

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592163

研究課題名（和文） 破骨細胞を制御する新規 MAP キナーゼ結合因子の解析

研究課題名（英文） Analysis of novel MAP kinase binding factor which regulates osteoclasts

研究代表者

山下 照仁（YAMASHITA TERUHITO）

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号：90302893

研究成果の概要：サイトカインの分泌や細胞生存に重要な p38 MAP キナーゼ経路を抑制的に制御する因子が破骨細胞で高発現しているという仮説の元、MKK6 結合因子 Alix を新規に同定し、破骨細胞におけるその機能の解析を行った。その結果、Alix は MKK6 に結合して p38 MAP キナーゼの活性化を抑制することを明らかにした。しかし、Alix の発現を抑制しても、破骨細胞の生存の亢進やサイトカインの再分泌は見られなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、MAP キナーゼ、骨吸収

1. 研究開始当初の背景

骨吸収の促進因子 RANKL や IL-1、リポ多糖 LPS は MAP キナーゼ経路を介して、破骨細胞を活性化する。これまでの研究で、p38 MAP キナーゼの活性化が破骨細胞の分化に必要である一方で、破骨細胞の機能は p38 MAP キナーゼに依存しないことを報告した (Endocrinology 143:3105, 2003)。また、破骨細胞は IL-1 や TNF などの骨吸収促進サイトカインを自ら分泌しないことを明らかにした (J Immunol 170:3688, 2003)。ところが、破骨細胞では、p38 MAP キナーゼの上

流 MKK6 がリン酸化されないことが明らかになり、以下の解析を行った。p38 MAP キナーゼを強制的に活性化すると、破骨細胞が延命した。また、破骨細胞では IL-1 や LPS の刺激により、ERK や JNK 経路は正常に活性化した。以上の研究成果から、破骨細胞では p38 MAP キナーゼ経路が特異的に阻害されていると考えた。

マクロファージは、IL-1 や TNF などのサイトカインの分泌に p38 MAP キナーゼの活性化を必要とする。破骨細胞が p38 MAP キナーゼを活性化して IL-1 や TNF を分泌できると仮定

すると、破骨細胞自身に作用して活性化や延命に働いてしまう。このように骨代謝バランスが骨吸収に傾くのを防ぐために、破骨細胞ではサイトカインが分泌できないように p38 MAP キナーゼ経路が抑制されていると仮説を立てた。骨炎症を起こしている動物モデルにおいて、p38 MAP キナーゼがリン酸化（活性化）している破骨細胞が存在していることが報告された (J Exp Med 201:903, 2005)。しかし、その活性化機構は不明である。

そこで、以上の研究成果を発展させるために、酵母ツーハイブリッド法を用いて、MKK6-p38 MAP キナーゼ経路を特異的に抑制する因子を探索した。その結果、MKK6 に物理的に結合する因子 Alix を新規に同定することに成功した。Alix は、Apoptosis-linked gene 2 (ALG2) (Cell Death Differ 6:124, 1999, J Biol Chem 274:1533, 1999)、EGF 受容体 (Mol Cell Biol 24:8981, 2004) などと結合すると報告された因子であり、特徴的な既知のドメインは持っておらず、その相互作用や機能に関わるドメインの解析は進んでいない。我々は、Alix は骨髄マクロファージよりも破骨細胞で発現が著しく上昇すること、内在性の MKK6 が Alix と共沈することなど、予備的な結果を得て、破骨細胞の分化過程の後半で Alix は量的に増加して、MKK6-p38 MAP キナーゼ経路を制御していることを予想した。

2. 研究の目的

我々が破骨細胞から作成した cDNA 発現ライブラリーを用いて、酵母ツーハイブリッド法で MKK6 との結合を指標に Alix を新規に同定した。それゆえ、MKK6-p38 MAP キナーゼ経路に直接関与すると考えられた。破骨細胞の分化には p38 MAP キナーゼ経路 (Endocrinology 143:3105, 2002)、破骨細胞の延命には ERK MAP キナーゼ経路 (EMBO J 22:6653, 2003) がそれぞれ機能している。

本研究の目的は、Alix が関与するシグナル伝達経路を明らかにし、破骨細胞における機能を解明することである。すなわち、Alix は、p38 MAP キナーゼ経路を特異的に制御するのか？ Alix は、破骨細胞の分化過程のどの段階で作用しているのか？ Alix の発現を亢進または抑制すると、破骨細胞のサイトカイン分泌は変動するのか？以上のことを明らかにする。

3. 研究の方法

レトロウイルスベクターを用いて Alix を過剰発現もしくは Alix 特異的な shRNA を破骨細胞前駆細胞のマウス骨髄マクロファ-

ージに導入し、以下の解析を行った。

(1) LPS で刺激した時の細胞内 MAP キナーゼ分子のリン酸化状態をウェスタンブロットで解析した。

(2) M-CSF と RANKL 刺激による破骨細胞分化を TRAP 染色により解析した。

(3) 形成した破骨細胞が LPS 刺激によりサイトカイン産生能を回復するかを、ELSA 法を用いて培養上清を解析した。

(4) Alix と相互作用する因子は、Alix の GST 融合蛋白質を作成して GST プルダウン法により解析した。

(5) Alix の発現をレトロウイルス遺伝子導入法で操作した成熟破骨細胞を用いて、Alix の破骨細胞の生存・アポトーシスに関する作用や、骨吸収活性に対する作用をスポット培養法や象牙質切片上での培養により解析した。

4. 研究成果

(1) LPS で刺激したときの MAPK p38 のリン酸化は Alix の過剰発現により抑制された。つまり、Alix は MAPK p38 経路に関与していることが分かった。

(2) Alix 遺伝子もしくは Alix の shRNA それぞれを、ウイルスベクターを用いてマウス骨髄細胞に過剰発現させ M-CSF と RANKL で破骨細胞に分化させたところ、Alix 遺伝子発現が亢進しても減少しても形成する破骨細胞数には有意差は認められなかった。

(3) 破骨細胞の分化に Alix の発現量の増減は影響しなかったことより、形成した破骨細胞におけるサイトカイン産生を ELISA 法で定量した結果、shRNA で Alix の発現を抑制しても、LPS 誘導性のサイトカイン (TNF や IL-1) 産生量が亢進することはなかった。

(4) また、Alix 遺伝子ノックダウンした破骨細胞では、LPS 刺激による MAPK p38 のリン酸化が亢進することはなかった。

(5) GST プルダウン法によって、Alix が MKK6 と複合体を作ることを確認した。

(6) Alix の過剰発現やノックダウンは破骨細胞の生存には関与しなかった。

(7) Alix の過剰発現は成熟破骨細胞の骨吸収を阻害することは無かった。

以上より、Alix は MKK6 と結合して p38MAP キナーゼのリン酸化を阻害していたが、そのノックダウンによってもシグナルは回復することがなく、破骨細胞のサイトカイン産生や生存・骨吸収には関与していないことが分かった。

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4件)

- ① Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Yamashita T, Hosoya A, Ninomiya T, Nakamura H, Yamamoto Y, Kinugawa S, Nakamura M, Nakamichi Y, Kobayashi Y, Nagasawa S, Oda K, Tanaka H, Tagaya M, Penninger JM, Ito M, Takahashi N: Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *J Cell Biol*, 184:541-554, 2009, 査読有
- ② Takahashi M, Mizoguchi T, Uehara S, Nakamichi Y, Yang S, Naramoto H, Yamashita T, Kobayashi Y, Yamaoka M, Furusawa K, Udagawa N, Uematsu T, Takahashi N: Docetaxel inhibits bone resorption through suppression of osteoclast formation and function in different manners. *J Bone Miner Metab*, 27: 24-35, 2009, 査読有
- ③ Yamashita T, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Yamaki M, Miura T, Tanaka S, Udagawa N, Takahashi N: MKK6-p38 MAPK signaling pathway enhances survival but not bone-resorbing activity of osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 365:252-257, 2008, 査読有
- ④ Udagawa N, Sato N, Yang S, Nakamura M, Yamashita T, Nakamura H, Noguchi T: Signal transduction of lipopolysaccharide-induced osteoclast differentiation. *Periodontology* 2000, 43:56-64, 2007, 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 山下照仁、溝口利英、小林泰浩、二宮 禎、宇田川信之、高橋直之：破骨細胞のMAPキナーゼp38 経路を制御する因子Alixの同定、日本骨代謝学会、平成19年7月21日、大阪市大阪国際会議場
- ② 溝口利英、武藤昭紀、細矢明宏、中道裕子、山下照仁、小林泰浩、宇田川信之、伊藤充雄、高橋直之：In vivoにおいて細胞周期の停止した破骨細胞前駆細胞 (pOCP) は5-FU非感受性である、日本骨代謝学会、平成19年7月21日、大阪市大阪国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 照仁 (YAMASHITA TERUHIITO)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：90302893

(2)研究分担者

高橋 直之 (TAKAHASHI NAOYUKI)
松本歯科大学・大学院歯学独立研究科・教授
研究者番号：90119222
二宮 禎 (NINOMIYA TADASHI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：00360222
溝口 利英 (MIZOGUCHI TOSHIHIDE)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：90329475

(3)連携研究者