

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 24年 5月 21日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592381

研究課題名（和文）破骨細胞酸分泌を調節する新規分子の探索とその調節機序解析

研究課題名（英文）Analysis of acid extrusion mechanism through new regulatory protein during bone resorption

研究代表者

鍛冶屋 浩 (KAJIYA HIROSHI)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80177378

研究成果の概要（和文）：

【目的】Clcn7型Cl⁻輸送体（*Clcn7*）は破骨細胞の酸分泌に必須の輸送体として知られ、KOマウスが骨吸収不全により大理石骨病を呈することや常染色体優性骨大理石病II型疾患に*Clcn7*の点変異が認められることが報告されている。最近、この輸送体の細胞膜への移行・安定化を調節する分子としてOsteopetrosis associated transmembrane protein 1 (*Ostm1*) が報告された。しかしながら、*Ostm1*が*Clcn7*のCl⁻分泌能を調節するか不明である。そこで、本研究は*Ostm1*以外の*Clcn7*に相互作用し機能的な調節を担う新規分子を検索してその機序を明らかにすることを目的とした。【方法】マウス*Clcn7*のC末をベイトとしてマウスcDNAライブラリーを用いてイーストハイブリッド法(Y2H)法によりに会合するタンパク質について検索した。この分子の破骨細胞における発現、局在についてqPCR法、Western blot法、免疫沈降法及び免疫染色法により検討した。又、パッチクランプ法と蛍光測光法を用い破骨細胞のCl⁻分泌能を評価し、調節分子の阻害剤の効果についても検討した。

【結果と考察】1) Y2H法により*Clcn7*の細胞内C末に会合する分子としてメバロン酸経路のファルネシル2リン酸合成酵素(Fdps)が挙げられた。2) Fdpsは破骨前駆細胞に発現し、分化に伴いわずかに発現が増加した。又、Fdpsと*Clcn7*は会合作用を持ち、破骨細胞において共局在していた。3) Fdps阻害剤のゾレンドロン酸は*Clcn7*によるCl⁻分泌を濃度依存性に抑制したが、エチドロン酸は抑制しなかった。さらに、RAW264.7細胞においてFdpsのsilencingによってもCl⁻分泌が低下した。以上の結果より、Fdpsは破骨細胞の*Clcn7*に会合してCl⁻分泌を活性化することが解った。さらに、Fdps阻害剤の窒素含有ビスフォスフォネートの骨吸収抑制作用としてCl⁻分泌能の抑制を介した新規の機序が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The *Clcn7* transporter is crucial for osteoclastic bone resorption and its deficiency or mutations suppress bone resorption and lead to severe osteopetrosis. Farnesyl diphosphate synthase (Fdps) catalyses the formation of an important cellular intermediate in mevalonic acid metabolism. Furthermore, Fdps is inhibited by nitrogen-containing bisphosphonate in mature osteoclasts. Here we describe a novel role for the enzyme in *Clcn7* Cl⁻ transporter activity in osteoclasts. Using yeast two-hybrid and co-immunoprecipitation methods, we demonstrate the binding of Fdps to *Clcn7* in mouse osteoclasts and Fdps and *Clcn7* overexpressing HEK cells. Bisphosphonates have been attributed to directly inhibit bone resorption and to promote apoptosis of mature osteoclasts. Furthermore, the main pharmacological mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates is to inhibit Fdps. Thus, we examined the effects of an Fdps inhibitor zoledronic acid on the *Clcn7* extrusion activity in osteoclasts. Extracellular acidification induced Cl⁻ currents associated with *Clcn7*, which were upregulated in

according to osteoclast differentiation. Zoledronic acid inhibited the acid-activated Cl^- current in dose-dependent manner. In contrast a non-nitrogen bisphosphonate etidronic acid has no effects on the acid-activated Cl^- current. The tetracycline-induced Fdps silencing significantly decreased the Cl^- current. Furthermore, the Cl^- current also suppressed the inhibitor of geranylgeranyl transferase. In contrast, zoledronic inhibitory effect was rescued by the addition geranylgeranyl acid a derivative of mebalonic acid. Although extracellular acidification decreased $[\text{Cl}^-]_i$ zoledronic acid significantly suppressed the decrease in $[\text{Cl}^-]_i$. The results suggest that nitrogen-containing bisphosphonates not only suppress resorbing osteoclast cytoskeleton structure but also inhibit acid extrusion transporter through inhibition of Fdps in mature osteoclasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯学

キーワード：骨代謝、酸分泌、Clcn7型Cl⁻輸送体、破骨細胞、メバロン酸経路

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は骨基質側の波状縁膜に発現するATP駆動性ポンプの液胞型H⁺-ATPase (V-ATPase)とClC7型Cl⁻輸送体(*Clcn7*)の2つの異なる膜輸送分子が連動してHCl(酸)を分泌し、骨ミネラルを溶解して血清Ca²⁺濃度を調節する。これら酸分泌輸送体の中で*Clcn7*はノックアウトマウスが骨吸収不全により大理石骨病を呈することや常染色体優性骨大理石病II型の患者全てに*Clcn7*の点変異が認められることが報告されている。私はこの*Clcn7*をHEK293細胞に過剰発現させてそのCl⁻電流について検討した。この結果、過剰発現細胞には外液酸性状態で活性化される外向き整流性のCl⁻電流が認められた。さらに、常染色体優性骨大理石病で認められた部分の中で、特に215番目のグリシンが

アルギニンに置換された点変異体の過剰発現細胞ではCl⁻電流が有意に小さくなることも明らかにした。

2. 研究の目的

破骨細胞の*Clcn7*に会合し、この機能調節を行う分子に関しては明らかではない。そこで、本研究は破骨細胞に発現するCl⁻輸送体*Clcn7*に相互作用し、その機能的な調節を行う新規分子の検索・同定し、その機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

①ClC7型Cl⁻輸送体を調節する分子として既に報告されている*Ostm1* (osteoclast transmembrane protein 1)の点変異を持つ*gl/gl*マウスの骨髄及び脾臓細胞より破骨細胞を分化・誘導し、骨吸収時におけるHCl分泌能をホールセルパッチクランプ法、蛍光測

光法、免疫染色法、形態染色法及び骨吸収能を検討した。さらに、RT-PCR 法や Western blot 法により Cl⁻輸送体発現を野生型、ヘテロ型の破骨細胞と比較検討した。

②*Clcn7* の C 末をベイトとしてマウスの胎児 cDNA ライブラリーを用いてイーストツーハイブリット法により *Clcn7* に会合するタンパク質について検索した。この候補分子が、実際破骨細胞に発現しているか、また破骨細胞の分化に伴って発現が変化するか免疫沈降法と Western blot 法により検討した。また、免疫染色法を用いてこれら分子が共局在しているか検討した。

4. 研究の成果

破骨細胞の Cl⁻分泌能に関係する *Clcn7* に会合する分子として 2006 年に *Ostm1* (が報告された。この分子のミータントマウスである *g1/g1* マウスが骨大理石病になることから骨大理石病関連の膜タンパク質として以前に報告されていたもの、この役割について明らかにではなかった。この報告は *Clcn7* と *Ostm1* が破骨細胞の波状縁に共局在していること、*Ostm1* は *Clcn7* と複合体を形成して膜への輸送に関与することより、*Ostm1* は *Clcn7* のサブユニットとして働くことが示唆された。

そこで、この *Ostm1* の突然変異を持つ *g1/g1* マウスを使用して破骨細胞の Cl⁻分泌能について検討した。この結果、破骨細胞の数は減少しているものの、吸収能や外液酸性環境で活性化される Cl⁻電流に野生型と比較して有意な差は認められなかった。従って、この *Ostm1* は少なくとも *Clc7* に由来する Cl⁻電流の調節には関与していないと考えられた。次

に、イーストツーハイブリット法を用いて *Clcn7* の C 末を bait としてマウス胎児 cDNA ライブラリーを prey として用い、*Clcn7* に会合するタンパク質を網羅的に検索した。この結果、mating が確認できた全 350 クローンの内 62 クローンについて、*Clcn7* に会合する分子のシーケンスを行った結果 19 クローンが同一分子であった。この分子は、コレステロール合成に関与するメバロン酸経路の中の合成酵素で、ジェラニルピロリン酸をファーンシルピロリン酸に合成するファーンシルピロリン酸合成酵素 (Farnesyl diphosphate synthase; Fdps) であった。そこで、この分子の破骨細胞における発現と *Clcn7* への会合について検討した。この Fdps は破骨細胞前駆細胞であるマウス骨髄細胞由来マクロファージ及びマウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞ともにユビキタスに発現していた。さらに、破骨細胞分化必須因子である Receptor activator of NF- κ B ligand; RANKL) 刺激により分化誘導すると、分化に伴いわずかに発現が増加した。さらに、コンフォーカル顕微鏡を用いて 2 つの分子の破骨細胞における局在を検討したところ、細胞質を中心に多くの Fdps 分子が *Clcn7* と共局在していた (Fig. 3)。従って、破骨細胞において Fdps は *Clcn7* を調節している可能性が示唆された。

(研究から明らかになったこと)

本実験は、イーストハイブリッド法により Clc7 型 Cl⁻輸送体 (*Clcn7*) に会合しその機能を調節する分子を探索した。その結果、ファーンシルピロリン酸合成酵素 (Farnesyl diphosphate synthase (Fdps)) が *Clcn7* に会合し、この機能を調節をする分子である可能

性が明らかになった。この Fdps 阻害剤が破骨細胞の吸収を抑制することは既に知られているが、その抑制機序に関しては、骨吸収時の細胞骨格を抑制すること、アポトーシスを促進することが示唆されていた。しかしながら、骨吸収輸送体に直接的に作用することに関しては全く報告がなかった。今回、Fdps が Clcn7 に直接会合して Cl⁻ 輸送を活性化している可能性が明らかになり、さらにこの阻害剤が Clcn7 自身の Cl⁻ 分泌能を抑制して最終的に骨と細胞間を強酸性状態に出来なくなることにより、吸収抑制作用の効果を持つこと可能性が明らかになった。

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 12 件)

- 1) Nakayama S, Kajiya H, Okabe K, Ikebe T* (2011) Effects of oxidative stress on the expression of 8-oxoguanine and its eliminating enzymes in human keratinocytes and squamous carcinoma cells. *Oral Science Inter* 8:11-16 (査読有)
- 2) Goto-T K, Kajiya H*, Nemoto T, Tsutumi T, Tsuzuki T, Sato H, Okabe K (2011) Hyperocclusion stimulated osteoclastogenesis via CCL2 expression. *J Dent Res* 90:793-798 (査読有)
- 3) Kimachi K, Kajiya H*, Nakayama S, Ikebe T, Okabe K (2011) Zoledronic acid inhibits RANK expression and migration of osteoclast precursors during osteoclastogenesis. *Naunyn Schmiedeberg's* 383:297-308. (査読有)
- 4) Wang B, Danjo A, Kajiya H, Okabe K, Kido MA* (2011) Oral Epithelial Cells are Activated via TRP Channels. *J Dent Res* 90:163-167. (査読有)
- 5) Ohgi K, Okamoto F*, Kajiya H, Sakagami R, Okabe K (2011) Antibodies against ClC7 inhibit extracellular acidification-induced Cl⁻ currents and bone resorption activity in mouse osteoclasts. *Naunyn Schmiedeberg's* 383:79-90. (査読有)
- 6) Kajiya H*, Okamoto F, Nemoto T, Kimachi K, Toh-Goto K, Nakayama S, Okabe K (2010) RANKL-induced TRPV2 expression regulates osteoclastogenesis via calcium oscillations. *Cell Calcium* 48:260-269. (査読有)
- 7) Nemoto T, Kajiya H*, Tsuzuki T, Takahashi Y, Okabe K (2010) Differential induction of collagens by mechanical stress in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 55:981-987. (査読有)
- 8) Fukushima A, Kajiya H*, Izumi T, Shigeyama C, Okabe K, Anan H (2010) Pro-inflammatory cytokines induce suppressor of cytokine signaling-3 in human periodontal ligament cells. *J Endod* 36:1004-1008. (査読有)
- 9) Tsumura M, Okumura R, Tatsuyama S, Ichikawa H, Muramatsu T, Matsuda T, Baba A, Suzuki K, Kajiya H, Sahara Y, Tokuda M, Momose Y, Tazaki M, Shimono M, Shibukawa Y* (2010) Ca²⁺ extrusion via Na⁺-Ca²⁺ exchangers in rat odontoblasts. *J Endod* 36:668-674. (査読有)
- 10) Nakao A, Kajiya H*, Fukushima H, Fukushima A, Anan H, Ozeki S, Okabe K (2009) PTHrP induces Notch signaling in periodontal ligament cells. *J Dent Res* 88:551-556. (査読有)
- 11) Kajiya H*, Okamoto F, Ohgi K, Nakao A, Fukushima H, Okabe K (2009) Characteristics of ClC7 Cl⁻ channels and their inhibition in mutant (G215R) associated with autosomal dominant osteopetrosis type II in native osteoclasts and hClcn7 gene-expressing cells. *Pflugers Arch* 458:1049-1059. (査読有)
- 12) Tada T, Shin M, Fukushima H, Okabe K, Ozeki S, Okamoto M, Jimi E. (2009) Oral squamous cell carcinoma cells modulate osteoclast function by RANKL-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Letters* 274:126-13 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Kajiya H, Kimachi K, Nakayama S, Okamoto F, Ikebe T, Okabe K. Zoledronic acid inhibits TNF- α -induced RANK expression and migration in osteoclast precursors. 第 32 回米国骨代謝学会, 2010 年 10 月 16 日 (Toronto, Canada)

- 2) Goto-T K, Kajiya H, Nemoto N, Tsuzuki T, Okabe K, Sato H. Hyper-occlusion stimulated osteoclast recruitment through chemokines expression. 第32回米国骨代謝学会, 2010年10月16日(Toronto, Canada)
- 3) Tsuzuki-T, Kajiya H, Goto-T K, Nemoto T, Okabe K Takahashi H. Hyperocclusion Stimulates Collagen type XII in periodontal ligament. 第32回米国骨代謝学会, 2010年10月16日(Toronto, Canada)
- 4) Kajiya H, Okamoto F, Okabe K. RANKL-induced expression of transient receptor potential (TRP) V2 is involved in osteoclastogenesis via calcium oscillations. 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), 2009年7月27-8月1日. (Kyoto)
- 5) Ohgi K, Okamoto F, Nemoto T, Kajiya H, Sakagami R, Okabe K. Characteristics of acid-activated outwardly rectifying Cl⁻ channels in mouse osteoclasts.. 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), 2009年7月27日-8月1日. (Kyoto)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍛冶屋 浩 (KAJIYA HIROSHI)
 福岡歯科大学・歯学部・講師
 研究者番号：80177378

(2) 研究分担者

岡本 富士雄 (OKAMOTO FUJIO)
 福岡歯科大学・歯学部・講師
 研究者番号：60153938

岡部 幸司 (OKABE KOUJI)

福岡歯科大学・歯学部・教授
 研究者番号：80224046

(3) 連携研究者

()

研究者番号：