



Title	小分子化合物ライブラリーLOPAC1280を用いた破骨細胞分化関連物質の探索
Author(s)	水田, 亜希子
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/55536
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

小分子化合物ライブラリー LOPAC¹²⁸⁰ を用いた
破骨細胞分化関連物質の探索

大阪大学大学院歯学研究科 分子病態口腔科学専攻
口腔分化発育情報学講座（顎顔面口腔矯正学教室）

水田 亜希子

学位論文

小分子化合物ライブラリーLOPAC¹²⁸⁰を用いた 破骨細胞分化関連物質の探索

大阪大学大学院歯学研究科 分子病態口腔科学専攻
口腔分化発育情報学講座（顎顔面口腔矯正学教室）

水田 亜希子

緒言

骨組織は形成と吸収を繰り返し、骨・カルシウムの代謝を調節しながらダイナミックにリモデリングを行っている。骨リモデリングは、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスの上に成り立ち、骨組織の機能と形態を維持するために重要である¹⁾。この相反する性質をもつ二つの細胞の存在が、骨組織の機能と形態を厳密に調節している。しかし、炎症、加齢、閉経、ストレスなど様々な要因により破骨細胞による骨吸収が亢進すると、このバランスが崩れ、骨密度が低下して歯周病や骨粗鬆症などの代謝性骨疾患が発症する^{2,3)}。高齢化に伴って増加しているこれらの骨吸収が亢進する疾患に対応するためには、破骨細胞分化の分子メカニズムを明らかにし、破骨細胞形成を選択的に阻害する有効な手段を確立することが望まれる。

破骨細胞は、マクロファージ系 Colony Forming Unit (CFU-M)、前駆破骨細胞を経て、成熟破骨細胞に分化誘導される⁴⁾。成熟破骨細胞は活性化されると骨を吸収し、最終的にアポトーシスにより一生を終える^{5,6)}。近年、腫瘍壊死因子 (TNF) スーパーファミリーに属する Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) が、破骨細胞の各分化段階において非常に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた⁷⁻¹¹⁾。RANKL は活性型ビタミン D₃ や副甲状腺ホルモン、インターロイキン (IL) -6, IL-11 などの刺激によって、骨芽細胞、骨髄ストローマ細胞に発現誘導される膜結合型サイトカインである¹²⁾。RANKL は TNF 転換酵素様タンパク質分解酵素によって細胞膜から切り離されることが報告されている¹³⁾。したがって、RANKL は細胞表面に発現する膜結合型タンパク質としてのみならず、可溶性タンパク質として広範囲に情報を伝達することが可能で、炎症性骨吸収などの骨破壊に関与していることが示唆されている。

骨髄細胞を可溶性のリコンビナント RANKL と Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) の存在下で培養すると破骨細胞に分化することも明かにされている¹⁴⁾。また、

RANKL のノックアウトマウス、または、破骨細胞表面に発現する受容体 Receptor Activator of NF- κ B (RANK) のノックアウトマウスが作製され、破骨細胞分化が著しく障害されることによって大理石骨病様の病態が現れることが両マウスにおいて明らかとなった¹⁵⁻¹⁸⁾。これらの結果からも、RANKL-RANK 系が実際の生体においても破骨細胞分化に重要な役割を果たしていると考えられている。

RANKL は RANK と結合することにより、細胞内へそのシグナルを伝達し、最終的にその経路を統合するマスター転写因子 Nuclear Factor of Activated T cells c1 (NFATc1) を誘導、活性化して破骨細胞を分化誘導する¹⁹⁻²¹⁾。

免疫系において、NFAT は T 細胞活性化に重要な IL-2 の発現を誘導する転写因子として発見され、免疫抑制剤である Cyclosporin A や Tacrolimus の直接の標的となるタンパク質脱リン酸化酵素 Protein Phosphatase 2B (Calcineurin) によって、その転写活性が調節を受けている²²⁻²⁶⁾。NFAT ファミリーは 4 種類の遺伝子から構成され、そのひとつである NFATc1 は RANKL 刺激による破骨細胞の分化過程でその発現が上昇する遺伝子として同定された。NFATc1 遺伝子欠損マウスの ES 細胞からは破骨細胞が誘導できないことや、NFATc1 を強制発現させることにより RANKL 非依存的に破骨細胞を誘導できることから、NFATc1 の機能は破骨細胞分化に必須であると考えられる^{20,21)}。NFATc1 は最終的に脱リン酸化することにより核内へ移行して破骨細胞分化に必要な複数の遺伝子の転写因子として働く。

以上のように、破骨細胞分化のために、NFATc1 の活性化までに至るシグナル分子の働きは徐々に解明されつつあるが、未だ不明な点が残っており、NFATc1 活性化以降の分子メカニズムも完全に解明されていない。

また近年、有機化学的な手法を駆使して生体内分子の機能や反応を分子レベルから扱おうとするケミカルバイオロジーという概念が提唱され、この概念は生体物質の相互作用とその制御というメカニズムを解明するヒントになると同時に、創薬のための新たな手法をもたらしたり、あるいは薬品が生体に与える影響・効果の解析に別の観点を与えている。特

に創薬という意味では、小さく単純な構造の分子を応用することができれば、生体由来のシグナル分子をそのまま使うよりも安価で制御しやすい薬物となるのではないかと期待されており、生体高分子を狙った分子標的薬もすでに実用化が進んできている。小分子化合物ライブラリーLOPAC¹²⁸⁰は機能不明の生体物質群だが、創薬や分子メカニズム解明のヒントになりうるツールとして注目されつつある。

そこで、本研究においては、破骨細胞の分化制御メカニズムを明らかにするため、NFATに対する影響の有無をスクリーニング的に解析するシステムを作り、これによって小分子化合物ライブラリーLOPAC¹²⁸⁰より破骨細胞分化に関連のある物質を探索するとともに、見出された物質の作用機序を解析した。

実験方法

前駆破骨細胞および破骨細胞の誘導

本研究では、マウス骨髄細胞由来マクロファージ系細胞 (M-BMM ϕ) ²⁷⁾とマウス単球系細胞株 RAW264.7 細胞 ^{19,28)}を前駆破骨細胞として用いた。M-BMM ϕ は、7 週齢雄性 ddY マウス (ケアリー, 大阪) の大腿骨から骨髄細胞を採取し、50 ng/ml M-CSF (R&D, Minneapolis) および 10 % FBS (ジャパン・バイオシーラム, 広島) を含む Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification (α -MEM ; Sigma #M4526, St. Louis) 培地にて 37 °C, 5 % CO₂ 気相下で 500 個/ml の濃度で播種後、3 日間培養して誘導した。さらに、M-BMM ϕ を 50 ng/ml M-CSF, 100 ng/ml soluble RANKL (sRANKL ; PeproTech EC LTD, London) および 10 % FBS を含む α -MEM 培地にて 37 °C, 5 % CO₂ 気相下で 3~6 日間培養することにより破骨細胞を得た ⁸⁾。RAW264.7 細胞は、100 ng/ml sRANKL および 10 % FBS 含有 α -MEM にて 500 個/ml の濃度で播種後、3~6 日間培養し、破骨細胞様形態への分化を誘導した。破骨細胞への分化の評価は、細胞を酒石酸耐性フォスファターゼ (TRAP) 法により染色し、3 核以上の TRAP 陽性細胞数を計測することにより行った。なお、すべての実験で α -MEM は 2 mM L-Glutamine (Sigma), 100 units/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin (nacalai tesque, 京都) をあらかじめ添加した後に使用した。

TRAP 染色

TRAP 染色は、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄した後、10 % Glutaraldehyde を用いて固定し、TRAP 溶液 [0.1 M Sodium Acetate, 0.1 M Acetic Acid, 10 mg/ml Naphtol AS-MX Phosphate (Sigma), 0.1 % Triton X-100, 0.3 M Potassium Tartrate, 0.3 mg/ml Fast Red

Violet LB Salt (Sigma)] にて 37 °C で 10 分間反応させることにより行った。

ルシフェラーゼアッセイ用株化培養細胞の作成

RAW264.7 細胞に対して pGL4.30 (Promega #E8481, Madison) を TransFast Transfection Reagent (Promega) を用い、遺伝子導入した。3 日後、Hygromycin B (和光純薬工業、大阪) を培地に 0.1 mg/ml 添加し、約 2 週間培養し続け、クローン化した。これらの細胞は sRANKL 投与後にルシフェラーゼ活性の上昇が確認できたものだけをその後の実験に使用した (Figure 1)。

LOPAC¹²⁸⁰

破骨細胞分化を制御する化合物のライブラリースクリーニングは、小分子化合物ライブラリーLOPAC¹²⁸⁰ (Sigma-Aldrich) を用いて行った。化合物のスクリーニングには、後述するルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼアッセイによるスクリーニングでは、各薬物化合物はすべて培地中で最終濃度が 10 μ M となるように添加して使用した。小分子化合物ライブラリーLOPAC¹²⁸⁰ の内容を Figure 2 に示す。

薬物

Phenserine (Sigma #P0111), Donepezil (Sigma #D6821) は Dimethyl sulfoxide (和光純薬工業) に対して溶解し、培養液に対して Dimethyl sulfoxide が 0.1 % となるように調整した上で使用した。

Butyrylcholinesterase from equine serum (Sigma #C4290) Recombinant mouse

acetylcholinesterase (R&D Systems #P21836), Mecamylamine hydrochloride (Sigma #M9020), Scopolamine hydrobromide trihydrate (Sigma #S1875), Tubocurarine chloride hydrate (Sigma #T2379), Dihydro- β -erythroidine hydrobromide (DHE; TOCRIS #2349), Methyllycaconitine citrate salt hydrate (MLA; Sigma #M168), Memantine hydrochloride (Sigma #M9292), Asoxime chloride (SANTA CRUZ #sc-207304), α -bungarotoxin (calbiochem #203980) は蒸留水にて溶解し、培養液に対して蒸留水が 0.1 % となるように調整した上で使用した。

ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼアッセイ恒常保有 RAW264.7 細胞を播種した翌日に sRANKL およびオーファンリガンドを処置し、24 時間後にルシフェラーゼアッセイ系 (Promega #E1501) のプロトコルに従って処理し、発光基質を加えた後、ルミノメーター (GloMax 20/20n, Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を検出した。

偽コリンエステラーゼ活性の測定

コリンエステラーゼキット・リキテックコリンエステラーゼ (Roche Diagnostics Inc, Japan) を用いて測定した。プロトコルに従って培養液にヘキサシアノ鉄 (Ⅲ) 酸カリウムを加えた後、ヨウ化ブチリルチオコリンを基質として加え、吸光度変化量を測定することにより偽コリンエステラーゼ活性を測定した。

統計処理

実験結果は、平均値 $\pm$ 標準誤差で表し、ANOVA にて分散分析後 Tukey-Kramer test を用

いて比較し，危険率 5% 以下を有意差ありと判定した。

結果

M-BMM ϕ 細胞から破骨細胞への誘導

M-BMM ϕ 細胞を sRANKL の存在下で 3～6 日間培養すると、TRAP 陽性の多核巨大細胞である破骨細胞への分化が誘導された (Figure 3)。

NFAT 活性を指標とした小分子化合物ライブラリー LOPAC¹²⁸⁰ のスクリーニング

NFATc1 を指標に、小分子化合物ライブラリー LOPAC¹²⁸⁰ を用いて、破骨細胞分化に影響を与える物質をスクリーニングした。まず、Figure 1 に示すプロトコルによりルシフェラーゼ遺伝子恒常保有株を作製した³⁰⁾。この細胞株は sRANKL および Tacrolimus 処置に応答してルシフェラーゼ活性が変化し、NFATc1 活性に影響を与える薬物のスクリーニングに適していることを確認した。このスクリーニングの結果は Figure 4 に示した。NFAT を活性化させるいくつかの物質について TRAP assay を行った。TRAP 陽性多核破骨細胞数は、control と比較して Riluzole では約 0.5 倍、Phenamil では約 0.8 倍、Roscovitine では約 1.0 倍、Harmine では約 0.5 倍、Phenserine では約 3 倍であった (date not shown)。特に破骨細胞分化の促進を認めた Phenserine に着目して、更なる検討を加えることにした。

Phenserine の破骨細胞分化に対する影響

Phenserine はアセチルコリンエステラーゼ阻害薬 (Figure 5) で、アルツハイマー病の治療薬として臨床応用されている³¹⁾。

NFATc1 は破骨細胞分化におけるマスター転写因子であるため¹⁹⁻²¹⁾、Phenserine が破骨細

胞分化を亢進させることが予測される。実際、RAW264.7 細胞を sRANKL 存在下で 5 日間培養して破骨細胞に分化誘導した際に Phenserine を添加した場合、破骨細胞分化を促進する結果が得られた (Figure 6)。RAW264.7 細胞 (破骨前駆細胞) の分化誘導培地中に、Phenserine を 0 nM (コントロール)、250 nM、500 nM、1 μ M 又は 2 μ M となるよう添加し、破骨前駆細胞の破骨細胞への分化 (TRAP 陽性多核破骨細胞数) を調べた。Phenserine の効果は 500 nM でピークに達し、さらに高濃度ではその効果は減少した。

Donepezil の破骨細胞分化に対する影響

Donepezil も、Phenserine と同様にアセチルコリンエステラーゼ阻害薬 (Figure 5) として、アルツハイマー病の治療薬として臨床応用されている³²⁻³⁴⁾。

そのため、Donepezil が Phenserine と同様に破骨細胞分化を亢進させることが予測される。RAW264.7 細胞を sRANKL 存在下で 5 日間培養して破骨細胞に分化誘導した際にドネペジルを添加した場合、破骨細胞分化を促進する結果が得られた (Figure 7)。RAW264.7 細胞 (破骨前駆細胞) の分化誘導培地中に、Donepezil を 0 nM (コントロール)、250 nM、500 nM、1 μ M 又は 10 μ M となるよう添加し、破骨前駆細胞の破骨細胞への分化を調べた。Donepezil は 1 μ M の濃度で最も破骨細胞を分化誘導した。

血清中の偽コリンエステラーゼの破骨細胞分化に対する影響

本実験に用いた培養液に添加した血清中には、偽コリンエステラーゼ活性が存在するため、その破骨細胞分化に及ぼす影響を検討した。ブチリルチオコリンを基質としてコリンエステラーゼを測定したところ、血清 A は 125 mU/ml、血清 B は 625 mU/ml と、両者の間には 500 mU/ml の差が認められた (Figure 8)。以下、本研究では、125 mU/ml の血清を使用した。

血清 A を使用した場合は、血清 B の約 3 倍の成熟破骨細胞が形成された。

偽コリンエステラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼの破骨細胞分化に対する影響

アセチルコリンエステラーゼ阻害剤である Phenserine と Donepezil によって破骨細胞分化が促進されたことより、破骨細胞分化にアセチルコリンが関与している可能性が示唆されたため、偽コリンエステラーゼまたはリコンビナントアセチルコリンエステラーゼを使用して、アセチルコリン類を枯渇させて、破骨細胞分化への影響を検討した。破骨前駆細胞 (M-BMM ϕ 由来破骨前駆細胞または RAW264.7 細胞) を、sRANKL 存在下で 5 または 6 日間培養して破骨細胞に分化誘導する際に、偽コリンエステラーゼ (500 mU/ml)、またはリコンビナントアセチルコリンエステラーゼ (2.5 ng/ml) を培養液中に添加した。これらの添加により破骨細胞分化は抑制された (Figure 9, 10)。次に、M-BMM ϕ 細胞を sRANKL 存在下で 6 日間培養して分化誘導した際の培地中に、リコンビナントアセチルコリンエステラーゼ (2.5 ng/ml 又は 25 ng/ml) を添加し、破骨前駆細胞の破骨細胞への分化を調べた (Figure 11)。アセチルコリンエステラーゼの添加により、TRAP 陽性破骨細胞数は有意に減少した。

アセチルコリン受容体阻害薬の破骨細胞分化に対する影響

アセチルコリン受容体は、ニコチン性アセチルコリン受容体とムスカリン性アセチルコリン受容体に分類される。破骨細胞分化に関与している受容体を検討するために、RAW264.7 細胞および M-BMM ϕ 細胞にニコチン性アセチルコリン受容体の阻害薬を処置して破骨細胞分化への影響を調べた。ニコチン性アセチルコリン受容体の阻害薬である Mecamylamine³⁵⁾を処置したところ、RAW264.7 細胞および M-BMM ϕ 細胞のどちらの細胞においても破骨

細胞分化を有意に抑制する結果が得られた (Figure 12)。RAW264.7 細胞にムスカリン性アセチルコリン受容体の阻害薬である Scopolamine³⁶⁾を処置したところ、破骨細胞分化への影響は認められなかった (Figure 13)。

ニコチン性アセチルコリン受容体サブタイプの検討

ニコチン性アセチルコリン受容体は、イオンチャネルー体受容体であり、主に筋肉型受容体と神経型受容体に分類される。RAW264.7 細胞に筋肉型受容体の阻害薬である Tubocurarine³⁷⁾を処置して破骨細胞分化への影響を調べたところ、コントロールと比較して破骨細胞数の差は認められなかった。つまり、Tubocurarine を添加しても、破骨細胞への分化には影響がなかった (Figure 14)。

マクロファージにおけるニコチン性アセチルコリン受容体の分子構造として、 $\alpha 7$ ホモ五量体と、 $\alpha 4\beta 2$ ヘテロ五量体が存在することが報告されている^{38,39)}。

RAW264.7 細胞または M-BMM ϕ 細胞に $\alpha 7$ ホモ五量体の特異的阻害薬である Methyllycaconitine (MLA) (Figure 15) を処置して破骨細胞分化への影響を調べたところ、どちらの細胞においても破骨細胞分化を強力に抑制する結果が得られた (Figure 16)。

また、RAW264.7 細胞に $\alpha 7$ ホモ五量体の非特異的阻害薬である Memantine, Asoxime, α -bungarotoxin を処置して破骨細胞分化への影響を調べたところ、それぞれの阻害薬において程度は低いですが、破骨細胞の分化が有意に抑制された (Figure 17)。

次に、RAW264.7 細胞に $\alpha 4\beta 2$ ヘテロ五量体の阻害薬である Dihydro- β -erythroidine (DHE)⁴⁰⁾を処置して破骨細胞分化への影響を調べた (Figure 18)。RAW264.7 細胞を sRANKL 存在下で 5 日間培養して分化誘導した際の培地中に DHE を 10 nM, 100 nM 又は 1 μ M となるように添加した。 $\alpha 4\beta 2$ ヘテロ五量体の特異的阻害薬である DHE を添加しても、コントロールと比較して、分化誘導された破骨細胞数に差が認められなかった。

考察

破骨細胞分化機構において RANKL が同定され⁷⁻¹⁰⁾, さらに RANKL と M-CSF による骨髓細胞単独での in vitro 破骨細胞分化系が確立し¹⁴⁾, RANKL による破骨細胞分化を制御するシグナル伝達の研究は飛躍的に進歩した。RANKL あるいは RANK ノックアウトマウスは破骨細胞分化の著しい障害により大理石骨病様の病態を示すことが明らかにされてきた¹⁵⁻¹⁸⁾。さらには, RANKL-RANK シグナル伝達経路を最終的に統合する NFATc1 の誘導, 活性化が破骨細胞を分化誘導することが明らかにされた¹⁹⁻²¹⁾。一方, NFATc1 は脱リン酸化されることにより核内へ移行し, 転写を活性化する。NFATc1 を強制発現させることにより RANKL 非依存的に破骨細胞分化を誘導することができること, あるいは Cyclosporin A や Tacrolimus によって NFATc1 の脱リン酸化を阻害することによって破骨細胞分化を抑制することが報告されている²⁴⁻²⁶⁾。

そこで本研究では, NFATc1 の転写因子活性を指標として用い, 機能不明の生体物質群である小分子化合物ライブラリーLOPAC¹²⁸⁰ から破骨細胞分化に影響を与える物質を検討した。まず, スクリーニングテストとして, なるべく簡便で迅速に結果を知ることのできるルシフェラーゼアッセイ系を選択したが, 破骨細胞分化のモデルとして主に用いられている M-BMM ϕ 細胞, RAW264.7 細胞は遺伝子導入の効率が低い細胞であるため, RAW264.7 細胞を元にルシフェラーゼベクターを恒常的に保有する細胞株を作製した。作製した細胞を用いて小分子化合物ライブラリーLOPAC¹²⁸⁰ に対するスクリーニングテストを行った結果, NFAT 活性を亢進させる物質のひとつとして Phenserine に注目した。

今回, スクリーニングにより発見した Phenserine はアセチルコリンエステラーゼ阻害薬で, アルツハイマー病の治療薬として臨床応用されていることが知られている³¹⁾。Phenserine に対する検証を進めた結果, Phenserine が特異的に NFATc1 を活性化させること, そして破骨細胞分化を促進することが判明した。また, Phenserine と同様にアセチルコリンエステラー

ぜの阻害薬である Donepezil³²⁻³⁴⁾についても検討したところ同様に、破骨細胞分化を促進することが明らかになった。これらのことから、破骨細胞分化においてアセチルコリンが関与するという仮説を立てた。

アセチルコリンはアセチルコリンエステラーゼにより分解される生理活性物質であるため、破骨細胞分化に及ぼすアセチルコリンエステラーゼの影響を検討した。また、破骨細胞分化の研究に必ず用いられる血清中には、偽コリンエステラーゼが存在することが考えられるため、その影響について検討した。偽コリンエステラーゼ活性を、ブチリルチオコリンを基質として測定したところ、血清の種類により 125 mU/ml と 625 mU/ml のように約 5 倍の差があることが判明した。そして、血清間の差である 500 mU/ml の馬血清由来の偽コリンエステラーゼを添加して検討したところ、高偽コリンエステラーゼ血清とほぼ同様の影響が確認された。また、リコンビナントアセチルコリンエステラーゼの添加によっても破骨細胞の分化が有意に抑制された。

アセチルコリン受容体には、ニコチン性アセチルコリン受容体とムスカリン性アセチルコリン受容体が存在する。破骨細胞分化誘導の際にそれぞれの阻害薬を処置し、破骨細胞分化に関与している受容体について検討した。ニコチン性アセチルコリン受容体阻害薬である Mecamylamine は破骨細胞分化を抑制したが、一方、ムスカリン性アセチルコリン受容体阻害薬である Scopolamine は破骨細胞分化へ影響を及ぼさなかったことから、破骨細胞分化の促進にはニコチン性アセチルコリン受容体に関与していると考えられた。

さらに、ニコチン性アセチルコリン受容体は、神経筋接合部に存在し横紋筋の収縮に関与する筋肉型受容体と、中枢神経系に存在しシナプス伝達に関与している神経型受容体に分類される。筋肉型受容体阻害薬である Tubocurarine について検討したところ、破骨細胞分化へ影響を及ぼさないことが判明した。このことより、破骨細胞分化において神経型受容体に関与している可能性を考え、更なる検討を加えた。

近年、神経型受容体の分子構造と認識されてきた $\alpha 7$ ホモ五量体と $\alpha 4\beta 2$ ヘテロ五量体が、

末梢のマクロファージにおいても存在することが報告されている^{38,39)}。本研究で使用した RAW264.7 細胞はマクロファージ系培養細胞株であることより、 $\alpha 7$ ホモ五量体の特異的阻害薬である MLA について検討したところ、破骨細胞分化を強力に抑制することが判明した。非特異的ではあるが、 $\alpha 7$ ホモ五量体の阻害薬である Memantine, Asoxime および α -bungarotoxin も破骨細胞分化を抑制した。一方、 $\alpha 4\beta 2$ ヘテロ五量体の阻害薬である DHE⁴⁰⁾ は、破骨細胞分化へ影響を及ぼさないことが判明した。

以上より、破骨細胞分化においてアセチルコリンが関与しており、破骨細胞表面に存在する受容体がニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 7$ ホモ五量体である可能性が示唆された。本研究では培養液中にアセチルコリンを添加した検討は行っていないが、コリンエステラーゼやその阻害薬による検討から、アセチルコリンが破骨細胞の分化に関与している可能性が示唆された。さらに、破骨細胞分化に関与するアセチルコリンを前駆破骨細胞自身が分泌する可能性も考えられた。また、このアセチルコリンは前駆破骨細胞表面に存在するニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 7$ ホモ五量体へ結合することにより、その分化が誘導される可能性が考えられる。今後は、アセチルコリン分泌とその制御のタイミングやニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 7$ ホモ五量体の存在を確認する必要があると考えられる。

本研究において、NFATc1 を活性化させる物質として Phenserine を見出した。さらに、Phenserine は破骨細胞分化を促進することを確認した。その作用機序として、アセチルコリンエステラーゼの阻害が、破骨細胞分化に関与しており、さらにはアセチルコリンが破骨細胞分化を促進している可能性が示唆された。また、ニコチン性アセチルコリン受容体阻害薬、特に、 $\alpha 7$ ホモ五量体特異的阻害薬である MLA によって破骨細胞分化が強力に抑制されたことより、ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 7$ ホモ五量体を介したシグナルが破骨細胞分化の情報伝達経路を調節している可能性が示唆された。Figure 19 にそのシエーマを示した。

今後は NFATc1 のシグナル伝達・分化制御のメカニズムのさらなる解明を目指すとともに、

破骨細胞の分化を制御する薬物開発についても検討していきたい。

結論

本研究において、分子化合物ライブラリーLOPAC 1280 より NFATc1 を亢進させる物質として Phenserine を見出した。また、その作用機序の解析からマウスの破骨細胞分化におけるシグナル伝達経路について以下のことを明らかにした。

1. Phenserine は、前駆破骨細胞において NFATc1 の活性化を亢進した。
2. Donepezil は、Phenserine と同様、破骨細胞の分化を促進した。
3. 培養液中への偽コリンエステラーゼやリコンビナントアセチルコリンエステラーゼの添加は、破骨細胞分化を抑制する。
4. ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 7$ ホモ五量体の特異的拮抗作用を持つ MLA により、破骨細胞分化は抑制された。

以上より、破骨細胞の分化誘導にはアセチルコリンが関与し、前駆破骨細胞に存在するニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 7$ ホモ五量体を介した情報伝達により制御されていると示唆された。

謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて頂き，終始御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分化発育情報学講座（顎顔面口腔矯正学教室），高田健治教授ならびに同顎口腔病因病態制御学講座（薬理学教室），上崎善規教授に深甚なる謝意を表します。そして，本研究の遂行にあたり，常に御懇篤なる御助言，御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（薬理学教室），佐伯万騎男講師ならびに同顎口腔機能再建学講座（歯科補綴学第一教室），江草宏助教に心より感謝申し上げます。

最後に，この研究に対して多大なる御協力と御助言を頂いた口腔分化発育情報学講座（顎顔面口腔矯正学教室）に顎口腔病因病態制御学講座（薬理学教室）の皆様は厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Manolagas, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21(2): 115-137.
- 2) Roodman, G. D. (1999). Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 27(8): 1229-1241.
- 3) Rodan, G. A. and Martin, T. J. (2000). Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289(5484): 1508-1514.
- 4) Kurihara, N., Chenu, C., et al. (1990). Identification of committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells formed in long term human marrow cultures. *Endocrinology* 126(5): 2733-2741.
- 5) Fuller, K., Owens, J. M., et al. (1993). Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med* 178(5): 1733-1744.
- 6) Kameda, T., Ishikawa, H., et al. (1995). Detection and characterization of apoptosis in osteoclasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 207(2): 753-760.
- 7) Lacey, D. L., Timms, E., et al. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93(2): 165-176.
- 8) Yasuda, H., Shima, N., et al. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to *trance/rankl*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7): 3597-3602.
- 9) Suda, T., Takahashi, N., et al. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20(3): 345-357.
- 10) Lacey, D. L., Tan, H. L., et al. (2000). Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 157(2): 435-448.

- 11) Theill, L. E., Boyle, W. J., et al. (2002). Rank-l and rank: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 20: 795-823.
- 12) Udagawa, N., Takahashi, N., et al. (1999). Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/rankl but not macrophage colony-stimulating factor: Receptor activator of nf-kappa b ligand. *Bone* 25(5): 517-523.
- 13) Lum, L., Wong, B. R., et al. (1999). Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (tnf-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of trance, a tnf family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 274(19): 13613-13618.
- 14) Takayanagi, H. (2005). Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* 83(3): 170-179.
- 15) Franzoso, G., Carlson, L., et al. (1997). Requirement for nf-kappab in osteoclast and b-cell development. *Genes Dev* 11(24): 3482-3496.
- 16) Iotsova, V., Caamano, J., et al. (1997). Osteopetrosis in mice lacking nf-kappab1 and nf-kappab2. *Nat Med* 3(11): 1285-1289.
- 17) Kong, Y. Y., Yoshida, H., et al. (1999). Opgl is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397(6717): 315-323.
- 18) Dougall, W. C., Glaccum, M., et al. (1999). Rank is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 13(18): 2412-2424.
- 19) Hsu, H., Lacey, D. L., et al. (1999). Tumor necrosis factor receptor family member rank mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7): 3540-3545.
- 20) Takayanagi, H., Kim, S., et al. (2002). Induction and activation of the transcription factor nfatc1 (nfat2) integrate rankl signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3(6): 889-901.

- 21) Boyle, W. J., Simonet, W. S., et al. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423(6937): 337-342.
- 22) Friedman, J. and Weissman, I. (1991). Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: One in the presence and one in the absence of csa. *Cell* 66(4): 799-806.
- 23) Liu, J., Farmer, Jr, J. D., et al. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin a and fkbp-fk506 complexes. *Cell* 66(4): 807-815.
- 24) Awumey, E. M., Moonga, B. S., et al. (1999). Molecular and functional evidence for calcineurin- α and β isoforms in the osteoclast: Novel insights into cyclosporin a action on bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 254(1): 248-252.
- 25) Igarashi, K., Hirotsu, H., et al. (2004). Cyclosporine a and fk506 induce osteoclast apoptosis in mouse bone marrow cell cultures. *Bone* 35(1): 47-56.
- 26) Miyazaki, M., Fujikawa, Y., et al. (2007). Tacrolimus and cyclosporine a inhibit human osteoclast formation via targeting the calcineurin-dependent nfat pathway and an activation pathway for c-jun or mitf in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 26(2): 231-239.
- 27) Kobayashi, K., Takahashi, N., et al. (2000). Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the odf/rankl-rank interaction. *J Exp Med* 191(2): 275-286.
- 28) Hirotsu, H., Tuohy, N. A., et al. (2004). The calcineurin/nuclear factor of activated t cells signaling pathway regulates osteoclastogenesis in raw264.7 cells. *J Biol Chem* 279(14): 13984-13992.
- 29) Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 227(5259): 680-685.

- 30) Egusa, H., Doi, M., et al. (2011). The small molecule harmine regulates NFATc1 and Id2 expression in osteoclast progenitor cells. *Bone* 49(2): 264-74.
- 31) Winblad, B., Giacobini, E., et al. (2010). Phenserine efficacy in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 22(4): 1201-8.
- 32) Zhong, Y., Zheng, X., et al. (2012). Effect of CYP2D6*10 and APOE Polymorphisms on the Efficacy of Donepezil in Patients with Alzheimer's Disease. *Am J Med Sci.* 14
- 33) Sozio, P., Cerasa, LS., et al. (2012). Transdermal donepezil on the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 8: 361-8.
- 34) Finucane, MM., Finucane, TE. Discontinuing donepezil or starting memantine for Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 366(23): 2227-8.
- 35) Arias, HR., Targowska-Duda, KM., et al. (2010). Different interaction between tricyclic antidepressants and mecamylamine with the human $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor ion channel. *Neurochem Int.* 56(4):642-9.
- 36) Drevets, WC., Zarate, CA. Jr, Furey, ML. (2012). Antidepressant Effects of the Muscarinic Cholinergic Receptor Antagonist Scopolamine. *Biol Psychiatry.* 3223(12): 891-8.
- 37) Li GQ, Correia MJ. (2011). Responses of pigeon vestibular hair cells to cholinergic agonists and antagonists. *Brain Res.* 1373: 25-38.
- 38) Hijioka, M., Matsushita, H., et al. (2012). $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptor agonist attenuates neuropathological changes associated with intracerebral hemorrhage in mice. *Neuroscience.* 222: 10-9.
- 39) van der Zanden EP., Snoek SA., et al. (2009). Vagus nerve activity augments intestinal macrophage phagocytosis via nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4\beta 2$. *Gastroenterology.* 137(3): 1029-39.

- 40) Xiao, C., Nashmi, R., et al. (2009). Chronic nicotine selectively enhances $\alpha 4\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors in the nigrostriatal dopamine pathway. *J Neurosci.* 29(40): 12428-39.

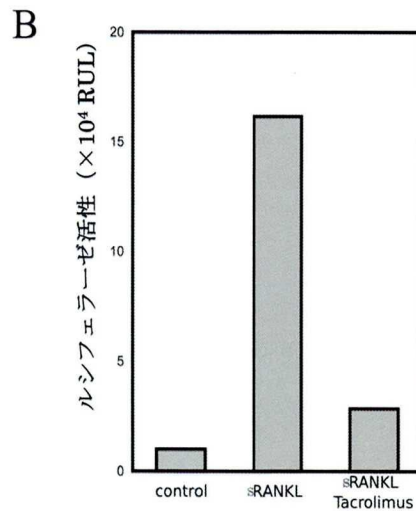
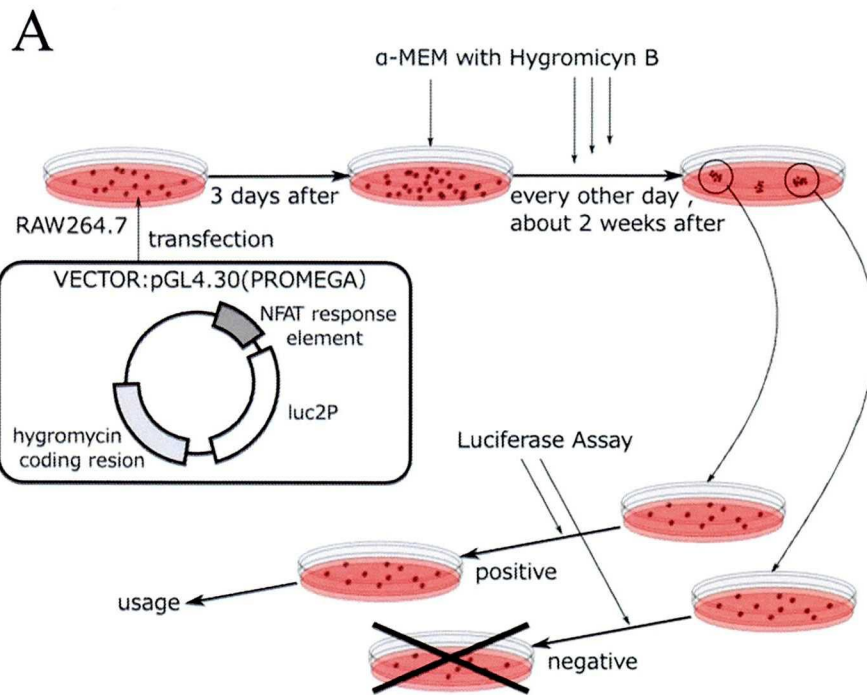


Figure 1 ルシフェラーゼ遺伝子恒常保有細胞株の作製プロトコル

A : ベクターpGL4.30 には NFAT が作用することによってルシフェラーゼを転写する領域と抗生物質 Hygromycin B 耐性遺伝子が存在する。これを RAW264.7 細胞に形質導入し、Hygromycin B 存在下で長期継代することでルシフェラーゼベクター恒常保有株を作製する。

B : 作製した細胞に対して sRANKL (100 ng/ml) および Tacrolimus (1 μ M) 処置後 24 時間で融解し、ルシフェラーゼ活性を測定した。sRANKL によって活性が上昇し、Tacrolimus の併用によって抑制されており、NFATc1 の挙動に対応すると考えられる。

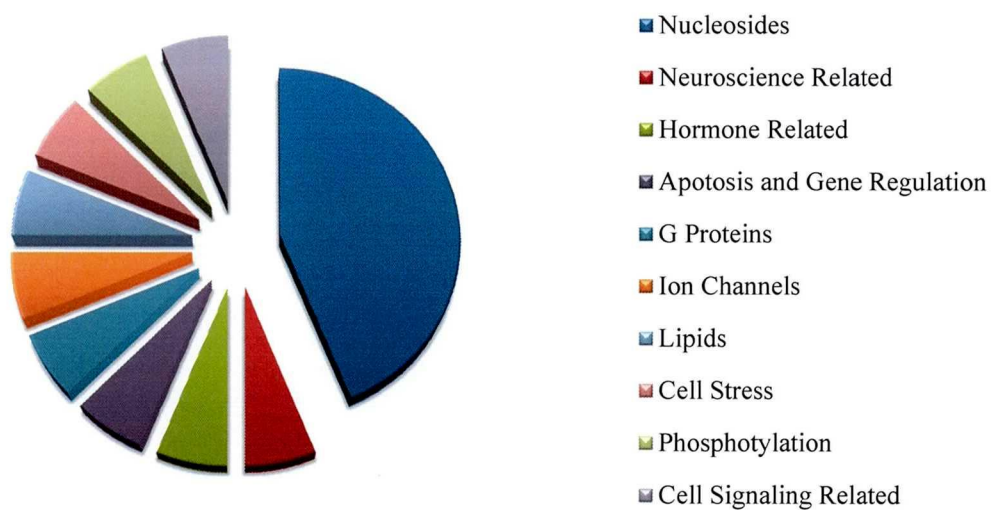


Figure 2 小分子化合物ライブラリーLOPAC¹²⁸⁰ (Sigma-Aldrich) の内容

1280 の小分子化合物から構成されており、 核酸や、G タンパク、イオンチャネル、また細胞シグナル伝達に関与する物質などが含まれている。

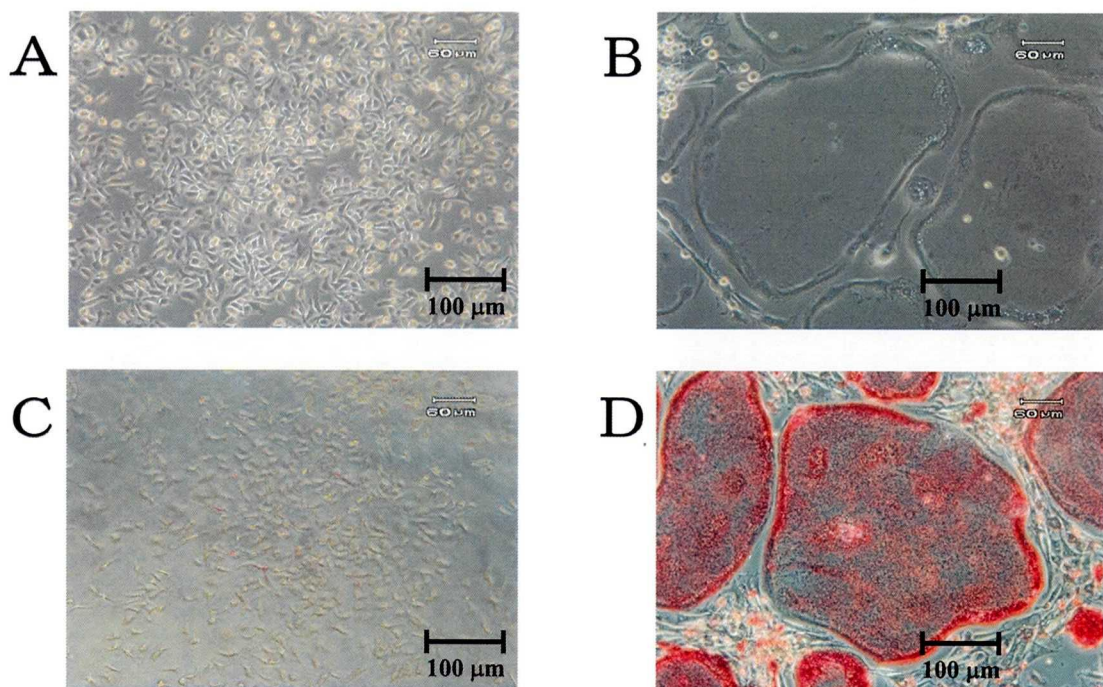


Figure 3 前駆破骨細胞および破骨細胞の位相差顕微鏡像および TRAP 染色像

マウス骨髄細胞を 50 ng/ml M-CSF 存在下で 3 日間培養した (A)。さらに M-CSF (50 ng/ml) および sRANKL (100 ng/ml) 存在下で 3~6 日間培養し、破骨細胞を誘導した (B)。両者の TRAP 染色を示す (C, D)。各図は 4 回の実験結果の代表例を示す。

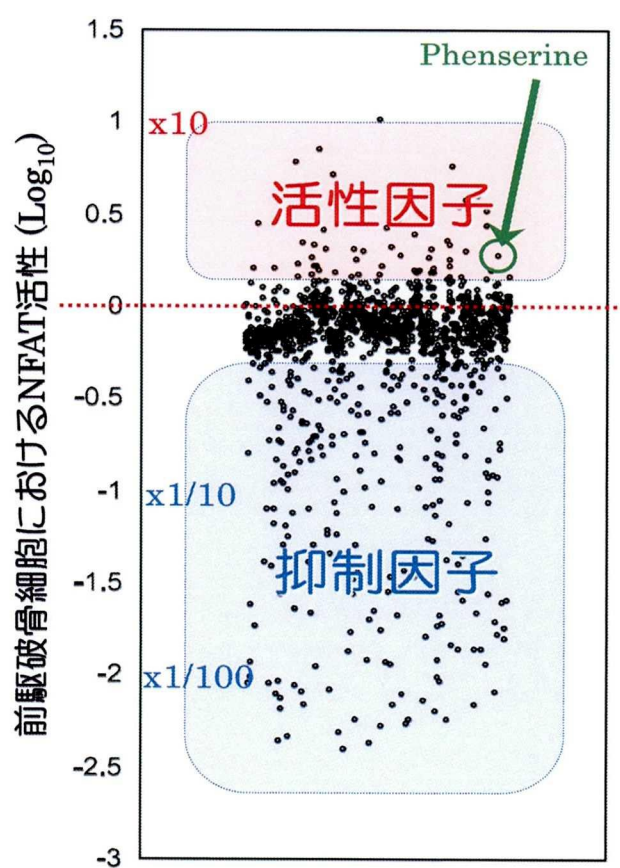
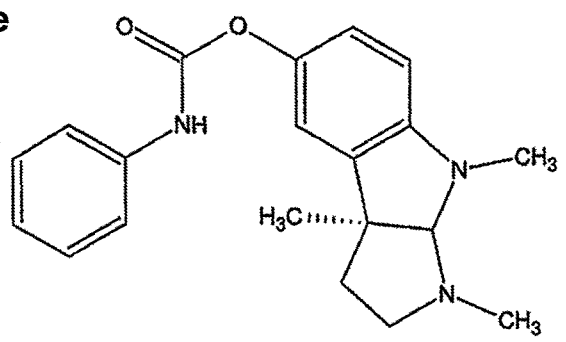


Figure 4 小分子化合物ライブラリーLOPAC¹²⁸⁰ の NFAT 活性に対するスクリーニングの結果

作製した細胞に対して sRANKL (100 ng/ml) および LOPAC¹²⁸⁰ (各 10 μM) を処置し、24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。sRANKL のみ処置したものを 0 とし、それぞれの NFAT 活性を対数値で示す。NFAT 活性を上昇させる物質として Phenserine に着目した。

Phenserine



Donepezil

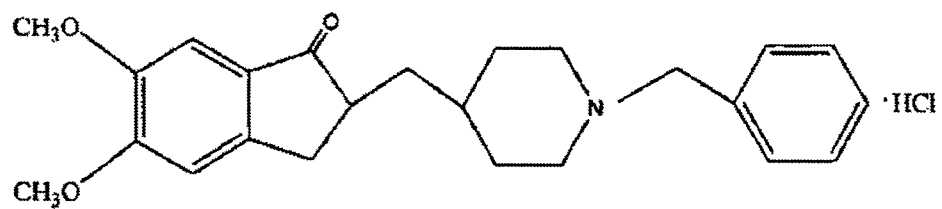


Figure 5 Phenserine および Donepezil の構造式

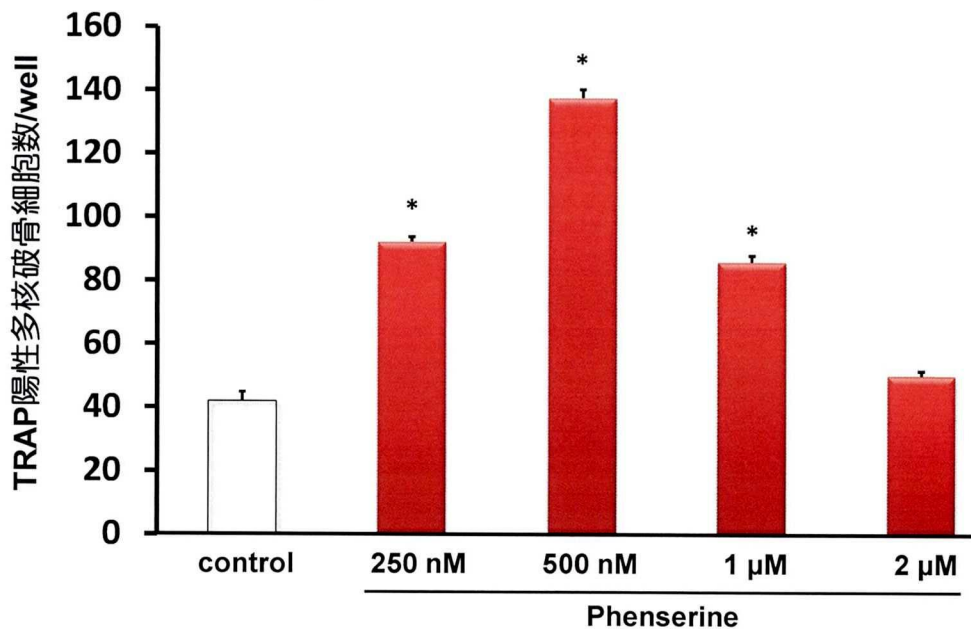


Figure 6 Phenserine による破骨細胞分化促進

前駆破骨細胞の破骨細胞への分化過程における Phenserine が与える影響を TRAP 染色により検討した。RAW264.7 細胞に対して sRANKL (100 ng/ml) および Phenserine 処置後 3~6 日間培養した。TRAP 染色を行い、分化誘導された破骨細胞数を計測した。Phenserine を処置することにより、破骨細胞の形成は増加した。値は平均値および標準誤差を示す (n=4)。

*, $P < 0.01$, vs control

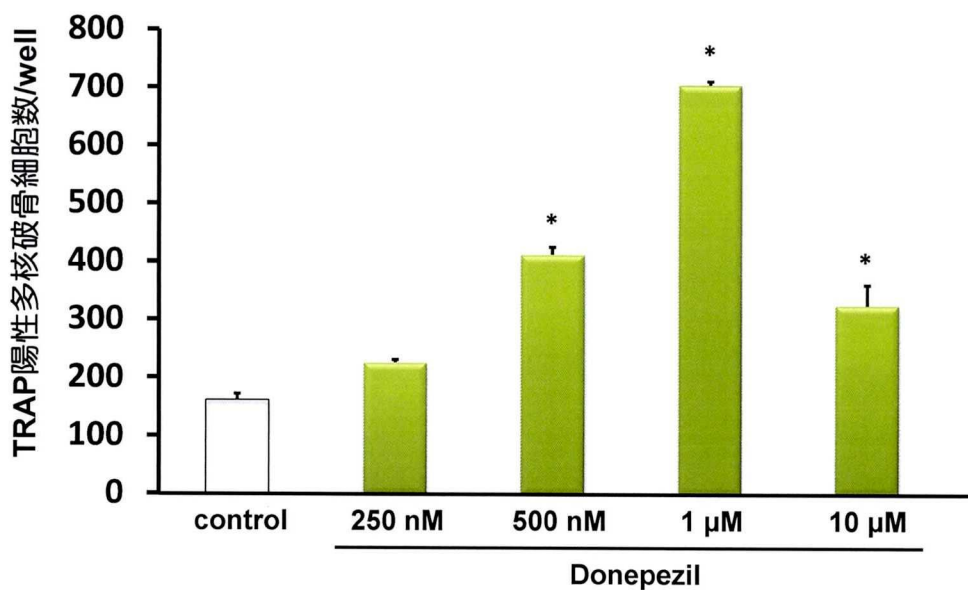


Figure 7 Donepezil による破骨細胞分化促進

前駆破骨細胞の破骨細胞への分化過程における Donepezil が与える影響を TRAP 染色により検討した。RAW264.7 細胞に対して sRANKL (100 ng/ml) および Donepezil 処置後 3~6 日間培養した。TRAP 染色を行い、分化誘導された破骨細胞数を計測した。Donepezil を処置することにより、破骨細胞の形成は増加した。(n=4) *, $P < 0.01$, vs control

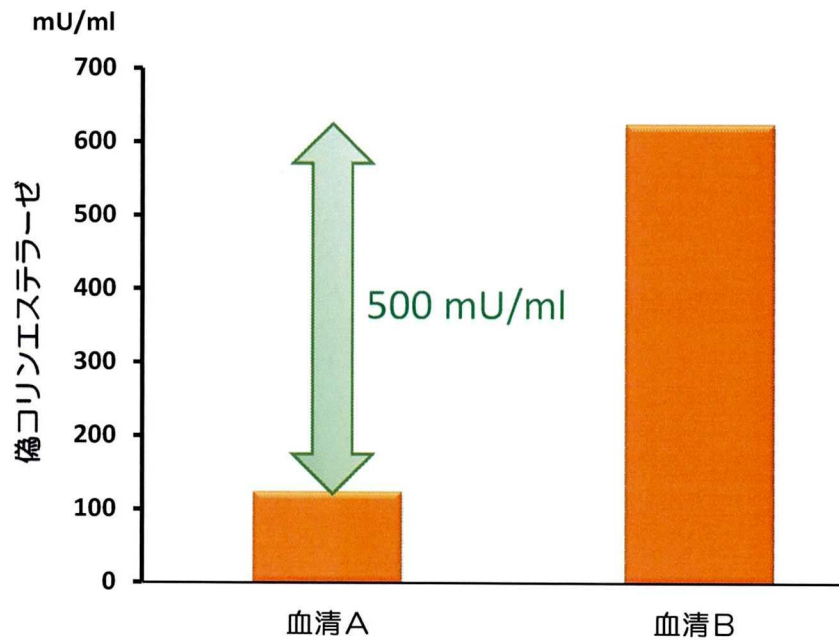


Figure 8 培養液中の血清中に存在する偽コリンエステラーゼの測定

それぞれの培養液中の血清の偽コリンエステラーゼ活性を、ヨウ化ブチリルチオコリンを基質として加え、吸光度変化量により測定した。血清 A は 125 mU/ml, 血清 B は 625 mU/ml の活性を示した。

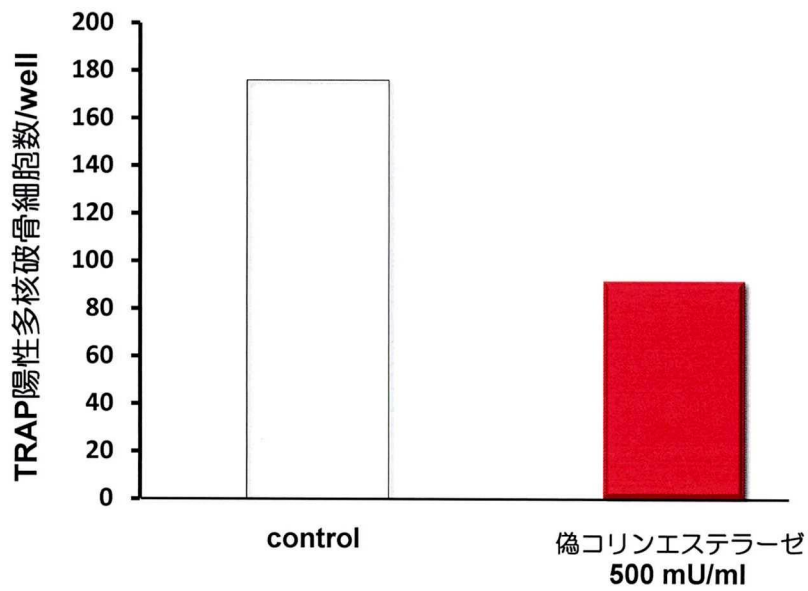


Figure 9 偽コリンエステラーゼによる破骨細胞分化抑制

前駆破骨細胞の破骨細胞への分化過程における偽コリンエステラーゼが与える影響をTRAP染色により検討した。馬血清由来偽コリンエステラーゼは、Figure 8の両血清の差である500 mU/mlを添加したが、これにより破骨細胞の形成は減少した。

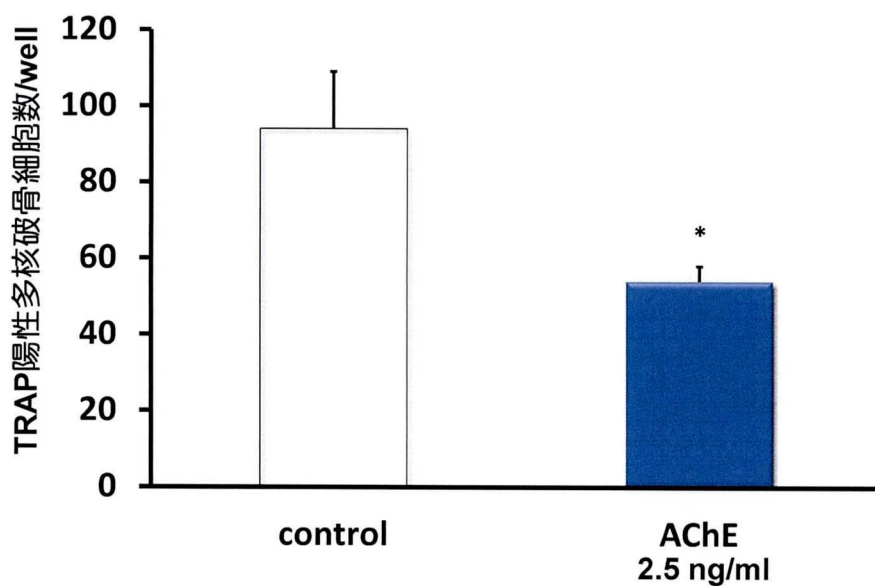


Figure 10 アセチルコリンエステラーゼによる破骨細胞分化抑制

RAW264.7 細胞に対して sRANKL (100 ng/ml) およびリコンビナントアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 処置後 3~6 日間培養し, TRAP 染色を行い, 分化誘導された破骨細胞数を計測した。アセチルコリンエステラーゼの添加により, 破骨細胞の形成は減少した。

(n=4) *, $P < 0.01$, vs control

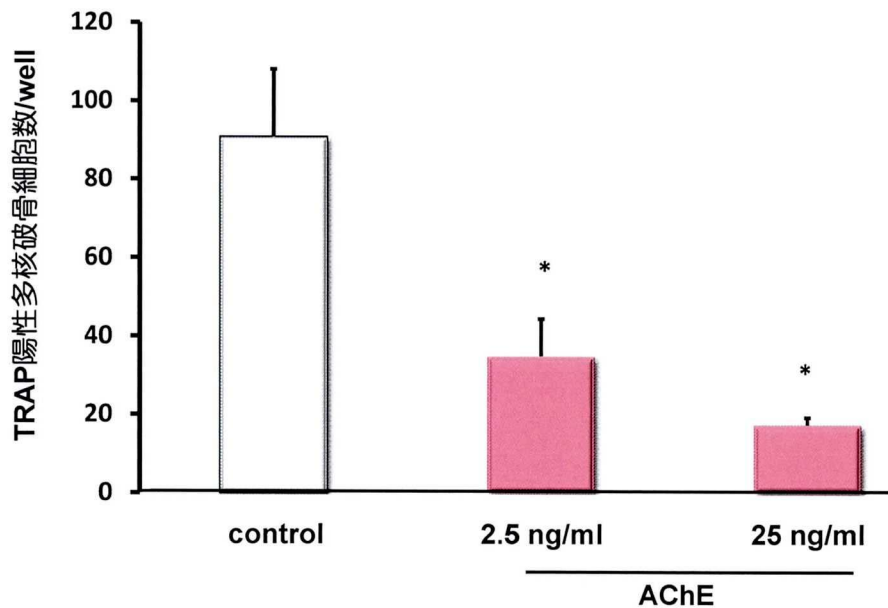


Figure 11 マウス骨髄細胞のアセチルコリンエステラーゼによる破骨細胞分化抑制

破骨細胞への分化過程におけるアセチルコリンエステラーゼが与える影響を TRAP 染色により検討した。マウス骨髄細胞に対して sRANKL (100 ng/ml) およびアセチルコリンエステラーゼ処置後 3~6 日間培養した。TRAP 染色を行い、分化誘導された破骨細胞数を計測した。アセチルコリンエステラーゼの処置により、破骨細胞の形成は減少した。(n=4)

*, $P < 0.01$, vs control

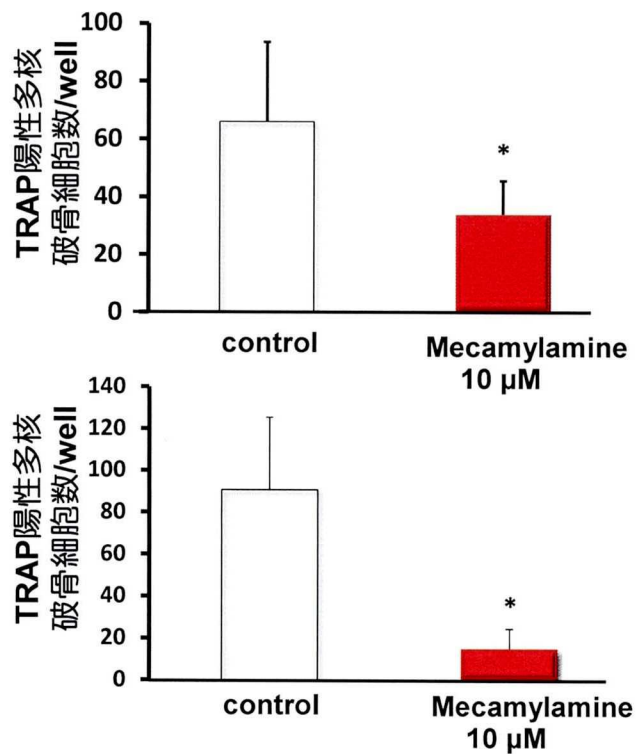


Figure 12 Mecamylamine による破骨細胞分化抑制

破骨細胞への分化過程に対する Mecamylamine の影響を TRAP 染色により検討した。RAW264.7 細胞（上図）およびマウス骨髄細胞（下図）に対して sRANKL（100 ng/ml）および Mecamylamine 処置後 3～6 日間培養した。TRAP 染色を行い，分化誘導された破骨細胞数を計測した。どちらの細胞においても Mecamylamine を処置することにより，破骨細胞の形成は減少した。（n=4）*, $P < 0.01$, vs control

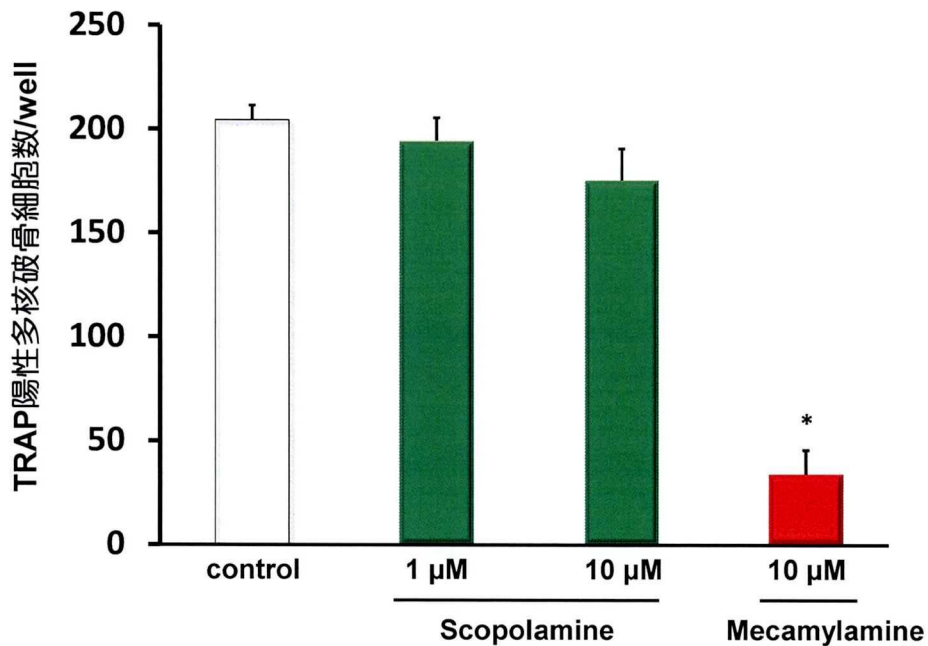


Figure 13 Scopolamine による破骨細胞分化への影響

前駆破骨細胞の破骨細胞への分化過程における Scopolamine の与える影響を TRAP 染色により検討した。RAW264.7 細胞に対して sRANKL (100 ng/ml) および Scopolamine または Mecamylamine 処置後 3~6 日間培養した。TRAP 染色を行い、分化誘導された破骨細胞数を計測した。Scopolamine を処置しても破骨細胞分化への影響は認めなかった。(n=4)

*, $P < 0.01$, vs control

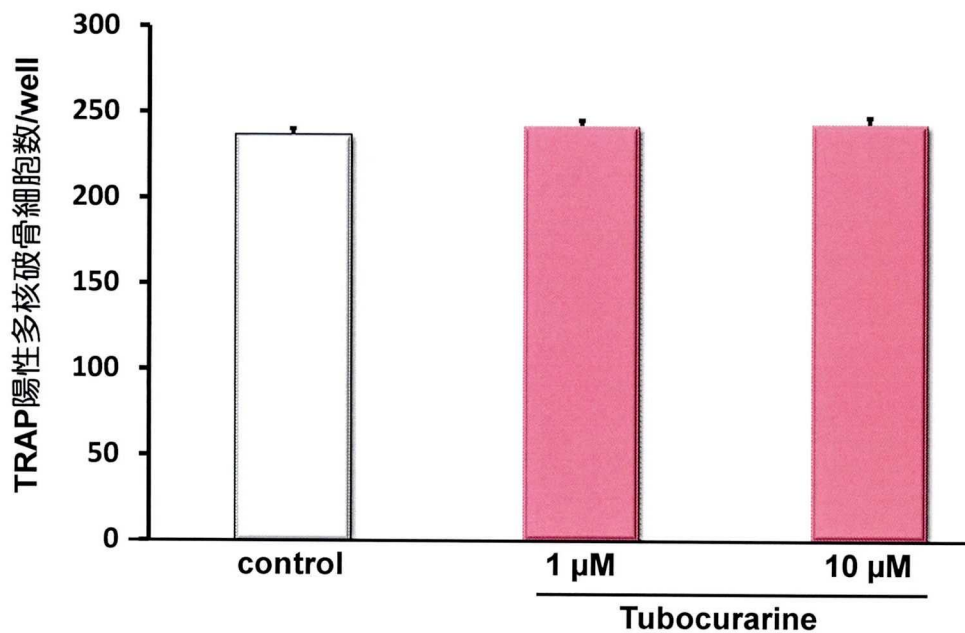


Figure 14 Tubocurarine による破骨細胞分化への影響

前駆破骨細胞の破骨細胞への分化過程における Tubocurarine が与える影響を TRAP 染色により検討した。RAW264.7 細胞に対して sRANKL (100 ng/ml) および Tubocurarine 処置後 3~6 日間培養した。TRAP 染色を行い、分化誘導された破骨細胞数を計測した。Tubocurarine を処置しても破骨細胞分化への影響は認めなかった。(n=4)

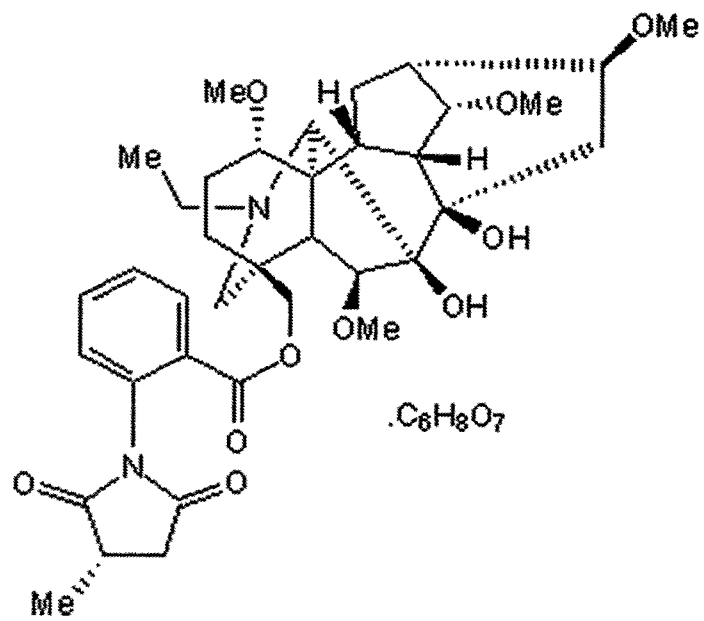


Figure 15 MLA (Methyllycaconitine citrate salt hydrate) の構造式

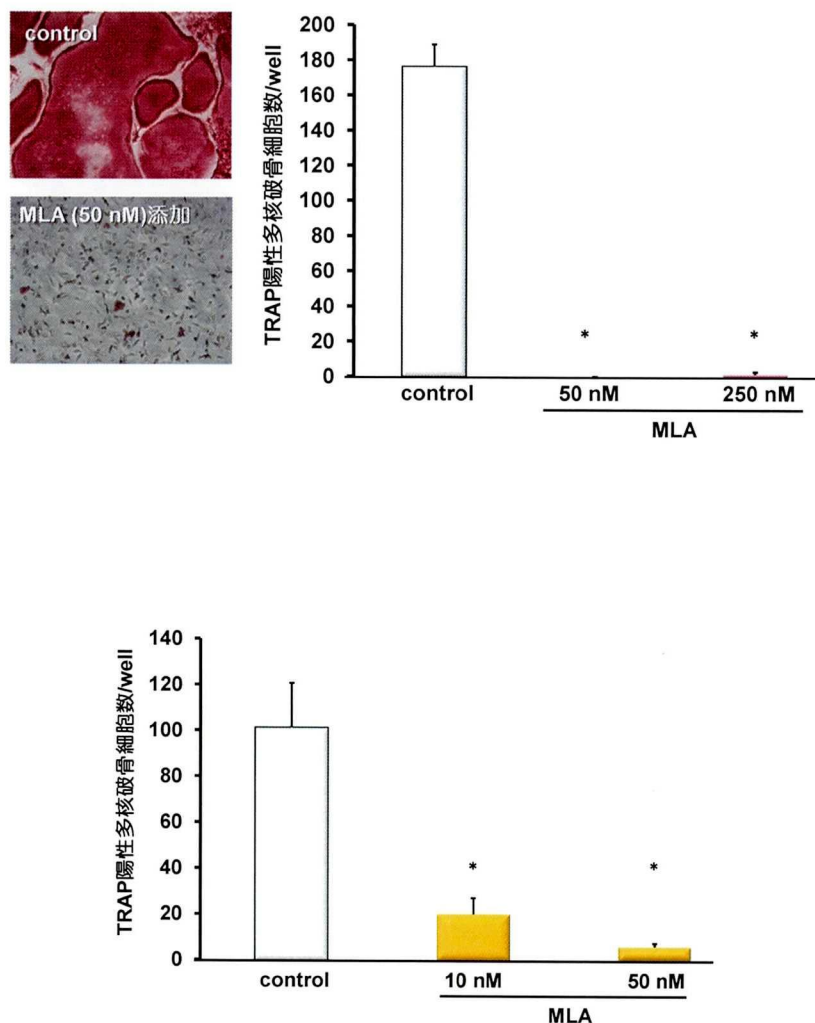


Figure 16 MLAによる破骨細胞分化抑制

破骨細胞への分化過程における MLA が与える影響を TRAP 染色により検討した。RAW264.7 細胞およびマウス骨髄細胞に対して sRANKL (100 ng/ml) および MLA 処置後 3～6 日間培養した。TRAP 染色を行い、分化誘導された破骨細胞数を計測した。どちらの細胞においても MLA を処置することにより、破骨細胞分化は強力に抑制された。(n=4) *, $P < 0.01$, vs control

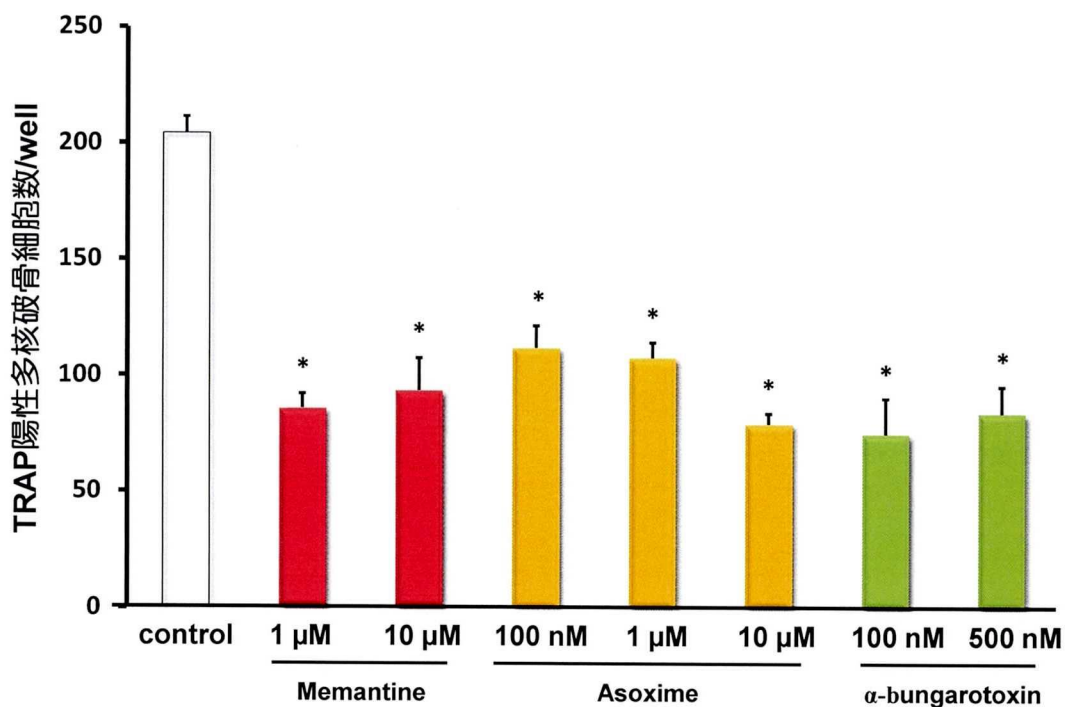


Figure 17 非特異的 $\alpha 7$ ホモ五量体の阻害薬による破骨細胞分化抑制

Memantine, Asoxime, α -bungarotoxin が破骨細胞分化に与える影響を TRAP 染色により検討した。RAW264.7 細胞に対して sRANKL (100 ng/ml) および薬物処置後 3~6 日間培養した。TRAP 染色を行い、分化誘導された破骨細胞数を計測した。それぞれの阻害薬において程度は低いが、破骨細胞の分化が抑制された。(n=4) *, $P < 0.01$, vs control

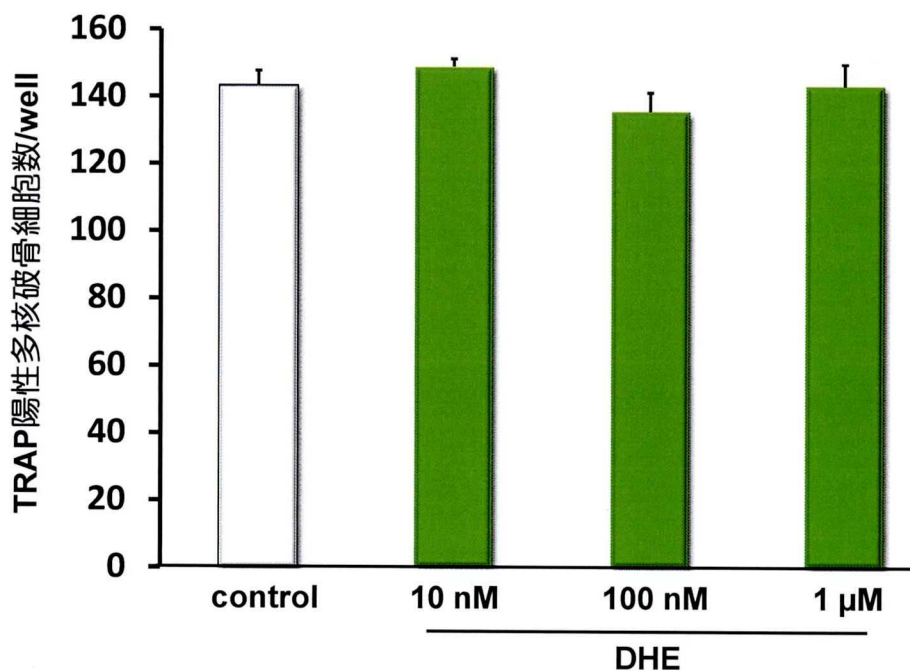


Figure 18 DHE による破骨細胞分化への影響

前駆破骨細胞の破骨細胞への分化過程における DHE が与える影響を TRAP 染色により検討した。RAW264.7 細胞に対して sRANKL (100 ng/ml) および DHE 処置後 3～6 日間培養した。TRAP 染色を行い、分化誘導された破骨細胞数を計測した。DHE を処置しても破骨細胞分化への影響は認めなかった。(n=4)

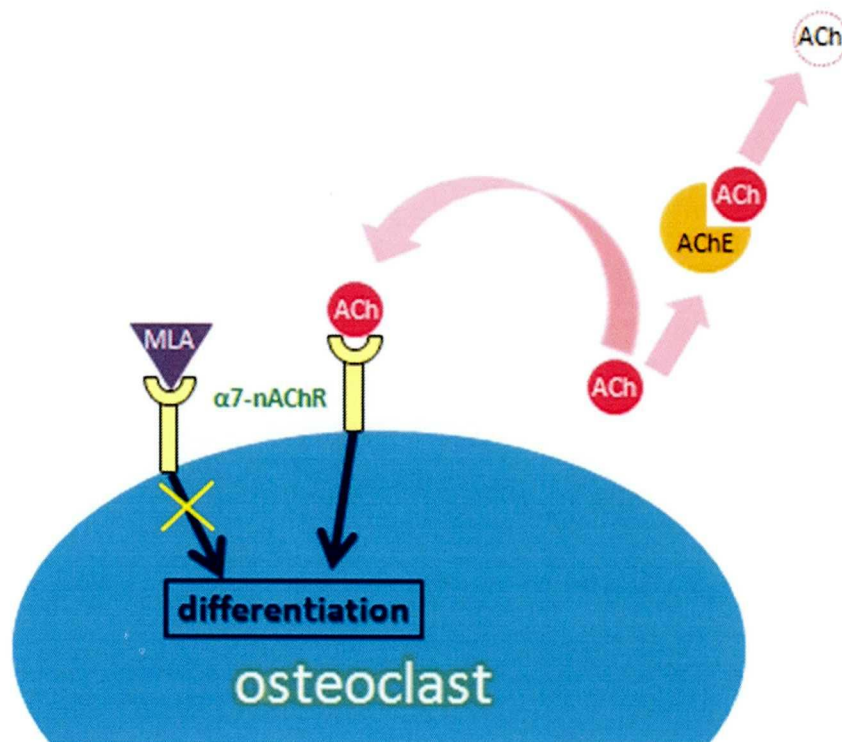


Figure 19 アセチルコリン (ACh) の破骨細胞分化への関与

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性が、破骨細胞分化に関与しており、さらにはアセチルコリン (ACh) が破骨細胞分化を促進している可能性が示唆された。また、特異的阻害薬である MLA によって破骨細胞分化が強力に抑制されたことより、ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 7$ ホモ五量体を介したシグナルが破骨細胞分化の情報伝達経路を調節している可能性が示唆された。

