

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791358

研究課題名 (和文) 破骨細胞による歯槽骨吸収における p130 Cas の役割

研究課題名 (英文) The role of p130 Cas in osteoclastic bone resorption

研究代表者

福島 秀文 (FUKUSHIMA HIDEFUMI)

九州歯科大学 歯学部 助教

研究者番号：70412624

研究成果の概要(和文):歯周病などの骨吸収疾患で骨を吸収する破骨細胞は重要な役割を示す。この破骨細胞の骨吸収の分子メカニズムを明らかにするために、破骨細胞の骨吸収制御分子 c-Src の下流ではたらくことが予想される p130Cas (Cas) による骨吸収調節機構を分子レベルで解明を行った。

研究成果の概要(英文): Integrin-mediated interaction with the extracellular matrix plays a critical role in the function of osteoclasts, the bone-resorbing cells. This study examines the role of p130<sup>Cas</sup> (Crk-associated substrate (Cas)) in actin organization in osteoclasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：歯学、機能系基礎歯科学

キーワード：骨、破骨細胞、骨吸収

## 1. 研究開始当初の背景

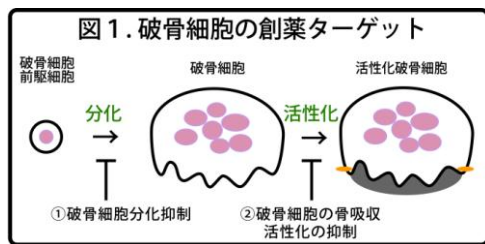
歯と、それを支える歯槽骨・顎骨は、口腔機能を維持する上で重要である。歯周病によって歯槽骨が吸収され、歯を喪失すると口腔機能は著しく低下する。歯周病は破骨細胞による骨吸収の亢進が原因の1つであることから、歯周病治療や歯槽骨の再生治療を成功させる

上で破骨細胞をターゲットにして骨吸収を自由に制御することが重要なポイントである。

## (1) 破骨細胞の制御ターゲット

破骨細胞による骨吸収を抑制するためには、2つの方法が考えられる。1つは破骨細胞の分化を抑制し破骨細胞の数を減らすことであり(図1①)、もう1つは、破骨細胞の骨吸収

そのものを抑制することである(図1②)。しかし、骨のリモデリングサイクルが約3ヶ月である(Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism 6th Edition)ことを考慮すると、破骨細胞の分化を制御するよりも、破骨細胞の骨吸収そのものを制御する方が即効性を期待でき、より効果的であると思われる。



### (2) 破骨細胞の骨吸収制御分子c-Src

破骨細胞の分化過程はRANKL やM-CSF などの分子によって制御されるが、骨を吸収する過程を制御する分子は未だ不明な点が多い。現在まで明らかになっている大理石骨病を呈する遺伝子欠損マウスの殆どが、破骨細胞の分化障害により破骨細胞が存在しないことが原因であるのに対して、c-Src 遺伝子欠損マウスは破骨細胞が存在するものの、全く骨を吸収できないため大理石病を呈する (Soriano P et al. Cell 199164:693-702)。このことは、破骨細胞が骨吸収を行う際にc-Src 分子が重要な役割を担っていることを意味する。しかしながら、c-Src がどのようなシグナル伝達経路を介して破骨細胞による骨吸収を制御しているのか不明な点が多い (Nakamura I and Jimi E. Recent Res. Devel. Immunology. 2004;6:79-94)。

### (3) 破骨細胞分化に伴って発現量の変化する遺伝子群のデータベース

私は破骨細胞分化に伴って発現量の変化する遺伝子群をDNA チップマイクロアレイを用いて網羅的に解析した(平成17-18 年度若手研究B:「乳歯歯根膜における生理的歯根吸収調

節因子の同定」18791580)。このデータベースを利用してc-Src のシグナル伝達に関わる分子の検索を行ったところ、c-Src の下流で働くと考えられるp130Cas、c-Cbl、Syk、Pyk2 の中で、p130Cas のみ発現の上昇が見られた(表1)ことから、p130Cas が破骨細胞に特異的な機能を持っている可能性を考えた。

	分化前	分化後	分化後/分化前
c-Src	1.4	18.5	13.2
Cas	6.4	12.6	2.0
c-cbl	146.4	159.8	1.1
Syk	18.9	19.0	1.0
Pyk2	34.4	19.9	0.6

表1. 破骨細胞分化過程における

c-Src シグナル関連遺伝子の発現変化

## 2. 研究の目的

破骨細胞骨吸収制御分子c-Srcの下流ではたらくことが予想されるp130Casによる骨吸収調節機構を分子レベルで解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

p130Cas遺伝子のクローニングを行い、さらにマウスp130Cas の野生型およびドミナントネガティブ型p130Cas の変異体を作製し、これら変異体をレトロウィルスベクターに組み込み発現ベクターを構築した。また、破骨細胞分化後の活性化時のp130Casの役割を明らかにするために、テトラサイクリン誘導性p130Cas shRNA発現ベクターを作製した。の野生型およびドミナントネガティブ型p130Cas 発現ベクター、およびp130CasshRNA発現ベクターをマクロファージ細胞株RAW264.7 細胞およびマウス骨髄細胞に遺伝子導入した後に、RANKLによって破骨細胞を誘導し、骨吸収のマーカーであるアクチンリングを形成する破骨

細胞数を計測した。また、p130Casの発現の変化を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 主な研究成果

##### ①p130Casは破骨細胞分化に伴いその発現は上昇する。

これまでの先行研究の結果から、破骨細胞分化の際、p130Cas mRNAが破骨細胞分化に伴い上昇することから、まず初めにウェスタンブロッティング法を用いてp130Cas分子のタンパクレベルでの発現を検討した。その結果、破骨細胞分化に伴い、骨吸収制御分子c-Srcや分化のマスターレギュレーターであるNFATc1の発現と同様にp130Casの発現上昇が見られた(図1)。

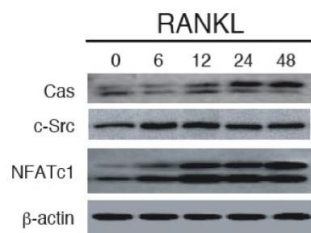


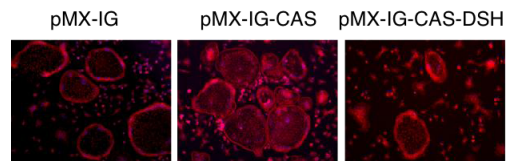
図1. 破骨細胞分化におけるCasの発現

##### ②p130CasのSH3ドメインは破骨細胞分化およびアクチンリング形成に重要である。

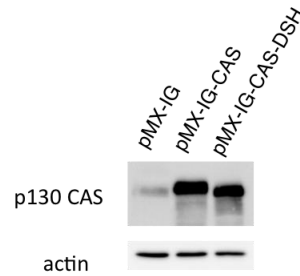
これまでの結果から、p130Casが破骨細胞分化と骨吸収の指標となるアクチンリング形成に関与することが考えられた。そこで、野生型p130Casと、p130Casの活性化に重要と言われるSrcホモロジードメイン3(SH3ドメイン)を欠失したドミナントネガティブ型p130Casをレトロウイルスベクターを用いて破骨細胞前駆細胞に過剰発現させた(図2A, B)。その結果、野生型では破骨細胞分化およびアクチンリング形成に著明な変化は見られなかったが、ドミナントネガティブ型p130Casでは破骨細胞分化、アクチンリング形成どちらも強力に抑制された。以

上のことから、p130Casは破骨細胞分化および、アクチンリング形成ともに関与することが考えられた(図2C, D)。

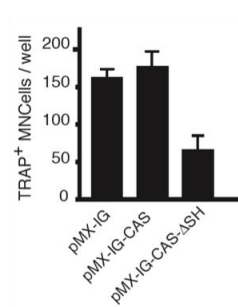
##### A



##### B



##### C



##### D

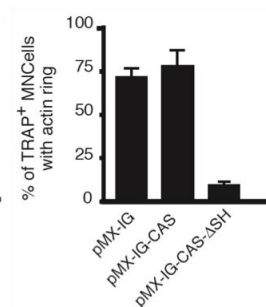


図2. ドミナントネガティブCASによる破骨細胞分化およびアクチンリング形成に対する効果

##### ③成熟破骨細胞のアクチンリング形成にp130Casは重要である。

②の結果から、p130Casは破骨細胞分化およびアクチンリング形成に重要であることが示唆されたが、ドミナントネガティブ型p130Casによるアクチンリングの形成の抑制は破骨細胞分化抑制による相対的な抑制効果であることも考えられる。そこでテトラサイクリン誘導性にp130Casを特異的にノックダウンする2種類のshRNAを発現するRAW267.7細胞株を樹立し、破骨細胞分化後のアクチンリング形成に対する効果を検討した(図3A, B)。

RANKL を投与することで分化した破骨細胞にテトラサイクリンを投与し shRNA を発現させると破骨細胞数に変化は見られないものの、アクチンリング形成が抑制された (図 3C, D)。以上の結果から、p130Cas は成熟破骨細胞のアクチンリング形成に重要な分子であることが示唆された。

以上①～③の結果から、p130Cas は破骨細胞分化のみならず、骨吸収機能の発現においても重要な分子であることが示唆された。

## (2) 成果の位置づけとインパクト

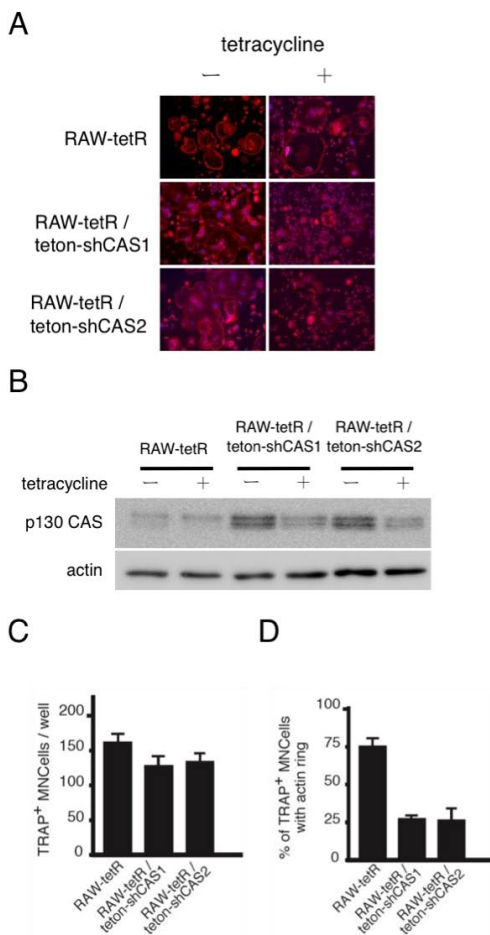


図3. CASのノックダウンによる破骨細胞分化およびアクチンリング形成に対する効果

本研究の結果から、破骨細胞の分化および骨吸収能の発現における p130Cas の役割を明らかにすることが出来た。これまで、アクチンリング形成における p130Cas の重要性を示唆する論文はあったものの、直接的な分子証明はなく、そのインパクトは十分に大きいも

のと思われる。また、今回行った破骨細胞の分化モデルに対する網羅的遺伝子解析から、破骨細胞の活性化に重要であると言われている NF- $\kappa$ B シグナルや、破骨細胞の骨吸収の際に機能する CLC7 分子に関する研究を行うことが出来、それらについても論文として報告した。

## (3) 今後の展望

今後の展望として、p130Cas ノックアウトは胎生致死であるため in vivo における破骨細胞分化の研究が困難であったが、共同研究者である広島大学本田先生から、p130Cas-loxp マウスを導入し、これを破骨細胞特異的に Cre recombinase 遺伝子を発現するマウスと交配し in Vivo における p130Cas の役割を明らかにしていきたいと考えている。また、これまで明らかになっていない破骨細胞活性化における p130Cas および c-Src 間の制御機構を、c-Src ノックアウトマウスを用いてレスキュー実験などを行う予定である。

これらの研究をもとに、これまでの研究をふまえて今後論文として発表していきたいと考えている。

## 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 7 件)

① Maruyama T, Fukushima H, Nakao K, Shin M, Yasuda H, Weih F, Doi T, Aoki K, Alles N, Ohya K, Hosokawa R, Jimi E. Processing of the NF- $\kappa$ B Precursor, p100, to p52 is Critical for RANKL-Induced Osteoclast Differentiation. J Bone Miner Res. 査読有 in press

② Jimi E, Hirata S, Shin M, Yamazaki M, Fukushima H. Molecular mechanisms of BMP-induced bone formation: Cross-talk between BMP and NF- $\kappa$ B signaling pathways in osteoblastogenesis, Japanese Dent Sci Rev. 査読有 2010 46:33-42.

③ Yamazaki M, Fukushima H, Shin M, Katagiri T, Doi T, Takahashi T, Jimi E. Tumor necrosis factor alpha represses bone morphogenetic protein (BMP) signaling by interfering with the DNA binding of Smads through the activation of NF- $\kappa$ B. J Biol Chem. 査読有 2009 284:35987-95.

④ Tada T, Shin M, Fukushima H, Okabe K, Ozeki S, Okamoto M, Jimi E. Oral squamous

cell carcinoma cells modulate osteoclast function by RANKL-dependent and -independent mechanisms. Cancer Lett. 査読有 2009 274:126-31.

⑤ Nakao A, Kajiya H, Fukushima H, Fukushima A, Anan H, Ozeki S, Okabe K. PTHrP induces Notch signaling in periodontal ligament cells. J Dent Res. 査読有 2009 88:551-6.

⑥ Kajiya H, Okamoto F, Ohgi K, Nakao A, Fukushima H, Okabe K. Characteristics of ClC7 Cl<sup>-</sup> channels and their inhibition in mutant (G215R) associated with autosomal dominant osteopetrosis type II in native osteoclasts and hClcn7 gene-expressing cells. Pflugers Arch. 査読有 2009 458:1049-59.

⑦ Fukushima H, Nakao A, Okamoto F, Shin M, Kajiya H, Sakano S, Bigas A, Jimi E, Okabe K. The association of Notch2 and NF- $\kappa$ B accelerates RANKL-induced osteoclastogenesis. Mol Cell Biol. 査読有 2008 28:6402-12.

[学会発表] (計 12 件)

① 福島秀文, Notch2 は NF- $\kappa$ B シグナルと協調し RANKL による破骨細胞の分化を制御する, 第 51 回歯科基礎医学会, 2009 年 9 月 11 日, 新潟

② 白土州, 福島秀文, 片桐岳信, 細川隆司, 自見英治郎, BMP 刺激依存的に Smad1 と結合するタンパク質の同定, 第 51 回歯科基礎医学会, 2009 年 9 月 10 日, 新潟

~~福島秀文, 進正史, 丸山俊正, 青木和広, 大谷啓一, 細川隆司, 自見英治郎, NF- $\kappa$ B 非古典的経路における破骨細胞分化調節機構, 第 51 回歯科基礎医学会, 2009 年 9 月 10 日, 新潟~~

③ 平田志津, 福島秀文, 進正史, 片桐岳信, 北村知昭, 寺下正道, 自見英治郎, NF- $\kappa$ B による BMP シグナルの抑制機構の解明, 第 51 回歯科基礎医学会, 2009 年 9 月 10 日, 新潟

④ 山崎雅人, 福島秀文, 進正史, 片桐岳信, 高橋哲, 自見英治郎, 転写因子 NF- $\kappa$ B は BMP シグナルを抑制する, 第 51 回歯科基礎医学会, 2009 年 9 月 10 日, 新潟

⑤ 福島秀文, 進正史, 丸山俊正, 青木和広, 大谷啓一, 細川隆司, 自見英治郎, NF- $\kappa$ B 非古典的経路における破骨細胞分化調節機構,

第 51 回歯科基礎医学会, 2009 年 9 月 10 日, 新潟

⑥ 平田志津, 福島秀文, 諸富孝彦, 北村知昭, 自見英治郎, 寺下正道, 転写因子 NF- $\kappa$ B は BMP による骨芽細胞分化を抑制する, 第 7 回日本再生歯科医学会, 2009 年 9 月 12 日, 福岡

⑦ 丸山俊正, 福島秀文, 進正史, 保田尚孝, 青木和宏, 細川隆司, 自見英治郎, NF- $\kappa$ B の p100 から p52 へのプロセッシングは破骨細胞分化を調節する, 第 27 回日本骨代謝学会学術大会, 2009 年 7 月 24 日, 大阪

⑧ 青木和広, 福島秀文, Alles N, 永野健一, 自見英治郎, 大谷啓一, 転写因子 p50 欠損マウスを用いたトレッドミル走行負荷による骨量増加作用, 第 26 回日本骨代謝学会学術大会, 2008 年 10 月 30 日, 大阪

⑨ 橋口大輔, 福島桂子, 牧憲司, 中尾加代子, 福島秀文, 自見英治郎, Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は破骨細胞の分化を抑制する, 第 46 回日本小児歯科学会大会, 2008 年 6 月 17 日, 埼玉

⑩ 山崎雅人, 福島秀文, 片桐岳信, 高橋哲, 自見英治郎, 転写因子 NF- $\kappa$ B は骨誘導因子 BMP シグナルを抑制する, 第 50 回歯科基礎医学会, 2008 年 9 月 24 日, 東京

⑪ 福島秀文, 中尾加代子, 自見英治郎, NIK 欠損 mutant による骨代謝調節機構, 第 50 回歯科基礎医学会, 2008 年 9 月 24 日, 東京

⑫ 進正史, 福島秀文, 門脇知子, 自見英治郎, BMP2 による口腔扁平上皮癌細胞の形態変化とその機能解析, 第 50 回歯科基礎医学会, 2008 年 9 月 25 日, 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福島 秀文 (Hidefumi Fukushima)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 70412624

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

自見 英治郎 (Eijiro Jimi)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 40276598

