

令和 3 年 4 月 14 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09509

研究課題名(和文) Src-Casを中心とした骨吸収活性調節におけるKifファミリー分子の役割解明

研究課題名(英文) Analysis of Kinesin family proteins as the downstream of Src-p130Cas axis in osteoclastic bone resorption

研究代表者

松原 琢磨 (Matsubara, Takuma)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：00423137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では破骨細胞の骨吸収を強力に誘導するSrc-p130Casシグナルの下流分子を網羅的解析により探索し、Kif1cを候補遺伝子として見出した。Kif1cの発現を抑制すると骨吸収機能が抑制された。Srcあるいはp130Cas遺伝子が欠損した破骨細胞は骨吸収できないが、これらの細胞ではKif1cの発現量は低かった。一方、Kif1cをp130Cas遺伝子欠損破骨細胞に過剰発現すると骨吸収機能が回復した。以上より、Kif1cはSrc-p130Casシグナル下流で骨吸収を制御してい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

近年の研究により破骨細胞を喪失させずに骨吸収機能を制御できれば有害事象の少ない代謝性骨疾患の治療法につながると考えられている。そこで申請者らは破骨細胞の生存とは関係なく骨吸収機能を強力に活性化するSrc-p130Casシグナル分子に着目した。Srcとp130Casは様々な生命現象にも重要であるため、治療標的とはなりにくい。そこで、本研究ではSrc-p130Casシグナルの下流分子を探索し、破骨細胞の骨吸収機能を担う新たな分子としてKif1cを同定した。これによりSrc-p130Casシグナルの解明による代謝性骨疾患治療法の開発の一助になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Actin ring formation in osteoclasts is essential structure for bone resorption. Osteoclasts lacking Src or its downstream proteins p130Cas could not form actin ring. We investigated the mechanism how regulates Src-p130Cas signaling regulates actin ring formation. First, we explore the target protein of Src-p130Cas with microarray analysis using Src deficient osteoclasts and p130Cas deficient osteoclasts. Then, we identified Kif1c that is less expressed in Src and p130Cas. We found the potential of Kif1c to regulate actin ring because of Kif1c localization in actin ring by immunostaining. To examine the function of Kif1c, we suppressed Kif1c expression by shRNA in osteoclasts. Osteoclasts lost actin ring formation by kif1c knock down. Interestingly, overexpression of Kif1c accelerates actin ring formation in p130Cas deficient osteoclasts. These results suggest that Kif1c works under the Src-p130Cas signaling.

研究分野：常態系口腔科学

キーワード：破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、未曾有の超高齢社会により骨粗鬆症をはじめとした代謝性骨疾患患者が急増している。代謝性骨疾患の多くは、破骨細胞による骨吸収が亢進し骨量が減少する。骨量の減少は、高齢者の腰痛や骨折の原因となり、高齢者の QOL を損なうだけでなく、骨折による寝たきりは「医療費の増加」や「介護」といった社会問題となっている。現在、骨吸収を長期間阻害するビスフォスフォネート (BP) 製剤や抗 RANKL 抗体が骨粗鬆症の治療に広く普及している。これらの治療薬は、破骨細胞を喪失させることにより効果を発揮する一方で、顎骨壊死をはじめとした有害事象の発生が大きな問題となっている。近年、骨代謝の維持には破骨細胞と骨芽細胞などの細胞間コミュニケーションの重要性が明らかになってきている。そこで、破骨細胞を喪失させるのではなく、破骨細胞機能を標的とする治療薬が開発されればより緻密に骨吸収をコントロールでき、有害事象発生の発生を減らすことが期待できる。

Src 遺伝子欠損マウスは破骨細胞が存在するにもかかわらず、骨吸収能がないため大理石骨病を呈する。また、Src シグナルの下流分子として同定された p130Cas も破骨細胞特異的に遺伝子欠損させると同様に大理石骨病を呈する。すなわち、Src-p130Cas axis が破骨細胞の骨吸収に必須である。しかしながら Src および p130Cas の機能は広範にわたるため、治療薬のターゲットとはなりにくい。そこで、Src-p130Cas axis 下流で骨吸収を制御している分子を明らかにできれば新しい治療法の開発につながると考えた。

2. 研究の目的

Src-p130Cas axis の下流分子の網羅的解析を行った結果、候補遺伝子として複数のキネシファミリータンパク質を見出した。本研究では、KIF ファミリータンパク質群(KIFs)の骨吸収における役割と Src-p130Cas axis との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 発現プロファイルの作成とスクリーニング

文献的スクリーニング、臓器・組織における発現、Src 遺伝子欠損あるいは p130Cas 遺伝子欠損破骨細胞における発現をリアルタイム PCR およびウエスタンブロットング法で検索し、スクリーニングをおこなった。

(2) 破骨細胞における KIFs の役割の解明

KIFs の細胞内局在を細胞免疫染色により検索した。KIFs の siRNA を作成し、破骨細胞に遺伝子導入する。導入した破骨細胞の分化を TRAP 染色で、破骨細胞の形態を細胞免疫染色で検討した。

(3) KIFs と Src, p130Cas との関係の解明

KIFs を Src 遺伝子欠損あるいは p130Cas 遺伝子欠損破骨細胞に過剰発現し、TRAP 染色、細胞免疫染色および骨吸収アッセイプレートによる骨吸収機能評価をおこなった。

4 . 研究成果

(1) Src-p130Cas axis 下流分子は、Src 遺伝子欠損あるいは p130Cas 遺伝子欠損破骨細胞での mRNA 発現量が減少していると考えた。そこで、KIFs の中でも特に発現量が減少していた Kif1c に着目した。タンパク質レベルで検討した結果、Kif1c は野生型破骨細胞において分化とともに発現量が増加したが、Src、p130Cas 遺伝子欠損破骨細胞での発現がほとんど認められなかった。また、他の臓器・組織での発現を検索したところ、Kif1c は肺、精巣などの Src および p130Cas の発現量の多い臓器・組織で発現している一方、Src、p130Cas の発現量の低い組織ではほとんど発現していなかった。この結果は Kif1c が Src および p130Cas と密接な関係があることを示唆している。

(2) Kif1c と破骨細胞の骨吸収機能との関連を検討した。まず、Kif1c の破骨細胞内の局在を検索した結果、Kif1c は破骨細胞が骨吸収をおこなう際に形成し、骨吸収に必須の細胞骨格構造であるアクチンリング上に局在していた。Src および p130Cas はアクチンリング上に局在しており、その形成に必須であるとされていることから、Kif1c はアクチンリング形成に関与している可能性が考えられた。そこで次に siRNA システムを用いて Kif1c の破骨細胞における発現を抑制した結果、破骨細胞のアクチンリング形成が抑制された。この結果は Kif1c が破骨細胞のアクチンリング形成に必須であることを示唆している。

(3) Src 遺伝子欠損破骨細胞および p130Cas 遺伝子欠損破骨細胞はアクチンリングを形成できないが、この現象と Kif1c 発現量との関連を検討した。まず、Src 遺伝子欠損破骨細胞に Kif1c を遺伝子導入した。その結果、Src 遺伝子欠損破骨細胞のアクチンリングは形成されないままであった。次に、p130Cas 遺伝子欠損破骨細胞に Kif1c を遺伝子導入したところ、興味深いことに、アクチンリングが形成された。さらに骨吸収を検討した結果、骨吸収活性を失っていた p130Cas 遺伝子欠損破骨細胞は Kif1c の遺伝子導入により骨吸収機能を回復した。

以上の結果より、Kif1c は p130Cas の下流で破骨細胞のアクチンリング形成を通じて破骨細胞による骨吸収を制御していることが示された。一方、Src は p130Cas だけではなく、他の様々な細胞骨格関連遺伝子を調節しており、Kif1c の過剰発現だけでは Src 遺伝子欠損破骨細胞のアクチンリング形成を回復するには十分でないことが推測される。

本研究結果より、破骨細胞骨吸収における新たな Src-p130Cas axis の下流分子として Kif1c が機能していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Touyama Kenya, Khan Masud, Aoki Kazuhiro, Matsuda Miho, Hiura Fumitaka, Takakura Nana, Matsubara Takuma, Harada Yui, Hirohashi Yuna, Tamura Yukihiko, Gao Jing, Mori Kayo, Kokabu Shoichiro, Yasuda Hisataka, Fujita Yuko, Watanabe Koji, Takahashi Yoshinori, Maki Kenshi, Jimi Eijiro	4. 巻 120
2. 論文標題 Bif 1/Endophilin B1/SH3GLB1 regulates bone homeostasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 18793 ~ 18804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.29193	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 Matsubara Takuma, Yaginuma Tatsuki, Addison William N., Fujita Yuko, Watanabe Kouji, Yoshioka Izumi, Hikiji Hisako, Maki Kenshi, Baron Roland, Kokabu Shoichiro	4. 巻 132
2. 論文標題 Plectin stabilizes microtubules during osteoclastic bone resorption by acting as a scaffold for Src and Pyk2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115209 ~ 115209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.115209	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 該当する
1. 著者名 Kobayakawa Miki, Matsubara Takuma, Mizokami Akiko, Hiura Fumitaka, Takakura Nana, Kokabu Shoichiro, Matsuda Miho, Yasuda Hisataka, Nakamura Ichiro, Takei Yosuke, Honda Hiroaki, Hosokawa Ryuji, Jimi Eijiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Kif1c regulates osteoclastic bone resorption as a downstream molecule of p130Cas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Biochemistry and Function	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbf.3476	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 Yaginuma Tatsuki, Gao Jing, Nagata Kengo, Muroya Ryusuke, Fei Huang, Nagano Haruki, Chishaki Sakura, Matsubara Takuma, Kokabu Shoichiro, Matsuo Kou, Kiyoshima Tamotsu, Yoshioka Izumi, Jimi Eijiro	4. 巻 -
2. 論文標題 p130Cas induces bone invasion by oral squamous cell carcinoma by regulating tumor epithelial?mesenchymal transition and cell proliferation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgaa007	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松原 琢磨、浦田真梨子、William N Addison、古株彰一郎
2. 発表標題 中間径フィラメント関連タンパク質Plectin1による破骨細胞の細胞骨格制御
3. 学会等名 第79回九州歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松原 琢磨, Addison William, 古株彰一郎
2. 発表標題 中間径フィラメント関連タンパク質Plectin による骨吸収制御機構
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Kobayakawa, Takuma Matsubara, Shoichiro Kokabu, Ryuji Hosokawa, Eijiro Jimi
2. 発表標題 The Role of Motor Protein Kif1c in Osteoclast Actin Ring Formation
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小早川美輝, 松原琢磨, 古株彰一郎, 細川隆司, 自見英治郎
2. 発表標題 破骨細胞のアクチンリング形成におけるKif1c の役割
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 松原 琢磨, 古株 彰一郎
2. 発表標題 破骨細胞のアクチンリング形成におけるSrc とHck の重複した役割
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	中富 満城 (Nakatomi Mitsushiro) (10571771)	九州歯科大学・歯学部・講師 (27102)	
研究分担者	古株 彰一郎 (Kokabu Shoichiro) (30448899)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	
研究分担者	自見 英治郎 (Jimi Eijiro) (40276598)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	

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
---------	---------