

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19986

研究課題名(和文) 受容体RANK/HCRを介した破骨細胞の分化メカニズムの包括的解明と、その応用

研究課題名(英文) Global elucidation of the molecular mechanism in osteoclastogenesis induced by receptor RANK/HCR, and development of novel therapeutic approach for bone diseases.

研究代表者

田口 祐 (Taguchi, Yuu)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：20549472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞はその骨吸収活性により、骨芽細胞の造骨活性と協調的に機能することで、体内の骨量を一定に維持する骨代謝の一翼を担っているため、分化機構の破綻は様々な骨疾患の原因となってしまう。本研究は破骨細胞の分化メカニズムを詳細に解明することを目的に実施され、破骨細胞分化に必須な受容体RANKにおける機能領域HCRに結合する分子を同定した。また、遺伝子発現解析から破骨細胞分化を制御する新規遺伝子を複数同定することに成功し、新たな分化メカニズムの一端を明らかにした。これらの成果は骨疾患治療方法の新規開発の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bone is an important organ, which has functions of supporting body shape and hematopoiesis. Osteoclasts are cells that degrade bone matrix, and have a crucial role in bone remodeling in concert with osteoblasts which generate bone matrix. The excess formation of osteoclast causes pathological bone resorption, such as that found in postmenopausal osteoporosis and bone metastases. Therefore, elucidation of the precise molecular mechanism of osteoclastogenesis is important for development of therapeutic strategies to treat or prevent such bone diseases. Our screening revealed that some novel proteins bind to HCR which is an essential region in RANK for induction of osteoclastogenesis. Moreover, we identified three genes which regulate osteoclastogenesis. These results will contribute to reveal the novel signal pathway involved in osteoclast differentiation.

研究分野：骨免疫学

キーワード：骨免疫 骨代謝 RANK 破骨細胞 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

骨は身体を支持する骨格としての機能だけでなく、ミネラルの貯蔵庫や造血器官としての役割があり、重要な臓器の1つである。骨芽細胞の骨形成活性と破骨細胞の骨吸収活性のバランスにより体内骨量は一定に保たれているが、破骨細胞分化・活性化が異常亢進して骨代謝バランスが崩壊すると様々な骨疾患(骨粗鬆症、関節リウマチ性炎症性骨変形症、癌の骨転移など)が発症する。日本は先進諸国でも群を抜いた超高齢社会であるため、老化に伴う種々の疾患への対策が急務であり、QOLへの影響が大きい骨疾患に関して医学・薬学における臨床研究のみならず基礎研究による新規成果に基づく原因解明と治療法の改善が待たれている。

骨粗鬆症や関節リウマチ性炎症性骨変形症などの骨疾患病変部位では、破骨細胞分化・活性化の異常亢進が病理学的に観察されるため、破骨細胞が骨疾患発症の主要因であると考えられている。また、癌骨転移部位においても異常分化・活性化した破骨細胞が観察され、癌細胞の転移場所の確保に破骨細胞が機能することで骨転移に関与すると考えられている。すなわち、破骨細胞は種々の骨疾患発症の中心的役割を担っているため、治療標的として非常に有用であり、実際に破骨細胞を標的とする骨吸収抑制剤 Bisphosphonate 製剤が臨床現場では広く使用されている。しかし、Bisphosphonate 製剤は治療効果が現れるまでに長時間を要することに加え、副作用が多いことも報告されている。そのため、破骨細胞の分化メカニズムを詳細に理解し、新規知見に基づいた骨疾患治療法の開発が待たれている。

破骨細胞の分化は、破骨前駆細胞に発現している受容体 RANK にそのリガンド(RANKL)が結合することで誘導される。RANKL 刺激依存的に RANK にはアダプター分子 TRAF6 が結合し、NF-κB シグナル伝達経路の活性化と、PLCγ2 を介した Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達経路が活性化される。本研究代表者は、受容体 RANK の細胞質内領域において、異なる動物種間でアミノ酸配列が高度に保存されている領域 HCR (Highly Conserved region in RANK)を見出し、HCR には NF-κB シグナル伝達経路と Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達経路の活性化を長期維持することで、破骨細胞分化のマスター転写因子 NFATc1 の発現誘導を引き起こす機能が有ることを明らかにしていた。そして、この HCR には RANKL 刺激依存的にアダプター分子 Gab2 が会合して PLCγ2 も含んだシグナル複合体が形成されることも解明していた(図(1A))。そのため、本研究代表者は、HCR 領域のアミノ酸配列のペプチド(HCR ペプチド)を破骨前駆細胞に導入することで、受容体 RANK におけるシグナル複合体形成を阻害し(図(1B))、破骨細胞の分化を人為的に制御できると考えた。

実際に HCR ペプチドを破骨前駆細胞に過剰発現させることで破骨細胞分化を顕著に抑制できたため(図(2))、分化を人為的に抑制できる可能性を見出していた。また更に、受容体 RANK は RANKL 刺激により HCR 依存的に細胞内へ internalization

し、NFATc1 の活性を制御していることを見出しており、そのため HCR には RANK 活性化の長期維持と、NFATc1 活性化の制御という2つの役割が有ることを明らかにしていた。しかし、HCR が機能発現する際の分子メカニズムの全容は未解明の部分が多く残されている状態であった。

2. 研究の目的

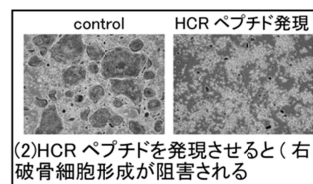
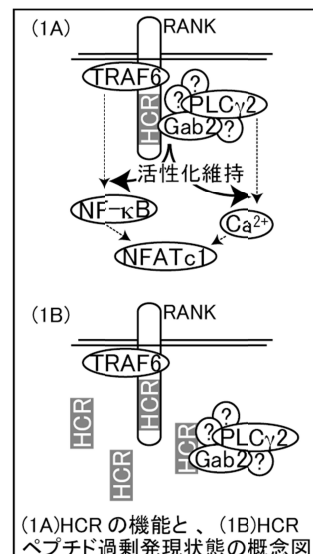
破骨細胞が多くの骨疾患を発症させる原因となっているが、現在の治療方法では問題点が残っているため、破骨細胞の分化メカニズムの詳細な解析から得られる新規知見に基づく治療方法の開発が待たれている。そして、本研究代表者が見出した HCR の分子メカニズムは未解明な点が多い。そこで、破骨細胞の分化過程における HCR の分子メカニズムを詳細に解析するとともに、破骨細胞分化に関与する新たな分子を同定してその作用メカニズムを明らかにし、得られた知見から骨疾患治療方法を新規開発することを目的として研究を展開した。具体的には以下の3点について解析を進めた。

- (1) HCR を介した RANK シグナルの伝達機構の解明
- (2) HCR ペプチドを用いた骨吸収抑制方法の新規開発
- (3) 破骨細胞分化を制御する新規遺伝子の探索と機能解析

3. 研究の方法

「2. 研究の目的」欄で記述した3点に関して、以下のように解析を進めた。

- (1) RANKL 刺激した破骨前駆細胞から採取した RNA を用いて新規に Library を作成し、HCR 配列を bait とした Yeast-2-Hybrid 法解析を実施して、HCR



結合タンパク質の同定を試みた。そして、得られた候補タンパク質が実際に HCR と会合するかを検証し、分子モデルを考察した。更に、internalization を低分子化合物で抑制した際の候補タンパク質を解析することで、internalization の役割の解明を試みた。また、特異的抗体を利用することで、RANK/HCR への翻訳後修飾を解析した。

- (2) 化学合成した HCR-peptide を用い、*in vitro* 破骨細胞分化系に添加して分化への影響を調べた。HCR 全域にわたり短い断片の peptide も合成し、同様に分化への影響を検証した。
- (3) 以前に本研究代表者は、保有しているマイクロアレイデータとデータベースに公表されているマイクロアレイデータを組み合わせて網羅的に解析し、RANKL 刺激依存的に発現量が減少する遺伝子を複数同定することに成功していた。これらの遺伝子を破骨前駆細胞に強制発現させ、分化への影響を調べた。また、遺伝子欠損マウスを入手し、分化を調べた。

#### 4. 研究成果

「2. 研究の目的」欄で記述した 3 点に関して解析を行い、以下のような成果を得た。

- (1) RANKL 刺激を加えた破骨前駆細胞を用いて新たに Library を作成し、HCR 配列を bait とした Yeast-2-Hybrid 解析を実施したところ、14 種の HCR 会合タンパク質候補を得ることができた。これらの候補分子と受容体 RANK の結合を調べたところ、1 種において結合が確認できた。このタンパク質は NFATc1 の活性化に関与することが知られていたため、同様に NFATc1 の活性化に関与する RANK の internalization との関係性を調べたところ、低分子化合物で RANK の internalization を阻害すると候補タンパク質の活性化が阻害されたため、RANK の internalization がこの候補タンパク質の RANK への集積と効率的な活性化のために機能していることが示唆され、新規分子メカニズムの一端が明らかになった。一方で、受容体の internalization との関連が報告されているユビキチン化や SUMO 化などの翻訳後修飾を特異的抗体を用いて RANK において調べたが、RANK がこれらの修飾を受けている結果は得られなかった。Yeast-2 Hybrid 法解析で得られた結合候補タンパク質には翻訳後修飾に関与する遺伝子は含まれておらず、分子メカニズムは不明である。そのため、今後は受容体 RANK に結合する全ての分子の同定を目指し、共同研究にて

Protein Array を実施する予定である。

- (2) HCR をいくつかの領域に分け、それぞれ膜透過性を持ったペプチド断片として合成し、破骨前駆細胞の培養系に添加して分化への影響を検証した。その結果、複数のペプチドにおいて分化が抑制されたため、HCR には複数の機能領域が備わっていることが示唆された。実験使用に十分なペプチドの合成等に時間がかかり実施できなかったが、今後、骨疾患モデルマウスを作出して患部に投与することで治療効果を検証し、新規骨疾患治療方法としての確立を目指す。また、機能部位と推定される領域の分子メカニズムを詳細に解析する予定である。
- (3) 以前に本研究代表者は種々のマイクロアレイデータを解析することで RANKL 刺激依存的に発現量が減少する遺伝子を新規に 13 種同定していた。更に、この 13 種の遺伝子を破骨前駆細胞に過剰発現させることで、分化する成熟破骨細胞を減少させる遺伝子(抑制遺伝子候補)を 1 つ、増加させる遺伝子(亢進遺伝子候補)を 2 つ同定していた。今回、再度過剰発現実験を実施したところ同様な結果が得られたため、これらの遺伝子は再現良く分化に影響を与えることが明らかになった。また、その 1 つの抑制遺伝子の欠損マウス由来の骨髄細胞から破骨細胞を分化させたところ、野生型に比べて多くの破骨細胞が分化形成されたため、この遺伝子が分化の新規抑制遺伝子であることが明らかになった。今後、この遺伝子欠損マウスの骨構造の解析と、破骨前駆細胞の解析を進めることで、新規分化メカニズムの詳細を解明する予定である。また、亢進遺伝子候補の 1 つを破骨前駆細胞に過剰発現させたところ、RANK 下流の ERK1/2 の活性化が増進しており、破骨細胞分化を制御する新たなシグナル伝達経路の存在が示唆された。すなわち、破骨細胞分化に関与する遺伝子を新規に同定することができたため、分化メカニズムの解明を目指して今後も解析を続ける予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (4) Takao Seki, Mami Yamamoto, Yuu Taguchi, Maki Miyauchi, Noritaka Yamaguchi, Jin Gohda, Taishin Akiyama, Jun-ichiro Inoue  
Visualization of RelB expression and activation at the single-cell level

during dendritic cell maturation in RelB-Venus knock-in mice  
*Journal of Biochemistry* (2015)査読有り  
vol. 158, pp458-495,  
doi:10.1093/jb/mvv064

〔学会発表〕(計 17 件)

- (4) 田口 祐、平山 榕子、井上 純一郎  
受容体 RANK の internalization とその  
破骨細胞分化における役割  
第 39 回 日本分子生物学会年会  
2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- (5) 弓桁 洋、田口 祐、井上 純一郎  
破骨細胞形成の細胞融合における  
TRAF6 依存性分子機構の解明  
第 39 回 日本分子生物学会年会  
2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- (6) 古賀 涼子、Mohamd O. Radwan、江島  
智彦、金丸 陽亮、柴田 佑里、田口 祐、  
井上 純一郎、大塚 雅巳、藤田 美歌子  
亜鉛結合性低分子化合物による TRAF6  
および下流シグナル経路に対する影響  
第 39 回 日本分子生物学会年会  
2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- (7) 関 崇生、田口 祐、井上 純一郎  
一細胞イメージングによる非古典的  
NF-kB 活性化経路のダイナミクスと遺  
伝子発現制御 (ポスター)  
第 39 回 日本分子生物学会年会  
2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- (8) 関 崇生、田口 祐、井上 純一郎  
一細胞イメージングによる非古典的  
NF-kB 活性化経路のダイナミクスと遺  
伝子発現制御 (口演)  
第 39 回 日本分子生物学会年会  
2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- (9) 弓桁 洋、田口 祐、井上 純一郎  
破骨細胞分化における細胞融合とアク  
チンリング形成の TRAF6 依存的分子  
機構の解明  
第 34 回 日本骨代謝学会学術集会  
2016 年 7 月 20 日-23 日  
大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)
- (10) 田口 祐、井上 純一郎  
RANKL 刺激依存的な受容体 RANK の  
internalization と、破骨細胞分化にお  
ける役割  
第 34 回 日本骨代謝学会学術集会

2016 年 7 月 20 日-23 日  
大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

- (11) Takao Seki, Mami Yamamoto, Yuu Taguchi, Maki Miyachi, Nobuko Akiyama, Noritaka Yamaguchi, Jin Gohda, Taishin Akiyama, Jun-ichiro Inoue  
Visualization of RelB expression and activation at the single-cell level during dendritic cell maturation in RelB-Venus knock-in mice  
Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology  
2016 年 3 月 13 日-17 日  
Whistler (カナダ)
- (12) Yuu Taguchi, Jun-ichiro Inoue  
Stimulation-dependent internalization of RANK is crucial for differentiation of osteoclast involved in bone metastasis  
10<sup>th</sup> AACR-JCR Joint Conference in Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics  
2016 年 2 月 16 日-20 日  
Maui (アメリカ合衆国)
- (13) 田口 祐  
受容体 RANK の機能領域 HCR が時空間的に制御する破骨細胞分化メカニズム (招待講演)  
2015 年 異分野融合ワークショップ 生体における情報伝達制御システムの破綻と疾患  
2015 年 12 月 9 日-10 日  
奈良先端科学技術大学院大学 (奈良県・生駒市)
- (14) 関 崇生、田口 祐、秋山 泰身、井上 純一郎  
非古典的 NF-kB 経路の振動は標的遺伝子の転写を制御する  
BMB2015  
2015 年 12 月 1 日-12 月 4 日  
神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- (15) 梶川 修平、田口 祐、早田 匡芳、江面 陽一、有村 純暢、井上 純一郎、野田 政樹、山梨 裕司  
Dok アダプターによる破骨細胞の分化制御機構  
BMB2015  
2015 年 12 月 1 日-12 月 4 日  
神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- (16) 古賀 涼子、江島 智彦、金丸 陽亮、柴田 佑里、田口 祐、井上 純一郎、大塚 雅

巳、藤田 美歌子  
TRAF6 ポリユビキチン化を制御する低  
分子化合物によるシグナル伝達制御の  
検討  
第 33 回 メディシナルケミストリーシ  
ンポジウム  
2015 年 11 月 25 日-11 月 27 日  
幕張国際研修センター (千葉県・美浜  
区)

研究者番号：

(4)研究協力者  
なし ( )

(17) 弓桁 洋、田口 祐、井上 純一郎  
破骨細胞の分化成熟における TRAF6  
の役割  
第 33 回 日本骨代謝学会学術集会  
2015 年 7 月 23 日-25 日  
京王プラザホテル (東京都・新宿区)

(18) 田口 祐、井上 純一郎  
刺激依存的な受容体 RANK の細胞質内  
局在化が果たす破骨細胞分化における  
役割  
第 33 回 日本骨代謝学会学術集会  
2015 年 7 月 23 日-25 日  
京王プラザホテル (東京都・新宿区)

(19) Yuu Taguchi、Jun-ichiro Inoue  
Stimulation-dependent  
internalization of RANK is critical for  
osteoclastogenesis  
東京大学生命科学シンポジウム  
2015 年 6 月 27 日  
東京大学武田先端知ビル (東京都・文京  
区)

(20) Yo Yumiketa、Yuu Taguchi、Jun-ichiro  
Inoue  
Role of TRAF6 in differentiation and  
maturation of osteoclasts  
医科学研究所創立記念シンポジウム  
2015 年 6 月 2 日  
東京大学医科学研究所 (東京都・港区)

〔その他〕

本研究成果に関する発表論文については、東  
京大学医科学研究所 分子発癌分野のホーム  
ページに掲載して公表。

<http://www.traf6.com/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

田口 祐 (Yuu Taguchi)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：20549472

##### (2)研究分担者

なし ( )  
研究者番号：

##### (3) 連携研究者

なし ( )