

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791031

研究課題名 (和文) 破骨細胞分化過程における骨吸収活性獲得機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of the mechanism for acquisition and regulation of bone resorption activity in osteoclasts.

研究代表者

北川 教弘 (Norihiro Ishida-Kitagawa)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：30294284

研究成果の概要：

破骨細胞は生体骨組織における唯一の骨吸収細胞であり、骨疾患と密接にかかわることから治療薬開発の標的細胞として研究が進められている。本研究では破骨細胞分化の鍵因子である NFAT2/NFATc1 下流で発現する膜タンパク質の機能解析を通じ、破骨細胞の分化や骨吸収機構、およびその調節機構の理解を目指した。その結果、破骨細胞で発現する増殖因子 HB-EGF が骨代謝における負の調節因子であることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は骨吸収の主細胞であり、骨粗鬆症をはじめとする骨疾患に密接にかかわることから治療薬開発の標的細胞として研究が進められている。破骨細胞は単球—マクロファージ系列の血球系細胞に由来する前駆細胞が、破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) の働きにより TRAP 陽性単核細胞へと分化し、

細胞融合過程を経て TRAP 陽性多核破骨細胞に分化する。現在までに RANKL-RANK (RANKL レセプター) 直下のシグナル伝達経路については多くの知見が蓄積されているのに対し、RANKL 刺激数日後から起こる破骨細胞の細胞融合機構や、骨基質の分解に働くタンパク質の発現といった破骨細胞の骨吸収活性の獲得に重要な分化段階についての知見はあま

り得られていない。

マウスマクロファージ細胞株 RAW264 を RANKL で刺激する *in vitro* 破骨細胞分化誘導系において、1) 転写因子 NFAT2/NFATc1 は RANKL 刺激 24 時間後から発現誘導されるが主に細胞質に局在し、48 時間後に核内に移行すること、2) NFAT2 の核内移行をシクロスポリン A で阻害する、もしくは NFAT2 の発現を抑制すると TRAP 陽性単核細胞の段階で分化過程が停止すること、を見出した。以上の結果は、NFAT2 が破骨細胞の骨吸収活性の獲得に関連する遺伝子の発現を誘導するキーレギュレーターであることを強く示唆している。また研究代表者の報告以降、NFAT2 が破骨細胞分化過程に必須な転写因子であることを示す研究成果が国内外で相次いで報告され、現在では NFAT2 は破骨細胞研究の主要分子のひとつとして認知されている。

TRAP 陽性単核細胞から TRAP 陽性多核破骨細胞への分化過程は、細胞融合過程や骨吸収機能の獲得という破骨細胞の機能発現に重要な分化段階であり、プロテアーゼやサイトカインなどの分泌タンパク質や、イオンチャネルやシグナル受容体などの膜タンパク質の大幅な転換が起こることから、NFAT2 はこれら分泌タンパク質や膜タンパク質の発現におけるマスターキーであると考えられた。シグナルシーケンストラップ法を用いて破骨細胞で発現する分泌タンパク質および膜タンパク質を網羅的に探索した結果、破骨細胞で発現する 50 種の分泌タンパク質および膜タンパク質を現在までに見出した。シグナルシーケンストラップ法で見出されたタンパク質のうち、EGF ファミリーに属する HB-EGF (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor) は NFAT2 下流で発現制御される遺伝子のひとつとしても見出されていた。破骨細胞分化過程における HB-EGF の機能解析を行

った結果、1) 破骨前駆細胞に強制発現すると細胞融合以降の分化過程が抑制されること、2) 分化抑制活性にはリガンド領域ではなく、ADAM プロテアーゼによる切断 (ectodomain-shedding) 後に生じる C 末端領域にあること、を見出している。

2. 研究の目的

研究代表者は転写因子 NFAT2 が細胞融合以降の破骨細胞分化過程に必須なキーレギュレーターであることを報告しており、NFAT2 下流の分子プログラムの解析から破骨細胞の骨吸収活性獲得機序の解明することを目指している。細胞融合は生体内においてごく限られた細胞においてのみ認められるユニークな現象であることから、本研究は副作用の少ない骨疾患治療薬開発の基盤研究になりうると期待される。

以上を踏まえ、本研究では特に以下の 3 点に焦点を絞り、研究を遂行した。

- (1) 内在性 HB-EGF の生体骨組織における生理的機能を明らかにする。
- (2) HB-EGF の破骨細胞分化抑制機構を解析する。
- (3) 破骨細胞の骨吸収活性獲得に働くタンパク質のスクリーニングとその作用機序を解析する。

3. 研究の方法

(1) **内在性HB-EGFの機能解析** HB-EGF を強制発現させたRAW264を用いた研究から、『ADAMプロテアーゼにより生成されたHB-EGF C末端領域が破骨細胞分化過程を抑制する』モデルが考えられた。また予備的なデータではあるが、ADAMプロテアーゼ阻害剤であるGM6001がマウス初代マクロファージの破骨細胞分化を亢進することが見出された。そこでHB-EGFノックアウト

マウスを用いた解析により、内在性HB-EGF C末端領域の細胞融合抑制能を *in vitro* および *in vivo* レベルで検討した。

① *in vitro*破骨細胞分化誘導系を用いた解析 HB-EGFノックアウトマウスおよび野生型マウスから調製した骨髄マクロファージをRANKLおよびM-CSFで刺激する分化誘導系を用い、破骨細胞形成数を比較した。またADAMプロテアーゼにより遊離するHB-EGFリガンド領域の生理機能については、破骨細胞分化には影響しないことを *in vitro* 培養系を用いた解析から明らかにしている。そこで破骨細胞の産生するsHB-EGFの骨芽細胞分化に及ぼす影響を *in vitro* 実験系で検討した。

② *in vivo*レベルの解析 HB-EGFノックアウトマウスおよび野生型マウスから採取した骨組織を用いた骨形態計測や尿中デオキシピリジノリンなどの骨吸収マーカーの検討を行うことにより、HB-EGFの生体骨組織における役割を検討した。

HB-EGFノックアウトマウスは大阪大学微生物研究所目加田英輔教授に提供していただいた。

(2) HB-EGF C末端領域中の細胞融合抑制領域の決定 HB-EGF C末端領域の各種欠失変異体や点変異体（それぞれC末端にHAなどのタグを付加する）を組み込んだ発現ベクターを作成し、マウス初代骨髄マクロファージやRAW264へ遺伝子導入した。*in vitro* 分化誘導系において多核破骨細胞形成効率を比較することにより、破骨細胞分化抑制に必須な最小領域の決定を行った。

(3) NFAT2の下流で発現誘導される分泌タンパク質、膜タンパク質の機能の検討

平成17年度科学研究費若手Bの研究において、破骨細胞において発現する50種の分

泌タンパク質、膜タンパク質を見出した。これら分子のうち、NFAT2の下流で発現制御されるタンパク質に着目し、マウスマクロファージ細胞株RAW264や初代骨髄マクロファージを前駆細胞とする *in vitro* 破骨細胞分化誘導系を用い、RNA干渉法により細胞融合以降の破骨細胞分化過程に必要なタンパク質のスクリーニングを行った。さらにサイレンシング変異体（siRNAの標的配列をコードするアミノ酸配列を変えずに他の塩基に置換した変異体）を前駆細胞へ過剰発現させ、RNA干渉法により抑制した内在性タンパク質の機能を代償しうることを確認した。

4. 研究成果

これまでの研究結果から、破骨細胞で発現する分泌タンパク質および膜タンパク質をシグナルシーケンストラップ法により網羅的にスクリーニングし、さらにNFAT2の制御下で発現調節される遺伝子群をRT-PCR法を用いて選別した。これらのうち特にHB-EGFに着目して解析した結果、HB-EGFのADAMプロテアーゼによる切断（ectodomain-shedding）後に生じるC末端領域が破骨細胞分化抑制活性を有することを見出していた。

まずHB-EGFの破骨細胞分化抑制の生理的意義に着目した研究を行った。HB-EGF遺伝子欠損マウスおよび非切断型HB-EGFノックインマウスの骨組織を野生型マウスと比較した結果、変異マウスでは破骨細胞および骨芽細胞数が野生型に比べ有意に増加していた。また変異マウスでは骨代謝マーカーである尿中デオキシピリジノリン濃度が有意に上昇していた。さらに骨髄破壊したマウスに野生型もしくはノックアウトマウス由来の骨髄細胞を移植し、それぞれの骨代謝を検討し

た結果、ノックアウトマウス由来の骨髄細胞を移植したマウスは野生型を移植したマウスと比較し、骨形成マーカー／骨吸収マーカーがともに上昇していた。以上の知見は破骨細胞において NFAT2 の制御下で発現調節される HB-EGF が骨代謝を負に制御する因子であることを強く示唆している。

続いて HB-EGF の破骨細胞および骨芽細胞分化制御機構について解析した。*in vitro* 破骨細胞分化誘導系を用いた解析から野生型マウスと比較して変異型マウス由来の骨髄細胞を用いた実験区では形成される破骨細胞における核数が増加しており、細胞融合が亢進していること、HB-EGF C 末端領域の細胞融合抑制活性には 207 番目のセリンが重要であること、を見出した。一方 *in vitro* 骨芽細胞分化誘導系を用いた解析から、sHB-EGF は骨芽細胞分化を抑制することが明らかとなった。

以上の結果から、1) 破骨細胞において発現する HB-EGF は ectodomain-shedding により sHB-EGF と HB-EGF C に切断される、2) HB-EGF C は破骨細胞分化を抑制する、3) 破骨細胞から産生された sHB-EGF は骨芽細胞による骨形成を抑制する、の機構により HB-EGF が骨代謝を負に制御することが強く示唆された。

これらの知見は破骨細胞において HB-EGF の ectodomain-shedding が HB-EGF の骨代謝制御機構の引き金であることを示唆している。今後は ectodomain-shedding が、1) どのプロテアーゼにより実行されるのか？また 2) ectodomain-shedding はどのような機構で制御されるのか、について検討することが重要であると考えられる。また HB-EGF C の破骨細胞分化抑制機構を解析することは、未だ不明な点の多い破骨細胞の骨吸収活性獲得機構の理解への新たな切り口として期

待される。さらにシグナルシーケンスストラップ法により見出された他の膜タンパク質群は破骨細胞分化や骨吸収機構の解明における新たな手掛かりとして期待される。実際、本研究では見出された膜タンパク質群から破骨細胞の細胞骨格形成に係わる 1 分子を同定しており、現在より詳細な解析を行っている。

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 3 件)

① Yogo K, Ishida-Kitagawa N, Takeya T.

Negative autoregulation of RANKL and c-Src signaling in osteoclasts. *J Bone Miner Metab.* 25(4):205-10. 査読有 (2007)

② 古賀慎太郎, 北川教弘, 竹家達夫, 与語圭一郎 破骨細胞で見出された c-Src の新しい機能、*日本臨床* 65 ; 85-89, 査読なし (2007)

③ 北川教弘 *ADAP*, *生化学* 79 ; 1162, 査読なし (2007)

[学会発表] (計 6 件)

① Anton Bartier, Toshiki Sakai, Norihiro Ishida-Kitagawa, Tatsuo Takeya, Takuya Ogawa, L-Serine modulates RANKL/RANK signaling cascade and play essential role in osteoclastogenesis *in vitro*. *BMB2008*, 2008.12.10, 神戸

② 小川拓哉、酒井俊樹、バーティアル アントン、北川(石田) 教弘、竹家達夫、L-セリンによる RANKL-RANK シグナル伝達系活性化機構の解析 第 26 回日本骨代謝学会、

2008. 10. 29, 大阪

③ 中村尚志、北川教弘、小川拓哉、竹家達夫 HB-EGF は骨代謝を負に制御する因子として機能する 第 26 回日本骨代謝学会, 2008. 10. 30, 大阪

④ 阿部恵美、中村尚志、安田法永、北川(石田)教弘、水島寛人、岩本亮、目加田英輔、竹家達夫、HB-EGF の破骨細胞分化抑制にはリン酸化部位 S207 が重要である BMB2007, 2007. 12. 12

⑤ 中村尚志、吉本晃正、戸井田英俊、小川拓哉、北川(石田)教弘、岩本亮、目加田英輔、竹家達夫、骨のリモデリング因子としての HB-EGF の役割 BMB2007, 2007. 12. 12-13, 横浜

⑥ 中村尚志、阿部絵美、北川(石田)教弘、竹家達夫、増殖因子 HB-EGF は細胞質内ドメインを介して破骨細胞分化を負に制御する 第 25 回日本骨代謝学会, 2007. 7. 20, 大阪

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 教弘 (Norihiro Ishida-Kitagawa)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号: 30294284

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: