

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11645

研究課題名(和文)シグナル分子PRIPによる破骨細胞分化制御機構の解明

研究課題名(英文)The role of PRIP, a signaling molecule, in the regulation of osteoclast differentiation

研究代表者

松田 美穂 (Matsuda, Miho)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：40291520

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)：シグナル分子PRIPの遺伝子欠損(KO)マウスでは海綿骨の骨量が増加するが、その要因が骨芽細胞分化能の亢進の他に破骨細胞分化における異常が示唆された。そこで本研究では、破骨細胞分化におけるPRIPの役割を明らかにすることを目的に解析を行った。その結果、破骨細胞分化過程においてPRIPは、分化のマスター制御因子であるNFATc1の核移行の制御、また破骨細胞分化抑制因子Semaphorin 3Aの受容体Neuropilin 1の発現制御に関わりKO細胞では分化抑制が続くことがわかった。これらのシグナル制御を通してPRIPが破骨細胞分化制御に機能することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

身体の支持組織でありかつ全身のエネルギー代謝を制御する組織でもある骨は、骨芽細胞と破骨細胞が担う骨形成と骨吸収のバランスで恒常性が維持されている。シグナル分子PRIPの遺伝子欠損マウスにおいて骨量増加が認められたことから、PRIPの骨代謝制御への関わりについて研究を進め、今回の成果からPRIPが破骨細胞分化における特定の細胞内情報伝達経路の制御を担うことが明らかとなった。このことは、破骨細胞分化制御機構に新たな視点を見出し未知の分子基盤を導き出すものであり、破骨細胞が担う骨吸収機能の低下によって引き起こされる疾患の病因・病態の解明や治療の標的分子の発見など臨床応用にも貢献しているものである。

研究成果の概要(英文)：This study revealed the following: (i) an inositol 1,4,5-trisphosphate binding and signaling molecule, PRIP regulates nuclear translocation of NFATc1, a master regulator of osteoclast differentiation, through the change of intracellular Ca²⁺ concentration. (ii) PRIP is involved in the regulation of Semaphorin 3A-Neuropilin 1 signaling which regulates negatively osteoclast differentiation. The failure of these regulation by PRIP deficiency causes abnormal osteoclast differentiation to result in the impairment of osteoclastogenesis in KO mice.

研究分野：骨代謝制御 生殖制御

キーワード：破骨細胞 分化 Neuropilin 1 PRIP 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

我々は、細胞シグナリング研究から新規タンパク質を見だし(*JBC*, 267,6518,1992)、その構造的・機能的特徴からPRIP [PLC (phospholipase C)-related but catalytically inactive protein] と名付けて機能解明を進めてきた。Ins(1,4,5)P₃結合性であることからCa²⁺シグナリングにおける役割を解明する研究を行うとともに(*BJ*, 349, 357, 2000; *JCP*, 202, 422, 2005)、PRIPと結合する分子を探索し、PP1 (protein phosphatase-1) と GABARAP (GABA_A receptor-associated protein)の2分子を同定した。これらの結合分子がGABA_A受容体機能への関わりを示唆したのでPRIP 遺伝子欠損(KO)マウスを作製し、GABA_A受容体機能に関わるPRIPの役割について検討してきた(*EMBO J*, 21, 1004, 2002; *JBC*, 281, 22180, 2006; *JNS*, 27, 1692, 2007)。また、PRIPがイノシトールリン脂質との結合を通して開口分泌に関わることも分かってきた(*JBC*, 287, 10565, 2012; *JBC*, 288, 7769, 2013)。ホスファターゼであるPP1, PP2Aとの結合を確認し、特定分子のリン酸化制御へのPRIPの関与を明らかにした(*Biochemistry*, 51, 3394, 2012)。KOマウスの表現型を観察していく過程で、野生型に比べ出産頻度や1回当たりの出産仔数、総出産仔数が少ないなどの生殖に関わる異常を見いだした(*Biol Reprod*, 81, 681, 2009)。生殖系ホルモンのアンバランスから骨組織の異常を想定し骨形態計測を行ったところ、予想に反して骨密度及び海綿骨の骨量が増大していた。PRIP欠損による骨量の増大が、骨形成の亢進と骨吸収の低下に起因することが示唆されたので(*JBC*, 286, 31032, 2011)、その分子メカニズムの解析に着手した。KOマウスでは骨芽細胞分化能が亢進するメカニズムを明らかにし(*J Cell Biochem*. 116, 2814, 2015)、破骨細胞においても培養による破骨細胞分化においてKO由来の細胞で破骨細胞数の低下が見られることから分化への関与が示唆された。

2. 研究の目的

破骨細胞分化における PRIP の役割を解明することにより、骨代謝制御機構における新規の分子基盤を見いだすことを目的とする。

3. 研究の方法

① PRIP の有無が及ぼす破骨細胞分化への影響1

野生型(WT)および PRIP 遺伝子欠損(KO)マウスの大腿骨から調製した骨髄細胞を用いて破骨細胞分化を誘導し、分化に重要な情報伝達機構(M-CSF/ c-Fms, RANK/RANKL シグナリング等)についてPRIPの有無が及ぼす影響を解析した。具体的には、M-CSF、RANKL 刺激による単独培養における破骨細胞分化状態を TRAP 活性、マーカー分子の免疫染色等で解析した。また、蛍光顕微鏡観察やウエスタンブロットティング、リアルタイム PCR などの細胞生物学的解析および生化学的解析により、シグナル経路を担うキー分子(c-Fms, RANK, TRAF6, NFATc1 など)の発現量やリン酸化状態、薬剤刺激に対する変化を経時的に追跡することで、それらのシグナリング調節への関与を検討した。

② PRIP の有無が及ぼす破骨細胞分化への影響2

マウス骨髄由来細胞と頭骸骨由来の骨芽前駆細胞との共存培養における破骨細胞への分化誘導を行い、破骨細胞分化の経時的変化を検討し WT と PRIP-KO との差異を検討した。具体的には、ビタミン D₃ およびプロスタグランジン E₂ 存在下で共存培養を行い、①同様に検討し、PRIP 欠損により分化に支障を来す時期を絞り込む。その時期の共存培養から骨芽前駆細胞を取り除き、残った骨髄由来細胞について網羅的 RNA 解析(マイクロアレイ)を行い、遺伝子発現変化におけ

るWTとKOの差異を比較検討した。

③ ②の結果から、遺伝子発現変化に差異のあった分子が関わるシグナル経路について、分子細胞生物学的手法を用いて PRIP 欠損が影響することを検討し、破骨細胞分化における PRIP の役割を追究した。

4. 研究成果

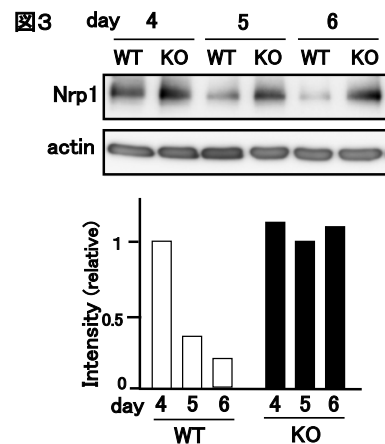
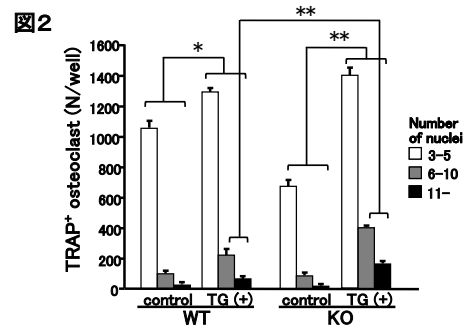
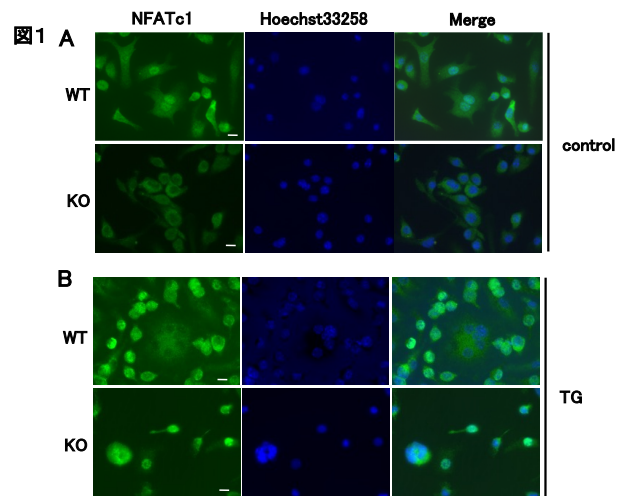
以前の解析結果から、PRIP が破骨細胞分化の初期に重要な MCSF シグナリングにおいて何らかの役割の担うことが示唆されたので、単独培養の系を用いて破骨細胞分化の解析を行った。M-CSF シグナル下流の幾つかの経路について関連分子の発現量やリン酸化を検討したところ、Ca²⁺/カルモジュリン複合体依存性の脱リン酸化酵素カルシニューリンの発現及び活性が減少していた。また、MCSF 刺激による細胞内 Ca²⁺濃度の上昇率が低下していた。

破骨細胞分化のマスターレギュレーターである転写因子 NFATc1 は、カルシニューリンによって脱リン酸化され活性化されて核移行する。そこで、破骨細胞分化過程で NFATc1 の核移行を検討した。その結果、WT に比べ KO では NFATc1 の核移行が著しく減少していた(図1A)。

核移行に重要な細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が KO では低いため、いくつかの細胞内 Ca²⁺濃度調節試薬を用いて破骨細胞分化を行ったところ、Thapsigargin (TG) を加えて細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させた場合、WT と同等に KO 細胞でも NFATc1 の核移行が生じ、TRAP 陽性の破骨細胞数も WT を上回るぐらい増加した(図1B、図2)。

これらの結果から、PRIP は破骨細胞分化において Ca²⁺/カルモジュリン-カルシニューリン-NFATc1 シグナリングの促進的調節を通して分化制御に機能することが明らかとなった。

骨芽前駆細胞と骨髄細胞との共存培養では、骨髄細胞の単独培養時に比べ分化した破骨細胞数が KO でより有意に減少するので、MCSF、RANKL 以外で骨芽細胞由来の分子によるシグナル経路がさらに関わる可能性が示唆された。そこで、WT および KO 由来骨髄細胞と WT 由来骨芽前駆細胞との共存培養を行い、経時的変化を検討した。分化5日、6日において破骨細胞数等に差が見られたため、4日、5日、6日の時期の骨髄由来細胞についてマイクロアレイを行ったところ、炎症系応答や免疫応答、分泌顆粒形成、骨吸収制御などの領域に関わる遺伝子の発現に差が見られた。これらの発現変化のあった遺伝子の中で Neuropilin 1 (Nrp1) に着目した。Nrp1 は、骨芽細胞が分泌し破骨細胞分化を抑制する Semaphorin 3A (Sema3A) の受容体で、破骨細胞分化が進むにつれ発現が減少することで、抑制制御を受けなくなり分化が促進する。そこでまず、破骨細胞分化過程における Nrp1 の発現を蛋白

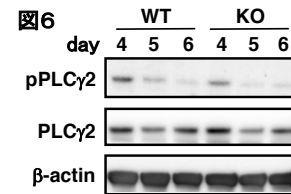
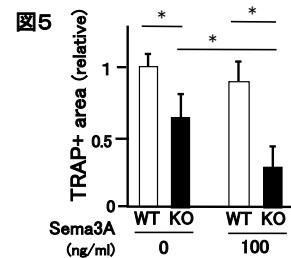
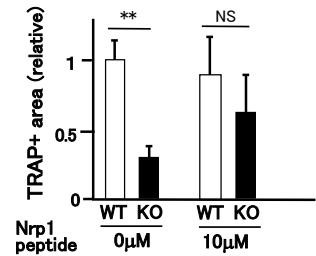
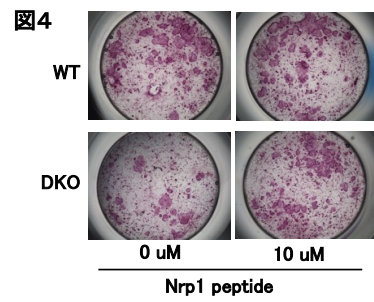


レベルで検討したところ、WT では分化が進むにつれ減少するのに対し KO ではあまり減少が見られなかった (図3)。

次に、Nrp1 が Sema3A に結合する部位の部分ペプチドを作製し、共存培養における影響を検討したところ、Nrp1 ペプチド存在下で KO における分化した破骨細胞数が増加した (図4)。また、組換え Sema3A 存在下で単独培養を行ったところ、WT に比べ KO において破骨細胞分化が抑制された (図5)。

さらに、Sema3A-Nrp1 シグナリングの下流にある PLC γ 2 のリン酸化が KO で低下しており (図6)、その下流で調節を受ける細胞内 Ca²⁺濃度も KO でベースが低く刺激応答の増減幅も小さかった。さらに下流で発現制御を受ける DC-STAMP や OSCAR、カルシトニン受容体などの破骨細胞関連因子の発現も低下していた。

これらのことから、KO マウスでは、破骨細胞分化過程で減少していく Nrp1 の発現があまり減少せず、このため共存培養において骨芽細胞由来の Sema3A による分化抑制が WT に比べて長く続き、分化した破骨細胞数が少ないものと考えられる。PRIP が、破骨細胞分化の抑制性シグナル経路である Sema3A-Nrp1 シグナリングを抑制的に調節し破骨細胞分化制御に機能することが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takakura Nana, Matsuda Miho, Khan Masud, Hiura Fumitaka, Aoki Kazuhiro, Hirohashi Yuna, Mori Kayo, Yasuda Hisataka, Hirata Masato, Kitamura Chiaki, Jimi Eijiro	4. 巻 135
2. 論文標題 A novel inhibitor of NF- κ B-inducing kinase prevents bone loss by inhibiting osteoclastic bone resorption in ovariectomized mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115316 ~ 115316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Otani, T., Matsuda, M., Mizokami, A., Kitagawa, N., Takeuchi, H., Jimi, E., Inai, T., and Hirata, M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Osteocalcin triggers Fas/FasL-mediated necroptosis in adipocytes regulated by the activation of p300.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death Disease	6. 最初と最後の頁 1194-1210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-018-1257-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murakami, A., Matsuda, M., Harada, Y., Hirata, M.	4. 巻 292
2. 論文標題 Phospholipase C-related, but catalytically inactive protein (PRIP) up-regulates osteoclast differentiation via calcium-calcineurin-NFATc1 signaling.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 7994-8006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.784777	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsuda, M., Hirata, M.	4. 巻 292
2. 論文標題 Phospholipase C-related but catalytically inactive proteins regulate ovarian follicle development.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 8369-8380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M116.759928	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松田美穂、自見英治郎、平田雅人
2. 発表標題 シグナル分子PRIPは卵胞成熟制御に関与する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takakura N, Matsuda M, Kitamura C, Jimi E
2. 発表標題 The inhibitory effect of NIK inhibitor on osteoclast differentiation
3. 学会等名 International Association of Dental Research (IADR) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高倉 那奈、自見 英治郎、松田 美穂、日浦 史隆、森馨代、北村 知昭
2. 発表標題 新規NIK阻害剤の骨吸収阻害薬としての効果の検討
3. 学会等名 第150回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大谷 崇仁、松田 美穂、溝上 顕子、北河 憲雄、自見英治郎、稲井哲一朗、平田 雅人
2. 発表標題 脂肪細胞を細胞死へと導く骨基質タンパク Osteocalcin
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高倉 那奈、松田 美穂、日浦 史隆、森馨代、北村 知昭、自見 英治郎
2. 発表標題 新規N1K阻害剤Compound33による破骨細胞分化・機能抑制効果の検討
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田美穂
2. 発表標題 情報伝達分子の逆遺伝学とダイバーシティ
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高倉那奈、松田美穂、日浦史隆、北村知昭、自見英治郎
2. 発表標題 新規N1K阻害剤のRANKL誘導性破骨細胞分化への影響の検討
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大谷 崇仁、溝上 顕子、北河 憲雄、松田 美穂、自見 英治郎、稲井 哲一郎、平田 雅人
2. 発表標題 オステオカルシンによる脂肪細胞のネクローシス
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高倉那奈、松田美穂、日浦史隆、自見英治郎、北村知昭
2. 発表標題 新規NIK阻害剤Cdc33の破骨細胞分化抑制効果の検討
3. 学会等名 第149回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田 美穂、自見 英治郎、平田 雅人
2. 発表標題 シグナル調節分子PRIPの破骨細胞分化における役割
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松田 美穂、村上 絢子、自見 英治郎、平田 雅人
2. 発表標題 シグナル分子PRIPのカルシウムを介した破骨細胞分化制御への関わり
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村上 絢子、松田 美穂、平田 雅人
2. 発表標題 PRIP regulates osteoclast differentiation through calcium-calcineurin-NFATc1 signaling in bone metabolism
3. 学会等名 日本矯正学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

脂肪細胞を細胞死へと導くシグナル経路の発見
<http://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/306>
シグナル分子PRIPは破骨細胞分化を制御する
http://www.jsbmr.jp/1st_author/272_mmatsuda.html
破骨細胞の形成を促す新しい分子の発見～骨リモデリング機構に新たな分子基盤を導き出す手がかり～
<http://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/115>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------