

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18592053

研究課題名（和文）

Ca<sup>2+</sup>透過性陽イオンチャネル(TRP)による破骨細胞の分化制御機序の解明

研究課題名（英文）

Role of transient receptor potentials (TRPs) of Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channels in osteoclast differentiation

研究代表者

岡本 富士雄 (OKAMOTO FUJIO)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60153938

研究成果の概要：破骨細胞が過剰に形成されると、骨溶解が亢進して骨粗鬆症を招く。従って、破骨細胞の分化誘導機序を明らかにすることは、骨粗鬆症の治療法の確立において意義がある。本研究では、破骨細胞の分化誘導に Ca<sup>2+</sup>透過性陽イオンチャネルの一つである TRPV2 が関わっていることを明らかにした。TRPV2 は細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入を促進し、分化誘導に必須の転写因子である NFATc1 を活性化することで、破骨細胞の形成を促進すると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	570,000	3,970,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：破骨細胞，分化，TRPV2，イオンチャネル，細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度，NFATc1

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化とともに増加する骨粗鬆症や関節リウマチといった骨破壊性疾患は、寝たきりになるなど QOL の低下を招くとともに、介護の面からも大きな社会問題となっている。骨格の維持は、高齢化社会にとって重要な課題であり、骨破壊性疾患の原因解明と治療法の開発は社会的な急務である。

骨は骨吸収と骨形成とがバランスよく行われて強度が維持される。骨破壊性疾患の多くは、このバランスが崩れ、破骨細胞による骨吸収が異常亢進するためとされている。骨吸収の亢進は、破骨細胞の分化が異常に促進

されて破骨細胞数が増加することが主な原因である。従って、骨破壊性疾患の原因解明と治療法の確立には、破骨細胞の分化メカニズムを十分に理解し、これをコントロールする手法を見出すことが重要である。このメカニズムが明らかになれば、分化担当分子をターゲットとした局所的かつ特異的な治療法を確立することが可能となり、創薬の面からも社会的意義が大きいと思われる。

従来、破骨細胞の形成は、マクロファージの形成刺激因子 M-CSF と破骨細胞の分化を誘導する因子 receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) が必須であり、この RANKL の

シグナルの下流で転写因子 Nuclear Factor of Activated T-cells 1 (NFATc1)が活性化されることが破骨細胞分化の過程に必須であることが明らかになった (Takayanagi et al., 2002; 以下、下図 1 を参照)。さらに、NFATc1 は  $Ca^{2+}$  依存性に脱リン酸化されることで機能するため、細胞内  $Ca^{2+}$  シグナルの発生が分化の鍵になることが明らかになった。最近、免疫受容体 (OSCAR や TREM-2) が破骨細胞に発現し、この受容体に会合する PLC $\gamma$  がイノシトールリン脂質代謝を介して細胞内  $Ca^{2+}$  貯蔵部位 (ER) から  $Ca^{2+}$  を放出することが報告されている (Koga et al., 2004)。また、これら受容体の下流シグナル分子である PLC $\gamma$  と DAP12 の遺伝子欠損マウスでは、破骨細胞が形成されない骨大理石病を呈することも報告された (Kim et al. 2005)。これらの報告は、破骨細胞分化における細胞内  $Ca^{2+}$  シグナルの重要性を物語っている。しかしながら、 $Ca^{2+}$  シグナルの発生に係わる分子やそれらの分子を介した  $Ca^{2+}$  動員機序については十分に解明されていない。

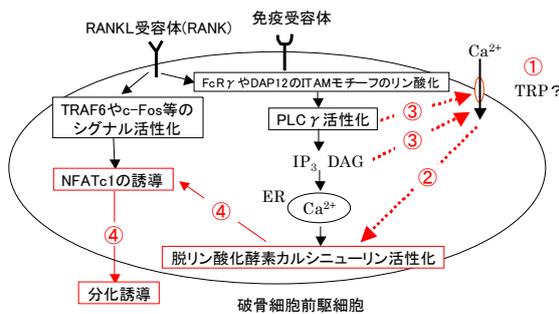


図 1

近年、細胞の分化や生存に係わる  $Ca^{2+}$  流入経路として transient receptor potential (TRP) チャネルの役割が注目されている。このチャネルファミリーは大きく TRPC、TRPV および TRPM に分けられ、この中には、分化調節因子やホルモンによって活性化されるもの、受容体に会合する PLC $\gamma$  による活性調節を受けるもの、さらに PLC の活性化に続く ER からの  $Ca^{2+}$  放出によって活性化されるものがあることが解っている。従って、破骨細胞に発現する RANK や免疫受容体、および、この下流で活性化される PLC $\gamma$ 、さらには ER から放出された  $Ca^{2+}$  が TRP チャネルの活性を調節して、細胞内  $Ca^{2+}$  シグナルの形成に関与している可能性は高いと考えられる。従って、TRP の機能とその制御機序を明らかにすることは、骨破壊性疾患の原因解明に繋がる重要なテーマである。TRP を介して細胞内  $Ca^{2+}$  シグナルをコントロールすることが出来れば、骨破壊性疾患の新たな治療法の確立へ繋がる可能性も考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、破骨細胞の分化過程における TRP 発現の変化とその役割を分子および機能レベルの両面から解明することを目的とする。そのために、下記の点を明らかにする (図 1) (1) 破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞への分化過程で発現する TRP 分子の分子種を同定する。(図 1 の①に該当) (2) 同定した TRP 分子が  $Ca^{2+}$  流入経路として実際に機能しているかどうかを電気生理学的手法および細胞内  $Ca^{2+}$  濃度測定法を用いて調べる。(図の②に該当) (3) 破骨細胞分化誘導因子である RANKL からのシグナルが TRP の活性調節に係わっているかどうかを調べる。特に、TRP の活性化が PLC $\gamma$  とその下流のシグナルによる調節を受けるかどうかを明らかにする。(図の③に該当) (4) 同定した TRP 分子の発現抑制が NFATc1 の誘導および破骨細胞分化に及ぼす影響を明らかにする。(図の④に該当) (5) 以上の結果より、破骨細胞分化誘導に係わる細胞内  $Ca^{2+}$  シグナル構築において TRP がどのような機能的役割を担っているか明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 破骨細胞の分化誘導法

マウス骨髄細胞を M-CSF (50 ng/ml) で培養して骨髄マクロファージ細胞へ誘導し、その後、可溶性 RANKL (30~50 ng/ml) で培養して成熟破骨細胞へ誘導した。また、マウスのマクロファージ株化細胞である RAW264.7 細胞を前駆破骨細胞として使い、可溶性 RANKL (30~50 ng/ml) 存在下で培養して破骨細胞様細胞へ分化させた。

### (2) 前駆破骨細胞に発現する TRP チャネルの検索

前駆破骨細胞における TRP の発現は DNA マイクロアレイ法、RT-PCR 法、Western blot 法および免疫染色法を用いて検討した。

### (3) RNAi 法を用いた TRP 分子の発現抑制の効果の検討

TRP の発現をコントロールするために、テトラサイクリン誘導性の shRNA 発現ベクターを RAW 細胞へ導入し、テトラサイクリンを培養液に添加することにより、標的とする TRP の発現を抑制した。shRNA 導入による標的タンパクの silencing 効果は Western blot 法にて確認した。

### (4) TRP を介して流れる非選択性陽イオン電流の記録と細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の測定

前駆破骨細胞細胞および RAW264.7 細胞からホールセルパッチクランプ法により、TRP チャネルを介して流れる陽イオン電流を誘導した。パッチ電極内および細胞外液には、 $Ca^{2+}$  を加え、 $K^{+}$  電流を抑制した。また、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度は  $Ca^{2+}$  蛍光指示薬 (fura-2) を用いて測定した。

(5) 破骨細胞形成能の評価と転写因子 NFAT1c の活性化評価

破骨細胞形成能は RANKL 刺激後、出現する酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 陽性細胞の数を計測した。NFAT1c の核へのトランスロケーションは NFATc1 の免疫染色により視覚的に確認した。

(6) 倫理面への配慮

本研究において、遺伝子組み換え実験に抵触する実験は、福岡歯科大学組み換え DNA 安全委員会の承認を得た。また、動物実験は福岡歯科大学動物実験指針に沿って行った。

#### 4. 研究成果

(1) RANKL 刺激によって発現が上昇する TRP チャネルの検索

RANKL 刺激によって発現が上昇する TRP を DNA マイクロアレイを用いて検索した (図 2)。RAW264.7 (以下 RAW と略記) 細胞では、48 時間の RANKL (30 ng/ml) 刺激により、破骨細胞に特異的な酵素群 (MMP9、cathepsin K、carbonic anhydrase、H<sup>+</sup>-ATPase (プロトンポンプ) や Cl<sup>-</sup>チャネル (ClC7) の発現上昇が認められ、同時に TRP ファミリーの中では特に TRPV2 と M7 の発現が上昇することが分かった。

そこで本研究では Ca<sup>2+</sup>透過性の高い TRPV2 に焦点を絞り、破骨細胞分化との関連を検討した。

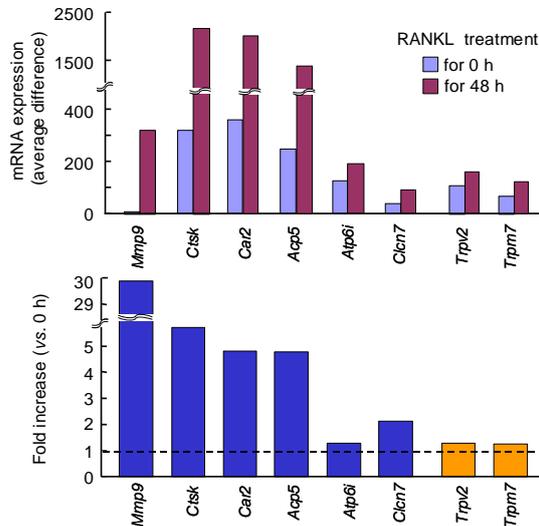


図 2

RANKL (30 ng/ml) 刺激した RAW 細胞における TRPV2 の発現経過を RT-PCR 法により調べると (図 3 A)、発現量は刺激後 24 時間でピークに達し、その後、減衰する傾向を示した。また、骨髄マクロファージ細胞でも 48 時間をピークに TRPV2 の発現が上昇した。さらに、Western blot 法によって、TRPV2 の発現をタンパクレベルで検討したところ、両細胞とも

に RANKL 刺激後 24 時間より発現が上昇することが明らかになった (図 3 B)。

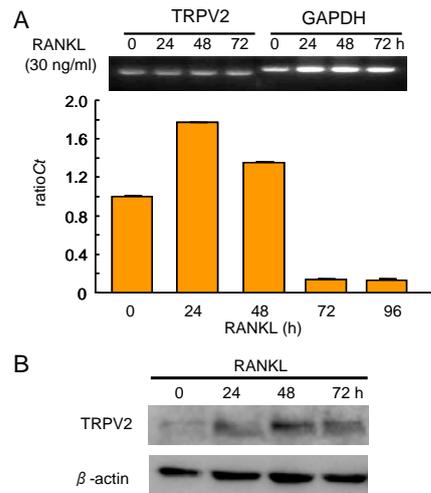


図 3

(2) 膜電流と細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度に対する RANKL 刺激の効果

RANKL (50 ng/ml) で 24 時間刺激した RAW 細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し、保持電位 -50~-60 mV にて膜電流を記録したところ、周期的に内向き電流が活性化されていることが分かった (図 4 A)。この電流は細胞外液中の Na<sup>+</sup>を細胞膜を透過し難い NMDG<sup>+</sup>に置換すると消失した。従って、この内向き電流は主に Na<sup>+</sup>の流入によって発生していることが分かった。一方、RANKL 刺激をしない細胞では内向き陽イオン電流の活性化はほとんど認められなかった (図 4 B)。また、RANKL で 24 時間刺激した RAW 細胞では、周期的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇、いわゆる Ca<sup>2+</sup>オシレーションが自発性に発生していた。

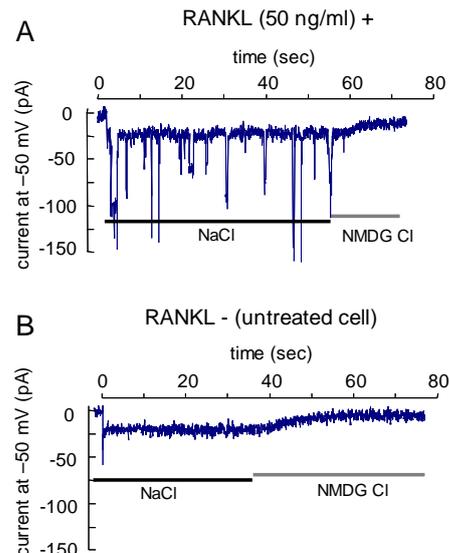


図 4

(3) 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションと内向き陽イオン電流に対する TRPV2 の silencing 効果

RANKL (50 ng/ml) で刺激した細胞では、 $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションが認められた (図 5A 上段、tetracycline-, RANKL+)。図には 4 個の細胞からの記録を重ねて示している。一方、tetracycline 誘導性に shRNA を発現させて、TRPV2 の発現を抑制した RAW 細胞では (図 5B 上段、tetracycline+, RANKL+)、オシレーションの頻度が著しく減少していることが分かった。また、TRPV2 の発現を抑制した RAW 細胞では、陽イオン電流の活性化頻度も低いことが分かった (図 5 下段、右)。

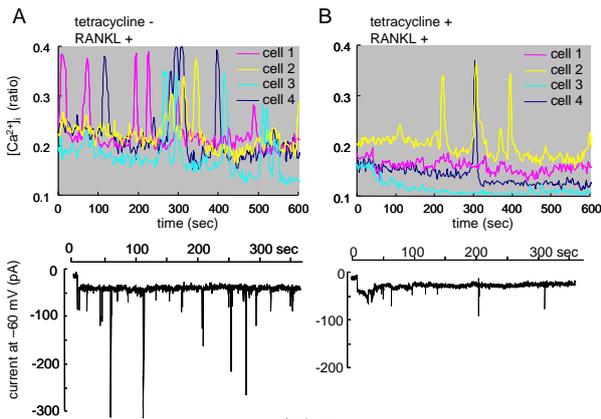


図 5

(4) 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションと内向き陽イオン電流に対する TRPV 阻害剤の効果

RANKL 刺激によって生じる  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは TRPV チャンネル阻害剤 ruthenium red (RR) により抑制された (図 6A)。また、RANKL 刺激で生じる陽イオン電流の周期的な活性化も RR により抑制された (図 6B)。なお、 $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは細胞外液中の  $\text{Ca}^{2+}$  除去によって消失した。これらの結果は、この陽イオン電流は TRPV2 の活性化を反映しており、TRPV2 がオシレーションの形成に関連している可能性を示唆する。

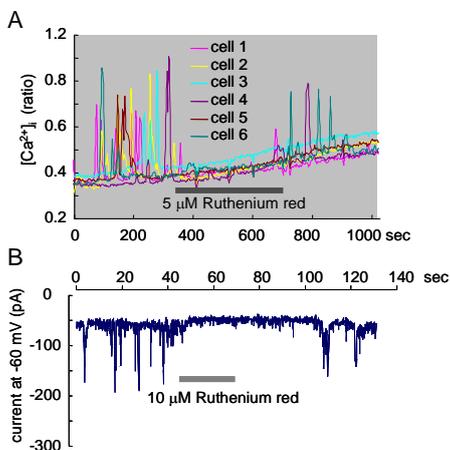


図 6

(5) 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションと TRPV2 活性に対する PLC 阻害剤の効果

破骨細胞分化には PLC $\gamma$  を介した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動員が関与していることが報告されている (Koga et al., 2004)。そこで、 $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションに対する PLC の関与を検討した。RANKL 刺激した細胞にみられる  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションは、PLC 阻害剤の inactive analog (U73343) を作用させてもなんら影響を受けなかったが、引き続き投与した阻害剤 (U73122) によって抑制された (図 7A)。同様に、内向き陽イオン電流の活性化も PLC 阻害剤の inactive analog では影響を受けず、阻害剤により抑制された (図 7B)。

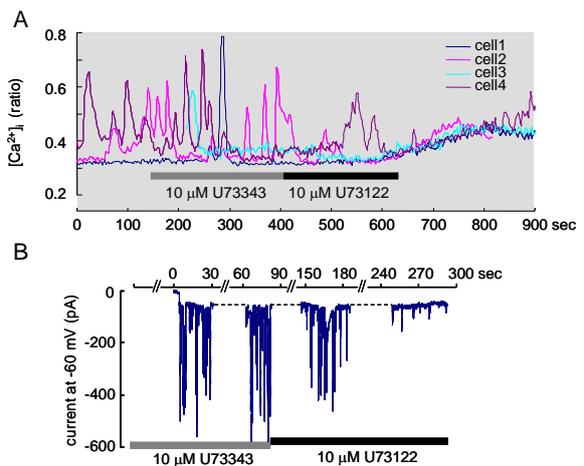


図 7

(6) RR および TRPV2 の発現抑制が破骨細胞形成におよぼす効果

RAW 細胞を RANKL (50 ng/ml) 存在下で 3 日間培養した後、TRAP 陽性細胞の数をカウントした。TRAP 陽性細胞の形成は RR を培養液中に加えると濃度依存的に抑制された (図 8A)。また、shRNA を発現させて TRPV2 を silencing しても (tetracycline+) RANKL 刺激による TRAP 陽性細胞の形成が抑制された (図 8B)。

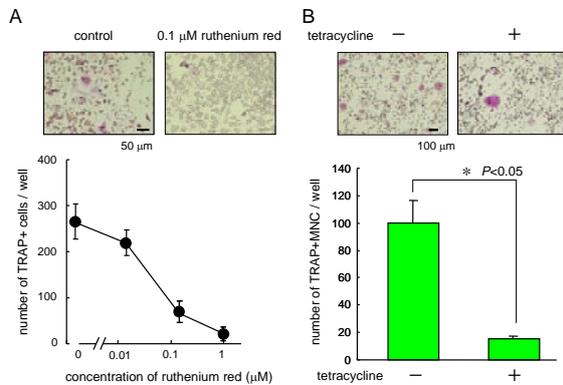


図 8

(7) NFATc1 の核内移行に対する TRPV2 の silencing 効果

RAW 細胞を RANKL (50 ng/ml) で 48 時間刺激した後、NFATc1 の細胞内局在を免疫染色により調べた。TRPV2 を silencing していない細胞 (図 9A, tetracycline-) では NFATc1 (緑) は、主に核(青)に局在していた (黄矢印は NFATc1 が核に局在する細胞)。一方、TRPV2 を silencing した細胞では NFATc1 は細胞質に存在し、核内へ移行していないことが明らかになった (図 9B)。

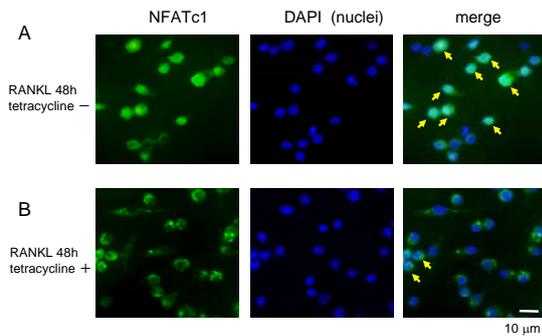


図 9

(8) CREB のリン酸化に対する TRPV2 の silencing 効果

近年、破骨細胞分化の調節に cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化が関与していることが示唆されている (Sato K., et al., 2006)。CREB のリン酸化は  $Ca^{2+}$  依存性酵素 CaMKIV によるため、ここにもまた細胞内  $Ca^{2+}$  シグナルが関与する。そこで、CREB のリン酸化が TRPV2 の silencing による影響を受けるか検討した。

図 10 は RAW 細胞を RANKL (50 ng/ml) 存在下で 48 時間培養した後、TRPV2、NFATc1 およびリン酸化 CREB の発現を Western blot 法により調べた結果である。TRPV2 の silencing により、RANKL 刺激による NFATc1 の発現は抑制され、同時にリン酸化 CREB の発現レベルも低下することが分かった (tetracycline+, 右レーン)。

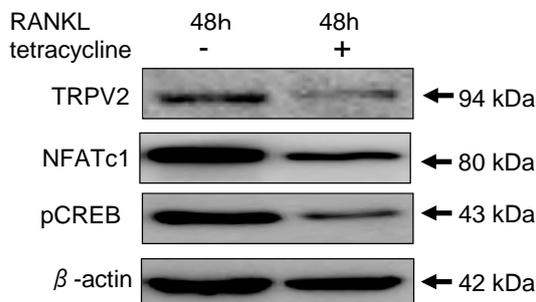


図 10

考 察

以上の結果より (図 11 参照)、RANKL 刺激によって前駆破骨細胞に周期的に発生する内向き陽イオン電流は、TRPV2 の活性を反映していると考えられた。このチャネル活性は PLC の下流シグナル、おそらく  $IP_3$ 、あるいは DAG、PKC のレギュレーションを受けると推測できる。また、TRPV2 の活性化と  $Ca^{2+}$  オシレーションとの間には高い相関性が認められることから、オシレーションの形成には細胞内  $Ca^{2+}$  ストアからの  $Ca^{2+}$  放出とともに、TRPV2 を介した細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入が必要であると考えられる。このようにして形成された  $Ca^{2+}$  オシレーションは  $Ca^{2+}$ /calmodulin を活性化して calcineurin による NFATc1 の脱リン酸化を促進する。これによって NFATc1 の核移行、つまり活性化が起こり、破骨細胞への分化誘導が促進されると考えられる。また、TRPV2 は CREB のリン酸化にも関わっていることが明らかになった。おそらく、TRPV2 を介して流入する  $Ca^{2+}$  は、CaMKIV を活性化している可能性も考えられる。従って、TRPV2 は NFATc1 と CREB による転写を活性化して、破骨細胞分化を促進すると考えられる。

前駆破骨細胞における TRPV2 の発現は、RANKL 刺激に依存することから、NFATc1 が TRPV2 の発現を促進している可能性が考えられる。従って、TRPV2 は NFATc1 の自己増幅に寄与している可能性が考えられるが、この点については、今後の検討課題としたい。

結語：TRPV2 は破骨細胞分化に必須の細胞内  $Ca^{2+}$  動員に係わる重要な機能分子である。

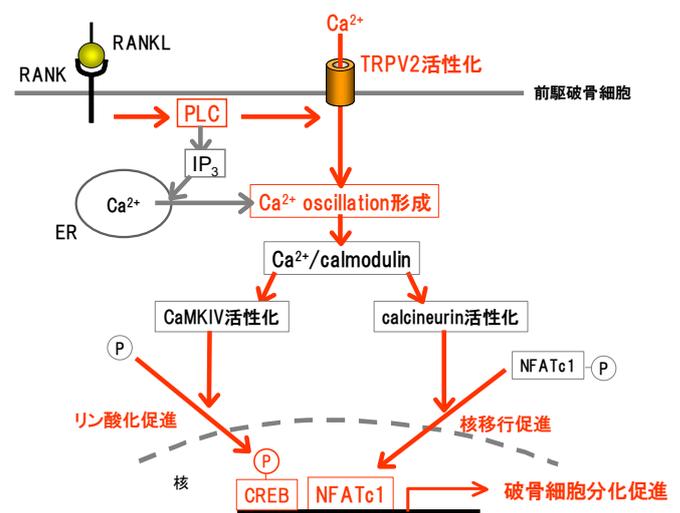


図 11

## 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)

- ① Fujio Okamoto, Hiroshi Kajiya, Kazuko Toh, Shinichi Uchida, Momono Yoshikawa, Sei Sasaki, Mizuho A. Kido, Teruo Tanaka, Koji Okabe, Intracellular CIC-3 chloride channels promote bone resorption in vitro through organelle acidification in mouse osteoclasts. Am J Physiol Cell Physiol 294, C693-C701, 2008, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 岡本富士雄、鍛冶屋 浩、中尾彰宏、岡部幸司、RANKL依存的に発現するTRPV2 は破骨細胞分化に必要なCa<sup>2+</sup>シグナル構築に寄与する、第49回歯科基礎医学会、平成19年8月30日、札幌市
- ② Hiroshi Kajiya, Fujio Okamoto, Akihiro Nakao, Koji Okabe, RANKL-induced expression of transient receptor potential V2 (TRPV2) channel in RAW264.7 cells is involved in osteoclast differentiation via induction of intracellular calcium signaling, 第29回米国骨代謝学会 (ASBMR 29th annual Meeting), 平成19年9月16-19日, Honolulu, Hawaii, USA
- ③ 岡本富士雄、鍛冶屋 浩、中尾彰宏、岡部幸司、TRPV2 はCa<sup>2+</sup>シグナルを活性化して破骨細胞分化を促進する、第58回西日本生理学会、平成19年10月19日、福岡市
- ④ 岡本富士雄、鍛冶屋 浩、大城希美子、根本哲臣、岡部幸司、前駆破骨細胞に発現するTRPV2 はCa<sup>2+</sup>オシレーションの構築分子として破骨細胞へ分化を誘導する、第59回西日本生理学会、平成20年10月3日、熊本市
- ⑤ 鍛冶屋浩、岡本富士雄、大城希美子、根本哲臣、岡部幸司、破骨細胞の分化トリガーシグナルCa<sup>2+</sup> oscillationの構築にはTransient Receptor Potential subfamily V2 (TRPV2) が必要である、第26回日本骨代謝学会、平成20年10月29日、大阪市
- ⑥ 岡部幸司、岡本富士雄、鍛冶屋浩、TRPV2を介する破骨細胞の分化調節機構、トランスポーターワークショップ IN 福岡、平成20年11月2日、福岡市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本 富士雄 (OKAMOTO FUJIO)  
福岡歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：60153938

### (2) 研究分担者

鍛冶屋 浩 (KAJIYA HIROSHI)  
福岡歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：80177378

岡部 幸司 (OKABE KOJI)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：80224046