

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20423

研究課題名(和文)新規分子PPP1r18による破骨細胞骨吸収活性制御機構の解明

研究課題名(英文)The role of PPP1r18, an actin binding protein, in osteoclastic bone resorption

研究代表者

松原 琢磨(Matsubara, Takuma)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00423137

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):骨吸収に必須のチロシンキナーゼc-Srcは破骨細胞の機能を明らかにすることにより破骨細胞による骨吸収の分子基盤を解明できると考えられる。我々は、c-Srcと結合する分子を質量分析により探索し、アクチンの重合に関与するProtein Phosphatase1, regulatory subunit 18 (PPP1r18)を同定した。本研究では機能的に未知であるPPP1r18の破骨細胞における機能を検討し、PPP1r18はProtein phosphatase 1と結合し、Srcの機能を負に制御し、破骨細胞の骨吸収活性を抑制することを示唆するデータを得た。

研究成果の概要(英文):Osteoclasts in tyrosine kinase Src deficient mice that show osteopetrosis hardly resorb bone matrix because of disable to attachment to bone matrix. Src organizes actin accumulation and regulates actin ring formation for attachment. However molecular mechanisms how Src regulates actin ring formation in osteoclasts are not fully understood. We identified an actin binding protein PPP1r18 as Src binding protein by mass spectrum analysis. PPP1r18 was expressed and localized in actin ring with Src of osteoclasts. These results suggest that PPP1r18 bind to Src and involved in actin ring formation. Downregulation of PPP1r18 expression promoted actin ring formation. On the other hand, overexpression of PPP1r18 inhibited actin ring formation and bone resorption. Mutation of protein phosphatase 1 binding domain of PPP1r18 canceled inhibition of actin ring formation by PPP1r18. These results suggest that PPP1r18 negatively regulates actin ring formation and bone resorption.

研究分野:機能系基礎歯科学

キーワード:破骨細胞 骨吸収

### 1. 研究開始当初の背景

近年、未曾有の超高齢社会により老化や閉経などに起因する骨粗鬆症や歯周病などの代謝性骨疾患が社会問題となっている。正常な骨組織においては、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成がバランスよく働くことにより、体内のカルシウム・リン代謝および骨格が維持されるが、老化や閉経などにより、このバランスが崩れると上記代謝性骨疾患となる。

現在、破骨細胞の細胞死を誘導するビスフォスフォネート製剤や破骨細胞の分化を抑制する抗RANKL抗体が代謝性骨疾患に対する治療法として広く普及しているが、一方で微小骨折や歯科領域における顎骨壊死などの副作用が社会的問題となっている。さらにこれらの薬剤は長期に渡り作用することから、薬剤による骨吸収活性の調節が難しい。

そのため、細胞の生存や分化ではなく破骨細胞の骨吸収機能そのものを抑制する薬剤があれば骨吸収活性の調節が容易で、上記のような副作用も少ないことが期待できる。そのような薬剤開発のためには破骨細胞の骨吸収活性制御機構を解明する必要がある。

### 2. 研究の目的

c-Src 遺伝子欠損マウスは、野生型マウスに比べて破骨細胞が多数存在するが、破骨細胞の骨吸収活性が障害されているため大理石骨病を呈する (P. Soriano, et al. Cell 1991)。すなわち、c-Src は破骨細胞の分化や生存ではなく、骨吸収に必須の分子であり、その作用メカニズムを解明することは破骨細胞による骨吸収の分子基盤を解明できると考えられる。

破骨細胞は骨吸収を行う際に F-アクチンの凝集を促し、特徴的なアクチン細胞骨格構造である明帯および波状縁形成することにより骨吸収の場を構築する (B. Boyce, et al., J Clin Invest. 1992) (図 1)。一方、c-Src 遺伝子欠損マウスの破骨細胞は F-アクチンの凝集が不完全なため、明帯や波状縁が形成されず、骨吸収できない。この結果から、c-Src は F-アクチンの凝集を介して明帯や波状縁形成を制御していると考えられている。

しかし、c-Src が骨吸収に必須の分子であるにもかかわらず、c-Src による破骨細胞の骨吸収制御の分子基盤は不明な点が多い。そこで、この点を解明するために、申請者は後述の通り c-Src 結合分子 PPP1r18 を同定した。本研究では、その機能の解明を試み、c-Src 下流にて骨吸収を制御している分子メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

[1] PPP1r18 の破骨細胞における機能的役割の解明

破骨細胞の骨吸収機能に対する PPP1r18 の役割を shRNA を用いた遺伝子ノックダウン (loss-of function)、あるいは構成的活性

型変体を遺伝子導入し (gain-of function)、アクチンリング形成を指標に、破骨細胞における PPP1r18 の機能的役割を明らかにする。 [2] c-Src と PPP1r18 の破骨細胞吸収に関する分子との相互関係の解明

c-Src と PPP1r18 の結合あるいはリン酸化調節による機能的相互関係を明らかにする。さらに、既知の c-Src 下流にて機能している分子との相互関係を明らかにする。

### 4. 研究成果

4-8 週齢マウス脾臓細胞より破骨細胞を分化誘導し、PPP1r18 の発現量の変化をウエスタンブロッティング法により検索した結果、PPP1r18 の発現量は破骨細胞に伴って低下した。さらに、免疫蛍光染色の結果、PPP1r18 の局在はアクチンリングおよび Src の局在と一致していた。次に、PPP1r18 の破骨細胞における役割を検討するために shRNA により PPP1r18 をノックダウンした結果、破骨細胞のアクチンリング形成を促進した。一方、PPP1r18 を破骨細胞に過剰発現した結果、PPP1r18 はアクチンリング形成を抑制し、象牙切片上における骨吸収窩形成を抑制した。また、PPP1r18 の Protein phosphatase 1 (PP1) 結合部位を欠損させた変異体を破骨細胞に過剰発現すると、アクチンリング形成および骨吸収活性を抑制しなかった。

以上よりアクチン制御分子 PPP1r18 は Src および PP1 との結合により破骨細胞のアクチンリング形成を制御することが示唆された。

### 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 5 件)

1. Eijiro Jimi, Shoichiro Kokabu, Takuma Matsubara, Chihiro Nakatomi, Kou Matsuo, Seiji Watanabe: NF- $\kappa$ B acts as a multifunctional modulator in bone invasion by oral squamous cell carcinoma, Oral Science International, Volume 13, Page 1-6, 2016, DOI: 10.1016/S1348-8643(15)00038-5
2. Matsubara T, Kinbara M, Maeda T, Yoshizawa M, Kokabu S, Takano Yamamoto T.: Regulation of osteoclast differentiation and actin ring formation by the cytolinker protein plectin. Biochem Biophys Res Commun 489:472-476. 2017
3. Kokabu S, Nakatomi C, Matsubara T, Ono Y, Addison WN, Lowery JW, Urata M, Hudnall AM, Hitomi S, Nakatomi M, Sato T, Osawa K, Yoda T, Rosen V, Jimi E: The transcriptional co-repressor TLE3 regulates myogenic differentiation by repressing the activity of the MyoD transcription factor. J Biol Chem 292:12885-12894. 2017
4. Matsubara T, Kokabu S, Nakatomi C,

Kinbara M, Maeda T, Yoshizawa M, Yasuda H, Takano-Yamamoto T, Baron R, Jimi E: The Actin-Binding Protein PPP1r18 Regulates Maturation, Actin Organization, and Bone Resorption Activity of Osteoclasts. *Mol Cell Biol* 38:e00425-17. 2017.

5. Matsubara T, Kinbara M, Maeda T, Yoshizawa M, Kokabu S, Takano-yamamoto T: Plectin, A Cytolinker Protein, Plays an Important Role in Differentiation and Actin Ring Formation in Osteoclasts *Mathews Journal of Cytology and Histology. Mathews J Cytol Histol* 1:6-8. 2018.

(学会発表) (計 39 件)

1. Takuma Matsubara, Chihiro Nakatomi, Mariko Urata, Masahiro Ogawa, Kenya Toyama, Hiroshi Kunihiro, Shoichiro Kokabu and Eijiro Jimi : A novel protein actin ring regulator PPP1r18 in osteoclasts, Asia-pacific conference in Fukuoka 2016, Kitakyushu, 2016/5/11
2. Chihiro Nakatomi, Shoichiro Kokabu, Takuma matsubara, Mitsushiro Nakatomi and Eijiro Jimi: NF- B alternative pathway regulates the endochondral ossification, Asia-pacific conference in Fukuoka 2016, Kitakyushu, 2016/5/11
3. Shoichiro Kokabu, Chihiro Nakatomi, Takuma Matsubara and Eijiro Jimi: NF- B signaling and denervation-induced skeletal muscle atrophy, Asia-pacific conference in Fukuoka 2016, Kitakyushu, 2016/5/11
4. 松原琢磨, 中富千尋, 古株彰一郎, 浦田真梨子, 自見英治郎 :新規アクチン結合分子 PPP1r18 による破骨細胞のアクチン細胞骨格制御, 九州歯科学会, 北九州, 2016/5/28-29
5. 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 自見英治郎: NF- B シグナルは除神経による骨格筋萎縮初期に亢進する, 九州歯科学会, 北九州, 2016/5/28-29
6. 中富千尋, 古株彰一郎, 中富満城, 松原琢磨, 浦田真梨子, 自見英治郎: 軟骨内骨化における NF- B 非古典的経路の機能解明, 九州歯科学会, 北九州, 2016/5/28-29
7. 松原琢磨, 中富千尋, 古株彰一郎, 自見英治郎 :新規アクチン結合分子 PPP1r18 による破骨細胞のアクチンリング形成制御, 日本骨免疫学会, 沖縄, 2016/7/6-8
8. 松原琢磨, 中富千尋, 古株彰一郎, 山本照子, 自見英治郎 :破骨細胞のアクチンリング形成を制御する新規アクチン結合分子 PPP1r18, 日本骨代謝学会, 大阪, 2016/7/21-23
9. 中富千尋, 古株彰一郎, 松原琢磨, 自見英治郎: 内軟骨性骨形成における NF- B 非古典的経路の役割, 日本骨代謝学会, 大阪, 2016/7/21-23
10. 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 自見英治郎: NF- B シグナル亢進と除神経性骨格筋萎縮, 日本骨代謝学会, 大阪, 2016/7/21-23
11. 松原琢磨, 中富千尋, 古株彰一郎, 山本照子, 自見英治郎: 新規アクチン結合分子 PPP1r18 は破骨細胞のアクチンリング形成を阻害する, 日本歯科基礎医学会, 北海道, 2016/8/24-26
12. 中富千尋, 古株彰一郎, 松原琢磨, 中富満城, 浦田真梨子, 自見英治郎: NF- B 非古典的経路は内軟骨性骨形成を調節している, 日本歯科基礎医学会, 北海道, 2016/8/24-26
13. 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 自見英治郎: TLE3 による MyoD の転写活性制御機構, 日本歯科基礎医学会, 北海道, 2016/8/24-26
14. 浦田真梨子, 松原琢磨, 竹内弘, 中富千尋, 平田-土屋志津, 古株彰一郎, 張皿, 北村知昭, 自見英治郎: Smad4 と NF- B/p65 の会合領域の同定, 日本歯科基礎医学会, 北海道, 2016/8/24-26
15. 吉澤光弘, 福永智広, 松原琢磨, 佐々木紀代, 坂本麻由里, 山本照子: メカニカルストレス下における骨細胞アポトーシスと p53, CCN2 の関与, 日本矯正歯科学会, 徳島, 2016/11/7-9
16. 松原琢磨: 破骨細胞アクチンリング形成を制御する分子 PPP1r18 の同定, *Skeletal Science Retreat*, 箱根, 2016/11/25-26
17. Takuma Matsubara, Chihiro Nakatomi, Shoichiro Kokabu, Eijiro Jimi: A novel c-Src binding protein PPP1r18 regulates actin ring in osteoclasts., *Asia-Pacific Conference in Fukuoka, Kitakyushu*, 2017/5/11
18. Mariko Urata, Takuma Matsubara, Shoichiro Kokabu, Chihiro Nakatomi, Min Zhang, Shizu Hirata-Tsuchiya, Chiaki Kitamura and Eijiro Jimi: Identification of the binding region of NF- B-p65 on Smad4., *Asia-Pacific Conference in Fukuoka, Kitakyushu*, 2017/5/11
19. Masahiro Ogawa, Shoichiro Kokabu, Chihiro Nakatomi, Takuma Matsubara, Seiji Watanabe and Eijiro Jimi: The role of BMP signaling in EMT of malignant melanoma., *Asia-Pacific Conference in Fukuoka, Kitakyushu*, 2017/5/11
20. Yuri Nakaminami, Yu Akaike, Katsuya Shirai, Shoichiro Kokabu, Takuma Matsubara and Eijiro Jimi: NF- B regulates the differentiation of skeletal muscle stem cells., *Asia-Pacific Conference in Fukuoka, Kitakyushu*, 2017/5/11
21. Shoichiro Kokabu, Chihiro Nakatomi,

- Takuma Matsubara and Eijiro Jimi: TLE3 regulates myogenic differentiation of muscle stem cells by repressing the transcriptional activity of MyoD., Asia-Pacific Conference in Fukuoka, Kitakyushu, 2017/5/11
22. Kenya Touyama, Takuma Matsubara, Shoichiro Kokabu, Chihiro Nakatomi, Kenshi Maki and Eijiro Jimi: A p130Cas binding protein Bif-1 is involved in osteoclastic bone resorption., Asia-Pacific Conference in Fukuoka, Kitakyushu, 2017/5/11
  23. Takuma Matsubara, Chihiro Nakatomi, Shoichiro Kokabu, Eijiro Jimi: An actin binding protein PPP1r18 regulates actin ring in osteoclasts through Protein phosphatase binding, The 65<sup>th</sup> annual meeting of Japanese association for dental research, Tokyo, 2017/11/18-19
  24. Miki Kobayakawa, Tsuyoshi Nakajima, Takuma Matsubara, William Addison, Ryuji Hosokawa, Shoichiro Kokabu: Expression levels of umami receptor, tas1r1/tas1r3, are decreased in an in vitro model of skeletal muscle atrophy., The 10th Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, Kitakyushu, 2017/11/19-21
  25. Tatsuki Yaginuma, Takuma Matsubara, Shoichiro Kokabu, Chihiro Nakatomi, Izumi Yosioka, Eijiro Jimi: p130Cas is involved in morphological change, mobility, and invasion ability in OSCC., The 10th Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, Kitakyushu, 2017/11/19-21
  26. Kenya Touyama, Takuma Matsubara, Shoichiro Kokabu, Chihiro Nakatomi, Kenshi Maki and Eijiro Jimi: A p130Cas binding protein Bif-1 is involved in osteoclastic bone resorption., The 10th Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, Kitakyushu, 2017/11/19-21
  27. 松原琢磨, 古株彰一郎, 中富千尋, 自見英治郎: 新規 c-Src 会合分子 PPP1r18 は破骨細胞の骨吸収を負に制御する, 第 77 回九州歯科学会総会・学術大会, 北九州, 2017/05/20,21
  28. 小川昌洋, 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 渡邊誠之, 自見英治郎: 悪性黒色腫の上皮間葉移行における BMP シグナルの役割, 第 77 回九州歯科学会総会・学術大会, 北九州, 2017/05/20,21
  29. 當山健弥, 松原琢磨, 古株彰一郎, 中富千尋, 牧 憲司, 自見英治郎: p130Cas と結合するタンパク質 Bif-1 は骨吸収に関与する, 第 77 回九州歯科学会総会・学術大会, 北九州, 2017/05/20,21
  30. 浦田真梨子, 松原琢磨, 古株彰一郎, 中富千尋, 土屋-平田志津, 鷲尾絢子, 諸富孝彦, 北村知昭, 自見英治郎: Smad4 と NF- B p65 の結合領域の検討, 第 77 回九州歯科学会総会・学術大会, 北九州, 2017/05/20,21
  31. 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 自見英治郎: TLE3 は骨格筋組織幹細胞 サテライト細胞の筋分化を制御する, 第 77 回九州歯科学会総会・学術大会, 北九州, 2017/05/20,21
  32. 松原琢磨, 古株彰一郎, 中富千尋, 自見英治郎: アクチン結合分子 PPP1r18 は破骨細胞のアクチンリング形成及び破骨細胞性骨吸収を制御する, 第 35 回日本骨代謝学会学術集会, 福岡, 2017/07/27-29
  33. 中富千尋, 古株彰一郎, 松原琢磨, 自見英治郎: NF-kB 非古典的経路の内軟骨内骨化過程における役割, 第 35 回日本骨代謝学会学術集会, 福岡, 2017/07/27-29
  34. 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 自見英治郎: TLE3 はサテライト細胞の筋分化を制御する, 第 35 回日本骨代謝学会学術集会, 福岡, 2017/07/27-29
  35. 松原琢磨, 古株彰一郎, 中富千尋, 自見英治郎: 破骨細胞のアクチンリング形成および破骨細胞性骨吸収を制御するアクチン結合分子 PPP1r18, 第 59 回歯科基礎医学学会学術大会, 松本, 2017/9/16-18
  36. 中富千尋, 松原琢磨, 中富満城, 古株彰一郎, 自見英治郎: 成長板軟骨細胞の増殖における NF- B 非古典的経路の役割, 第 59 回歯科基礎医学学会学術大会, 松本, 2017/9/16-18
  37. 小川昌洋, 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 渡邊誠之, 自見英治郎: 悪性黒色腫の顎骨浸潤と転移における BMP シグナルの役割, 第 59 回歯科基礎医学学会学術大会, 松本, 2017/9/16-18
  38. 古株彰一郎, 中富千尋, 松原琢磨, 自見英治郎: TLE3 による骨格筋組織幹細胞サテライト細胞の増殖・分化制御機構, 第 59 回歯科基礎医学学会学術大会, 松本, 2017/9/16-18
  39. 浦田真梨子, 松原琢磨, 古株彰一郎, 中富千尋, 土屋-平田志津, 鷲尾絢子, 諸富孝彦, 北村知昭, 自見英治郎: BMP による骨形成促進を目的とした Smad4 と NF- B p65 の会合領域の検討, 第 59 回歯科基礎医学学会学術大会, 松本, 2017/9/16-18
- 〔図書〕(計 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計 件)
- 名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松原琢磨 (MATSUBARA, Takuma)  
九州歯科大学、分子情報生化学分野、助  
教  
研究者番号：00423137

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

自見 英治郎 (JIMI, Eijiro)  
九州歯科大学、分子情報生化学分野、教授  
(現・九州大学歯学研究院、教授)  
研究者番号：40276598  
古株 彰一郎 (KOKABU, Shoichiro)  
九州歯科大学、分子情報生化学分野、准教授  
研究者番号：30448899

##### (4) 研究協力者

中富千尋 (NAKATOMI, Chihiro)  
浦田真梨子 (URATA, MARIKO)  
當山健弥 (TOYAMA, Kenya)  
小早川美輝 (KOBAYAKAWA, Miki)  
柳沼樹 (YAGINUMA, Tatsuki)