

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790129
 研究課題名 (和文) 細胞内トラフィック制御に基づいた骨粗鬆症治療の可能性検証
 研究課題名 (英文) Feasibility study of RANKL subcellular trafficking as a novel therapeutic target for osteoporosis
 研究代表者
 本間 雅 (HONMA MASASHI)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：60401072

研究成果の概要(和文)：従来 RANKL に対する分泌型おとり受容体と考えられていた OPG は、ゴルジ体における RANKL 生合成段階で既に相互作用しており、OPG と複合体を形成した RANKL が Vps33a との相互作用を介してリソソームへ選別輸送を受けること、およびリソソームに蓄積された RANKL が RANK 刺激依存的に細胞膜表面へ放出されることなどを見出した。RANKL 放出過程を制御する分子が新たな創薬標的になると期待される。

研究成果の概要(英文)： We have found that OPG, which is previously recognized as a decoy receptor for RANKL, forms a complex with RANKL at the Golgi apparatus and the complex formation is necessary for Vps33a-mediated RANKL sorting to the lysosomes in osteoblastic cells. We have also found that RANKL localized at the lysosomes relocate to the cell surface in response to RANK stimulation. These processes can be novel therapeutic targets for osteoporosis.

交付決定額

(金額単位:円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:薬学・医療系薬学

キーワード:薬理学、生理学、シグナル伝達、発現制御、生体分子

1. 研究開始当初の背景

骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を常に繰り返しており(骨リモデリング)、骨リモデリングのバランスが崩れて骨破壊側に偏ることが骨粗鬆症の原因と考えられている。現在、日本における骨粗鬆症の患者は 1,000 万人を超えていると推定されるが、高齢者人口の増

大に伴って患者数はさらに増加していくと予測され、適切な治療法の確立は臨床上極めて重要であり、社会的にも強く要請されている。

Receptor Activator of NF- κ B (RANK) ligand (RANKL)は、骨芽細胞の表面に発現するリガンド分子であり、生体における骨吸収のレベルを最終的に決定する最も重要な因子である。この

ため、破骨細胞前駆細胞の表面に発現し、RANKLシグナルの受容分子であるRANKの下流シグナル伝達経路は精力的に研究され、関与するシグナル分子群と作動メカニズムが詳細に同定されてきた。一方、RANKシグナルの起点分子であり、シグナルの入力を決定する重要な分子であるにも関わらず、RANKLの細胞内挙動とその制御機構に関しては、これまで十分な研究が行なわれていなかった。

2. 研究の目的

申請者らは上記の背景に基づき、RANKLの骨芽細胞内での分子挙動を解析することが、破骨細胞形成の制御機構の全体像の解明には必須であり、また新たな創薬標的の探索に繋がると考え、骨芽細胞のモデル細胞であるST2細胞を用いた余検討を行った。その結果、RANKL分子の細胞内局在は当初想定されていた細胞表面への局在はほとんど観察されず、むしろ細胞内の小胞状のオルガネラに局在していることが明らかとなった。さらに、各種細胞内オルガネラのマーカーとの共染色を行った結果、RANKLの局在している細胞内小胞はリソソームであることが明らかとなった。そこで、RANKLに相互作用しRANKLの細胞内輸送を制御する分子の存在を想定し、RANKLに相互作用するタンパク質を、ST2細胞を用いたプルダウンアッセイ、及び質量分析によって探索した。その結果、候補としてVacuolar protein sorting 33a (Vps33a)が得られ、GFP-RANKLとHisタグ付加したVps33a (HisHA-Vps33a)の共発現系において、Hisタグ沈降法によりRANKLとVps33aの相互作用が確認された。

本申請研究は、これらの余検討の結果に基づき、Vps33aによるRANKLのリソソームへの選別輸送機構も含むRANKL細胞内トラフィックが、骨粗鬆症治療の新たな治療標的となり得る可能性を考え、より詳細に細胞レベル・個体レベルで、RANKLの細胞内トラフィックの制御機構を解明することを目的として計画・立案された。

3. 研究の方法

① 実験動物・細胞培養

全ての動物実験は、東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会による承認のもと、動物実験計画書に基づき行った。C57/BL6マウスは日本SLCより購入した。OPG遺伝子欠損マウスは御厚意により松本歯科大学総合歯科医学研究所より譲受した。

HeLa細胞およびST2細胞は理研細胞バンクより譲受、293FT細胞はInvitrogenより購入し、定法に従って培養し、実験に用いた。

マウス初代培骨芽細胞は、既報に従って1-3日齢の雄マウスより単離培養し、検討に用いた(Biomaterials 2004 25(5): 757-68)。マウス骨髄細胞は、既報に従って6-8週齢の雄マウスより単離培養し、検討に用いた(Endocrinology 2003

144(11): 4999-5005)。

② 発現ベクターの構築と細胞導入

RANKL, RANK, OPG, Vps11, Vps16, Vps18, Vps33a, Vps39, Vps41 および細胞内オルガネラ・マーカーとしてLAMP-1, calnexin, Golgi-58Kの各遺伝子を、それぞれマウス臓器より調製したcDNAを鋳型としたRT-PCR法によりクローニングし、各種発現ベクターにサブ・クローニングした。また、OPGの各種変異体の構築は、オーバーラップPCR法、あるいはQuickChange® (STRATAGENE)を用いた部位特異的変異導入法を用いて行った。

各種発現ベクターの細胞への導入に関しては、Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)を用い、推奨プロトコールに従った。

③ 組み換えOPGタンパク質の精製

OPGの各種変異体組み換えタンパク質に関しては、C末端に付加したHisタグを利用し、293FT細胞に一過性導入した後の培養メディアウムからアフィニティ・クロマトグラフィによって単離精製し、BCA法にてタンパク質濃度を測定した後、各種検討に用いた。

④ 共焦点顕微鏡による細胞内局在の解析

UPLSAPO 100XO対物レンズ(開口数:1.40, Olympus)を備えた共焦点顕微鏡FV1000 (Olympus)を用い、生細胞及び固定した細胞の観察を行った。

⑤ 細胞膜表面ビオチン化アッセイ

細胞膜表面のタンパク質のみを回収する目的では、EZ-Link sulfo-NHS-SS-biotin (Pierce)を用い、推奨プロトコールに従って細胞表面タンパク質のビオチン標識を行った。その後細胞をNP-40などの界面活性剤を用いて可溶化し、MagnaBind Streptavidin beads (Pierce)とインキュベーションすることでビオチン化されたタンパク質を回収し、その後の検討に用いた。

⑥ 酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)

細胞の培養上清あるいは細胞内のRANKL及びOPGタンパク質発現量を定量する目的では、Quantikine® Immunoassay kits (R&D Systems)を用い、推奨プロトコールに従った。

⑦ 共培養実験

ST2細胞またはマウス初代培骨芽細胞に、必要に応じて予め発現ベクターの導入を行い、その翌日に細胞を剥がし、マウス骨髄細胞と混合して撒き、10 nM VD₃及び100 nM Dexを添加したα-MEM中にて共培養を行った。必要に応じて、各種OPG組み換えタンパク質の添加(100 ng/ml)も行った。その後、培地交換を3日毎に行い、培養開始から7日後に、TRACP assay kit (Takara)を用いて、TRAP酵素活性を測定し、成熟破骨細胞形成の指標として用いた。

⑧ PCRを用いた遺伝子発現量の定量

遺伝子発現量の定量は、SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen)によるリアルタイムPCR反応を、CHROMO4 (BioRad)にて検出し、添付のソフトウェアにて解析することで

行った。各々の遺伝子発現量は、 β -actin をリファレンスに用いて規格化した。

4. 研究成果

① 骨芽細胞において、RANKL は主として分泌型リソソームに局在する

骨芽細胞における RANKL の細胞内局在を明らかにするために、マウス骨髄由来間質細胞で骨芽細胞の形質を維持する ST2 細胞に対し、抗 RANKL 抗体を用い免疫染色を行ったところ、RANKL は主として細胞内小胞に局在し、細胞膜での発現は微弱であることが示唆された。RANKL と同様に TNF superfamily に属する Fas ligand は、細胞障害性 T 細胞においてリソソームに蓄積され、標的細胞との接触に伴い接触面に輸送・分泌される。RANKL の細胞内での局在が、Fas ligand と同様の分泌型リソソームへの蓄積であることを想定し、リソソームマーカーである LAMP-1 に対する抗体を用いて RANKL と共免疫染色したところ、局在の大部分が一致した。また、生細胞において RANKL の局在を高感度に観察するために、GFP を付加した RANKL (GFP-RANKL) を ST2 細胞に導入したところ、GFP-RANKL は大部分がリソソームマーカーにより染色される小胞に局在し、GFP-RANKL が内在性の RANKL と同様の局在を示すことが示唆された(Fig.1)。

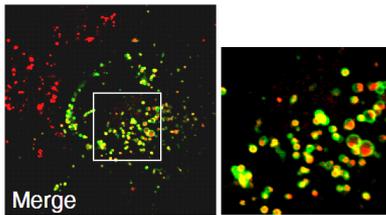


Fig.1 ST2 細胞において GFP-RANKL はリソソームに局在する

次いで、破骨細胞と骨芽細胞が細胞間接触した際の RANKL の細胞内挙動について検討を行った。破骨細胞の簡易モデルとして RANK の細胞外領域組み換えタンパク質を平均 6600 分子/ビーズの割合で表面に固相化したポリスチレンビーズを作成し、GFP-RANKL を発現させた ST2 細胞に添加し、GFP-RANKL の局在を観察した。その結果、ビーズとの接触面への GFP-RANKL の集積と、細胞内の GFP-RANKL 量が低下した(Fig.2)。このことから、骨芽細胞において RANKL は破骨細胞との細胞間接触により、リソソームから細胞膜へ移行する可能性が示唆され、RANKL の局在する細胞内小胞が分泌型リソソームであると考えられた。

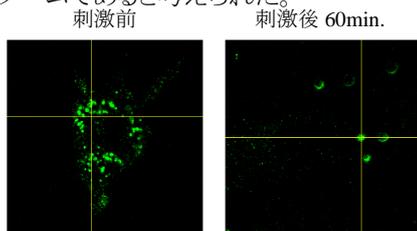


Fig.2 GFP-RANKL は RANK 刺激依存的にリソソームから放出される

② Vps33a は RANKL の分泌型リソソームへの輸送を制御する

siRNA を用いて一過性に Vps33a をノックダウンした ST2 細胞での GFP-RANKL の局在を検討した。その結果、Vps33a のノックダウン細胞の一部では、コントロールで観察される分泌型リソソームへの GFP-RANKL の局在が破綻し、主としてゴルジ体への集積する像が観察された。このことから、Vps33a が RANKL のゴルジ体からリソソームへの輸送に関与することが示唆された。

③ RANKL のリソソームへの選別輸送には OPG の共発現が必須である

非骨芽細胞系モデル細胞として HeLa 細胞を用い、GFP-RANKL を導入することで、RANKL の細胞内局在に対する OPG の関与を検討した。GFP-RANKL を単独で導入した場合には、主として細胞膜上に発現する様子が観察される一方で、C 末に His タグを付加した OPG (OPG-H) 共発現下では、GFP-RANKL は主としてリソソームに局在することが明らかとなり、骨芽細胞系における RANKL 細胞内局在と共通する結果となった。一方、GFP-RANKL 発現条件下で OPG-H 組み換えタンパク質を培養メディウム中に添加した場合には、GFP-RANKL の局在は細胞膜のままであった。これらの結果から、RANKL のリソソームへの選別輸送には OPG の共発現が必須であることが示唆された(Fig.3)。

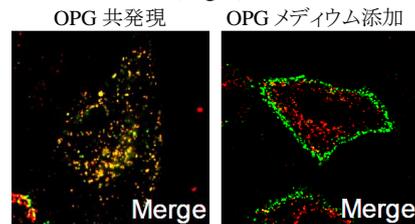


Fig.3 HeLa 細胞における RANKL 局在

④ OPG の各種ドメインは RANKL の細胞内局在を制御する上で重要な役割を担う

OPG は RANKL 結合ドメインであるシステインリッチドメイン(CRD)を前半に持ち、後半には生理的意義が未知のデスドメイン様ドメイン(DDHD)、及びヘパリン結合ドメイン(HBD)を有している。まず、CRD が RANKL の細胞内選別輸送制御に果たす役割を検討したところ、OPG の CRD のみ(OPG-CRD)、或いは OPG の CRD を RANK の CRD に入れ替えた変異体コンストラクト(RANK-CRD-OPG- Δ CRD)では、RANKL の細胞膜局在に変化は観察されなかった。これらの結果は、OPG による RANKL の選別輸送制御機能には、RANKL 結合ドメインとして OPG の CRD が必須であること、及び OPG の後半ドメインも必須であることを示唆している。そこで、OPG の後半に位置する HBD を欠失させた変異体(OPG- Δ HBD)や、HBD の機能発揮に必要と考えられる複数の塩基性アミノ酸残基をアラニンに変異させた変異体(OPG-KR-A)を共発現させたところ、GFP-RANKL は細胞膜やリソソーム上にはほとんど観察されず、主としてゴルジ体、及び

一部が小胞体(ER)に集積する様子が観察された。これらの結果は、OPG による RANKL 選別輸送制御機能には、OPG の HBD が重要な役割を果たしていることを示唆している。また、他の変異体の解析も含め、RANKL と OPG は ER 或いはゴルジ体での成熟段階で既に相互作用していることが示唆された。

⑤ OPG 遺伝子欠損マウス由来の骨芽細胞では RANKL は主としてゴルジ体へ集積する結果、RANKL の細胞膜表面量が増大する

HeLa 細胞を用いた検討によって示唆された、OPG による RANKL の細胞内選別輸送制御に関して、骨芽細胞における機能を確認するために、マウス由来の初代培養骨芽細胞(POB)を用いて検討した。OPG^{+/+}の POB では内在性 RANKL は主としてリソソームに局在する一方で、OPG^{-/-}の POB では主にゴルジ体へ集積する様子が観察された。さらに、RANKL の細胞膜上での発現量を細胞膜表面バイオチン化アッセイにより定量したところ、OPG^{-/-}の POB では OPG^{+/+}の POB に比べて、顕著に増大していることが明らかとなった。これらの結果から、OPG 遺伝子欠損により RANKL がゴルジ体へ集積した結果、通常では minor と考えられるゴルジ体から直接細胞膜へ輸送される経路を介して、細胞膜へ移行する RANKL 量が増大したと考えられた。RANKL の細胞膜表面量の増大は破骨細胞の過剰な活性化に繋がると考えられ、本研究で見出された現象が、OPG 遺伝子欠損マウスの示す骨粗鬆症様形態の一因となっていることが示唆される。

⑥ OPG の RANKL 細胞内選別輸送制御機能は、デコイ受容体としての機能に匹敵する重要性を有する

これまで、OPG は細胞外に分泌されて RANKL に対するデコイ受容体として機能すると認識されてきたため、本研究で見出された OPG の新たな機能である、RANKL に対する選別輸送制御機能を評価する目的で、この機能のみを選択的に抑制する方法を考案した。

HeLa 細胞を用いた一連の検討結果から、RANK-CRD-OPG-ΔCRD タンパク質を骨芽細胞に過剰発現させた場合、ゴルジ体において内在性 OPG と RANKL の相互作用に拮抗すると考えられた。骨芽細胞系モデル細胞である ST2 細胞を用い、破骨前駆細胞との共培養系において、この組み換えタンパク質を培地中に添加すると、顕著な破骨細胞分化の抑制を示したことから、RANK-CRD-OPG-ΔCRD は OPG と同様にデコイ受容体としての機能を保持していることが示された(Fig.4)。

一方で、ST2 細胞に RANK-CRD-OPG-ΔCRD を過剰発現させた後に共培養実験を行ったところ、系内のデコイ受容体総分子数は増加しているにもかかわらず、破骨細胞形成を有意に促進させることが明らかとなった(Fig.4)。これらの結果から、OPG の RANKL 細胞内選別輸送制御機

能は、RANKL に対するデコイ受容体としての機能と同程度、或いはそれ以上に破骨細胞の活性化抑制に寄与していると考えられた。

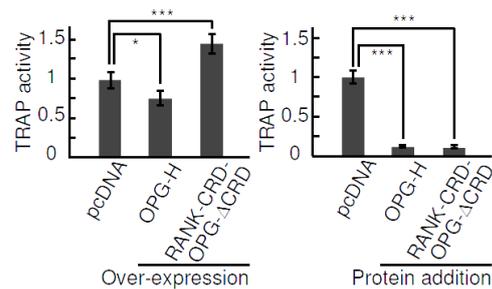


Fig.4 OPG の RANKL 選別輸送制御機能は、デコイ受容体としての機能より大きく、破骨細胞抑制活性に寄与している

⑦ 結論

骨芽細胞において、通常 RANKL の大部分は細胞内の分泌型リソソームに蓄積されており、細胞膜表面には僅かに発現しているのみであること、およびこの細胞膜表面に局在する少量の RANKL は、破骨前駆細胞内にシグナルを入力するリガンド分子としてだけでなく、RANK との相互作用に伴って骨芽細胞内にリバース・シグナルを伝達するシグナル受容分子としても機能し、このリバース・シグナルによって、分泌型リソソームからの RANKL 放出がトリガーされること、などを見出すことができた(Kariya *et al.* JBMR 2009 / 論文業績②)。

またさらに、骨芽細胞に発現する RANKL のデコイ受容体 OPG は従来、細胞外に分泌された後に細胞膜表面の RANKL と結合することでシグナル伝達を阻害していると考えられてきたが、実は大部分の RANKL はゴルジ体でのタンパク質合成段階で既に OPG と相互作用しており、OPG と複合体を形成した RANKL が Class C Vps complex との相互作用を介して分泌型リソソームへの選別輸送を受けていること、およびこの OPG による RANKL 選別輸送の調節機能は、デコイ受容体としての機能より大きく破骨細胞活性化抑制に寄与していること、なども明らかにしている(Aoki *et al.* JBMR in press / 論文業績①)。

これらの結果は、RANKL の細胞内局在の制御が生体における骨代謝調節に極めて重要な役割を果たしていることを示唆しており、従来の RANKL シグナル伝達制御に関する常識を覆す画期的な研究になったと考えている。

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 2 件、全て査読有)

- ① Shigeki Aoki, Masashi Honma*, Yoshiaki Kariya, Yuko Nakamichi, Tadashi Ninomiya, Naoyuki Takahashi, Nobuyuki Udagawa and Hiroshi Suzuki (*corresponding) Function of

OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. Journal of Bone and Mineral Research 2010 in press

② Yoshiaki Kariya, **Masashi Honma***, Shigeki Aoki, Atsushi Chiba and Hiroshi Suzuki (*corresponding) Vps33a Mediates RANKL Storage in Secretory Lysosomes in Osteoblastic Cells. Journal of Bone and Mineral Research Vol.24 Issue 10, 2009, pp.1741-52

[学会発表] (計 7 件、全て査読有)

① 青木重樹、**本間雅**、苅谷嘉顕、鈴木洋史 OPG の生理作用発現における、RANKL 細胞内挙動制御の重要性 日本薬学会第 130 年会 岡山 2010 年 3 月

② 青木重樹、**本間雅**、苅谷嘉顕、鈴木洋史 Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis 第 32 回日本分子生物学会 年会 横浜 2009 年 12 月

③ **Masashi Honma**, Shigeki Aoki, Yoshiaki Kariya, and Hiroshi Suzuki OPG functions as a traffic regulator for RANKL. 第 31 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 大阪 2009 年 11 月

④ 青木重樹、**本間雅**、苅谷嘉顕、鈴木洋史 OPG は RANKL の骨芽細胞内選別輸送を担う 第 82 回日本生化学会大会 神戸 2009 年 10 月

⑤ **Masashi Honma**, Yoshiaki Kariya, Hiroshi Suzuki RANKL storage in secretory lysosomes in osteoblastic cells – the involvement of Vps33a 2nd Joint Meeting of the International Bone & Mineral Society and the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society Sydney 2009 年 3 月

⑥ Yoshiaki Kariya, **Masashi Honma**, Hiroshi Suzuki RANKL secretion from secretory lysosomes in osteoblastic cells – the involvement of small GTPase Rab27a/b 2nd Joint Meeting of the International Bone & Mineral Society and the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society Sydney 2009 年 3 月

⑦ **本間雅**、苅谷嘉顕、青木重樹、鈴木洋史 骨芽細胞における RANKL 細胞内動態を制御する因子の解析 第 30 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 札幌 2008 年 8 月

6. 研究組織

(1)研究代表者

本間 雅(HONMA MASASHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号:60401072

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者
該当なし