

機関番号：37114

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 年度～2010 年度

課題番号：20390475

研究課題名 (和文) 破骨細胞分化を制御する Ca^{2+} オシレーション形成と転写因子 NFAT の調節機構研究課題名 (英文) Regulatory mechanisms of Ca^{2+} oscillations and transcription factor NFAT in osteoclastogenesis.

研究代表者

岡部 幸司 (OKABE KOJI)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80224046

研究成果の概要 (和文)：破骨細胞形成の重要な誘導因子である Receptor Activator of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ligand (RANKL) は、 Ca^{2+} オシレーションを誘発し、破骨細胞分化に必須な転写調節因子である Nuclear Factor of Activated T cells 1 (NFATc1) を活性化する。この Ca^{2+} オシレーションは破骨細胞分化に重要なトリガ信号であるにも関わらず、その細胞内 Ca^{2+} 流入を担う分子は未だ不明である。我々は DNA マイクロアレイを用いてこの遺伝子発現を検索した結果、RAW264.7 細胞 (破骨前駆細胞) を RANKL 処理することにより、Transient Receptor Potential Vanilloid channels 2 (TRPV2) が有意に発現上昇することを見だし、 Ca^{2+} オシレーション形成と破骨細胞分化における TRPV2 の発現と機能について検討した。その結果、破骨前駆細胞における Ca^{2+} オシレーション発生は、RANKL を介する TRPV2 の発現上昇や活性化、及び、ストア作動性 Ca^{2+} 流入 (SOCE) の活性化や Ca^{2+} 放出の促進により誘導されることが明らかとなった。そして、TRPV2 による Ca^{2+} オシレーション形成に続く、NFATc1 の活性化が破骨細胞形成を促進すると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：The receptor activator of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ligand (RANKL) induces Ca^{2+} oscillations and activates the Nuclear Factor of Activated T cells 1 (NFATc1) during osteoclast differentiation (osteoclastogenesis). Ca^{2+} oscillations are an important trigger signal for osteoclastogenesis, however the molecular basis of Ca^{2+} permeable influx pathways serving Ca^{2+} oscillations has not yet been identified. Using a DNA microarray, we found that Transient Receptor Potential Vanilloid channels 2 (TRPV2) are expressed significantly in RANKL-treated RAW264.7 cells (preosteoclasts) compared to untreated cells. Therefore, we further investigated the expression and functional role of TRPV2 on Ca^{2+} oscillations and osteoclastogenesis. In conclusion, Ca^{2+} oscillations in preosteoclasts are triggered by RANKL-dependent TRPV2 and SOCE activation and intracellular Ca^{2+} release. Subsequent activation of NFATc1 promotes osteoclastogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

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、Ca²⁺オシレーション、TRP チャンネル、NFAT、破骨細胞分化

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は造血幹細胞を起源として、種々の制御因子により分化誘導され、破骨前駆細胞より形成される。近年、この破骨細胞の形成過程には、マクロファージ形成刺激因子 M-CSF と破骨細胞の分化誘導因子である receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) の存在が必須であることが確立された。また、この RANKL 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に必須な過程であることが明らかになった (Takayanagi et al., 2002)。さらに、この転写因子は Ca²⁺依存性脱リン酸化酵素 (カルシニューリン) により活性化される分子であり、Ca²⁺シグナルが鍵となることも明らかされた。最近、免疫受容体 (OSCAR や TREM-2) が破骨細胞に発現し、PLC γ のイノシトールリン脂質代謝を介して細胞内 Ca²⁺貯蔵部位 (小胞体) から Ca²⁺を放出することが明らかになり (Koga et al., 2004)、これら受容体の下流シグナル分子の FcR γ と DAPI2 の遺伝子欠損マウスでは破骨細胞形成が抑制され骨大理石病を呈することも報告された (Kim et al. 2005)。これらの報告の中で注目すべき現象は、単なる一過性の Ca²⁺シグナリングや持続的な Ca²⁺濃度上昇ではなく、周期的な細胞内 Ca²⁺濃度変化 (Ca²⁺オシレーション) が、NFATc1 の活性化や破骨細胞分化に有効であることである。この Ca²⁺オシレーションの形成には細胞膜を介する Ca²⁺流入と Ca²⁺排出、及び、細胞内 Ca²⁺貯蔵部位からの Ca²⁺放出と Ca²⁺取込みの連動による細胞内の局所 Ca²⁺濃度のダイナミックな調節系が関わると考えられるが、破骨細胞におけるこれらを担う分子実体や機序に関しては報告がなく、ましてや、これらの Ca²⁺濃度の周期的な変動が、何故、NFATc1 の活性化や破骨細胞の分化に重要なかは全く不明である。従って、破骨細胞分化における Ca²⁺オシレーションを担う分子実体を同定し、オシレーションの発生機構と NFATc1 活性化への仕組みを解明することは重要な意義があると考えられる。

2. 研究の目的

これまで、我々は破骨細胞のイオン輸送と骨吸収機能の調節に関する研究を行い、多くの成果を発表してきた。その中で、PGE₂ 投与や細胞膜の伸展刺激、及び、膜電位の過分極刺激等は、Ca²⁺透過性を持つ非選択性陽イオンチャンネルを活性化し細胞内 Ca²⁺濃度を上昇

させ、破骨細胞機能を調節することを報告している (Okamoto et al. 2004 ; Kajiya et al. 2003 ; Tsuzuki et al. 2000)。その後、我々のグループでは、破骨細胞に発現する Ca²⁺透過性陽イオンチャンネルの分子検索を行った。その結果、DNA マイクロアレイ解析において、Ca²⁺透過性陽イオンチャンネルの一種である transient receptor potential (TRP) ファミリーに属する TRPV2 チャンネルが RANKL 投与により破骨前駆細胞に優位に誘導され、破骨細胞の分化と共に数日で発現量が減衰することや、TRPV 阻害剤により破骨細胞形成が抑制されることを発見した。従って、TRPV2 が破骨細胞分化や Ca²⁺オシレーション発生に関与する分子実体としての可能性が明らかとなってきた。本来、TRPV ファミリー (vanilloid 受容体) は痛覚神経の侵害受容器として発見されたが (Caterina et al. 1997)、その後の研究で神経以外の細胞にも存在することが明らかとなり、侵害受容以外の重要な役割があることが示唆されている。破骨細胞における TRP 分子に関しては、TRPV5 が成熟破骨細胞の骨吸収機能に関与するとの報告があるが (Bram et al., 2005)、この TRPV5 は破骨細胞の分化時期には殆ど検出されず、破骨細胞の分化誘導に関わる Ca²⁺オシレーション機構への関与は考えにくい。一方、我々が破骨細胞で発見した TRPV2 分子に関しては、神経系の細胞において、膜の機械的刺激や熱刺激などの侵害刺激により活性化されることや、受容体に会合する PLC γ や PKC 等により活性調節を受けること等が報告されているが (Shimosato et al. 2005)、神経以外ではその機能や調節系は不明である。そこで、本研究では、破骨細胞の分化誘導を担う Ca²⁺オシレーション形成における TRPV2 の役割を分子レベル及び機能レベルの両面から解明することを目的としている。

3. 研究の方法

- (1) マクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞に RANKL を作用させ破骨細胞を誘導した。そして、RANKL 刺激前と刺激 48 時間後における Ca²⁺輸送体の発現変化を DNA マイクロアレイ法により比較した。
- (2) その結果、Ca²⁺輸送体の候補となった TRPV2 の破骨細胞分化過程に伴う発現量の変化を RT-PCR 及び Western blot 法を用いて調べた。

(3) TRPV 阻害剤やTetracycline 誘導性 shRNA TRPV2-silencing による Ca^{2+} オシレーション発生と TRPV を介する非選択性陽イオン電流に対する効果を Fura2 蛍光測定法及び Patch-clamp 法を用いて検討した。

(4) これらの阻害が最終的な転写調節因子である NFATc1 の発現や核内移行、及び破骨細胞への分化誘導への効果について調べた。

4. 研究成果

まず、DNA マイクロアレイを用いて RANKL 刺激によって発現が上昇する TRP 分子を検索するために、RANKL 刺激により破骨細胞に分化する RAW264.7 細胞を用いて、RANKL 刺激前と刺激後 48 時間における遺伝子発現を比較した (図 1 参照)。RANKL 刺激により破骨細胞特有の遺伝子である、MMP9、カテプシン K (Ctsk)、炭酸脱水素酵素 II (Car2)、マーカー酵素である TRAP、液胞型プロトンポンプ (Atp6i)、Clc7 型 Cl チャネルのメッセージが顕著に上昇した。一方、TRP サブファミリーの中では、特に TRPV2 と TRPM7 の発現が優位に上昇した。

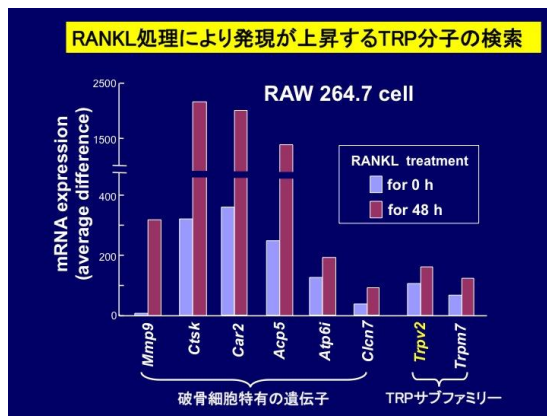


図 1

今回は、特に Ca^{2+} 透過性の高いと考えられる TRPV2 に注目し、破骨細胞分化との関連を検討した。

次に、RANKL 刺激後の TRPV2 発現の経時変化を RT-PCR 法にて調べた (図 2 参照)。

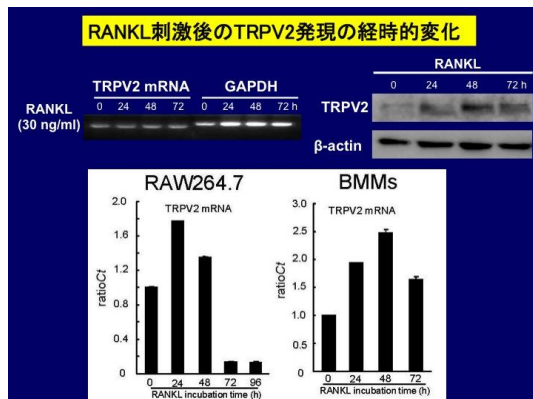


図 2

RAW 細胞を RANKL 刺激すると TRPV2 の発現は刺激後 24 時間でピークに達し、その後低下する一過性の発現上昇が認められた。

また、マウス骨髄細胞から誘導した破骨細胞においても、48 時間をピークに TRPV2 の発現が一過性に上昇した。さらに、Western blot 法にて TRPV2 タンパクの発現を検討したところ、同様なパターンで RANKL 刺激後 24 時間より発現が上昇した。

また、TRPV2 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、テトラサイクリン依存性の TRPV2 silencing を行った。その結果、テトラサイクリン非存在下で RANKL 刺激した場合、免疫染色と Western blot により TRPV2 の発現を確認できたが、テトラサイクリン存在下で RANKL 刺激すると、TRPV2 の発現が優位に抑制された。従って、この TRPV2 の silencing が有効であることが確認できた。

続いて、この TRPV2 の silencing を用いて、破骨前駆細胞に認められる Ca^{2+} オシレーションに対する TRPV2 発現抑制の効果を検討した (図 3 参照)。テトラサイクリン非存在下で RANKL 刺激した細胞群では、細胞内 Ca^{2+} 濃度の周期的な上昇、いわゆる Ca^{2+} オシレーションを自発的に発生するが、テトラサイクリン誘導性の TRPV2 silencing した細胞群では、オシレーション頻度が優位に減少した。

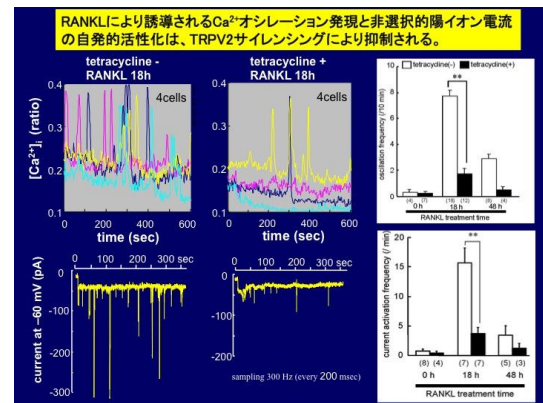


図 3

また、パッチクランプ法により Ca^{2+} 添加により K^+ 電流は抑制した条件下で、TRPV2 を介する陽イオン電流を検討したその結果、テトラサイクリン非存在下で、TRPV2 を発現した細胞 (図 3 下段左側) は、保持電位を 0 mV から -50 mV に過分極保持すると、自発的な一過性の内向き電流が活性化された。一方、TRPV2 silencing した細胞 (図 3 下段中側) では、内向き電流の量は小さく発生頻度も低かった。従って、 Ca^{2+} オシレーションの発生とこの電流の活性化には共に TRPV2 が関与していることが明らかとなった。

我々はCa²⁺オシレーションはRANKL刺激した前駆細胞にのみ発生することを既に確認しているため、この電流の活性化もまたRANKL刺激に依存するかどうかを調べた(図4参照)。まず、RANKL刺激したRAW264.7細胞では保持電位-50mVにて、内向き電流の活性化が活発に認められた。一方、RANKL刺激をしない細胞では、電流の活性化は殆ど認められなかった。従って、この内向き電流もまたCa²⁺オシレーションと同様にRANKL刺激に依存することが分かった。また、この内向き電流の活性化は細胞外液中のNa⁺を膜不透過性のNMDG⁺に置換すると完全に消失した。図4中の左下aはちょうど内向き電流が活性化された時の電流-電圧関係を示す。

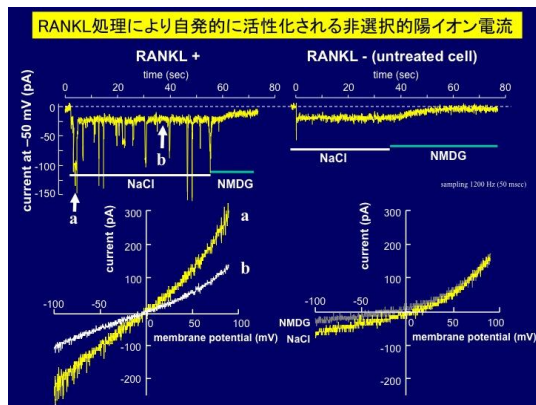


図4

次に、TRPVチャネルを全般的に抑制するruthenium red (RR)の効果を検討した(図5参照)。RAW264.7細胞におけるRANKL刺激で生じる内向き電流の周期的な活性化はruthenium red投与により、速やかに抑制され、washoutにより回復した。RR投与前と投与後30秒における電流の活性化頻度を多数例で比較した結果、この電流はRR感受性が高いことが分かった。また、RANKL刺激によって生じるCa²⁺オシレーションについてもRRは可逆的な抑制を示した。また、Ca²⁺オシレーションは外液中のCa²⁺除去によって消失した。これらの結果は、この内向き電流がTRPV2の活性化を示し、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している。

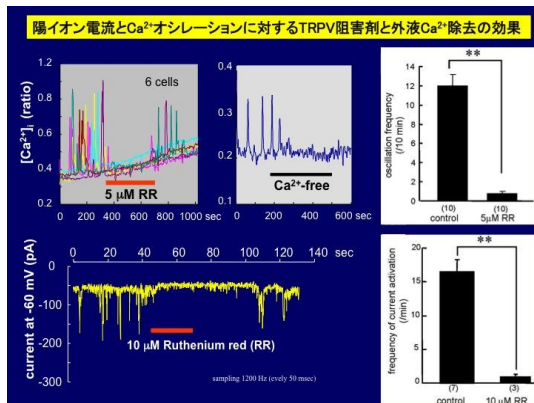


図5

また、破骨細胞分化にはPLCγ2を介したCa²⁺動員が関与していることが報告されている。そこで、まず、RAW264.7細胞を用いてCa²⁺オシレーションに対するPLCの関与を検討した(図6参照)。その結果、オシレーションはPLC阻害剤のinactive analog(U73343)では影響を受けないが、引き続き投与したactive analog(U73122)によって抑制された。次に、RAW264.7細胞を用いてTRPV2の活性化に対する影響を調べた。RANKL刺激した細胞を、まず、PLC阻害剤のinactive analogで前もって約5分間処理した後、保持電位-60mVにて活性化される電流を記録した。active analog(U73122)投与により数分後に内向き電流の活性化が優位に減弱した。図7右下はinactive analogとactive analogで15分間前処理した細胞群における、内向き電流の活性化頻度を多数例で比較した。PLC阻害剤により電流活性化が強く抑制されることが分かった。

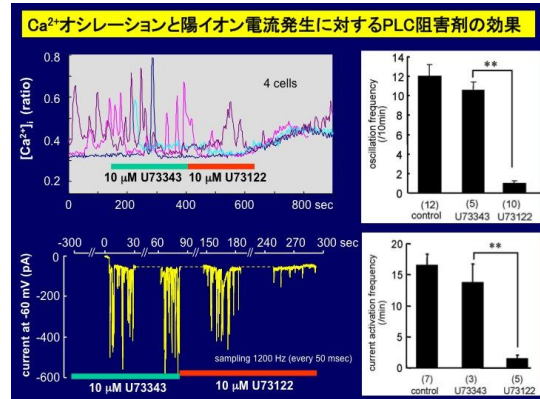


図6

次に、store-operated Ca²⁺ entry (SOCE)を形成する機能分子であると報告されるStim1やOrailのCa²⁺オシレーション形成への関与を検討した。RANKL刺激により、経時的にTRPV2の発現と共に、Stim1やOrailの発現上昇が優位に認められた。また、テトラサイクリン誘導性にStim1及び、Orailをsilencingすると、TRPV2電流の発生とCa²⁺オシレーション形成がそれぞれ抑制された(図7参照)。

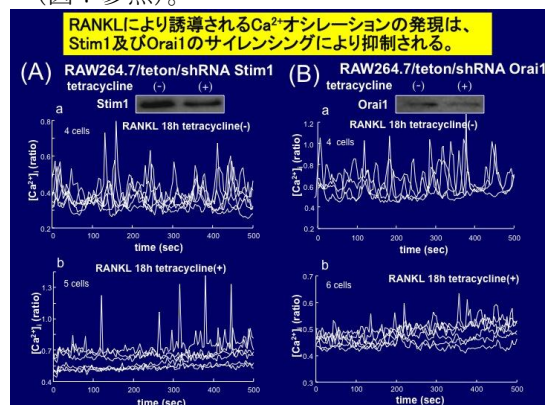


図7

以上の結果より、TRPV2 は破骨細胞分化を誘発する Ca^{2+} オシレーションを構築する重要な機能分子であり、その活性化には PLC 系や SOCE 機構も関与すると考えられた。

更に、破骨細胞の分化シグナルである転写因子 NFATc1 の活性化を調べるために、NFATc1 の核内移行に対する TRPV2 silencing の効果を検討した (図 8 参照)。これは RANKL 刺激後 48 時間の RAW264.7 細胞で、緑が NFATc1、青は核を示し、右側 (merge) は両イメージを重ね合わせたものである。このように、TRPV2 を silencing していない細胞では NFATc1 は核に局在していた。一方、テトラサイクリン誘導性に shRNA を発現させて TRPV2 を silencing すると NFATc1 は細胞質に存在し核内移行が抑制された。

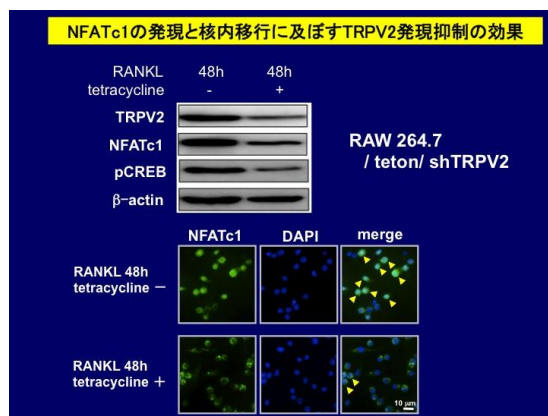


図 8

最後に、破骨細胞分化における TRPV2 の役割を検討するために、破骨細胞形成に対する RR と TRPV2 silencing の効果を調べた。まず、RAW 細胞を RANKL 存在下で 3 日培養し、TRAP 陽性細胞の数をカウントした結果、破骨細胞形成は RR により濃度依存的に抑制された。また、TRPV2 silencing によっても、破骨細胞形成は優位に抑制された (図 9 参照)。

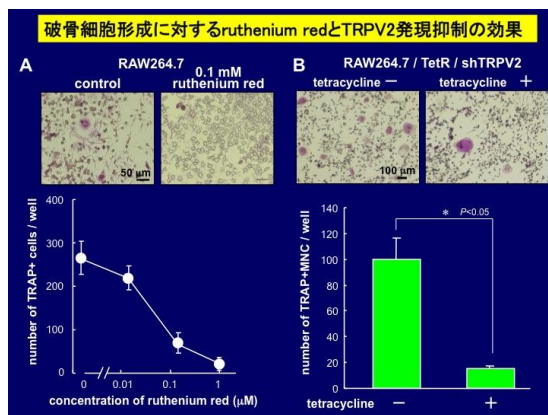


図 9

考察

以上より、(1) 破骨前駆細胞の分化初期には RANKL 依存性に TRPV2 の発現が一時的に上昇すること。(2) TRPV2 の発現抑制や機能障害は、 Ca^{2+} オシレーション発生を抑制し、最終的に NFAT c1 の活性化や破骨細胞形成を低下させること。(3) この TRPV2 の活性化には PLC 系や SOCE 機構も関与することが明らかとなった (図 10 参照)。

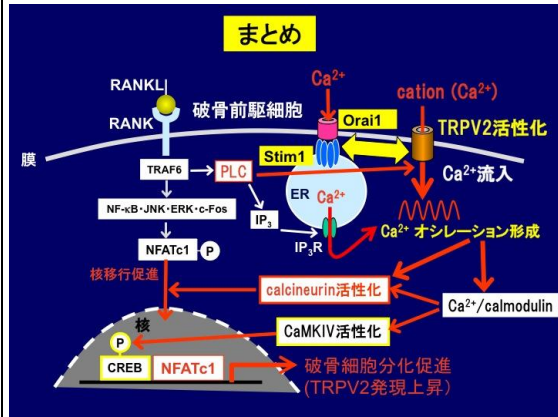


図 10

従って、破骨前駆細胞の分化初期に発現する Ca^{2+} オシレーション形成には、報告された IP_3 受容体からの Ca^{2+} 放出だけでなく、TRPV2 を介した Ca^{2+} 流入が重要で、TRPV2 はこの Ca^{2+} オシレーションを構築する重要な機能分子であると考えられた。また、この TRPV2 自身を PLC 系や SOCE 機構が直接制御する可能性があるが、TRPV2 による Ca^{2+} オシレーションの形成機序との関係については更に詳しく調べる必要がある。一方、この TRPV2KO マウスは胎生致死で解析が困難であるので、今後、破骨細胞特異的な TRPV2 コンディショナル KO マウスを作成し、in vivo 及び in vitro での検討を加えていく予定である。また、本研究から TRPV2 だけでなく TRPM7 という TRP 分子も RANKL 依存性に発現が優位に上昇することが明らかとなった。この TRP M7 は Ca^{2+} よりも Mg^{2+} を主として輸送するユニークな分子であり、今後は TRP M7 分子のコンディショナル KO マウスの作成にも取り組み、その機能解析も進めていく予定である。

以上の研究より、破骨前駆細胞に発現する TRP 分子という Ca^{2+} 輸送体の機能や役割が明らかになってきた。従って、これら機能分子と破骨細胞の骨吸収機能の関連を解明することは、歯周病やリュウマチ等における病的骨吸収を制御するために有用なアイデアを提供し、破骨細胞 TRP 分子をターゲットとした特異的かつ簡便な制御によって異常骨吸収に対する新しい薬剤や治療法の開発への展開が期待され、社会的にも大変意義があると考えられる。

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 3 件)

- ① Kajiya H, Okamoto F, Nemoto T, Kimachi K, Goto T K, Nakayama S, Okabe K, RANKL-induced TRPV2 expression regulates osteoclastogenesis via calcium oscillations. *Cell Calcium*, 査読有, Vol.48, 2010, pp.260-296
- ② Wang B, Danjo A, Kajiya H, Okabe K, Kido M.A, Oral epithelial cells are activated via TRP channels. *J Dent Res*, 査読有, Vol.90, 2011, pp.163-167
- ③ Ohgi K, Okamoto F, Kajiya H, Sakagami R, Okabe K, Antibodies to ClC7 inhibit extracellular acidification-induced Cl⁻ currents and bone resorption activity in mouse osteoclasts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, Vol.383, 2011, pp.79-90

[学会発表] (計 11 件)

- ① 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Ca²⁺ 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、2008年10月29日、大阪国際会議場 (大阪市)
- ② 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Ca²⁺オシレーションの構築分子として破骨細胞への分化を誘導する、第59回西日本生理学会、2008年10月3日、熊本市民会館 (熊本市)
- ③ 岡部幸司、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、2008年11月2日、福岡大学 (福岡市)
- ④ 増山律子、鍛冶屋浩、北浦英樹、岡部幸司、小守壽文、TRPV4の活性型変異はカルシウムオシレーションを早発させ、破骨細胞分化を促進する、第27回日本骨代謝学会、2009年7月25日、大阪国際会議場 (大阪市)
- ⑤ Kajiya H, Okamoto F, Nemoto T, Ohgi K, Okabe K, RANKL-induced expression of TRPV2 is involved in osteoclastogenesis via calcium oscillations. XXXVI th International Union of Physiological Sciences (IUPS), July 29, 2009, Kyoto International Conference Center (Kyoto)
- ⑥ 城戸瑞穂、王 冰、鍛冶屋 浩、岡部幸司

、張 旌旗、山座孝義、口腔上皮におけるカプサイシン感受性細胞の解析、第51回歯科基礎医学会、2009年9月11日、新潟コンベンションセンター (新潟市)

- ⑦ 大城希美子、岡本富士雄、鍛冶屋 浩、根本哲臣、来海慶一郎、岡部幸司、新規抗ClC7抗体は破骨細胞ClC7型Cl⁻チャンネルのCl⁻輸送と骨吸収活性を抑制する、第28回日本骨代謝学会、2010年7月21日、京王プラザホテル (東京都)
- ⑧ 来海慶一郎、鍛冶屋 浩、中山修二、根本哲臣、大城希美子、岡本富士雄、岡部幸司、窒素含有ビスフォスフォネート (NBP) 製剤のゾレドロ酸による破骨前駆細胞の分化・遊走能抑制作用、第52回歯科基礎医学会、2010年9月21日、タワーホール船橋 (東京都)
- ⑨ 大城希美子、岡本富士雄、鍛冶屋 浩、根本哲臣、堤 貴司、岡部幸司、新規抗ClC7抗体の破骨細胞ClC7Cl⁻チャンネルのCl⁻活性と骨吸収活性に対する抑制作用、第52回歯科基礎医学会、2010年9月22日、タワーホール船橋 (東京都)
- ⑩ 王 冰、合島怜央奈、鍛冶屋 浩、岡本富士雄、岡部幸司、城戸瑞穂、口腔上皮細胞における機能的なTRPV4チャンネルの発現、第52回歯科基礎医学会、2010年9月21日、タワーホール船橋 (東京都)
- ⑪ Kimachi K, Ikebe T, Nakayama S, Okamoto F, Kajiya H, Okabe K, Zoledronic Acid Inhibits TNF- α Induced RANK Expression and Migration in Osteoclast Precursors.、ASBMR 2010 Annual Meetin, October 18, 2010, Metro Toronto Convention Centre (Toronto, Canada)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fdcnet.ac.jp/col/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

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

井上 隆司 (INOUE RYUJI)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：30232527