

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16426

研究課題名（和文）破骨細胞でリソソームが統合する代謝シグナルの役割の解明

研究課題名（英文）Integration of metabolic signals at the lysosomes in osteoclasts

研究代表者

木村 哲也（Kimura, Tetsuya）

大阪大学・微生物病研究所・特任助教（常勤）

研究者番号：40792346

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、破骨細胞に含まれる細胞内小器官リソソームの機能を研究しました。破骨細胞から分泌される酸により、骨の硬さの源であるミネラル分がまず分解され、続いて酵素カテプシンにより、骨の土台であるコラーゲンが分解されて、骨が壊されることが従来知られていました。これらの機構は、骨を新陳代謝し健康を保つために本来必要ですが、骨粗鬆症を進行させ病気の原因にもなります。本研究では酸やカテプシンでなく、リソソーム膜に存在する細胞内シグナル蛋白の役割を調べました。このシグナル経路は近年発見されたものですが、これを標的にすれば新しい骨粗鬆症治療薬を開発できる可能性を本研究により突き止めました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の人口の高齢化に伴い、骨粗鬆症の患者が今後増加することが見込まれます。また世界の先進国でも人口の高齢化が進んでいます。特に閉経後の高齢女性では骨粗鬆症のリスクが高くなります。骨折により寝たきりになったり介護が必要になると、患者自身の生活の質を下げ、介護者にも負担となります。骨粗鬆症で骨がもろくなるメカニズムの一つが、破骨細胞による骨吸収（骨が分解されること）です。本研究の成果を応用し、新しい骨粗鬆症治療薬を開発できれば、世界中で骨粗鬆症を治療し、特に高齢者の健康増進と、各国における経済損失の抑制につながります。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the function of the lysosome, an intracellular organelle, in osteoclasts. It is known that the acid secreted by osteoclasts initially degrades minerals, which contribute to bone hardness. Subsequently, the enzyme cathepsin breaks down collagen, the structural basis of bone, leading to bone degradation. While these mechanisms are vital for bone metabolism and maintaining health, they can also contribute to diseases such as osteoporosis. In this study, we focused on the role of intracellular signaling proteins located at the lysosomal membrane, rather than on acids or cathepsins. The signaling pathway at the lysosomal membrane, recently discovered, presents a potential target for developing new drugs to treat osteoporosis.

研究分野：代謝免疫学

キーワード：破骨細胞 リソソーム

1. 研究開始当初の背景

骨では骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収が常に起きている。古い骨、ダメージを受けた骨は除去され、新たな骨が作られることにより、健康な骨量と骨質が保たれている。いくつかの疾患では骨形成と骨吸収がマイナスバランスに傾き、骨量が減少する。例えば女性におけるエストロゲン減少は骨量を減少させ、全ての女性で閉経後は骨粗鬆症・骨折・寝たきりの危険性がある。また、肥満症および2型糖尿病患者においても、骨質の低下が起きると考えられている。このように、ホルモンや代謝は骨代謝に影響する。肥満症患者、糖尿病患者、閉経後女性等が人口に占める割合は今後も増加が予測され、全ての人が長く健康を維持できる科学技術の開発が、我が国を含む先進国で求められている。骨の健康維持もその一環として重要である。

破骨細胞による骨吸収において、リソソームとその構成蛋白が極めて重要な役割を担っている。まず破骨細胞のリソソームは、**ruffled border** と呼ばれる骨と破骨細胞の境界面に移動し、**v-ATPase** を介してプロトンが骨側に輸送される。骨側の空間はインテグリンで密封されており、プロトンが蓄積し酸性環境となり、骨からハイドロキシアパタイトが溶出する。溶出後に残るコラーゲン骨格は、**カテプシン K** など破骨細胞由来のリソソーム酵素によって分解され、骨吸収が完了する。リソソームは内部が酸性のオルガネラで、従来は細胞内の不要物を加水分解するためのゴミ箱と考えられていた。しかし近年、リソソームの新たな機能が次々と解明された。まずリソソームが極めて重要なシグナル中心であることが明らかとなった。リソソーム膜に存在する蛋白複合体 **Ragulator** (5つの蛋白 **Lamtor1/2/3/4/5** で構成される)はそのコアであり、細胞内の栄養状態(主にアミノ酸の過不足)と、細胞外からのシグナル(インスリン・**IGF-1**・サイトカイン等)を統合する足場である。**Ragulator** を足場として、キナーゼ複合体 **mTORC1** が活性化され、細胞増殖・脂質合成・核酸合成・オートファジー抑制など様々な細胞応答が起きる。リソソームはまた、**ER**・形質膜などと接触し、オルガネラ間で物質や情報をやりとりしていることも解明されつつある。しかし細胞内シグナルの統合やオルガネラ間相互作用というリソソームのこれら新機能が、破骨細胞および骨全体に及ぼす影響は未解明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、リソソーム膜に存在する蛋白複合体 **Ragulator** の重要性と分子生物学的役割を、破骨細胞において解明することである。マウス個体の表現型として明瞭な影響が出るほど重要な役割を果たしているかをまず検討し、もしそうであれば、どのような細胞内メカニズムで **Ragulator** が破骨細胞機能に関与しているかを解明する。これまで骨粗鬆症発症の重要な危険因子として閉経(エストロゲン枯渇)が知られている。本研究では閉経後骨粗鬆症に **Ragulator** が影響するか否か、またエストロゲンの細胞内シグナルに **Ragulator** が関与するかも検討する。

3. 研究の方法

Ragulator ノックアウトマウスの老化個体(雌雄)で骨密度を測定し、骨粗鬆症の発症率と骨密度に野生型と差があるかどうかを検討する。また閉経後骨粗鬆症のモデルとして、8~12週齢の **Ragulator** 欠損マウスと対照マウスで卵巣切除を行った後、骨密度を測定する。破骨細胞の機能と細胞内シグナルは *in vitro* で検討する。マウス骨髄細胞を **M-CSF** と **RANKL** 存在下に培養し、破骨細胞を誘導する。破骨細胞の分化は **TRAP assay** で評価し、骨吸収機能は **pit formation assay** にて評価する。また破骨細胞の細胞融合、アクチンリングの形成、発現蛋白や遺伝子の変化も検討する。さらにエストロゲン、インスリン、脂質、アミノ酸を培地にそれぞれ添加し、**Ragulator** 欠損破骨細胞と野生型破骨細胞が異なる表現型を示すか検討する。これにより、**Ragulator** がどの栄養シグナルと破骨細胞を結びつけているのかも明らかにする。これまで破骨細胞で機能が特定された重要な蛋白(**v-ATPase**, **カテプシン K**, **C1C-7** など)は **western blotting** で定量し、その他の発現蛋白はプロテオーム解析で網羅的にスクリーニングする。また **RNA-seq** により網羅的な遺伝子発現解析を行う。このデータを用いて **unbiased** な **パスウェイ** 解析も行い、**Ragulator** 欠損破骨細胞においてこれまで知られていない細胞内シグナルの変化が起きていないかも検討する。細胞内で代謝に大きな変化が生じている可能性が高い場合は、**untargeted metabolomics** を追加で行う。

4. 研究成果

本研究ではリソソーム膜において **mTORC1** を活性化する蛋白複合体 **Ragulator** に焦点を当て、

破骨細胞におけるリソソームの役割を改めて検討した。まず野生型および Ragulator 遺伝子ノックアウトマウスを用い、高齢メスマウスの骨密度を測定した。次に加齢時の性差を検討するため、高齢オスマウスについても野生型およびノックアウトマウスで骨密度を評価した。これにより加齢マウスで性差および Ragulator の有無による骨密度への影響を総合的に評価しえた。さらに閉経後骨粗鬆症のモデルである卵巣切除マウスにて、野生型マウスとノックアウトマウスで骨密度測定を行った。マウス実験と並行し、in vitro で破骨細胞を効率良く誘導する細胞培養法を確立した。誘導した破骨細胞が発現する遺伝子を網羅解析し、Ragulator に影響される細胞内シグナル等を新たに見出した。その他に、発現蛋白質の検討を行い、また破骨細胞機能の検討も行った。

国内外で破骨細胞の Ragulator 機能を解析した報告はこれまでなく、近日中に国際学術誌への報告を予定している。今後の展望として、破骨細胞におけるリソソーム機能を、細胞内シグナルおよび、オルガネラの細胞内機能の観点からさらに多面的に解析し、最終的には骨粗鬆症の新たな治療標的として本研究の成果を応用・発展させることを目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tetsuya Kimura
2. 発表標題 Diverse roles of Ragulator protein complex Beyond mTORC1 activation
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村哲也
2. 発表標題 mTORC1の基質特異的足場としてのRagulator
3. 学会等名 第12回TOR研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村哲也
2. 発表標題 mTORC1を活性化し、つなぐRagulator
3. 学会等名 第13回TOR研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------