

令和元年6月11日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10908

研究課題名(和文) 新たなHMG関連タンパク質の骨吸収活性制御における役割

研究課題名(英文) Novel role of HMG-related protein in the regulation of bone resorption

研究代表者

馬渡 正明 (Mawatari, Masaaki)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80202357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス応答のキープレイヤーとして知られているHMG関連タンパク質Nuclear protein1 (Nupr1)/p8の破骨細胞分化と機能における働きについて解析を行った。Nupr1は破骨細胞分化で発現が誘導され、Nupr1を欠損したマウスの大腿骨では破骨細胞の形成が低下しており骨量が増加していた。さらに、Nupr1を欠損したマウスでは、破骨細胞の前駆細胞への分化や増殖能が低下し、破骨細胞ではオートファジーとそれによる細胞死が亢進していた。Nupr1は破骨細胞前駆細胞の増殖や破骨細胞の分化と生存を制御することにより骨吸収を制御するタンパク質であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨代謝は骨吸収を行う破骨細胞と骨形成を行う骨芽細胞によって営まれており、炎症や栄養状態、ストレスなどによっても影響を受ける。Nupr1はストレスで誘導されストレス応答のキープレイヤーとして注目されており、癌細胞の増殖や進展においても重要な働きをすることが報告されている。本研究では、初めてNupr1が生理的条件下での破骨細胞の分化と骨量の維持において新たな働きをしていることを明らかにした。本研究で得た知見は、骨破壊を伴う骨関連疾患の理解や治療法の開発などの研究に将来的に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：HMG-related protein nuclear protein 1 (NUPR1/p8) is a multifunctional stress-induced protein involved in regulating tumorigenesis, apoptosis, and autophagy. We analyzed expression and role of Nupr1 in osteoclastogenesis. Nupr1 was induced by RANKL in osteoclast differentiation. Using micro-computed tomography, we found that mice lacking Nupr1 exhibited increased bone volume. Histological analysis showed that Nupr1 deficiency decreased osteoclast numbers. In vitro culture of bone marrow macrophages showed that RANKL-induced osteoclastogenesis was downregulated, and cell proliferation was decreased in Nupr1-deficient of osteoclast precursor cells. In addition, expression of autophagy-related genes were upregulated, whereas apoptosis induced by autophagy was enhanced in Nupr1-deficient osteoclasts. These results indicate that Nupr1 is a novel regulator of bone volume by promoting the growth of osteoclast precursor and survival of osteoclasts.

研究分野：整形外科学

キーワード：破骨細胞 転写因子 骨代謝 ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急速な高齢化を背景に我が国における骨・関節疾患患者数は増加しており、変形性関節症や骨粗鬆症に伴う脆弱性骨折による ADL 低下は大きな社会問題となっている。骨粗鬆症患者数は 1280 万人と推定されており、骨・関節疾患に対する病態の解明と新たな治療法の開発による健康寿命の延伸は急務である。

我々は、ラット破骨細胞培養系を用いた DNA マイクロアレイ解析において、破骨細胞で高い発現を示す遺伝子 Nupr1 (nuclear protein 1/p8)を見出した。Nupr1 は p8 或いは Com1 とも知られており、HMG(High mobility group)と類似した構造や生化学的な特徴を有した 82 アミノ酸の分子量の小さな核タンパク質で、急性膵炎において膵臓腺房細胞で強発現する遺伝子として初めて報告された。その後、LPS、炎症、低酸素、栄養飢餓など様々なストレスで誘導され、ストレス応答を制御するキープレイヤーであると考えられた。また、Nupr1 は膵癌や乳癌などにおいて発現が亢進しており、癌の増殖、進展、オートファジー、アポトーシスに関わることが報告された。癌細胞で Nupr1 をノックダウンした場合は、Foxo3 の転写活性が亢進しさらに Foxo3 の標的遺伝子である Bnip3 の転写活性化が起こり、オートファジーが亢進したと考えられた。近年、HMG 関連タンパク質の加齢依存的軟骨変性メカニズムや変形関節症との関連が報告されており、また Nupr1 が軟骨細胞における matrix metalloproteinase 13 (MMP13)の産生に関連することが報告されていることから、HMG 関連タンパク質の骨代謝における関与が示唆される。また、オートファジータンパク質が破骨細胞の骨吸収能において役割を持つことも報告されている。

2. 研究の目的

Nupr1 の破骨細胞分化、骨吸収制御における役割を *in vitro* 培養系を用いて明らかにする。さらに Nupr1 ノックアウトマウスを用いて *in vivo*における骨代謝と破骨細胞分化機能における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *in vitro*破骨細胞分化系及びその解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 のクローン RAW-D に RANKL を添加し 3 日間培養し破骨細胞を形成した。野生型及び Nupr1 ノックアウトマウスの大腿骨、脛骨より骨髓細胞を単離し、M-CSF (10ng/ml)の存在下で 3 日間培養し骨髓マクロファージ(BMM)を形成したのち、RANKL (50ng/ml)および M-CSF (10ng/ml)の存在下で 24 時間培養し前破骨細胞を、48 時間培養し破骨細胞を形成した。培養後破骨細胞特異的マーカーである TRAP を用いて染色を行い多核の破骨細胞数を測定し、RNA を単離し RT-PCR 解析、及び蛍光免疫染色を行った。Nupr1shRNA レンチウイルスプラスミドを構築しレンチウイルスを作成し、RAW-D 細胞及び野生型マウス由来の骨髓マクロファージに感染させ Nupr1 の発現をノックダウンした。破骨細胞前駆細胞の増殖は、骨髓マクロファージを培養し、Cell counting kit (CCK-8) (Dojindo) を用いて解析した。破骨細胞の分化の指標として、骨髓細胞に由来する破骨細胞前駆細胞における RANK の発現を、抗 RANK 抗体を用いて Flow cytometry 法により行った。破骨細胞初期分化のシグナルについて骨髓マクロファージを RANKL で刺激したときの p38 MAPK のリン酸化について Western 解析を行った。

(2) マウスの骨パラメーター解析及び骨形態計測

野生型及び Nupr1 ノックアウトマウス (11 週令) 大腿骨の海綿骨と皮質骨の骨構造解析を μ CT (SkyScan-1076) により行った。海綿骨と皮質骨の骨パラメーターは CTAn software を用いて解析した。大腿骨を単離し Villanueva 染色後、非脱灰標本を作製し海綿骨における破骨細胞の骨形態計測を行なった。

(3) オートファジーとアポトーシスの解析

骨髓マクロファージに RANKL を添加した破骨細胞に分化系においてオートファジー関連遺

伝子の発現を RT-PCR 法により解析した。破骨細胞を形成した後にアミノ酸を含まない培地に交換しオートファジーを誘導させ、オートファジー関連遺伝子の発現を RT-PCR 及び Western 解析によりアポトーシスについては CCK-8 を用いた解析により行った。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞分化における Nupr1 の発現誘導と局在

マウスマクロファージ細胞株 RAW-D 及びマウス骨髄マクロファージに RANKL を添加し、破骨細胞分化における Nupr1 の発現を解析したところ、RANKL により破骨細胞のマスターレギュレータとして報告されている NFATc1 の発現が誘導された後に、Nupr1 mRNA の発現が上昇した。Nupr1 タンパク質は破骨細胞の前駆細胞や多核の破骨細胞の核に局在し、NFATc1 との共局在が認められた。さらに、Nupr1 プロモーター上流 1kp 領域には NFATc1 結合コンセンサス配列が7つ存在し、NFATc1 シグナル阻害剤 FK506 添加により Nupr1 の発現が用量依存的に低下した。

(2) Nupr1 ノックアウトマウスの骨構造の解析と破骨細胞の動態

Nupr1 の *in vivo* の骨代謝における生理的な役割について明らかにするために、野生型と Nupr1 ノックアウトマウスの大腿骨の骨表現型を μ CT により解析した。Nupr1 ノックアウトマウスの海綿骨では野生型と比較し、骨密度の増加、海綿骨量、数及び厚さの有意な増加が見られた。一方皮質骨においては骨量の違いが認められなかった。さらに、骨量増加についてのメカニズムを明らかにするために、骨形態計測を行った。その結果、 μ CT 解析の結果と一致して Nupr1 ノックアウトマウスでは骨量が増加しており、海綿骨の組織学的な解析では、骨面上の破骨細胞数や破骨細胞面及び骨吸収面の低下が見られた。さらに、骨面上の単核の破骨細胞数の低下が認められ、破骨細胞分化の低下が骨量の増加の一因であると考えられた。

(3) *in vitro* 破骨細胞分化の解析

さらに、Nupr1 ノックアウトマウスの破骨細胞分化の低下のメカニズムについて明らかにするために、野生型及び Nupr1 ノックアウトマウス由来の骨髄マクロファージに RANKL を添加したときの破骨細胞の形成能を比較した。その結果、RANKL 添加後 72 時間では TRAP 陽性の破骨細胞の形成及び破骨細胞特異的な遺伝子 NFATc1 やカテプシン K の発現が Nupr1 ノックアウトマウスでは低下していた。これらの作用が Nupr1 の破骨細胞系列細胞における働きによるものであるか明らかにするために、RAW-D 細胞に RANKL を添加し破骨細胞分化を誘導した時に Nupr1shRNA を用いて Nupr1 の発現をノックダウンしその影響を調べた。その結果、TRAP 陽性破骨細胞の形成、NFATc1 の発現が顕著に低下しており、Nupr1 は破骨細胞の分化に直接関与することが考えられた。つぎに Nupr1 が破骨細胞の分化の初期に関与するかどうかについて、骨髄マクロファージの RANKL の受容体 RANK の発現をフローサイトメトリー法により解析した。その結果、Nupr1 ノックアウトでは野生型マウスと比較して RANK の発現が低下しており破骨細胞の初期分化が低下していた。さらに、破骨細胞の初期分化の作用について調べるために RANKL の下流の初期シグナルの p38MAPK のリン酸化について調べたところ、p38 のリン酸化には違いは認められなかった。一方、骨髄マクロファージの細胞増殖能が、ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して低下していた。以上のことより、Nupr1 を欠損すると破骨細胞の初期分化において前駆細胞の増殖が低下し、さらにその分化が低下することが考えられた。

(3) オートファジーおよびアポトーシスの解析

オートファジー関連遺伝子 FOXO3 は Nupr1 の標的遺伝子の一つで破骨細胞の分化にも関わることを報告されている。野生型と Nupr1 ノックアウトマウスの破骨細胞分化過程における Foxo3 の発現を調べたところ、Nupr1 ノックアウトマウスで野生型と比較し亢進していた。破骨細胞分化系におけるオートファジー指標タンパク質 LC3-II の発現をウエスタン解析により解析したところ、ノックアウトマウスにおいて LC3-II の発現が高いことがわかった。さらに骨髄マクロファージから形成した破骨細胞をアミノ酸飢餓状態としオートファジーを誘導したところ、Nupr1 mRNA の発現が上昇し、Nupr1 ノックアウトマウスにおいてはオートファジーによる細胞死が亢進した。

以上のことから Nupr1 は破骨細胞前駆細胞の増殖や破骨細胞の生存に促進的に働いて破骨細胞の分化と骨吸収を制御することが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

Shiraki M, Xu X, Iovanna JL, Kukita T, Hirata H, Kamohara A, Kubota Y, Miyamoto H, Mawatari M, Kukita A. Deficiency of stress-associated gene Nupr1 increases bone volume by attenuating differentiation of osteoclasts and enhancing differentiation of osteoblasts. 査読有 **FASEB J**. 2019 May 8:fj201802322RR. doi: 10.1096/fj.201802322RR. [Epub ahead of print]

Badawy T, Kyumoto-Nakamura Y, Uehara N, Zhang J, Sonoda S, Hiura H, Yamaza T, Kukita A, Kukita T. Osteoblast lineage-specific cell-surface antigen (A7) regulates osteoclast recruitment and calcification during bone remodeling. 査読有 **Lab Invest**. 2019 Feb 11. doi: 10.1038/s41374-018-0179-4.

Xu X, Hirata H, Shiraki M, Kamohara A, Nishioka K, Miyamoto H, Kukita T, Kukita A. Prostate transmembrane protein androgen induced 1 is induced by activation of osteoclasts and regulates bone resorption. 査読有 **FASEB J**. 2019 Mar;33(3):4365-4375. doi: 10.1096/fj.201801573R. Epub 2018 Dec 17.

Shiratori T., Kyumoto-Nakamura Y., Kukita A., Uehara N., Zhang J., Koda K., Kamiya M., Badawy T., Tomoda E., Xu X., Yamaza T., Urano Y., Koyano K., Kukita T. IL-1 β induce pathologically activated osteoclasts bearing extremely high level of resorption activity imaged by pH-sensitive fluorescence probes: A possible pathological subpopulation of osteoclasts, accompanied with suppressed expression of integrin regulating molecule kindling-3 and talin-1. 査読有 **J. Immunology** 2018 Jan 1;200(1):218-228. doi: 10.4049/jimmunol.1602035.

Funakubo N, Xu X, Kukita T, Nakamura S, Miyamoto H, Kukita A. Pmepa1 induced by RANKL-p38 MAPK pathway has a novel role in osteoclastogenesis. 査読有 **J Cell Physiol**. 2018 Apr;233(4):3105-3118. doi: 10.1002/jcp.26147.

Uehara N, Kukita A, Kyumoto-Nakamura Y, Yamaza T, Yasuda H, Kukita T. Osteoblast-derived Laminin-332 is a novel negative regulator of osteoclastogenesis in bone microenvironments. 査読有 **Lab Invest**. 2017 Oct;97(10):1235-1244. doi: 10.1038/labinvest.2017.55.

Ueno M, Miyamoto H, Tsukamoto M, Eto S, Noda I, Shobuie T, Kobatake T, Sonohata M, Mawatari M. Silver-Containing Hydroxyapatite Coating Reduces Biofilm Formation by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus In Vitro and In Vivo. 査読有 **Biomed Res Int**. 2016;2016:8070597. doi: 10.1155/2016/8070597.

Li YJ, Kukita A, Kyumoto-Nakamura Y, Kukita T. Extremely high expression of antisense RNA for Wilms' Tumor 1 in active osteoclasts: Suppression of Wilms' Tumor 1 protein expression during osteoclastogenesis. 査読有 **Am J Pathol**. 2016 Sep;186(9):2317-25. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.05.005. Epub 2016 Jul 7.

Ota Y., Niuro H., Ota S., Ueki N., Tsuzuki H., Nakayama T., Mishima K., Higashioka K., Jabbarzadeh-Tabrizi S., Mitoma H., Akahoshi M., Arinobu Y., Kukita A., Yamada H., Tsukamoto H., Akashi K. Generation mechanism of RANKL⁺ effector memory B cells: its relevance to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. 査読有 **Arthritis Research & Therapy** 18(1)2016 016 Mar 16;18:67. doi: 10.1186/s13075-016-0957-6.

[学会発表] (計 13 件)

白木誠、平田寛人、蒲原麻菜、久木田明子、馬渡正明 ストレス応答タンパク質 nuclear protein/p8 の破骨細胞のオートファジーおよびアポトーシス制御における役割 第 33 回 日本整形外科学会基礎学術集会 10月11-12日 2018

Shirak M., Hirata H., Kamohara M., Iovanna J., Kukita T., Mawatari M., Kukita A. Deletion of the gene encoding Nupr1/p8, a regulator of autophagy, attenuates osteoclastogenesis but increases trabecular bone mass by enhancing osteoblast differentiation. 41th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research 2018.09.28 10.01 (Montreal, Canada)

Kamohara A., Xu X., Shiraki M., Hirata H., Kukita T., Kukita A. IgG complex with protein A of Staphylococcus aureus enhance the differentiation and bone resorption of osteoclasts. 41th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral

Research 2018.09.28 10.01 (Montreal, Canada)

蒲原 麻菜, 徐 祥赫, 白木 誠, 平田 寛人, 久木田敏夫, 久木田明子 黄色ブドウ球菌の
プロテイン A と IgG 複合体による骨破壊促進機構 第 34 回 日本骨代謝学会 2018,7,
26-28

Shiraki M., Xu X., Kamohara A., Iovanna J., Kubota Y., Kukita T., Mawatari M., Kukita
A., Nupr1/p8, a Key Player of Stress Response, Regulates Autophagy and Apoptosis of
Osteoclasts 40th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research
2017.09.7 11 (Colorado, USA)

Xu X., Shiraki M., Kamohara A., Nishioka K., Matsuhisa F., Kitajima S., Kukita T.,
Kukita A. Pmpa1 is Specifically Induced by Bone Components in Osteoclasts and
Regulates Bone Resorption Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral
Research 2017.09.10 (Colorado, USA)

Xu X, Shiraki M., Kamohara A., Shobuike T., Kukita T., Kukita A. LRF/OCZF regulates
Survival of Osteoclasts via Sam68, a Splicing Regulator of Bcl-x. Annual Meeting of
American Society for Bone and Mineral Research 2017.09.10 (Colorado, USA)

白木誠、徐祥赫、蒲原麻菜、馬渡正明、久木田明子 Nuclear protein1/p8 の破骨細胞の
オートファジーおよびアポトーシス制御における役割 第 35 回 日本骨代謝学会
2017.07.28 (福岡)

蒲原 麻菜, 徐 祥赫, 白木 誠, 久木田明子 黄色ブドウ球菌はプロテイン A による IgG
複合体形成を介して破骨細胞の分化を亢進する 第 35 回 日本骨代謝学会 2017.07.27
(長崎)

白木誠、徐祥赫、蒲原麻菜、馬渡正明、久木田明子 Nuclear protein1/p8 の破骨細胞の
オートファジーおよびアポトーシス制御における役割 第 3 回 日本骨免疫学会
2017.06.28

久木田明子、徐祥赫、白木誠、蒲原麻菜、菖蒲池健夫、久木田敏夫 zBTB タンパク質
LRF/OCZF の Bcl-X のスプライシング制御因子 Sam68 を介した破骨細胞の生存調節 第 3 回
日本骨免疫学会 2017.06.27 29

白木誠、徐祥赫、蒲原麻菜、馬渡正明、久木田明子 ストレス応答タンパク質 Nuclear protein
1/p8 の破骨細胞における新たな機能 第 34 回 日本骨代謝学会 7月20-23日 2016 (大
阪) プログラム抄録集 p220

徐祥赫、白木誠、蒲原麻菜、菖蒲池健夫、久木田敏夫、久木田明子 zBTB タンパク質 LRF/OCZF
の破骨細胞分化における機能と骨吸収中の破骨細胞における発現の解析 第 34 回 日本
骨代謝学会 7月20-23日 2016 (大阪)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：久木田 明子

ローマ字氏名：Kukita Akiko

所属研究機関名：佐賀大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30153266

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：白木 誠

ローマ字氏名：Shiraki Makoto