

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590321

研究課題名(和文) 破骨細胞による骨分解機構の解明—骨リモデリングを制御する治療の開発に向けて

研究課題名(英文) Investigation of bone resorption by osteoclasts: aiming at therapy regulating osteoclastic bone resorption.

研究代表者

通山 由美 (TOHYAMA YUMI)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：70362770

研究成果の概要(和文)：骨を分解する破骨細胞の活性化と制御に関わる分子を探索し、ATPが受容体 P2X<sub>7</sub> を介して骨分解開始因子として機能する事を見いだした。さらに、ATP/P2X<sub>7</sub> シグナルが、アクチン細胞骨格の再構成によるシーリングゾーンの形成と骨分解顆粒の輸送と放出を誘導する事、この一連の反応において、チロシンキナーゼ Syk が微小管のアセチル化/脱アセチル化の制御を介して骨の溶解に必須の役割を果たしている事を示した。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts are bone-degrading cells playing an exclusive role in bone remodeling but molecular mechanism of osteolysis is poorly understood. Here we established a traceable and reproducible *in vitro* analyzing system for osteolysis using human osteoclasts because we found that an energy molecule ATP acts as a specific osteolysis initiator via P2X<sub>7</sub>-nucleotide receptor. We further show that deacetylation of  $\alpha$ -tubulin is a critical reaction for osteolysis. Pharmacological inhibition of  $\alpha$ -tubulin deacetylation resulted in defective bone resorption, accompanied by (1) failure of sealing-zone formation and (2) ceased secretion of osteolytic granules. Furthermore, kinetics of deacetylation was found to be regulated by Syk. These data suggest a novel P2X<sub>7</sub>-Syk-acetylation/deacetylation pathway for therapeutic targets in osteolytic diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1080,000	4,680,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：破骨細胞、リソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

骨は、その硬質なイメージとは異なり、ダイナミックに再構築されている（骨リモデリング）。すなわち、骨内部（骨髄）では、破骨細胞という強力な骨分解能を有する細胞が骨を分解し（骨吸収）、それを補うべく骨芽細胞が再形成をおこなっている。正常な骨はこのバランスにより維持されておりその破綻は重篤な疾患や病態をもたらす。中でも、骨破壊が亢進した骨粗鬆症や関節リウマチ、がんの骨髄転移は、骨痛や骨折、脊髄圧迫など患者に多大な苦痛と Quality of Life(QOL)の低下を招く。加えて、閉経後の骨粗鬆症が、エストロゲンの減少により破骨細胞の生存期間が延長した結果であると報告されて、破骨細胞の機能を制御する治療の重要性が再認識されている。

## 2. 研究の目的

骨を分解する破骨細胞の活性化と制御の分子機構の解明をめざす。破骨細胞が骨分解開始シグナルを受けると、骨上に環状の接着帯（シーリングゾーン）を形成してその内側の空間を外部から隔絶する。この空間はプロトンポンプにより酸性に維持されており、破骨細胞は骨分解酵素を含むリソソームを細胞直下へ放出して骨を分解する。これらの過程の中で以下の3点に焦点を絞り研究を進める。

- (1) 骨分解誘導開始因子とその受容体の探索、
- (2) シーリングゾーンを形成するための細胞骨格再構成機構の解明、
- (3) リソソームの放出に至る細胞内輸送とこの輸送を支える微小管ダイナミクスの解明、

これらの研究を通して、骨破壊性疾患の新規治療法の分子基盤の確立に貢献する。

## 3. 研究の方法

まず、(1) ヒト末梢血由来の単球およびヒト白血病細胞株を分化成熟させて破骨細胞

とし、象牙質切片や、骨基質を塗布したグラス上で骨分解過程を再現する *in vitro* の実験系を確立した。引き続いて、(2) 破骨細胞に骨分解を開始させる刺激因子とその受容体を探索した。本研究では、申請者らが骨分解の誘導活性を見いだした候補分子として ATP を利用した。具体的には、ATP 刺激後の変化を①シーリングゾーンの形成に必須のアクチンの再構成、②カテプシン K など骨分解酵素を含むリソソームの細胞内輸送と放出機構、さらに ③その輸送を支える微小管のダイナミクスに着目して、共焦点レーザー顕微鏡を用いた可視的手法、生化学的手法により経時的に解析した。各段階について鍵となる化学反応と標的分子を探索し、候補分子について、その発現抑制型 (shRNA の導入)、および変異型-破骨細胞を作成してその機能領域と下流分子を探索した。

## 4. 研究成果

骨を分解する破骨細胞の活性化と制御の分子機構を明らかにするため、(1) 骨分解を誘導する開始因子とその受容体の探索、(2) シーリングゾーンの形成に関わる細胞骨格再構築のメカニズムの解析、(3) 骨分解酵素の放出に至る骨分解顆粒の細胞内輸送とこの輸送を支える微小管ダイナミクスの制御機構に焦点をあてて研究に取り組んだ。

破骨細胞としては、ヒト末梢血由来の単球およびヒト白血病細胞株 HL60 を、分化誘導因子存在下に培養して用い、*in vitro* に骨溶解実験をおこなった。その結果、

- (1) ATP が破骨細胞の活性化刺激リガンドとしてはたらく事、

ATP 刺激依存性に

- (2) 既存のアクチン細胞骨格は一旦崩壊し、環状の接着帯であるシーリングゾーンが再構築される事、

- (3) カテプシン K などの骨分解酵素を含む酸性顆粒の輸送が加速して骨上かつ環状構造内部に放出される事、

さらに、ATP 刺激依存性に誘導される上記(1)、(2)の反応は、

(4)イオンチャンネル型核酸受容体 P2X<sub>7</sub> を介している事、

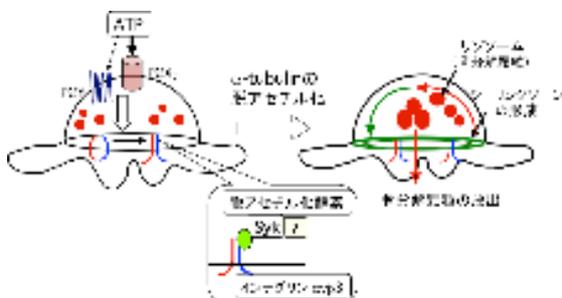
(5) α チューブリンの脱アセチル化阻害剤により可逆的に停止する事、を見いだした。

加えて、

(6)チロシンキナーゼ Syk の発現を抑制すると、α チューブリンの脱アセチル化の反応速度の減少とともに、ATP 刺激依存性の骨溶解が阻害される事を確認した。

上記、(1)～(6)の結果より、ATP が受容体 P2X<sub>7</sub> を介して骨吸収開始因子として機能し、ATP/P2X<sub>7</sub> シグナルが、アクチン細胞骨格の再構成によるシーリングゾーンの形成と骨分解顆粒の輸送と放出を誘導し、さらに、この一連の反応の上流において、Syk が、微小管のアセチル化/脱アセチル化の制御を介して骨分解に必須の役割を果たしている事が示唆された。

本研究の総括を下図に示す。



## 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6件)

①Yokoyama K, Kaji H, He J, Tanaka C, Hazama R, Kamigaki T, Ku Y, Tohyama K, Tohyama Y

Rab27a negatively regulates phagocytosis by prolongation of the actin-coating stage around phagosomes J Biol Chem. 286 :

5375-5382 2011 査読有

②Kajimoto T, Sawamura S, Tohyama Y, Mori Y, Newton AC

Protein kinase C delta-specific activity reporter reveals agonist-evoked nuclear activity controlled by Src family of kinases J Biol Chem. 285 : 41896-41910 2010 査読有

③Matsuoka A, Tochigi A, Kishimoto M, Nakahara T, Kondo T, Tsujioka T, Tasaka T, Tohyama Y, Tohyama K

Lenalidomide induces cell death in an MDS-derived cell line with deletion of chromosome 5q by inhibition of cytokinesis.

Leukemia. 24 : 748-755 2010 査読有

④Hazama R, Qu X, Yokoyama K, Tanaka C, Kinoshita E, He J, Takahashi S, Tohyama K, Yamamura H, Tohyama Y

ATP-induced osteoclast function; the formation of sealing-zone like structure and the secretion of lytic granules via microtubule-deacetylation under the control of Syk. Genes to Cells 14:871-884 2009 査読有

⑤Tohyama Y Yamamura H

Protein-Tyrosine Kinase, Syk: A Key Player in Phagocytic cells

J Biochem. 145:267-273 Review 2009 査読有

⑥Kondo T, Okuno N, Naruse H, Kishimoto M, Tasaka T, Tsujioka T, Matsuoka A, Sugihara T, Tohyama Y, Tohyama K

Validation of the revised 2008 WHO diagnostic criteria in 75 suspected cases of myeloproliferative neoplasm.

Leuk Lymphoma. 49:1784-1791 2008

査読有

[学会発表] (計10件)

主要なものは以下3件

① Yumi Tohyama, Hirohei Yamamura

ATP-induced bone resorption in osteoclasts: the formation of sealing-zone like structure and the

secretion of lytic granules via Syk dependent deacetylation of alpha tubulin.

第14回 国際免疫学会、

2010年8月26日、神戸国際会議場（兵庫県）

② 陌間 亮一, 通山 由美

破骨細胞においてATP/P2X<sub>7</sub>受容体シグナルにより誘導される微小管のアセチル化制御を介した骨吸収の分子機構の解析、

第28回 日本骨代謝学会学術集会、

2010年7月23日、京王プラザホテル（東京都）

③ 陌間 亮一, 山村 博平, 通山 由美

ATP/P2X<sub>7</sub>シグナリングを介した破骨細胞による骨吸収機構の解析、

第82回 日本生化学会大会

2009年10月22日、神戸国際会議場（兵庫県）

[その他]

ホームページ等

[http://www.himeji-du.ac.jp/faculty/dp\\_pharm/pharm/pt2/](http://www.himeji-du.ac.jp/faculty/dp_pharm/pharm/pt2/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

通山 由美 (TOHYAMA YUMI)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：70362770

### (2) 研究分担者

梶本 武利 (KAJIMOTO TAKETOSHI)

姫路獨協大学・薬学部・講師

研究者番号：00509953

(2008年度のみ)

### (3) 連携研究者

加地 弘明 (KAJI HIROAKI)

姫路獨協大学・薬学部・講師

研究者番号：10368706

(2010年度のみ)

田中 千都 (TANAKA CHISATO)

姫路獨協大学・薬学部・助手

研究者番号：30461122

(2008年度-2010年度)