒性阻害 4 価ペプチドおよびこれを含む疾患治療薬. 特許第 5897178 号、出願人；学校法人同志社、2016 年 3 月 30 日

39. 西川喜代孝、高橋美帆、三井貴瑛、清水英子、山崎伸二. Stx2 阻害 4 価ペプチドおよびこの Stx2 阻害 4 価ペプチドを含む治療薬. 特許 6422046 号、出願人；学校法人同志社、公立大学法人大阪府立大学、2018 年 11 月 14 日.
40. Tomimori, Y. *et al.* Evaluation of pharmaceuticals with a novel 50-hour animal model of bone loss. *J. Bone Miner. Res.* **24**, 1194–1205 (2009).
41. Maack, T., Johnson, V., Kau, S. T., Figueiredo, J. & Sigulem, D. Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: a review. *Kidney Int.* **16**, 251–270 (1979).
42. Kasugai, S., Fujisawa, R., Waki, Y., Miyamoto, K. & Ohya, K. Selective drug delivery system to bone: small peptide (Asp)₆ conjugation. *J. Bone Miner. Res.* **15**, 936–943 (2000).
43. Ishizaki, J., Waki, Y., Takahashi-Nishioka, T., Yokogawa, K. & Miyamoto, K.-I. Selective drug delivery to bone using acidic oligopeptides. *J. Bone Miner. Metab.* **27**, 1–8 (2009).
44. Takayanagi, H. *et al.* Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell* **3**, 889–901 (2002).
45. Matsumoto, M., Sudo, T., Saito, T., Osada, H. & Tsujimoto, M. Involvement of p38 Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathway in Osteoclastogenesis Mediated by Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL). *J. Biol. Chem.* **275**, 31155–31161 (2000).
46. Matsumoto, M. *et al.* Essential Role of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Cathepsin K Gene Expression during Osteoclastogenesis through Association of NFATc1 and PU.1*. *J. Biol. Chem.* **279**, 45969–45979 (2004).
47. Wei, S. & Siegal, G. P. p38 MAPK as a potential therapeutic target for inflammatory osteolysis. *Adv. Anat. Pathol.* **14**, 42–45 (2007).
48. 松本征仁. p38MAP キナーゼを介した破骨細胞の分化段階的制御. *生化学* **79**, 140–144 (2007).

図表目録

Fig. 1	骨粗鬆症の年代別有病率	7
Fig. 2	骨恒常性維持における破骨細胞と骨芽細胞の機能的平衡	8
Fig. 3	破骨細胞分化シグナルの概要	9
Fig. 4	RANK と TRAF6 との相互作用の模式図	10
Fig. 5	TRAF6 を標的とした既存の破骨細胞分化阻害剤	11
Fig. 6	4 価型核構造と RANK-tet・RANK-mono のモチーフ	21
Fig. 7	RANK-tet はクラスター効果を発揮して TRAF-C に結合する	22
Fig. 8	RANK-tet は R392 特異的に TRAF-C に結合する	23
Fig. 9	Arg による膜透過修飾を施した RANK-tet 誘導体	24
Fig. 10	各種膜透過型 RANK-tet が破骨細胞分化に与える影響	25
Fig. 11	CR4-RANK-tet がマウス骨髄細胞の生存に与える影響	26
Fig. 12	多価型ペプチドライブラリーシートスクリーニング法の概要	33
Fig. 13	多価型ペプチドライブラリーのスクリーニングの様子	34
Fig. 14	スクリーニングによって得られた新規 4 価型ペプチド	35
Fig. 15	新規ペプチドがマウス骨髄細胞の生存に与える影響	36
Fig. 16	新規ペプチド (0.3 μ M) が破骨細胞分化に与える影響	37
Fig. 17	新規ペプチド (3 μ M) が破骨細胞分化に与える影響	38
Fig. 18	CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet は、CR4-RANK-tet と比較して有意に強く破骨細胞分化を阻害する	39
Fig. 19	新規ペプチドの TRAF-C への結合親和性	40
Fig. 20	膜透過型ペプチドの TRAF-C への結合親和性	41
Fig. 21	CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の骨破壊モデルマウスに対する治療効果	47
Fig. 22	骨破壊モデルマウスの海綿骨立体構造指標に CR4-WHD-tet が与える影響	48
Fig. 23	CR4-RRK-tet および CR4-WHD-tet を投与されたマウスの体重変化	49
Fig. 24	CR4-WHD-tet および CR4-RRK-tet の ¹²⁵ I 標識	50
Fig. 25	CR4-RRK-tet および CR4-WHD-tet の排出と体内残存量	51
Fig. 26	CR4-RRK-tet および CR4-WHD-tet の投与 3 時間後における体内分布	52
Fig. 27	CR4-RRK-tet および CR4-WHD-tet の投与 6 時間後における体内分布	53
Fig. 28	CR4-RRK-tet および CR4-WHD-tet の骨組織への集積	54
Fig. 29	ビオチン標識 WHD-tet は内在性 TRAF6 と直接的に結合する	66
Fig. 30	CR4-WHD-tet は NFATc1 の発現に影響しない	67
Fig. 31	CR4-WHD-tet は破骨細胞分化後期に作用する	68

Fig. 32	CR4-WHD-tet は破骨細胞分化前期・中期には作用しない	69
Fig. 33	分化後期において CR4-WHD-tet は NFATc1 発現に影響しない.....	70
Fig. 34	分化後期特異的に発現が上昇し、CR4-WHD-tet によってそれが抑制される破骨細胞 分化関連因子の探索.....	71
Fig. 35	CR4-WHD-tet は 3 回目の RANKL 刺激に続く p38 の活性化を特異的に阻害する	72
Fig. 36	p38 阻害剤は分化後期に投与しても破骨細胞分化を阻害する	73
Fig. 37	CR4-WHD-tet は 3 回目の RANKL 刺激に続く NF- κ B 経路の活性化には影響しない	74
Fig. 38	CR4-WHD-tet は 1 回目の RANKL 刺激に続く NF- κ B 経路の活性化には影響しない	75
Fig. 39	CR4-WHD-tet の作用スキームの概要	76
Fig. 40	CR4-WHD-tet は破骨細胞分化の最終段階を誘導する複数の遺伝子の発現に影響を与 える	83
Fig. 41	CR4-WHD-tet は NFATc1 の活性化に伴う核移行には影響を与えない	84
Fig. 42	CR4-WHD-tet は RANKL 刺激に伴う p38 の核移行を阻害する	85
Fig. 43	破骨細胞分化後期に特異的な p38 経路と CR4-WHD-tet の作用スキーム	86