

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20770153

研究課題名 (和文) 破骨細胞形成における RANK/TRAF6 を介した新規シグナル伝達機構の解明

研究課題名 (英文) Clarification of molecular mechanisms of RANK/TRAF6 signaling pathways in osteoclastogenesis

研究代表者

合田 仁 (GOHDA JIN)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：90361617

研究成果の概要 (和文)：

破骨細胞は、古い骨組織を吸収・破壊することで骨の代謝維持を担っており、細胞膜に存在する RANK と呼ばれる受容体タンパク質が刺激を受けると分化誘導される。本研究では、RANK にはタンパク質間の会合を安定化させる機能をもつアミノ酸配列が存在すること、人工的に調製したそのアミノ酸配列は、破骨細胞の形成を顕著に抑制することを発見した。これらの発見は、骨粗鬆症など破骨細胞の形成異常が関与する骨疾患への新たな治療法開発に貢献すると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

Osteoclasts, which are bone-resorbing cells, play a pivotal role in maintenance of bone homeostasis. The formation of osteoclasts requires the signaling pathways mediated by the receptor protein, RANK. In the present study, I demonstrated that RANK has a novel functional domain that sustains its interaction with the downstream signaling factors. Furthermore, Treatment with the peptides containing the amino acid sequence of its domain significantly suppressed osteoclast formation. These findings might contribute to development of new treatments for bone diseases, such as osteoporosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学、細胞生物学、免疫学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：発生・分化、細胞内シグナル伝達、骨代謝、破骨細胞、アダプター分子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 破骨細胞は骨吸収を担っており、その分化・機能異常は種々の骨疾患の原因と考えられている。したがって、それら分化誘導メカニズムの解明は、骨疾患に対する新規治療法開発に必要不可欠である。

(2) 破骨細胞は、受容体 RANK 及びアダプター分子 TRAF6 を介したシグナルにより分化誘導される。一方、以前に本研究代表者は、破骨細胞誘導に必須な新規 RANK 機能領域 HCR (highly conserved in RANK) を発見し、HCR は RANK のみ保存された領域であることを見

出していた。しかし、HCR を介したシグナル伝達機構については全く不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) HCR に結合するタンパク質を同定することで、HCR を介したシグナル伝達を担う因子を発見する。

(2) HCR のシグナル伝達因子群がどのような機構で、破骨細胞分化誘導を制御しているのか解明する。特に、破骨細胞形成に必要な TRAF6 シグナル、ITAM 受容体シグナルに焦点を当て、HCR 及びその結合因子群によるそれらシグナルに対する制御機構を明らかにすることで、破骨細胞形成における HCR の役割を解明する。

(3) HCR によって発現制御を受ける遺伝子を同定し、(1)、(2)で得られた知見と合わせて、HCR のシグナル伝達機構の全体像を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) HCR 結合因子を同定するために、破骨細胞分化誘導への関与が知られている因子群のうち、野生型 RANK には結合するが、HCR を欠損した RANK には結合しないものを、免疫沈降法によりスクリーニングした。さらに、その因子と 62 アミノ酸残基からなる HCR ペプチドとの結合を検討した。

(2) 研究代表者は、以前に、ヒト CD40 由来細胞外領域とマウス RANK 由来細胞質領域からなる h40/mRK キメラ受容体をマウス骨髄細胞由来破骨前駆細胞にレトロウイルスベクターを用いて発現させ、抗ヒト CD40 抗体で刺激する *in vitro* 破骨細胞分化誘導系を構築した。そこで、HCR を欠損させた hCD40/mRK 受容体を用いて、TRAF6 シグナル (NF- $\kappa$ B、MAPK の活性化) 及び ITAM 受容体シグナル (PLC 活性化、Ca 振動) を評価した。さらに、破骨細胞形成のマスター転写因子である NFATc1 の発現誘導に対する HCR 欠損の影響を検討した。

(3) 破骨前駆細胞を RANKL で刺激し、DNA マイクロアレイにより刺激依存的に発現が変化する遺伝子群を同定した。さらに、これらのうち、HCR 依存的に発現制御を受ける遺伝子群を、HCR 欠損キメラ受容体を用いて定量的 RT-PCR により同定を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 293T 細胞を用いた過剰発現系により、キメラ受容体 h40/mRK に結合する因子をスクリーニングしたところ、アダプター因子 Gab2 が結合した。さらに、Gab2 は、HCR 欠損

hCD40/mRK には結合せず、かつ HCR 領域からなるペプチドに結合すること、Gab2 と RANK の結合は刺激依存的であることを見出した (図 1)。これまで、Gab2 欠損マウスの解析より Gab2 が破骨細胞形成に重要な因子であることが報告されていたが、これらの結果より、Gab2 は HCR を介したシグナルの伝達因子であることが初めて示唆された。

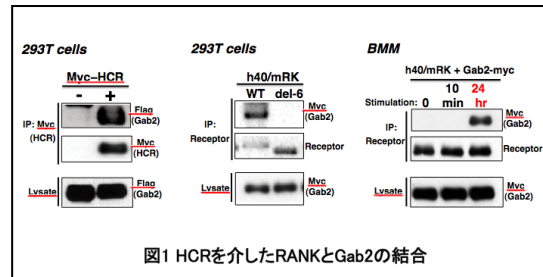


図1 HCRを介したRANKとGab2の結合

(2) 破骨細胞分化における HCR シグナルの役割を解明するために、HCR 欠損 h40/mRK を前駆細胞に発現させ、NF- $\kappa$ B 及び MAPK の活性化を評価した。その結果、刺激 60 分までは野生型受容体と同様に、HCR 欠損受容体においても NF- $\kappa$ B、MAPK を活性化したが、刺激 6 時間以降は、NF- $\kappa$ B の活性化が顕著に抑制された。したがって、HCR は TRAF6 シグナル (NF- $\kappa$ B、MAPK の活性化誘導) を長期に持続させる働きを見出した。

(3) 破骨細胞分化には RANK シグナル以外に ITAM 受容体を介した PLC- $\gamma$ 2 の活性化、それに引き続く細胞内 Ca<sup>++</sup>振動が必須であり、両シグナルが協調して最終的に分化のマスター因子である NFATc1 の発現を誘導することが知られている。そこで、ITAM 受容体シグナルに対する HCR 欠損の影響を検討した。HCR 欠損 h40/mRK は、刺激 60 分まで PLC- $\gamma$ 2 の活性化を誘導したが、刺激 6 時間以降の活性化を持続させることができなかった。さらに、刺激 24 時間以降で観察される Ca<sup>++</sup>振動及び NFATc1 の発現誘導も全くみられなかった。また、hCD40/mRK と PLC- $\gamma$ 2 の結合を免疫沈降法により検討したところ、刺激 60 分までは hCD40/mRK と PLC- $\gamma$ 2 との結合は観察されな

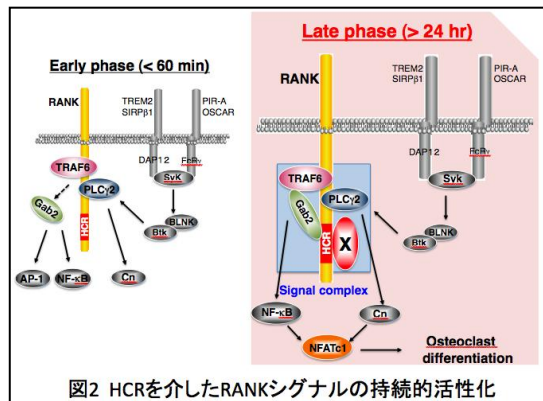


図2 HCRを介したRANKシグナルの持続的活性化

ったが、刺激 60 分以降において両者は HCR 依存的に会合した。これらの結果より、HCR は RANK と PLC- $\gamma$ 2 の結合を長時間維持させ、ITAM シグナルを持続させる役割を果たしていることが示唆された (図 2)。

(4) これまでの結果から、HCR は Gab2 との直接の会合を介して TRAF6 及び PLC- $\gamma$ 2 を含むシグナル複合体の形成を長時間維持させることにより、NF- $\kappa$ B 及び ITAM シグナルを持続させる役割を果たしている可能性が示唆された。そこで、人為的に HCR ペプチドを破骨前駆細胞に発現させ、HCR シグナル複合体の形成を阻害することで、破骨細胞形成を抑制することができるか検討した。62 アミノ酸残基からなる HCR ペプチドをマウス骨髄由来前駆細胞にレトロウイルスベクターを用いて発現させ、RANKL で刺激したところ、破骨細胞形成の顕著な抑制が認められた。さらに、HCR ペプチド発現細胞において、NF- $\kappa$ B 及び ITAM シグナルの低下がみられた。したがって、これらの結果から、HCR 複合体形成を阻害することで、破骨細胞分化を人為的に抑制することが示唆された (図 3)。

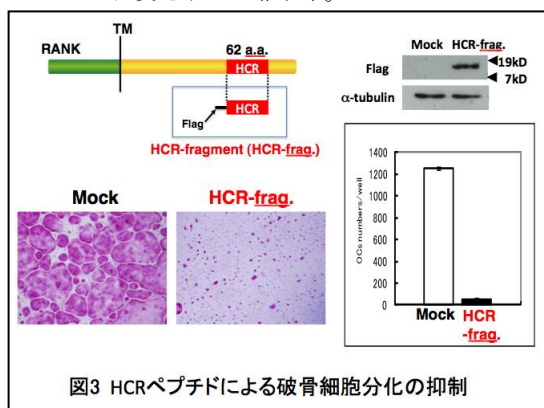


図3 HCRペプチドによる破骨細胞分化の抑制

(5) 破骨前駆細胞を RANKL で刺激し、DNA マイクロアレイ解析によって刺激依存的に発現上昇する遺伝子群として、約 100 種類の遺伝子を同定した。そのうち、HCR 欠損キメラ受容体によって発現誘導をされない遺伝子を解析し、NFATc1、TRAP などを含む HCR 依存的に発現制御を受ける遺伝子群を同定した。

(6) 本研究により、RANK は HCR を介して TRAF6、Gab2、PLC- $\gamma$ 2 を含むシグナル複合体の形成し維持させることにより、長時間の NF- $\kappa$ B 及び ITAM シグナルの活性化を維持させ、破骨細胞分化を誘導することが示された。このことにより、これまで未解明であった HCR の役割が明らかになっただけでなく、シグナル活性化の時間的制御が破骨細胞分化に必要であることを示すことができた。さらに、破骨細胞分化を担う TRAF6 シグナル、ITAM シグナルのクロストーク、及びその分子機構を初めて明らかにした。また、HCR シグナル複

合体形成を阻害することで、破骨細胞形成を人為的に抑制することを示すことができた。したがって、本研究の成果は、破骨細胞分化の分子機構の理解を深めるとともに、骨破壊を伴う種々の骨疾患治療に対する新たな治療標的を見出した。

(7) 本研究で HCR を介した破骨細胞分化シグナルの時間的制御を明らかにしたが、それらのシグナルの空間的な制御機構については未解明である。今後、RANK を含むシグナル複合体の局在及び変化、複合体構成因子の経時的変化を解析することで、RANK シグナルの時空間的制御を明らかにする必要がある。さらに、細胞膜透過性ペプチドを利用した HCR ペプチドを作製し、その投与による破骨細胞形成の阻害について *in vitro*、*in vivo* のレベルで検討することで、本研究の成果を骨疾患治療への実際的応用へ発展させていきたい。

#### 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 1 件)

① Taguchi, Y., Gohda, J., Koga, T., Takayanagi, H., Inoue, J.

A unique domain in RANK is required for Gab2 and PLC $\gamma$ 2 binding to establish Osteoclastogenic signals.  
*Genes. Cells*, 14(11), 1331-1345, 2009

[学会発表] (計 7 件)

① 田口 祐、氣賀 陽子、合田 仁、井上 純一郎

Identification of a novel RANK-derived peptide as a potent inhibitor of osteoclastogenesis.  
第 33 回 日本分子生物学会年会  
2010 年 12 月 8 日  
神戸ポートアイランド

② 田口 祐、合田 仁、井上 純一郎  
破骨細胞形成抑制ペプチドの同定とその作用機構の解明  
第 28 回 日本骨代謝学会学術総会  
2010 年 7 月 21 日  
京王プラザホテル (東京)

③ Yuu Taguchi, Jin Gohda, Yoko Kiga,

Jun-ichiro Inoue

A unique cytoplasmic domain in RANK induces long-term signaling required for osteoclastogenesis  
Keystone Symposia ~NF- $\kappa$ B in Inflammation and Disease~  
2010年1月8日  
Santa Fe, New Mexico, USA

(3) 連携研究者  
なし ( )

研究者番号:

④ 氣駕 陽子、田口 祐、合田 仁、井上 純一郎

Identification of a RANK-derived peptide as a potent inhibitor of osteoclastogenesis.

第32回 日本分子生物学会年会

2009年12月9日

パシフィコ横浜

⑤ 田口 祐、合田 仁、井上 純一郎  
破骨細胞形成に必須な持続的 RANK シグナル伝達機構

第27回 日本骨代謝学会学術総会

2009年7月23日

大阪国際会議場

⑥ 田口 祐、合田 仁、古賀 貴子、高柳 広、井上 純一郎

破骨細胞形成に必須な持続的 RANK シグナルの伝達機構

第31回 日本分子生物学会年会

2008年12月11日

神戸ポートアイランド

⑦ 田口 祐、合田 仁、井上 純一郎  
癌骨転移に関与する破骨細胞の新規分化機構の解明。

第67回 日本癌学会学術総会、

2008年10月28日、

名古屋国際会議場

[その他]

本研究成果に関する発表論文については、東京大学医科学研究所・分子発癌分野のホームページに掲載。

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/BunshiHatsugan/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

合田 仁 (GOHDA JIN)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 90361617

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号: