

主論文の要旨

**Lansoprazole Upregulates Polyubiquitination of the TNF
Receptor-Associated Factor 6 and Facilitates
Runx2-mediated Osteoblastogenesis**

ランソプラゾールは TNF 受容体関連因子 6 の
ポリユビキチン化を亢進し Runx2 を介した
骨芽細胞分化を促進する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野
(指導：西田 佳弘 准教授)

三島 健一

【背景】

Runx2 は間葉系幹細胞から骨芽細胞系列への分化決定に必須の転写因子であり、TGF- β 活性化キナーゼ 1 (TAK1)-p38 MAPK 経路は Runx2 を活性化する主要な経路として知られている。TGF- β /BMP (骨形成タンパク質) シグナルは、アダプター分子 TRAF6 (TNF 受容体関連因子 6) を介してこの MAPK 経路に伝達されるが、ユビキチンリガーゼでもある TRAF6 は TGF- β /BMP1 型受容体に結合し、自己ユビキチン化することで活性化する。このユビキチン化はプロテアソームタンパク分解システムで働くリシン 48 結合型ではなく、細胞内シグナル伝達に関わるリシン 63 結合型 (K63) である。MAPKKK である TAK1 は TAK1 結合タンパクを介し特異的に K63 ポリユビキチン鎖と結合、TAK1 複合体を形成することで自己リン酸化し、下流の p38 MAPK を活性化する。つまり TGF- β /BMP 受容体-TRAF6-TAK1-p38 MAPK 経路は Runx2 の主要な活性化シグナルである。近年 TGF- β /BMP1 型受容体を制御する因子として脱ユビキチン化酵素 (DUB)が注目されている。DUB の 1 つ、CYLD は特異的に K63 ポリユビキチン鎖を分解し、TGF- β /BMP シグナルや NF- κ B シグナルを負に制御することが知られている。CYLD や TRAF6 はまた単球/マクロファージ系細胞からの破骨細胞分化や成熟、そして骨吸収活性に重要な働きをしており、CYLD の抑制によって TRAF6 の自己ポリユビキチン鎖が安定化すると、破骨細胞の分化や機能は正に制御される。ドラッグリポジショニング (DR)は既存薬の新規薬効を探索し、安価で迅速な創薬を実現する手法である。本研究では骨形成促進薬の開発を目指し、DR 戦略を活用して Runx2 を活性化する既存薬の探索を行った。

【対象と方法】

薬効スクリーニング

ヒト RUNX2 遺伝子の P1 プロモーター領域(-1500~+468)をルシフェラーゼレポーターベクター pGL4.10 にサブクローニングした pGL4-hRunx2P1-luc2 ベクターを作製、これをマウス未分化間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞に遺伝子導入し、G418 による選択を経て安定発現株を樹立した。次に BMP-2 で前処理した安定発現株に 1186 種類の既認可薬を添加し、ルシフェラーゼアッセイを行って目的のプロモーター活性を調べた。コントロールと比べて 1.5 倍以上のレポーター活性を示した候補薬の中から濃度依存性に活性を上昇させる候補薬を絞り、ランソプラゾールを同定した。

ラット大腿骨骨折モデル

SD ラットの左後肢大腿骨骨幹部に 3 mm 長の骨欠損を作製、逆行性にワイヤーを髓内に刺入して内固定した。早期の骨癒合を防ぐため骨膜は全周性に剥離した。DMSO に溶解したランソプラゾールをさらに水に溶かし、自由飲水で投与した。体重と飲水量を適宜モニタリングし、ヒト常用量の 10~20 倍の投与量となるように濃度調整し 4 週間投与した。

細胞内ユビキチンアッセイ

HEK293 細胞に Flag タグ付きヒト TRAF6 発現ベクターを遺伝子導入し、24 時間無

血清培地で培養した。続いてランソプラゾールで 30 分間前処理後 BMP-2 を添加し、5, 15, 30 分後に全タンパク質を回収した。サンプルを変性条件で調整し、Flag 抗体で免疫沈降後に SDS-PAGE で展開した。自己ポリユビキチン化 TRAF6 はユビキチン抗体で検出した。

試験管内ユビキチンアッセイ

ユビキチンシステムに必須の酵素群、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン転移酵素 (E3; TRAF6) にユビキチンと ATP を混和し、30°C 1 時間反応させて未結合のポリユビキチン鎖を合成した。一旦ユビキチン反応を停止後、正常型や変異型の CYLD を添加し、さらに 30°C 1 時間反応させて脱ユビキチン化反応を行った。TRAF6 や CYLD はそれぞれの Flag タグ付き発現ベクターを過剰発現させた HEK293 細胞から抗 DYKDDDK 抗体固定化アガロースビーズを用いて溶出、精製した。

【結果】

ランソプラゾールはマウス未分化間葉系幹細胞株、ヒト骨芽細胞様細胞株、ヒト間葉系幹細胞 (Fig.1)、ラット初代骨髄細胞のいずれにおいても *Runx2* 遺伝子の発現を濃度依存性に増加させた。ランソプラゾールはまた *Runx2* タンパクの核内集積 (Fig.2) や転写活性化能を亢進させ、その標的遺伝子である *Spp1* 遺伝子の発現や骨芽細胞分化マーカーである ALP 活性を濃度依存性に上昇させた。さらに患者由来ヒト初代骨髄細胞をランソプラゾール含有骨分化培養条件で培養すると、最終骨分化である基質の石灰化が促進された (Fig.3)。ラット大腿骨骨折モデルに全身投与すると、骨折部間隙の間充織内に形成される石灰化組織の割合が増加し、骨折治癒は促進された。

分子作用機序の解明を進めると、ランソプラゾールはヒト間葉系幹細胞において TAK1-p38 MAPK 経路を活性化した (Fig.4)。さらにランソプラゾールは TRAF6 の自己ポリユビキチン化を誘導・促進した (Fig.5)。試験管内でのユビキチンアッセイを行うと、ランソプラゾールは TRAF6 のユビキチン化酵素活性を上昇させなかったが、CYLD の DUB 酵素活性を抑制していた (Fig.6)。

ランソプラゾールと CYLD のドッキングシミュレーションを行うと、ランソプラゾールが安定的に結合できる CYLD 表面のポケットが見付かった (Fig.7)。そしてこのポケット構造にランソプラゾールが結合すると、ユビキチン分子 C 末端の酵素活性中心への到達が妨げられ、その結果 CYLD の酵素活性が阻害されるモデルが導かれた (Fig.7)。続いてポケット構造を人工的に改変させた変異型 CYLD を用いて同様のユビキチンアッセイを行ったところ、CYLD の酵素活性は保たれたままランソプラゾールによる CYLD 抑制効果は消失した (Fig.8)。

マウス単球/マクロファージ系細胞株 RAW264.7 細胞を破骨細胞分化誘導因子 RANKL とランソプラゾールで刺激すると、多核破骨細胞数の割合や骨吸収窩の面積は有意に増加した (Fig.9)。

【考察】

過去の DR 研究では、高脂血症治療薬スタチンに BMP-2 の発現上昇を介した骨形成促進効果があると報告されている。しかし骨密度増加作用には相反する報告があり一定の見解は得られていない。これは BMP-2 には多彩な生理作用があり、骨芽細胞だけでなく軟骨細胞や脂肪細胞、そして破骨細胞への分化誘導促進作用があるためと考えられる。一方 Runx2 は専ら骨芽細胞系列への分化決定や促進、軟骨細胞の肥大分化のみに関わり、単独では骨芽細胞の最終分化を誘導できない。Runx2 は BMP シグナルによって活性化され両者は協調的に働くため、スタチンとランソプラゾールの併用でさらなる骨形成促進効果を期待できるかもしれない。

現在のところ TGF- β /BMP シグナルに関わる分子の中で、CYLD が作用するのは TRAF6 だけであるが、TRAF6 に結合した K63 ポリユビキチン鎖だけでなく、未結合の K63 ポリユビキチン鎖も TAK1 の自己リン酸化を誘導できることが分かっている。つまりランソプラゾールによる TAK1 の活性化は、TRAF6 と結合したポリユビキチン鎖の安定化だけでなく、未結合のポリユビキチン鎖の安定化によっても起こり得ると考えられる。

TRAF6 のユビキチンリガーゼ (E3)活性を担う RING フィンガードメインは破骨細胞の分化には必須ではないが、分化成熟や骨吸収機能獲得には不可欠な領域である。また CYLD 欠損マウスでは巨大多核破骨細胞数が増加し、骨髄細胞を RANKL で刺激すると有意に破骨細胞分化マーカーが上昇する。つまりランソプラゾールによる破骨細胞の分化成熟促進や骨吸収活性上昇は CYLD や TRAF6 がランソプラゾールの標的分子であることを別角度から示唆していると考えられる。

DR 戦略はヒトに対する至適投与量、副作用、禁忌がすでに確立された既存薬をスクリーニング対象とするため、安全性の高い薬剤の安価かつ迅速な臨床応用を可能とする。本研究で同定したプロトンポンプ阻害薬ランソプラゾールは、強力な胃酸分泌抑制薬として胃十二指腸潰瘍や逆流性食道炎などに幅広く使用されてきた安全性の高い医薬品である。今後は局所投与でのランソプラゾールの有効性を骨欠損モデル動物において検証するとともに、骨折治療薬としての臨床応用の可能性を検討していく。

【結論】

ランソプラゾールは骨形成促進薬として有効である可能性が示唆された (Fig.10)。