

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20791038  
 研究課題名 (和文) L-セリンによる RANK シグナリングの制御と骨代謝における役割  
 研究課題名 (英文) L-serine regulation of RANK signaling machinery and its role in bone metabolism  
 研究代表者  
 小川 拓哉 (OGAWA TAKUYA)  
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教  
 研究者番号：30457147

研究成果の概要 (和文)：破骨細胞は骨量維持の主役であり、その RANKL 刺激による *in vitro* での分化誘導には培地中のセリンが必須である。破骨細胞分化におけるセリンの作用機構とこの現象の生理的意義の理解を目的に解析を進めた結果、前駆細胞ではセリンと他のアミノ酸の取込みが連動しており、セリンの欠乏が広範なアミノ酸の細胞内濃度の低下を招くこと、同時に RANKL 受容体 RANK の顕著な減少が分化抑制に寄与することを見出した。

研究成果の概要 (英文)：Osteoclasts play central roles in the development and remodeling of bone. In addition to the stimulation by RANKL, serine in the culture medium is necessary for the *in vitro* differentiation of osteoclasts from their precursors. We conducted a series of experiments to understand the regulatory mechanism of osteoclast differentiation by serine as well as its physiological significance, and found the association between serine transport and cellular uptake of other amino acids and serine deprivation suppresses the differentiation through the reduction of other several intracellular amino acids and the downregulation of RANKL receptor, RANK.

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：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：アミノ酸、セリン、細胞・組織、発生・分化、発現制御、シグナル伝達、骨・軟骨代謝学、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨代謝は、破骨細胞による古い骨基質の吸収

反応と骨芽細胞による新しい骨基質の形成

反応の相互応答的な機構 (骨リモデリング)

により制御され、健常時は一定の回転速度に維持されている。骨粗鬆症などの主要な骨関連疾患は破骨細胞の形成・活性の異常亢進が主たる要因であることから、破骨細胞の形成や骨吸収活性の制御機構に関する研究が盛んに行われている。破骨細胞分化機構の研究は、分化因子 RANKL や分化の鍵となる転写因子 NFATc1/NFAT2 の同定を契機として、RANKL 受容体である RANK 下流のシグナル伝達経路、NFAT2 活性化機構や標的遺伝子などについて多くの知見が集められ、飛躍的に理解が進んだ。研究代表者は *in vitro* における前駆破骨細胞の分化には培地中のセリンが重要であることを見出したが、その詳細な作用機構や生理的意義については未解明であった。

## 2. 研究の目的

(1) 破骨細胞分化制御におけるセリンの作用機構を分子レベルで明らかにする。

(2) 骨髄移植実験等により、セリン供給を介した破骨細胞分化制御の生理的な役割について解析する。

## 3. 研究の方法

(1) *in vitro* 分化誘導系における RANK・TRAF6 の発現、活性化状態に対するセリンの有無による比較・検討。

(2) スフィンゴシン 1 リン酸などのセリン代謝産物の添加や代謝酵素の阻害による、RANK シグナル伝達経路と破骨細胞分化への関与の検討。

(3) 前駆破骨細胞におけるセリン合成系酵素の発現の解析、セリンの輸送に関わる中性アミノ酸トランスポーターの同定、セリン合成系酵素の過剰発現による分化や細胞内アミノ酸濃度への影響の解析。

(4) 骨芽細胞との共培養系での破骨細胞分化誘導時のセリンの有無による比較。

## 4. 研究成果

(1) セリンと RANKL-RANK シグナリングとのクロストーク

セリン除去後の RANK 発現レベルの経時的変化について調べ、セリン非存在下における RANK の速やかな発現低下を見出した。RANK の発現抑制機構に関してさらに詳細な解析を行うため、RANK 遺伝子上流 6kbp のゲノム領域ならびに非翻訳領域を取得し、レポーターコンストラクトを構築した。このうち、過去にプロモーター活性が見出されていた RANK 転写開始点上流 1kbp の領域 (Ishii *et al.*, *J Cell Biochem.* 105:896-904. (2008)) から成るレポーターコンストラクトは、マウスマクロファージ細胞株である RAW264 においては既報通りに活性を示したものの、初代細胞においてはプロモーター活性が観測されなかった。そこで RANK の pre-mRNA 量を定量的 RT-PCR によって調べたところ、転写量はセリンの有無により大きな差を示さなかった。RANK mRNA の安定性についてもアクチノマイシン D 処理後の減少速度を定量的 RT-PCR により調べたが、セリンの有無に関わらず、RANK mRNA は比較的安定であることが示された。一方、RANK の翻訳量について Ser 非存在下での変化を調べた結果、発現量の変化は mRNA レベルよりもタンパク質レベルでの低下が先行しており、また同時に総タンパク質の合成量についても低下が見られた。RANK タンパク質の安定性について調べた結果、RANK タンパク質は極めて不安定なタンパク質であることが判明したが、その分解速度にはセリンの有無による影響は見られなかった。よってセリン非存在下での RANK の減少は、主に翻訳量の低下と RANK タンパク質の不安定性によるものであり、結果的にセリンは RANK の転写後調節に重要であることが

示唆された。

## (2) セリン代謝産物の RANK シグナリングへの関与

セリンはスフィンゴ脂質をはじめとする様々な生理活性物質へと代謝されるが、その一種であるスフィンゴシン 1 リン酸の産生に関わる SphK2 に関し、RAW264 細胞からの破骨細胞分化系において、分化に伴う発現誘導を見出した。miRNA を用いた SphK2 発現抑制により、SphK2 発現抑制細胞では分化に必須な c-Fos が減少し、分化効率が低下することを見出した。これまで破骨細胞分化における SphK の役割に関し、SphK1 に関しては既に詳細な解析がなされているが (Ryu J *et al.*, *EMBO J.* 25:5840-51. (2006)), SphK2 に関しては解析が行われていない。近年、他の細胞系において SphK2 がスフィンゴシン 1 リン酸の産生によりヒストン脱アセチル化酵素 HDAC を抑制することで、c-Fos などの転写におけるエピジェネティックな制御の関わっていることが報告されており (Hait NC *et al.*, *Science.* 325:1254-7. (2009)), 破骨細胞分化における c-Fos の誘導においても、同様の機構が作用している可能性が考えられる。

## (3) 前駆破骨細胞・骨芽細胞におけるセリン合成系・輸送系の評価

セリン飢餓による破骨細胞分化抑制の原因を明らかにする目的で、セリン合成に関わる三種類の酵素 (PHGDH, PSAT-1, PSPH) の前駆破骨細胞における発現について RT-PCR により調べたところ、いずれの酵素に関しても発現が確認された。また、三酵素の強制発現によっても、セリン非依存性分化能の獲得は見られず、破骨細胞分化のセリン要求性は、セリン合成系の欠損によるものではないことが示唆された。細胞内アミノ酸濃度を測定したところ、細胞内セリンは培地からのセリン除去後 8 時間以内に枯渇し、同時にいくつ

かの他のアミノ酸にも減少が見られたことから、セリンの輸送と他のアミノ酸の輸送・代謝との連動が示唆された。近年、セリンと同じく非必須アミノ酸に分類されるグルタミンについて、その取り込み・排出が他の必須アミノ酸の細胞内への取り込みにおける律速段階として作用しており、栄養センサータンパク質 mTOR による翻訳調節に重要であるという報告がなされていることから (Nicklin P *et al.*, *Cell.* 136:521-34. (2009)), セリンも同様の機構により細胞種特異的な翻訳調節に関与していることが考えられ、取り込みや排出に寄与する輸送経路の同定や、その阻害による分化への影響等、さらなる解析が必要である。

## (4) 前駆破骨細胞の *in vivo* 微小環境におけるセリン供給を介した分化制御機構の存在の証明

破骨細胞分化における Ser の役割に関する *in vivo* での検討に関しては、セリン合成系酵素過剰発現細胞がセリン非依存性分化能を示さなかったため、当初予定していたこれらの細胞の移植実験へと進めることが出来なかった。しかし、骨芽細胞との共存培養実験を行ったところ、セリン非存在下においても破骨細胞の誘導が見られ、骨芽細胞側より前駆破骨細胞に対してセリン非存在下での分化を促進する何らかのシグナルが与えられている可能性が考えられた。最近、骨転移した乳癌細胞が、セリンの合成と前駆破骨細胞への供給を介し、転移巣での骨破壊を促進しているという報告もなされていることから

(Pollari S *et al.*, *Breast Cancer Res Treat.* in press.), 生理的・病的条件下でのセリン供給を介した破骨細胞分化制御についてのさらなる理解が望まれる。よって現在、骨芽細胞や前駆破骨細胞において細胞特異的にセリン合成系を破壊したコンディショナ

ルノックアウトマウスの作製を進めている。今後これらのマウスの骨組織形態計測等を行い、生理的条件下での *in vivo* 微小環境において、骨芽細胞よりセリン供給を介した破骨細胞分化制御が行われているのか否か明らかにしたい。

#### 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3件)

①Nakamura T, 他4名, Ogawa T (6番目), Takeya T, Ishida-Kitagawa N. Potential involvement of Twist2 and Erk in the regulation of osteoblastogenesis by HB-EGF-EGFR signaling. *Cell Struct Funct.* in press. 査読有

②Bahtiar A, 他5名, Ogawa T (7番目), Takeya T. Identification of a novel L-serine analog that suppresses osteoclastogenesis *in vitro* and bone turnover *in vivo*. *J Biol Chem.* 284:34157-34166. (2009), 査読有

③小川 拓哉 (1番目), 他7名, 細胞外L-セリンは破骨細胞分化におけるRANKL-RANKシグナル伝達系活性化に必須である. *アミノ酸研究*. 3:63-65. (2009), 査読無

[学会発表] (計9件)

①Bahtiar A (代:小川拓哉), Identification of a novel inhibitor for osteoclastogenesis *in vitro* and bone turnover *in vivo*. 第32回日本分子生物学会年会, 2009/12/11, パシフィコ横浜

②西田織衣, マウス前駆破骨細胞の細胞内アミノ酸レベルに対する細胞外L-セリンの作用. 第32回日本分子生物学会年会, 2009/12/10, パシフィコ横浜

③的場祐衣, 前駆破骨細胞のRANK発現制御におけるL-セリンの役割. 第32回日本分子生物学会年会, 2009/12/10, パシフィコ横浜

④小川拓哉, 細胞外L-セリンは破骨細胞分化におけるRANKL-RANKシグナル伝達系活性化に必須である. 日本アミノ酸学会第3回学術大会, 2009/9/30, 京都府立大学

⑤Ogawa T, Lactoperoxidase, a Major Component of Milk Basic Protein, attenuates *in vitro* Osteoclast Differentiation. 31st Annual Meeting of The American Society for Bone and Mineral Research, 2009/9/13, Colorado Convention Center

⑥Bahtiar A, Identification of a Novel L-Serine Analog that Suppresses Osteoclastogenesis *in vitro* and Bone Turnover *in vivo*. 第27回日本骨代謝学会学術集会, 2009/7/25, 大阪国際会議場

⑦ Bahtiar A, L-Serine modulates RANKL/RANK signaling cascade and plays an essential role in osteoclastogenesis *in vitro*. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008/12/10, 神戸国際展示場

⑧Ogawa T, L-セリンによるRANKL-RANKシグナル伝達系活性化機構の解析. 第26回日本骨代謝学会学術集会, 2008/10/29, 大阪国際会議場

⑨Ogawa T, A novel role of L-serine for the activation of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)-RANK signaling machinery in osteoclastogenesis *in Vitro*. 30th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2008/9/13, Palais des congrès de Montréal

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 拓哉 (OGAWA TAKUYA)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・助教

研究者番号：30457147

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：