

平成 2 2 年 4 月 3 0 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790637
 研究課題名(和文)：破骨細胞の自己管理システムと新規化合物による分化制御の分子機構の解明
 研究課題名(英文)：Self-Control of osteoclasts on bone resorption and mechanism of osteoclast differentiation by a novel drug
 研究代表者
 松本 征仁 (MATSUMOTO MASAHIITO)
 埼玉医科大学・医学部・講師
 研究者番号：90321819

研究成果の概要：破骨細胞は骨吸収によりカルシウムなどのミネラル成分の動員を行い、合目的かつ系統的に骨合成とのバランスを厳密に調節することにより骨代謝の恒常性を維持している。研究代表者はこれまで骨吸収に必須の破骨細胞マーカーであるカテプシンK遺伝子の発現がp38MAPキナーゼによる転写因子NFATc1を介した多段階制御とその破骨細胞分化の特異性決定機構を明らかにした。本研究では新規薬剤5-S-GADが破骨細胞分化誘導因子RANKLを介したp38MAPキナーゼ上流の活性酸素を誘導するNADPHファミリー、Nox1を標的として破骨細胞の分化を阻害するのみならず、選択的にNoxファミリーを抑制し骨吸収を調節することを見出した。さらに代表者は転写因子Pax6の過剰発現によりTRAP遺伝子の発現ならびに破骨細胞分化が抑制されること、転写制御因子Stat3結合因子PIAS3発現トランスジェニックマウスが大理石骨病を発症する原因としてPIAS3が転写因子MITFと結合して転写活性が阻害された結果c-fos, NFATc1の発現が抑制されることが明らかとなった。以上より、破骨細胞内転写制御因子であるPax6やPIAS3は過剰な骨破壊が起こらないよう自身の細胞を監視し破骨細胞の自己管理システムに寄与し正常な骨代謝の平衡状態を調節していることが強く示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：破骨細胞、転写因子、分化

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は骨吸収によりカルシウムなどのミネラル成分の動員を行い、合目的かつ系統的に骨合成とのバランスを厳密に調節することにより骨代謝の恒常性を維持している。しかし、病的な骨破壊の亢進による骨代謝維

持機構の破綻の結果、高齢化に伴う医療費の増大で深刻化している骨粗鬆症などの骨代謝疾患を引き起こす。従って、新規薬剤または細胞内因子を介した破骨細胞制御の分子機構解明は、過剰な骨破壊を阻止するために骨代謝に関わる分子標的の同定による新た

な骨代謝疾患の治療戦略を考慮する上で重要な課題である。研究代表者はこれまで骨吸収に必須の破骨細胞マーカーであるカテプシン K 遺伝子の発現が p38MAP キナーゼによる転写制御因子 NFATc1 を介した多段階制御とその破骨細胞分化の特異性決定機構を明らかにした。

2. 研究の目的

(1) 破骨細胞分化において NFATc1 を中心とした転写因子群相互の協調的な働きは、破骨細胞マーカー遺伝子の効率的な発現誘導をもたらす破骨細胞のダイナミックな骨吸収に寄与している。転写因子である Pax ファミリーは臍臓や眼神経のさまざまな細胞分化に重要な働きをすることで知られているが、本研究で Pax ファミリーのひとつである Pax6 がマクロファージ・破骨細胞に発現し、破骨細胞マーカー遺伝子の発現を制御していることを新たに見出した。そこで本研究は Pax6 ならびにこの他 PIAS3 などの細胞内転写制御因子を介した破骨細胞制御の分子機構解明を目的としている。

(2) これまで我々は、破骨細胞の分化・機能に重要なマーカー遺伝子の発現誘導が p38MAPK 経路を介した NFATc1 を中心とした転写因子群相互の協調的な働きによって制御されていることを報告してきた。次いで昆虫細胞 (*Sarcophaga peregrina*) から抽出された抗菌物質 5-S-GAD が破骨細胞分化と成熟過程において新たな阻害剤として働くことを見出した。今回我々は 5-S-GAD が分化・成熟した破骨細胞の骨吸収に対しても抑制的に働くことを確認したので報告する。本研究では新規薬剤 5-S-GAD が活性酸素を誘導する NADPH ファミリーである Nox1 を標的として破骨細胞の分化を阻害するのみならず、選択的に Nox ファミリーを抑制し骨吸収を調節することを見出した。

3. 研究の方法

(1) 6-8 週齢の C57B/6N マウス大腿骨より単核骨髄細胞を採取し M-CSF の存在下に 3 日間培養後 RANKL 処理を 5 日間行った後 total RNA を回収した。total RNA を用いて cDNA 合成の後、Pax6 および破骨細胞マーカー遺伝子特異的プライマーによって PCR 反応を行った。

(2) 5-S-GAD による破骨細胞の分化阻害
6-8 週齢の C57B/6N マウスより骨髄細胞を採取し、M-CSF の存在下に 3 日間培養後 RANKL 刺激を 5 日間昆虫細胞 (*Sarcophaga peregrina*) から抽出された 5-S-GAD 存在下と非存在下に分けて行い、破骨細胞に分化させた。

(3) 骨吸収活性の測定

6-8 週齢の C57B/6N マウスより骨髄細胞を採

取し、M-CSF の存在下に collagen gel 上で 3 日間培養後 RANKL 刺激を 5 日間行って破骨細胞に分化させた。破骨細胞は collagenase 処理して回収した。5-S-GAD を添加した群 (5-S-GAD 群) とコントロール群に分け、dentine slice 上で 24 時間培養し Mayer's 染色を行って骨吸収領域を計測した。

(4) 破骨細胞の細胞骨格への影響

5-S-GAD 群とコントロール群において破骨細胞の形成するアクチンリングの破壊率について評価した。加えてアクチンリングの形成に重要なチロシンキナーゼである Pyk2 の局在性について検討した。

4. 研究成果

(1) RT-PCR による mRNA の発現解析の結果、マクロファージにおいて PAX ファミリーのなかで PAX6 が有意に発現しており、RANKL 刺激による破骨細胞誘導においてさらにその発現量が増加することを見出した。破骨細胞のマーカー遺伝子である TRAP 遺伝子プロモーター配列内に PAX6 の DNA 結合配列の存在を明らかにし、TRAP プロモーターを使った reporter gene assay を行った結果、NFATc1 は TRAP 遺伝子のプロモーター活性を増強するが、PAX6 はその活性を量依存的に抑制した (図 1)。さらに、PAX6 の転写機能領域を除いた変異体 PAX6-344 では NFATc1 による TRAP プロモーターの活性化を抑制しないことより、Pax6 の機能が転写制御に必要であることが示された。

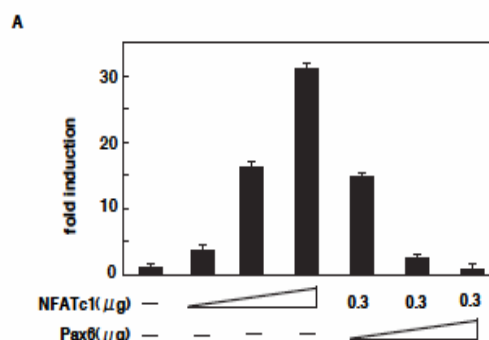


図 1 Pax6 による NFATc1 を介した TRAP 遺伝子プロモーター活性の抑制

以上より、転写因子 Pax6 の過剰発現により TRAP 遺伝子の発現ならびに破骨細胞分化が抑制されること、また共同研究により転写制御因子 Stat3 結合因子 PIAS3 発現トランスジェニックマウスが大理石骨病を発症する原因として PIAS3 が転写因子 MITF と結合して転写活性が阻害された結果 c-fos, NFATc1 の発現が抑制されることが明らかとなった。

従って、破骨細胞内因子である Pax6 や PIAS3 は過剰な骨破壊が起こらないよう自身の細胞を監視し破骨細胞の自己管理システムに寄与し正常な骨代謝の平衡状態を調節していることが強く示唆された。

(2) RANKL 刺激による破骨細胞初代培養において、5-S-GAD を付加すると量依存的に破骨細胞への分化誘導を抑制することを見出した(図2)。RANKL 刺激時の破骨細胞マーカー遺伝子の mRNA 発現への影響を調べたところ、5-S-GAD は骨吸収マーカーであるカテプシン K、TRAP、OSCAR、カルシトニンレセプターの mRNA の発現を強力に抑制した。破骨細胞分化の重要な転写因子として働く NFATc1 の mRNA の発現も抑制していることから、分化の初期の段階で 5-S-GAD が作用していることが示唆された。実際 5-S-GAD 処理によりこれまで一貫して追求している破骨細胞分化に必須な p38 経路の活性化を特異的に阻害する結果によって裏付けられた。

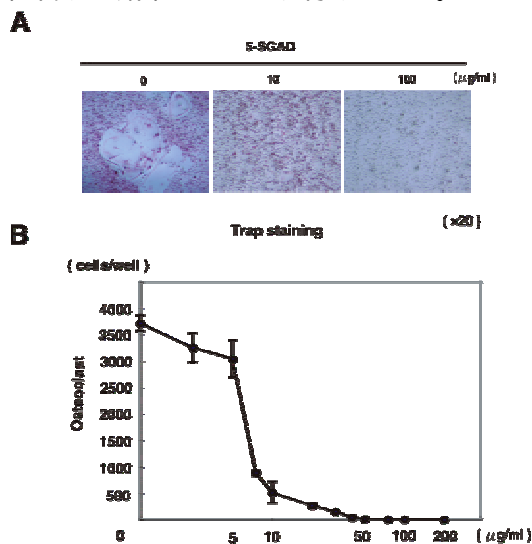


図2 5-S-GAD による破骨細胞分化の阻害

マクロファージを RANKL で刺激することによってもたらされる p38MAPK のリン酸化を 5-S-GAD は抑制しており、p38MAPK より上流に働くことが示唆された。さらに、マクロファージを RANKL で刺激すると細胞内の活性酸素の発現が一過性に上昇するが、5-S-GAD はその発現を抑制した。活性酸素の一つであるスーパーオキシドの産生も抑制していたため、スーパーオキシドを産生する NOX に着目した。その結果、NOX2 によるスーパーオキシド産生が分化初期において重要な働きをすることが明らかとなった。

本研究において 5-S-GAD が破骨細胞分化のみ

ならず成熟した破骨細胞の骨吸収に対してコントロール群と比較して骨吸収領域は著明に縮小しており、このことは 5-S-GAD が骨吸収を強力に阻害していることを示している(図3)。アクチンリングの破壊率はコントロール群が 28.6%、5-S-GAD 群が 66%であり有意差をもって破壊率が増加した。Pyk2 についても同様の所見であった。さらに新規薬剤 5-S-GAD が活性酸素を誘導する NADPH ファミリーである Nox1 を標的として破骨細胞の分化を阻害するのみならず、選択的に Nox ファミリーを抑制し骨吸収を調節することを見出した。

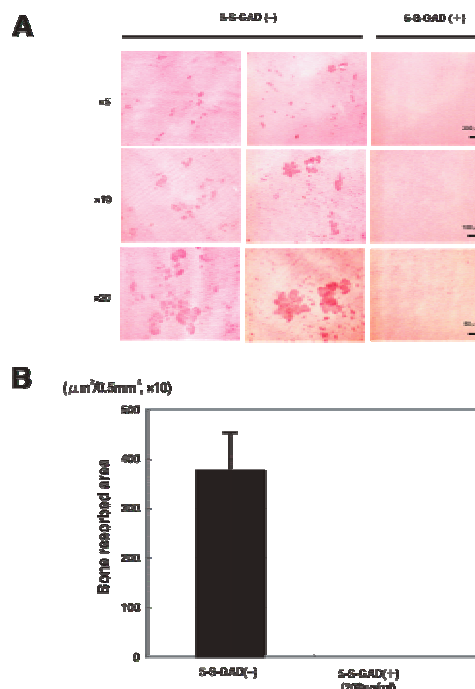


図3 5-S-GAD による骨吸収抑制

本研究では新規薬剤 5-S-GAD が活性酸素を誘導する NADPH ファミリーである Nox1 を標的として破骨細胞分化誘導因子 RANKL によって誘導される破骨細胞の分化を阻害するのみならず、選択的に Nox ファミリーを抑制し骨吸収をも調節することを見出した。さらに転写因子 Pax6 の過剰発現により TRAP 遺伝子の発現ならびに破骨細胞分化が抑制されること、破骨細胞内転写制御因子 PIAS3 発現トランスジェニックマウスが大理石骨病を発症しその原因が PIAS3 が転写因子 MITF と結合し転写活性が阻害されるため破骨細胞分化に必須な c-fos, NFATc1 の発現が抑制された結果であることが示された。最近、破骨細胞分化に必須な p38 変異モデルマウスを用いて野生型に比較して骨吸収能が低下することに加え、鎖骨神経損傷において p38 が神経

再生に重要であることを見出している。以上より、本研究成果によって破骨細胞転写制御因子である Pax6 や PIAS3 は過剰な病的骨破壊による骨粗鬆症などの骨代謝疾患が容易に発症しないよう自身によって細胞を監視し破骨細胞の自己管理システムに寄与し正常な骨代謝の平衡状態を精密に調節していると考えられる。また p38 が破骨細胞分化のみならず神経再生に重要な役割を担っていることから、p38 介した組織特異的な細胞分化・再生機構の存在を示唆している。さらに今後、病的な骨破壊が主因である骨代謝疾患に対する新たな治療戦略を検討する上で Pax6, PIAS3 を分子標的とするこれらの機能を調節する薬剤および 5-S-GAD を利用した骨粗鬆症に対する新たな治療薬としての可能性が期待される。

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)

Hikata, T., Takaishi, H., Takito, J., Furukawa, M., Uchikawa, S., Kimura, T., Okada, Y., Matsumoto, M., et al. PIAS3 negatively regulates the RANKL-mediated osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblasts. *Blood*, 113, 2202-2212, 2009, 査読有

Uemura, Y., Liu, T.Y., Narita, Y., Suzuki, M., Nakatsuka, R., Araki, T. Matsumoto, M., Iwai, L.K., Hirasawa, N., Matsuoka, Y., Murakami, M., Kimura, T., Hase, M., Kohno, H., Sasaki, Y., Ichihara, Y., Ichihara, O., Kikuchi, H., Sakamoto, Y., Jiao, S.C., Senju, S., and Sonoda, Y. Cytokine-dependent modification of IL-12p70 and IL-23 balance in dendritic cells by ligand activation of V α 24 invariant NKT cells. *J. Immunol.* 183, 201-208, 2009, 査読有

加藤直樹, 松本征仁, 緒方正人, 禾泰壽, 織田弘美 個体レベルにおける p38 MAPK の神経再生への関与, 末梢神経 20, 174-175, 2009 査読無

加藤直樹, 松本征仁, 緒方正人, 関川三四子, 禾泰壽, 織田弘美 遺伝子組み換えマウスを用いた p38 MAPK の神経再生制御機構に関する新たな知見 末梢神経 19,

398, 2008 査読無

[学会発表](計7件)

加藤直樹, 緒方正人, 禾泰壽, 織田弘美, 松本征仁 変異型 p38 ノックインマウスを用いた骨代謝における p38MAPK の関与 第26回日本骨代謝学会

2008年10月29-31日 大阪

加藤直樹, 松本征仁, 緒方正人, 禾泰壽, 織田弘美 遺伝子組み換えマウスを用いた p38MAPK の神経再生制御機構に関する新たな知見 第19回日本末梢神経学会 2008年9月5-6日 名古屋

甲川 昌和, 秋山伸子, 和田誠基, 住本英樹, 禾泰壽, 辻本 雅文, 松本 征仁 新規破骨細胞分化阻害剤 5-s-GAD の作用機序 第25回日本骨代謝学会

2007年7月19-21日 大阪

日方智宏, 高石官成, 松本征仁, 高柳広, 浅原弘嗣, 戸山芳昭 PIAS3 は RANKL 刺激による破骨細胞形成を抑制する 第25回日本骨代謝学会

2007年7月19-21日 大阪

加藤直樹, 甲川昌和, 秋山伸子, 和田誠基, 辻本雅文, 織田弘美, 禾泰壽, 松本征仁 新規薬剤5-S-GADの破骨細胞に対する骨吸収抑制機構 第25回日本骨代謝学会 2007年7月19-21日 大阪

加藤直樹, 甲川昌和, 秋山伸子, 和田誠基, 辻本雅文, 禾泰壽, 織田弘美, 松本征仁 新規薬剤5-S-GADは破骨細胞の骨吸収を抑制する 第22回日本整形外科学会学術集会 2007年

甲川 昌和, 加藤直樹, 秋山 伸子, 和田誠基, 辻本 雅文, 禾泰壽, 松本征仁 新規薬剤による破骨細胞の分化の制御 第22回日本整形外科学会学術集会 2007年

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 征仁 (MATSUMOTO MASAHIITO)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号: 90321819