

# 骨軟骨代謝のダイナミクスと小胞体ストレス応答

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科  
放射線ゲノム医科学講座 分子細胞情報学  
今泉 和則

## 1. はじめに

変異タンパク質の発現やミスフォールドタンパク質（折りたたみ異常なタンパク質）の細胞内蓄積などタンパク質品質管理に異常を来すと小胞体の機能障害（小胞体ストレス）を引き起こし、神経変性疾患、糖尿病などの様々な疾患の発症につながる。我々が同定したタンパク質品質管理に関わる小胞体タンパク質センサーOASIS や BBF2H7 を欠損したマウスでは骨あるいは軟骨の形成不全を起こす。本研究の目的はタンパク質品質管理という新たな視点に立って骨および軟骨代謝のダイナミクスを分子レベルで解明し、小胞体機能を制御することで骨軟骨疾患（特に骨粗鬆症、骨形成不全症あるいは軟骨低形成症）の根本的治療のための基本原理を構築することにある。本研究では、1) 骨軟骨組織における小胞体タンパク質センサーの活性化機構の解析、2) ヒト骨軟骨疾患との関連性、3) 骨軟骨細胞における小胞体タンパク質品質管理制御法の開発からなる3つのテーマに関して研究を実施した。

## 2. 方法

1) 小胞体タンパク質センサーの活性化機構の解析：小胞体タンパク質センサーOASIS および BBF2H7 は正常時には合成された後すみやかに分解する。一方、小胞体ストレス時には安定化して小胞体に過剰の分子が蓄積する。OASIS や BBF2H7 の安定化と分解のメカニズムが解明できれば、活性化のメカニズムが明らかにできると考え、これら分子に結合して分解を促進する分子を探索した。分解因子の探索には、小胞体に局在する各種の E3 ユビキチンライゲースの siRNA を細胞に処理した際の OASIS や BBF2H7 の安定化を指標にスクリーニングした。

2) ヒト骨軟骨疾患との関連性：骨粗鬆症患者群と対照群の血液サンプルからゲノム DNA を抽出し、これを用いて SNP を利用したケースコントロール相関解析を行った。HapMap データをもとに Minor allele frequency (MAF) > 0.1,  $r^2 > 0.8$  となるように OASIS 遺伝子の tag SNPs を選出したところ、5SNPs で caver ratio=100(%) となることがわかった。日本人女性 DNA サンプル（患者群 891 例、対照群 565 例）を用いてインベダー法にてこの 5SNPs のタイピングを行った。さらに、中国人女性 DNA サンプル（患者群 658 例、対照群 422 例）を用いて replication study を行った。

3) 骨軟骨細胞における小胞体タンパク質品質管理制御法の開発：これまでに小胞体ストレスを緩和する小胞体分子シャペロン誘導剤の開発に成功している。この化合物 BIX は細胞レベルでは骨基質の分泌を促進し、骨形成に働くことを明らかにしてきた。今回は *in vivo* での BIX の効果を調べた。骨粗鬆症モデルとして汎用される卵巣摘出マウスを用いた。20~36 週齢 ICR 雌マウスをペントバルビタールナトリウムで全身麻酔し卵巣を摘出した。卵巣摘出後 BIX を 30mg/kg/day あるいは同じ投与量で 1 日 2 回投与を行った。陽性対照としては  $17\beta$ -Estradiol を頸背皮下にペレットとして埋め込んだ。薬物の投与は 8 週間とし、投与終了後右大腿骨の重量および右脛骨の骨密度を DEXA 法で測定した。

### 3. 結果

#### 1) 小胞体タンパク質センサーの活性化機構の解析

OASIS および BBF2H7 はプロテアゾーム阻害剤を細胞に処理すると、細胞内タンパク質量が激増した。また、細胞に小胞体ストレスを誘導する薬剤を処理したときにもその量が増加した。このような結果から、小胞体タンパク質センサーOASIS および BBF2H7 は通常時はユビキチン-プロテアゾーム系で分解されているが、細胞に小胞体ストレスが負荷された際にはこの分解経路から回避し、安定化することがわかった。次に OASIS および BBF2H7 を分解するために働く E3 ユビキチンライゲースを探索した。小胞体に局在する各種の E3 ユビキチンライゲースの siRNA を細胞に処理した際の OASIS や BBF2H7 の安定化を指標にスクリーニングした結果、HRD1 の siRNA を処理したときに限って両分子が極めて安定化することがわかった。さらに通常時に OASIS や BBF2H7 は HRD1 と結合するが、小胞体ストレス時には結合が解離していた。以上の結果から、HRD1 が小胞体タンパク質センサーOASIS および BBF2H7 の特異的 E3 ユビキチンライゲースであることが明らかになった。

#### 2) ヒト骨軟骨疾患との関連性

相関解析の結果、table 1 に示すように rs6485674 で  $P < 0.05$  となり、相関があることが示唆された。さらに、中国人女性においても rs6485674 で  $P < 0.05$  となり、有意であることが示唆された。日本および香港の結果を合わせて、rs6485674 に対するメタ解析を行ったところ、 $P = 0.00865$  となり、Bonferroni correction ( $0.05/5 = 0.01$ ) を下回る P 値を得ることができた。結果として、rs6485674 において骨粗鬆症との相関が弱いながら認められた。

Table 1 Genotype counts and case-control association test results

Gene	dbSNP ID	Genotype counts (1/1, 1/2, 2/2)		Frequency of allele 1		P values			
		Case	Control	Case	Control	Genotype	Allele	Recessive	Dominant
CREB3L1 (OASIS)	rs2288249	782/103/5	490/68/7	0.937	0.927	0.361	0.340	0.523	0.164
	rs7127254	734/149/8	450/105/9	0.907	0.891	0.296	0.148	0.216	0.227
	rs11038852	621/246/23	403/133/25	0.836	0.837	0.0526	0.947	0.402	0.0522
	rs12280680	698/180/13	455/103/6	0.884	0.898	0.517	0.252	0.285	0.518
	rs6485674	630/237/17	394/148/22	0.847	0.830	0.0766	0.225	0.566	0.0234

Table 2 Results of single locus test for high and low BMD

SNP	Case/Con	Count			recessive model				dominant model				additive model			
		1/1	1/2	2/2	P-value	OR	95% CI		P-value	OR	95% CI		P-value	OR	95% CI	
		lower	upper	lower			upper	lower			upper					
rs2288249	Low BMD	546	90	6	0.581	1.21	0.61	2.39	0.064	1.21	0.99	1.49	0.071	0.71	0.49	1.03
	High BMD	337	70	5												
rs7127254	Low BMD	475	154	13	0.649	0.90	0.57	1.41	0.245	0.90	0.76	1.07	0.253	0.84	0.63	1.13
	High BMD	301	100	13												
rs11038852	Low BMD	398	212	31	0.079	0.57	0.30	1.07	0.180	0.81	0.59	1.10	0.077	0.80	0.62	1.03
	High BMD	247	136	28												
rs12280680	Low BMD	470	150	16	0.461	1.19	0.75	1.91	0.681	0.96	0.81	1.15	0.904	1.02	0.75	1.38
	High BMD	308	90	12												
rs6485674	Low BMD	349	229	49	0.119	0.66	0.39	1.11	0.047	0.73	0.54	1.00	0.028	0.77	0.61	0.97
	High BMD	214	156	40												

Table 3 Meta-analysis of rs6485674

Pooled chi-square	6.893
Pooled p-value	0.00865
Pooled OR	0.578
Pooled 95% CI (lower)	0.384
Pooled 95% CI (upper)	0.870

### 3) 骨軟骨細胞における小胞体タンパク質品質管理制御法の開発

BIX の *in vivo* における骨形成促進効果を調べる目的で、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスに BIX を 8 週間連続経口投与した際の骨病変治療効果について検討した。投与終了後大腿骨の重量を測定したところ、溶媒投与群に比べ、BIX の 30mg/kg/day 及び 30mg/kg/day<sup>2</sup> 回投与群で骨重量が増加し、卵巣摘出を行わなかった sham オペ群の骨重量に近い値を示した。さらに脛骨の骨密度も回復傾向を示し、化合物 BIX は骨形成を促進する効果があることが明らかになった。一方、陽性対照として用いた 17 $\beta$ -Estradiol 投与群では骨重量および骨密度は sham オペ群よりはるかに高い数値を示した。正常骨よりも過剰な骨形成が生じたことから 17 $\beta$ -Estradiol は治療薬として適切でないこともわかった。

### 4. まとめ

小胞体タンパク質センサーの活性化機構の解析から、OASIS および BBF2H7 は非常に不安定なタンパク質であり、常に HRD1 依存的に分解を受けている。OASIS や BBF2H7 は骨や軟骨の形成に必須であることがすでに明らかになっている (Murakami et al. *Nature Cell Biology*, 2009, Saito et al. *Nature Cell Biology*, 2009)。これら分子と HRD1 との結合が阻害できれば、常に活性化状態が維持でき、骨や軟骨の形成を促進できる新規薬剤の開発につながる可能性がある。今後は HRD1 の活性化阻害薬ないしは OASIS や BBF2H7 との結合阻害薬の開発が待たれる。

OASIS 遺伝子の遺伝子多型解析を行い、骨粗鬆症と弱い相関が認められた。病理所見と合わせて、OASIS 遺伝子は骨粗鬆症の発症に重要な役割を担っている可能性が示唆された。今後は骨粗鬆症のタイプ別を行い、OASIS が関連する骨粗鬆症がどのような骨病変を形成するものなのかを明らかにする必要がある。これは治療法を考える上でも極めて重要である。

化合物 BIX の経口投与で骨形成の促進効果がみられた。BIX は小胞体分子シャペロンを誘導することで、小胞体内でタンパク質のフォールディングを促しタンパク質のよりスムーズな分泌を促進する。骨組織はタンパク質の代謝が最も活発な組織であることから BIX による小胞体機能の活性化が骨形成の促進につながったと考えられる。骨粗鬆症の治療戦略としてはこれまでは破骨細胞に作用し骨吸収を抑える薬物が有効とされてきた。一方、骨芽細胞に作用して骨形成を促進する薬物の開発は皆無であった。従って全く新しい視点での治療薬開発に新たな道が開けたことに大きな意味がある。

BIX による骨形成促進効果は 30mg/kg 前後の投与量で観察される。急性毒性試験では約 100mg/kg の濃度で痙攣、呼吸不全などのいくつかの重要な毒性症状が観察されている。BIX をそのままヒトの骨疾患の治療に使用するには毒性が強すぎる。今後はより安全域が広く、BIX よりも薬効が期待できる化合物を作成し、骨疾患治療に向けたより現実的な戦略の構築が望まれる

### 5. 発表論文

1. Murakami T, Hino SI, Nishimura R, Yoneda T, Wanaka A, Imaizumi K. Distinct mechanisms are responsible for osteopenia and growth retardation in OASIS-deficient mice. *Bone*, 2010, in press.
2. Sekiya H, Murakami T, Saito A, Hino S, Tsumagari K, Ochiai K, Imaizumi K. Effects of the bisphosphonate risedronate on osteopenia in OASIS-deficient mice. *J. Bone Miner. Metab.* 28:384-394, 2009.