

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592175

研究課題名（和文） 破骨細胞におけるアスパラギン酸プロテアーゼの機能

研究課題名（英文） Role(s) of pepstatin A-sensitive aspartic proteinases in osteoclast differentiation

研究代表者

西下 一久 (NISHISHITA KAZUHISA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20237697

研究成果の概要（和文）：酸性条件下で活性を発揮するアスパラギン酸プロテアーゼの破骨細胞分化における役割を探った。カテプシンE欠損マウス由来骨髄細胞における破骨細胞形成抑制はアポトーシス亢進により生じ、我々が以前報告したアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤による破骨細胞分化抑制時に観察された RANKL 下流のシグナリング抑制とは別の分子機構によることが示唆された。また、新規プロテアーゼであるナプシンの比較遺伝学的分析と生化学的解析を行い、破骨細胞分化への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the roles of aspartic proteinase family in mouse in vitro osteoclast differentiation model. Osteoclastogenesis in bone marrow macrophage culture from cathepsin E-knockout mice were significantly suppressed, probably through elevating the RANKL-induced caspase 3 activation. We also studied the comparative genetic and biochemical analyses of napsins. Napsin A is endogenously expressed in mouse bone marrow cells and recombinant proteins possess pepstatin-A sensitive activities against several synthetic aspartic proteinase substrates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、プロテアーゼ、カテプシンE、カテプシンD、アポトーシス、ナプシン

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は造血幹細胞由来のマクロファージ系前駆細胞が融合して形成される多核巨細胞であり、骨吸収を担う唯一の細胞である。アスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤であるペプスタチンAを破骨細胞に添加したところ、破骨細胞分化及び骨吸収が非常に抑制される。破骨細胞にはアスパラギン酸プロテアーゼとしてカテプシンDとカテプシン

Eが存在するが、両酵素の関与する分子メカニズムは不明のままであった。

2. 研究の目的

カテプシンDおよびカテプシンE欠損マウスを用いて、カテプシンDおよびEの破骨細胞分化及び骨吸収に寄与する分子基盤を明らかにすること、具体的には両酵素がコラーゲンなどの骨基質タンパク質を単に分解する酵素でなく、RANKなどの破骨細胞の分化

や生存、骨吸収能制御に必須な受容体の分解に関与する重要な酵素ではないかとの仮説を立て、それを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) カテプシンE欠損マウス由来骨髄細胞の *in vitro* 破骨細胞形成能

カテプシンE欠損マウス由来骨髄細胞を macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 存在下で3日間培養し、マクロファージ様細胞を得た。破骨細胞分化のためにはマクロファージ様細胞をさらに M-CSF と RANKL 存在下で培養した。培養プレート上の細胞を固定後、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い顕微鏡観察下にて多核の TRAP 陽性細胞を計数することにより破骨細胞形成の評価を行った。

(2) 細胞表面受容体の発現量の比較

チオグリコレートにて誘導した腹腔マクロファージ (MAC-2 陽性率 95%以上) と蛍光標識した各種抗体を混合、放置の後よく洗浄してフローサイトメトリーにより細胞表面受容体発現量を計測した。

(3) RANKL 刺激による破骨細胞分化、細胞融合に関与する遺伝子群発現の異常の有無

リアルタイム RT-PCR 法により破骨細胞分化並びに細胞融合に関連する各種遺伝子 (産物) の変動をカテプシンE欠損の有無で比較を行った。

(4) アポトーシスの亢進の有無

骨髄細胞に RANKL を作用させて破骨細胞に分化させたときのアポトーシスをみるためには、細胞抽出液中の活性型カスパーゼ分子を抗カスパーゼ3抗体を用いてウエスタンブロットにて検出した。

(5) マウス骨髄細胞の *in vitro* 破骨細胞分化に伴うカテプシンE発現の変動

破骨細胞分化に伴うカテプシンE発現の変動をウエスタンブロット法ならびにリアルタイム RT-PCR 法にて観察した

(6) アスパラギン酸プロテアーゼナプシンの比較遺伝学的解析と生化学的解析

NCBI の核酸データベース上にてナプシンの EST 解析、SNP 解析ならびにヒトナプシン B オルソログ検索を行った。ナプシン A・ナプシン B の全長を含む EST クローンより哺乳類細胞発現プラスミドを作成し、HEK293 細胞に発現させ、生化学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 骨髄細胞の *in vitro* 破骨細胞形成能の異常

カテプシンE欠損マウス由来骨髄細胞の破骨細胞形成能は野生型マウス由来骨髄細胞と比較して低下していた。

(2) 細胞表面受容体の発現量の比較

破骨細胞前駆細胞は造血幹細胞由来であるが、多核巨細胞であり、大きさもまちまちなためフローサイトメトリーによる解析が

困難である。そこでまず同細胞と起源を同じくするマクロファージについて細胞表面受容体発現量の比較を行った。カテプシンE欠損マウス由来の腹腔マクロファージでは細胞遊走能および細胞接着能の低下がみられた。またケモカイン受容体 (CCR-2) やインテグリン (CD18、CD29) などの発現量が低下していた (図1、図2 論文⑤より引用)。

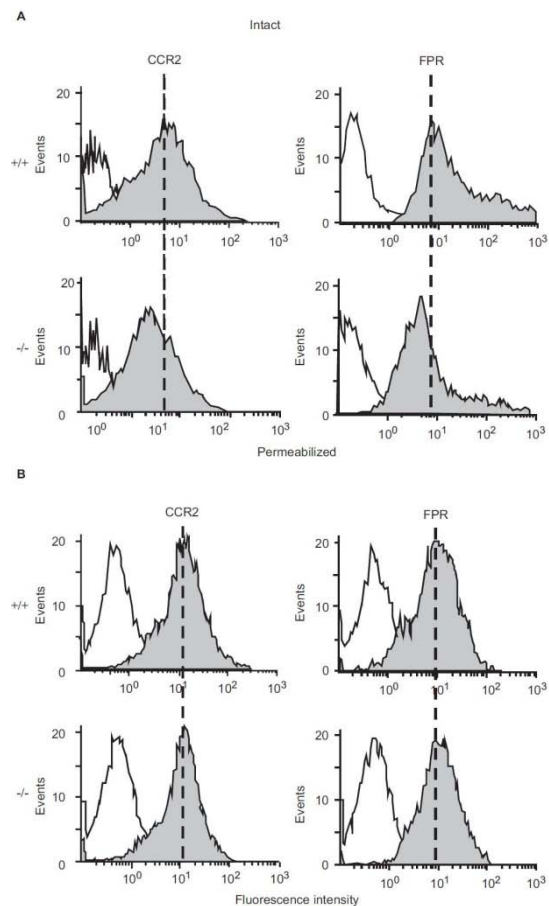


図1

以上の結果は、カテプシンE欠損により細胞遊走や接着にかかわる細胞表面受容体発現量の低下が生じることでマクロファージの機能低下が引き起こされることを強く示唆している。

(3) RANKL 刺激による破骨細胞分化、細胞融合に関与する遺伝子群発現の異常の有無

カテプシンE欠損マウス由来骨髄細胞培養下における破骨細胞分化が低下していたことについて、さらに詳細な解析を行った。カテプシンE欠損マウス由来骨髄細胞より RANKL で分化させた細胞の酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 活性染色を行うと、破骨細胞と計数される3核以上の TRAP 陽性細胞は有意に少ないが、2核以下の小型の細胞は多く存在していた。リアルタイム RT-PCR 法による TRAP 遺伝子の発現を野生型マウス由来骨髄細胞と比較すると顕著な差は認められず、破骨細胞前駆細胞同士の細胞融合が

抑制されている可能性を考えた。そこで、細胞融合に重要な役割を持つことが知られている DC-STAMP、OC-STAMP 両遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて観察したところ RANKL 添加後増加するが、その増加傾向は野生型細胞と顕著な差は認められなかった。

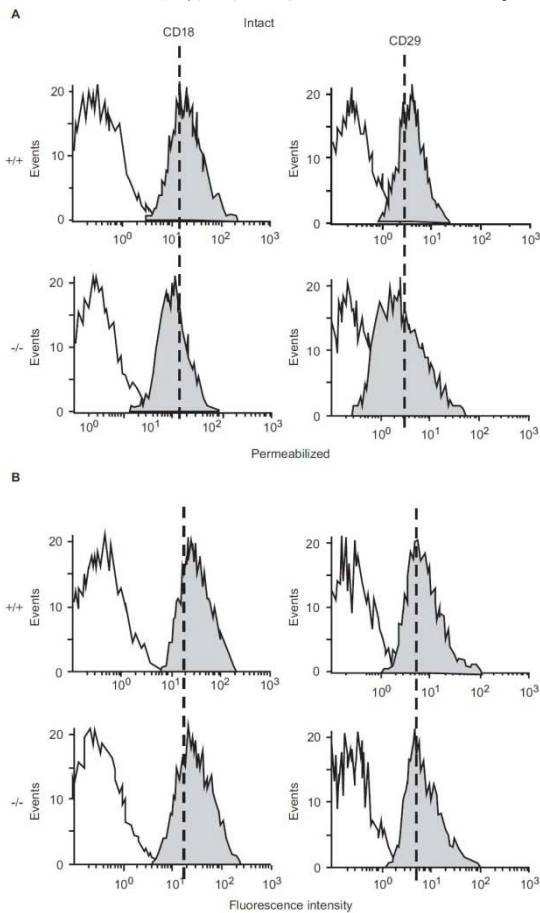


図 2

(4) アポトーシスの亢進の有無

培養下における破骨細胞分化が低下している理由のひとつに前駆細胞ならびに成熟破骨細胞のアポトーシスが亢進している可能性が考えられた。RANKL は破骨細胞への分化を促すが、無血清培養下では破骨細胞前駆細胞にアポトーシスを引き起こすことが報告されている。カテプシンE欠損マウス由来骨髄細胞では血清存在培養下においても RANKL 刺激によりカスパーゼ3の活性化亢進が観察された。破骨細胞と起源を同じくするカテプシンE欠損マクロファージでは(2)で示したように細胞接着能の低下、インテグリン (CD18、CD29) などの発現量が低下していたことを考え合わせると、カテプシンE欠損により接着にかかわる細胞表面受容体タンパク発現量の低下が生じることでアポトーシスが生じやすい細胞内環境に陥っている可能性を示唆している。

(5) マウス骨髄細胞の in vitro 破骨細胞分化に伴うカテプシンE発現の変動

破骨細胞分化に伴うカテプシンE発現の

変動をウエスタンブロット法ならびにリアルタイム RT-PCR 法にて観察したところ、RANKL 添加による分化誘導の初期の段階で発現量が著しく低下することが明らかとなった。このことより、我々が以前報告したアスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤ペプスタチンAによる破骨細胞分化抑制が初期段階で特に顕著であった結果 (Yoshida et al. *J. Biochem.* **139**, 583-590, 2006) は、カテプシンEを阻害することで生じた効果ではないかと考えられた。しかし、ペプスタチンA添加で観察された RANKL 下流の ERK や NFATc1 などの活性化の抑制はカテプシンE欠損マウス由来骨髄細胞では観察されなかった。

(6) アスパラギン酸プロテアーゼナプシンの比較遺伝学的分析と生化学的解析

カテプシンE欠損とペプスタチンAによる破骨細胞分化抑制はそれぞれ別の分子メカニズムで生じることが推察された。そこで、破骨細胞においてカテプシンEやカテプシンDとは異なる末同定のアスパラギン酸プロテアーゼが分化に重要な役割を担っているという仮説のもとにナプシンの比較遺伝学的分析と生化学的解析を行った。ナプシンは

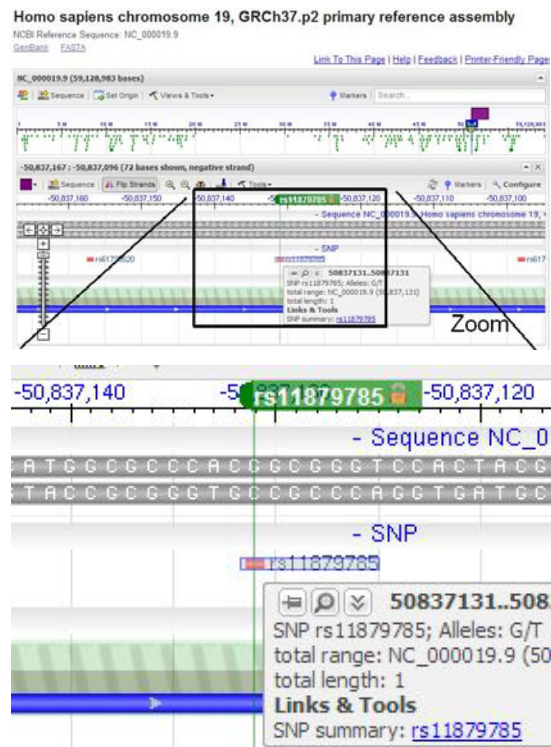


図 3

哺乳類に存在するアスパラギン酸プロテアーゼである。ヒトのナプシンには A (NAPSA) および B (NAPSB) があり、前者は 420 アミノ酸をコードするが、後者は NAPSA の終止コドンに相当する核酸配列が TGC であることから偽遺伝子であるとされていた。NCBI の核酸データベース上にてナプシンの EST 解析、SNP 解析ならびに NAPSB オルソログ検索を行った

ところヒト NAPS B の終止コドン相当位置には TGC/A の 2 種の対立遺伝子が存在し (NCBI SNP ## rs=11879785) (図 3)、チンパンジー NAPS B

EST Profile

Mm.383181 - Napsa: Napsin A aspartic peptidase

Breakdown by Body Sites

	Mm.383181	
adipose tissue	0	0/1564
adrenal gland	0	0/2044
bladder	0	0/13461
blood	59	1/16832
bone	0	0/32327
bone marrow	320	44/137491
brain	2	1/459991
connective tissue	0	0/19790
dorsal root ganglion	0	0/10186
embryonic tissue	15	10/664846
epididymis	0	0/2652
extraembryonic tissue	0	0/73200
eye	0	0/184900
fertilized ovum	0	0/26353
heart	19	1/52131
inner ear	0	0/37947
intestine	11	1/84236
joint	0	0/17136
kidney	1968	241/122453
liver	119	13/108957
lung	82	8/96442
lymph node	329	5/15170
mammary gland	29	9/302624
molar	0	0/3601
muscle	0	0/27256
nasopharynx	0	0/8067
olfactory mucosa	0	0/3281
ovary	0	0/53434
oviduct	0	0/3201
pancreas	9	1/105756
pineal gland	0	0/3914
pituitary gland	0	0/16965
prostate	0	0/29888
salivary gland	0	0/19345
skin	104	12/114950
spinal cord	0	0/21805
spleen	402	38/94430
stomach	0	0/29435
sympathetic ganglion	0	0/9045
testis	0	0/113759
thymus	8	1/116168
thyroid	790	7/8859
tongue	0	0/9861
turbinate	0	0/1383
uterus	0	0/6842
vagina	0	0/5171
vesicular gland	0	0/2187

図 4

オルソログ (NCBI Gene symbol: LOC456226) や、他の霊長類のオルソログには終止コドンが存在していた。マウスには NAPS A オルソログ (MGI:109365) のみがあり、骨髄や脾臓など破骨細胞前駆細胞を含む臓器に分布していた (図 4)。従ってナプシン遺伝子は霊長類進化の過程で重複が生じ、ヒトでは NAPS B において偽遺伝子化が進んでいると考えられた。NAPS A・NAPS B の全長を含む EST クローンより哺乳類細胞発現プラスミドを作成し、HEK293 細胞に発現させ、既存のアスパラギン酸プロテアーゼ基質を用いて活性を計測したところ NAPS B は既存のアスパラギン酸プロ

テアーゼの基質を分解する活性を検出できなかったが、NAPS A はペプシン、カテプシン D、カテプシン E 及び BACE の基質を分解する幅広い活性を有しており、その活性はペプスタチン A にて阻害された。

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 6 件)

① Sato T, Nishishita K, Okada Y, Toda K. The receptor potential of frog taste cells in response to cold and warm stimuli. *ChemSenses* 査読有 2010, 35, 491-99

② Yasuda Y, Izumikawa M, Okamoto K, Tsukuba T, Saito T. Carbon dioxide laser irradiation stimulates mineralization in rat dental pulp cells. *IntEndod J* 査読有 42, 2009, 940-946

③ Sato T, Nishishita K, Okada Y, Toda K. Effect of gap junction blocker beta-glycyrrhetic acid on taste disk cells in frog. *Cell MolNeurobiol* 査読有 29, 2009, 503-512

④ Sato T, Nishishita K, Okada Y, Toda K. Interaction between gustatory depolarizing receptor potential and efferent-induced slow depolarizing synaptic potential in frog taste cell. *Cell MolNeurobiol* 査読有 29, 2009, 243-252

⑤ Tsukuba T, Yanagawa M, Okamoto K, Okamoto Y, Yasuda Y, Nakayama KI, Kadowaki T, Yamamoto K. Impaired chemotaxis and cell adhesion due to decrease in several cell-surface receptors in cathepsin E-deficient macrophages. *J Biochem* 査読有 2009145(5):565-73

⑥ Ishida Y, Hu J, Sakai E, Kadowaki T, Yamamoto K, Tsukuba T, Kato Y, Nakayama K, Okamoto K. Determination of active site of lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) by use of *Porphyromonasgingivalis* plasmid system. *Arch Oral Biol* 査読有 53, 2008, 538-544

[学会発表] (計 2 2 件)

① 文元玲子 Nrf2 活性化剤は RANKL 誘導性破骨細胞分化を阻害する 第 84 回日本薬理学会年会 2011 年 3 月 23 日 神奈川県横浜市

② 坂井詠子 RANKL 依存的 H0-1 発現抑制は HMGB1 の遊離とカスパーゼ 3 の活性化につづく破骨細胞分化に必要なものである 第 84 回日本薬理学会年会 2011 年 3 月 23 日 神奈川県横浜市

③ 坂井詠子 H0-1 の発現誘導は RANKL を介した HMGB1 の細胞外遊離と破骨細胞分化を阻害する 第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 10 日 兵庫県神戸市

④岡元邦彰 カテプシン E 欠損における破骨細胞分化への影響第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 8 日 兵庫県神戸市

⑤植原 峻 RANKL 誘導性破骨細胞分化における遺伝子型の影響 第 52 回歯科基礎医学会学術大会 2010 年 9 月 23 日東京都江戸川区

⑥坂井詠子 HO-1 は HMGB1 の遊離を抑制し破骨細胞形成を阻害する第 52 回歯科基礎医学会学術大会 2010 年 9 月 23 日東京都江戸川区

⑦西下一久 アスパラギン酸プロテアーゼナプシンの比較遺伝学的分析と生化学的解析第 52 回歯科基礎医学会学術大会 2010 年 9 月 23 日東京都江戸川区

⑧筑波隆幸 カテプシン群によるメンブレントラフィックへの影響第 52 回歯科基礎医学会学術大会 2010 年 9 月 21 日東京都江戸川区

⑨筑波隆幸カテプシン E 欠損によるオートファジー低下とそれに伴うミトコンドリア機能低下と酸化ストレスの増大 第 14 回日本病態プロテアーゼ学会 2009/8/22 大阪府豊中市

⑩坂井詠子鉄代謝を介した新規の破骨細胞分化機構 第 51 回 歯科基礎医学会学術大会 2009 年 9 月 10 日新潟県新潟市

⑪筑波隆幸カテプシン E 欠損マクロファージにおけるオートファジーの低下とそれに伴うミトコンドリア機能異常と酸化ストレスの上昇 第 51 回歯科基礎医学会学術大会 2009 年 9 月 11 日新潟県新潟市

⑫坂井詠子破骨細胞分化における鉄代謝とミトコンドリアストレスの重要性 第 33 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 2009 年 9 月 12 日岡山県倉敷市

⑬岡元邦彰カテプシン E の発現制御機構における解析 第 83 回 日本薬理学会年会 2010 年 3 月 17 日 兵庫県神戸市

⑭筑波隆幸カテプシン E 欠損マクロファージにおけるオートファジーの減弱とそれに伴うミトコンドリア異常と酸化ストレスの増大 第 83 回日本薬理学会年会 2010 年 3 月 17 日 兵庫県神戸市

⑮坂井詠子 破骨細胞分化過程における鉄代謝機構の役割 第 32 回鉄バイオサイエンス学会 2008 年 9 月 14 日 青森県青森市

⑯嶋田めぐみ RANKL による破骨細胞分化における鉄代謝機構の役割 第 50 回歯科基礎医学会学術大会 2008 年 9 月 24 日 東京都江東区

⑰門脇知子カテプシン E 欠損マウスにおける高脂血症および脂肪肝の誘導 第 50 回歯科基礎医学会学術大会 2008 年 9 月 24 日 東京都江東区

⑱坂井詠子 RANKL 誘導性破骨細胞分化における鉄結合蛋白の関与 第 50 回歯科基礎医学会学術大会 200809 年 9 月 25 日 東京都江東区

⑲岡元邦彰 カテプシン E 遺伝子発現に関する転写因子 Sp1 第 50 回歯科基礎医学会学

術大会 2008 年 9 月 25 日 東京都江東区

⑳ Yamamoto K Cathepsin E in tumor progression and bacterial infection. 11th Symposium on Proteinase inhibitors and Biological Control 2008/08/30 - 09/03 Portoroz, Slovenia

*筑波隆幸カテプシン E 欠損はオートファジー低下とそれに伴うミトコンドリア機能異常と酸化ストレスを引き起こす第 81 回日本生化学会/第 31 回日本生物物学会合同大会 2008 年 12 月 9-12 日兵庫県神戸市

*岡元美子マウスカテプシン E 遺伝子発現に関する転写因子 Sp1 第 81 回日本生化学会/第 31 回日本生物物学会合同大会 2008 年 12 月 9-12 日兵庫県神戸市

〔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

西下一久 (NISHISHITA KAZUHISA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：20237697

(2) 研究分担者

筑波隆幸 (TSUKUBA TAKAYUKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30264055
岡元邦彰 (OKAMOTO KUNIAKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准
教授

研究者番号：10311846

坂井詠子 (SAKAI EIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助
教

研究者番号：10176622