

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390424

研究課題名（和文）TACE の骨代謝・造血系における機能解析

研究課題名（英文）Analysis of the functions of TACE in bone metabolism and hematopoiesis

研究代表者

堀内 圭輔（HORIUCHI KEISUKE）

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：30327564

研究成果の概要（和文）：本研究では膜型のタンパク質分解酵素である TACE の機能を多岐にわたって解析し、TACE を不活化することにより、骨形成や造血に異常をきたすこと、また TACE が破骨細胞前駆細胞に発現する受容体を切断することにより破骨細胞分化に間接的に関わっていることを明らかにした。また、TACE の類縁遺伝子である ADAM10 の遺伝子改変マウスも作成し、ADAM10 が生体において顆粒球の産生を負に制御する因子であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In the present study we analyzed the functions of a membrane-bound metalloprotease, TACE, and found that it has a critical roles in the regulation of bone metabolism as well as hematopoiesis. In addition, we also generated *Adam10* mutant mice and revealed that ADAM10 negatively regulates granulopoiesis *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	10,000,000	3,000,000	13,000,000

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：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

受容体・リガンドを含めた様々な膜型蛋白質は細胞膜上において蛋白質分解作用を受け、その細胞外領域が可溶性蛋白質として放出される。この蛋白質分解作用は ectodomain shedding（以下 shedding）と呼ばれ、蛋白質転写後の活性調節に重要な機能を果たすことが知られている（図1）。種々の疾患の分子標的としても注目される上皮性増殖因子レセプター（EGFR）リガンド（肺癌、乳癌などと関連）および TNF（関節リウマチ、クローン病などと関連）はともに膜型の前駆体蛋白質として産生され、その後 TACE

（TNF converting enzyme / A Disintegrin And Metalloprotease 17）による shedding を受けることによってその活性が調節されることが徐々に解明されつつある。TACE はもともと TNF 前駆体を可溶化する酵素として同定された遺伝子であるが、その後の研究から TACE には TNF 前駆体以外にも極めて多くの基質が存在し、生体における shedding の中心的な役割を果たすことが強く示唆されている。しかしながら TACE 欠損マウスが周産期致死性であったためその *in vivo* における機能は現在まで十分理解されていない。

2. 研究の目的

本研究ではこの問題を回避するため研究代表者によって作成された TACE コンディショナルノックアウトマウス(以下 *Tace^{lox/lox}* マウス)を利用し、その表現系解析を手掛かりに TACE による shedding の骨代謝・造血および炎症・免疫反応における機能の解明を目指している。また本研究テーマの延長として、TACE の類縁遺伝子である ADAM10 の機能解析、並びにタンパク質転写後の機能調節に重要なかわりを持つ小胞体ストレス応答機構の骨代謝における機能解析を行った。

3. 研究の方法

組織特異的に TACE を不活化したマウスモデルを作成するため、種々の組織特異的 Cre 遺伝子導入マウスを入手し、順次交配を行った。作成されたマウスはマクロ、組織の評価を行ったうえで、表現型が確認されたマウスにおいては、そのメカニズムを *in vitro* の系を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 前年度終了となった科学研究補助金(基盤研究(C)19591765)より継続となった研究成果。

TACE は FLT3 リガンドの可溶化酵素である：FLT3 リガンド(以下 FLT3L)は CSF-1 および Kit リガンドと相同性を有する分子であり、hematopoietic stem cell や樹状細胞の分化・増殖に重要な役割のあることが報告されている。FLT3L はまずは膜型蛋白質として産生され、その後細胞膜表面にて蛋白質分解作用を受け可溶型蛋白質として放出されるが、その分解酵素はこれまで不明であった。本研究プロジェクトでは生化学的手法および TACE 遺伝子改変マウスを利用して TACE が FLT3L の shedding の主要な酵素であることを明らかにした(論文 18)。

Tace/Sox9 マウスの表現型解析：TACE 欠損マウスが周産期致死性であるため成獣における TACE の機能は十分に理解されていない。そこで、*Tace^{lox/lox}* と Sox9 プロモーター下で Cre を発現するトランスジェニックマウス(*Sox9/Cre*)を交配し、比較的広範に TACE を欠損した変異マウス(以下 *Tace/Sox9* マウス)を作成した。SOX9 は骨・軟骨細胞をはじめとして、皮膚、内臓、神経組織などに広く発現するが、血球系細胞には発現しないことが知られている。作成した *Tace/Sox9* マウスの大多数は4カ月以上生存したが、成長障害、皮膚異常など多彩な表現系を呈することが観察された。これらの表現系の中でも特に骨、

および造血の異常を中心に解析を行い TACE が 1) 長管骨の長軸方向の成長に関与すること、2) TACE を全身性に欠損した結果、Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) の異常産生が生じ、骨量低下や脾腫などの異常を呈すること、などを明らかにした(論文 19)。

また本遺伝子改変マウスでは皮膚にも強い表現型を呈しており、これらは後述するように共同研究にて解析を行い論文を発表している(論文 1-3)。

(2) 本科学研究補助金における研究成果

RANK の可溶化による破骨細胞分化制御：破骨細胞分化には破骨細胞前駆細胞および骨細胞・ストローマ細胞による細胞間接着が必須である。その細胞間の情報伝達に破骨細胞前駆細胞に発現する Receptor Activator of NF- κ B (RANK)、および骨細胞・ストローマ細胞に発現する RANK リガンドが重要な機能を有することが知られている。本研究では破骨細胞前駆細胞に発現する RANK が TACE によるタンパク質分解を受け可溶型タンパク質として放出され、TACE が細胞膜状の RANK 発現量の制御因子であることを示した。また *in vitro* における破骨細胞分解系実験から TACE を欠損した破骨細胞前駆細胞は相対的に RANK の発現が更新し、RANK リガンドによる破骨細胞分化誘導にこう感受性であることを明らかにした(論文 15)。

ADAM10 は G-CSF 産生を負に制御し、間接的に顆粒球産生を抑制する：ADAM10 は TACE と高い相動性を有する膜型のタンパク質分解酵素である。TACE が EGFR リガンドや膜型 TNF 前駆蛋白質を切断し活性化するのに対し、ADAM10 は Notch 並びに Cadherin の蛋白質分解に関わっていることが報告されている。Notch はもともと昆虫で同定された分子であるが、哺乳類においても極めて重要な機能を担う分子であり、種々の細胞系列の分化制御や多分可能維持に関わっていることが知られている。本研究では、ADAM10 を比較的全身的に欠損させた遺伝子改変動物(*Adam10-Mx1* マウス)を作成し、ADAM10 の生体における機能解析を試みた。

通常の ADAM10 欠損マウスは胎生致死性であることがすでに報告されていることから本研究では *Mx1-Cre* マウスを利用し、マウス出生後に ADAM10 を不活化する方法をとった。遺伝子改変マウスは ADAM10 の不活化誘導後 2-3 週より脾腫を呈し、また徐々に皮膚炎様の表現型を呈することが観察された。本遺伝子改変マウスをさらに詳細に解析したところ、ADAM10 を欠損した非血球系細胞が G-CSF を強く産生し、この結果造血異常

を呈すること、また ADAM10 を欠損した造血細胞自体も増殖が G-CSF 非依存的に亢進することを明らかにした。これらの結果から ADAM10 は非血球細胞 (G-CSF 依存的)、血球細胞 (G-CSF 非依存的) の両面から顆粒球の産生を抑制する機能を有することが明らかになった (論文 5)。

小胞体ストレス応答機構 IRE1 -XBP1 は Osterix の転写を介して骨芽細胞分化を制御する：分泌蛋白質は小胞体において種々の化学的修飾を受け高次構造を獲得する。しかしながら、何らかの理由により、このプロセスが障害されると、正しい高次構造を得られなかった“不良蛋白質”が、細胞外に分泌されることなく、小胞体に蓄積される。このように小胞体に蓄積した不良蛋白質は“小胞体ストレス”を引き起こし、細胞の機能維持に重大な障害となる。この負荷を解消するため、不良蛋白質応答 (unfolded protein response: UPR) と呼ばれる防御システムが細胞に備わっている。本研究では主要な UPR 伝達経路の一つである IRE1 - XBP1 経路に注目し、その骨芽細胞分化における機能解析を試みた。

本研究の *in vitro* の骨芽細胞分子系実験から骨芽細胞分化過程において、IRE1 - XBP1 経路が活性化され、これを抑制することにより、骨芽細胞分化が著しく阻害されることを明らかにした。また、遺伝子発現解析から IRE1 欠損細胞では骨細胞分化に必須の転写因子である Osterix の発現が顕著に低下していることが観察された。そこで、IRE1 -XBP1 経路と Osterix の転写制御の関連を検討したところ、XBP1 が Osterix プロモーターに直接結合し、Osterix の転写を亢進しうることを見出した。以上の結果から、IRE1 -XBP1 経路は、骨芽細胞分化系において活性化され、Osterix の転写を介し骨芽細胞分化に対し正に機能することが明らかとなった (論文 6)。

(3) 共同研究による TACE の機能解析

TACE の皮膚炎・毛根機能維持における機能解析：TACE の欠損した皮膚では EGFR シグナルが低下し、皮膚炎が生じるとともに、毛根の機能維持に障害を来し脱毛した状態になることを示した (論文 1-3)。

TACE の炎症病変における機能解析：各種マウス病態モデル (肺炎・肺損傷 (論文 4, 7, 12), 大動脈解離 (論文 10), 肝炎 (論文 13), 腹膜炎 (論文 14)) を利用し TACE の病的環境下における機能解析を行った。

TACE のミエリン形成における関与：神経

細胞特異的に TACE を欠損した遺伝子改変動物を作成し、TACE が neuregulin の活性調節を介して、ミエリン形成を負に制御することを示した (論文 8)。

T 細胞分化における TACE の関与 (論文 16)

糖代謝における TACE の関与 (論文 9)

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 19 件)

1. Nagao, K., T. Kobayashi, M. Ohyama, H. Akiyama, K. Horiuchi, and M. Amagai. 2012. Brief report: requirement of TACE/ADAM17 for hair follicle bulge niche establishment. *Stem Cells* 30:1781-1785. (査読有り)
2. Nagao, K., T. Kobayashi, K. Moro, M. Ohyama, T. Adachi, D. Y. Kitashima, S. Ueha, K. Horiuchi, H. Tanizaki, K. Kabashima, A. Kubo, Y. H. Cho, B. E. Clausen, K. Matsushima, M. Suematsu, G. C. Furtado, S. A. Lira, J. M. Farber, M. C. Udey, and M. Amagai. 2012. Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nat Immunol* 13:744-752. (査読有り)
3. Franzke, C. W., C. Cobzaru, A. Triantafyllopoulou, S. Loffek, K. Horiuchi, D. W. Threadgill, T. Kurz, N. van Rooijen, L. Bruckner-Tuderman, and C. P. Blobel. 2012. Epidermal ADAM17 maintains the skin barrier by regulating EGFR ligand-dependent terminal keratinocyte differentiation. *J Exp Med* 209:1105-1119. (査読有り)
4. Dreytmueller, D., C. Martin, T. Kogel, J. Pruessmeyer, F. M. Hess, K. Horiuchi, S. Uhlig, and A. Ludwig. 2012. Lung endothelial ADAM17 regulates the acute inflammatory response to lipopolysaccharide. *EMBO Mol Med* 4:412-423. (査読有り)
5. Yoda, M., T. Kimura, T. Tohmonda, S. Uchikawa, T. Koba, J. Takito, H. Morioka, M. Matsumoto, D. C. Link, K. Chiba, Y. Okada, Y. Toyama, and K. Horiuchi. 2011. Dual functions of cell-autonomous and

- non-cell-autonomous ADAM10 activity in granulopoiesis. *Blood* 118:6939-6942. (査読有り)
6. Tohmonda, T., Y. Miyauchi, R. Ghosh, M. Yoda, S. Uchikawa, J. Takito, H. Morioka, M. Nakamura, T. Iwawaki, K. Chiba, Y. Toyama, F. Urano, and K. Horiuchi. 2011. The IRE1alpha-XBP1 pathway is essential for osteoblast differentiation through promoting transcription of Osterix. *EMBO Rep* 12:451-457. (査読有り)
 7. Rowlands, D. J., M. N. Islam, S. R. Das, A. Huertas, S. K. Quadri, K. Horiuchi, N. Inamdar, M. T. Emin, J. Lindert, V. S. Ten, S. Bhattacharya, and J. Bhattacharya. 2011. Activation of TNFR1 ectodomain shedding by mitochondrial Ca²⁺ determines the severity of inflammation in mouse lung microvessels. *J Clin Invest* 121:1986-1999. (査読有り)
 8. La Marca, R., F. Cerri, K. Horiuchi, A. Bachi, M. L. Feltri, L. Wrabetz, C. P. Blobel, A. Quattrini, J. L. Salzer, and C. Taveggia. 2011. TACE (ADAM17) inhibits Schwann cell myelination. *Nat Neurosci* 14:857-865. (査読有り)
 9. Kaneko, H., T. Anzai, K. Horiuchi, K. Morimoto, A. Anzai, T. Nagai, Y. Sugano, Y. Maekawa, H. Itoh, T. Yoshikawa, Y. Okada, S. Ogawa, and K. Fukuda. 2011. Tumor Necrosis Factor-alpha Converting Enzyme Inactivation Ameliorates High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Altered Energy Homeostasis. *Circ J* 75:2482-2490. (査読有り)
 10. Kaneko, H., T. Anzai, K. Horiuchi, T. Kohno, T. Nagai, A. Anzai, T. Takahashi, A. Sasaki, M. Shimoda, Y. Maekawa, H. Shimizu, T. Yoshikawa, Y. Okada, R. Yozu, and K. Fukuda. 2011. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is a key mediator of abdominal aortic aneurysm development. *Atherosclerosis* 218:470-478. (査読有り)
 11. Isshiki, H., K. Sato, K. Horiuchi, S. Tsutsumi, M. Kano, H. Ikegami, H. Abe, A. Umezawa, H. Aburatani, and Y. Toyama. 2011. Gene expression profiling of mouse growth plate cartilage by laser microdissection and microarray analysis. *J Orthop Sci* 16:670-672. (査読有り)
 12. Arndt, P. G., B. Strahan, Y. Wang, C. Long, K. Horiuchi, and B. Walcheck. 2011. Leukocyte ADAM17 Regulates Acute Pulmonary Inflammation. *PLoS One* 6:e19938. (査読有り)
 13. Murthy, A., V. Defamie, D. S. Smookler, M. A. Di Grappa, K. Horiuchi, M. Federici, M. Sibilio, C. P. Blobel, and R. Khokha. 2010. Ectodomain shedding of EGFR ligands and TNFR1 dictates hepatocyte apoptosis during fulminant hepatitis in mice. *J Clin Invest* 120:2731-2744. (査読有り)
 14. Long, C., Y. Wang, A. H. Herrera, K. Horiuchi, and B. Walcheck. 2010. In vivo role of leukocyte ADAM17 in the inflammatory and host responses during E. coli-mediated peritonitis. *J Leukoc Biol* 87:1097-1101. (査読有り)
 15. Hakozaki, A., M. Yoda, T. Tohmonda, M. Furukawa, T. Hikata, S. Uchikawa, H. Takaishi, M. Matsumoto, K. Chiba, K. Horiuchi, and Y. Toyama. 2010. Receptor Activator of NF- κ B (RANK) Ligand Induces Ectodomain Shedding of RANK in Murine RAW264.7 Macrophages. *J Immunol* 184:2442-2448. (査読有り)
 16. Gravano, D. M., B. T. McLelland, K. Horiuchi, and J. O. Manilay. 2010. ADAM17 deletion in thymic epithelial cells alters aire expression without affecting T cell developmental progression. *PLoS One* 5:e13528. (査読有り)
 17. Le Gall, S. M., P. Bobe, K. Reiss, K. Horiuchi, X. D. Niu, D. Lundell, D. R. Gibb, D. Conrad, P. Saftig, and C. P. Blobel. 2009. ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell* 20:1785-1794. (査読有り)
 18. Horiuchi, K., H. Morioka, H. Takaishi, H. Akiyama, C. P. Blobel, and Y. Toyama. 2009. Ectodomain shedding of FLT3 ligand is mediated by TNF-alpha converting enzyme. *J Immunol* 182:7408-7414. (査読有り)

19. Horiuchi, K., T. Kimura, T. Miyamoto, K. Miyamoto, H. Akiyama, H. Takaishi, H. Morioka, T. Nakamura, Y. Okada, C. P. Blobel, and Y. Toyama. 2009. Conditional inactivation of TACE by a Sox9 promoter leads to osteoporosis and increased granulopoiesis via dysregulation of IL-17 and G-CSF. *J Immunol* 182:2093-2101. (査読有り)

[学会発表](計 17 件)

1. La Marca, R., F. Cerri, K. Horiuchi, A. Bachi, M. Laura Fltri, L. Wrabetz, C. P. Blobel, J. L. Salzer, and C. Taveggia. 2011年11月13日. Regulation of myelination by secretase: role of Adam17/TACE. In *Society of Neuroscience meeting*, Washington USA
2. 内川伸一, 依田昌樹, 千葉一裕, 堀内圭輔, and 戸山芳昭. 2011年10月27日. IL-1受容体シグナルにおける TNF converting enzyme (TACE) の機能解析. In *第26回日本整形外科学会基礎学術集会*, 前橋.
3. 堀内圭輔, 東門田誠一, 森岡秀夫, 戸山芳昭, and 千葉一裕. 2011年10月27日. 小胞体ストレス応答経路である IRE1 -XBP1はBMPによる骨芽細胞分化に必須である. In *第26回日本整形外科学会基礎学術集会*, 前橋.
4. 東門田誠一, 戸山芳昭, and 堀内圭輔. 2011年9月3日. 小胞体ストレス応答機構Xbp1 -XBP1経路は, 骨芽細胞分化過程において活性化されOsterixの転写を促進する. In *第12回運動器学研究会*, 高知.
5. 内川伸一, 依田昌樹, 千葉一裕, 堀内圭輔, and 戸山芳昭. 2011年7月20日. IL-1受容体シグナリングにおける TNF - converting enzyme (TACE) の機能解析. In *第29回日本骨代謝学会学術集会*, 神戸.
6. 東門田誠一, 宮内芳輝, 千葉一裕, 戸山芳昭, and 堀内圭輔. 2011年7月19日. 小胞体ストレス応答機構 Xbp1 -XBP1経路は, 骨芽細胞分化過程において活性化されOsterixの転写を促進する. In *第29回日本骨代謝学会学術集会*, 神戸.
7. Horiuchi, K., K. Saito, T. Kimura,

K. Sato, Y. Okada, and Y. Toyama. 2011年7月14日. Conditional inactivation of TACE in chondroblasts results in shorter long bones and defective fracture healing. In *Gordon Research Conference (Regulated Proteolysis of Cell Surface Proteins)*, Davidson, NC USA

8. 堀内圭輔, 斎藤憲太, 木村徳宏, 佐藤和毅, 秋山治彦, 岡田保典, 千葉一裕, and 戸山芳昭. 2011年6月11日. 2型コラーゲンプロモーターにより TACEを不活化したマウスは骨の成長障害を来たす. In *第43回日本結合組織学会学術集会, 第58回マトリックス研究会大会 合同学術集会*, 別府.
9. Horiuchi, K. 2010年12月9日. Studies from TACE mutant mice. In *The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan*, Kobe.
10. 斎藤憲太, 堀内圭輔, 木村徳宏, 佐藤和毅, 千葉一裕, 秋山治彦, and 戸山芳昭. 2010年10月15日. 軟骨細胞分化および骨折治療過程における TNF converting enzyme(TACE)の機能解析. In *第25回日本整形外科学会基礎学術集会*, 京都.
11. 堀内圭輔, 斎藤憲太, 木村徳宏, 佐藤和毅, 秋山治彦, 岡田保典, 千葉一裕, and 戸山芳昭. 2010年8月26日. 2型コラーゲンプロモーターにより TACEを不活化したマウスは骨の成長障害を来たす. In *第11回運動器学研究会*, 軽井沢.
12. 堀内圭輔, 斎藤憲太, 高石官成, 秋山治彦, 佐藤和毅, 中村孝志, 千葉一裕, and 戸山芳昭. 2010年5月28日. 2型コラーゲンプロモーターにより TACEを不活化したマウスは骨の成長障害を来たす. In *第83回日本整形外科学会学術総会*, 東京.
13. 斎藤憲太, 堀内圭輔, 木村徳宏, 佐藤和毅, 千葉一裕, 秋山治彦, and 戸山芳昭. 2010年4月2日. 軟骨細胞分化および骨折治癒過程における TNFa converting enzyme (TACE)の機能解析. In *第23回日本軟骨代謝学会*, 鹿児島.
14. Kawasaki, T., Y. Niki, T. Miyamoto, K. Horiuchi, M. Matsumoto, M. Aizawa, and Y. Toyama. 2010年3月6日. Inhibitory effect of HGF on BMP-2

- induced osteoblast differentiation in vitro. In *56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*, New Orleans, Louisiana USA
15. Horiuchi, K. 2009年9月2日. Conditional inactivation of TACE by a Sox9 promoter leads to osteoporosis and increased granulopoiesis via dysregulation of IL-17 and G-CSF. In *MMP Gordon Research Conference*. les diablerets, Switzerland.
16. 堀内圭輔, 高石官成, 秋山治彦, 中村考志, and 戸山芳昭. 2009年7月24日. 2型コラーゲンプロモーターによりTACEを不活化したマウスは骨の成長障害を来す. In *第27回日本骨代謝学術集会*, 大阪.
17. 堀内圭輔. 2009年6月5日. Studies from TACE mutant mice. In *Joint Conference of 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium (PPCTSS), 41st Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research (JSCTR), and 56th Annual Meeting of the Japan Matrix Club (JMC)*, 横須賀.

〔図書〕(計1件)

1. Horiuchi, K. 2009. [Emerging roles of TACE as a central component of ectodomain shedding in vivo]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 54:1728-1734.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.keio-ortho.jp/orthopaedic/group05_03.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀内 圭輔 (HORIUCHI KEISUKE)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：30327564

(2)研究分担者

戸山 芳昭 (TOYAMA YOSHIAKI)

慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40129549

(3)連携研究者 該当者なし