

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390358

研究課題名(和文)筋・骨格形成および造血におけるシェディングの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of ADAMs in the musculoskeletal and hematopoietic system

## 研究代表者

堀内 圭輔(Horiuchi, Keisuke)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：30327564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膜型タンパク質分解酵素ADAM17およびADAM10の機能を多岐にわたって解析を行った。本研究結果から、1) ADAM17が成長軟骨の吸収を制御していること、2) ADAM17はIL-1の型受容体の特異的に切断し、IL-1シグナルを正に制御しうること、また3) ADAM17その活性が転写・翻訳レベルでの制御をほとんど受けないことを明らかにした。一方、ADAM10に関しては、筋衛星細胞の恒常性維持に必須であることを解明した。またこれらの研究と並行し、破骨細胞における小胞体ストレスの機能を解析し、小胞体ストレスセンサーIRE1を介し破骨細胞分化を制御す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 ADAM10 and ADAM17 in the musculoskeletal system. Specifically, we found that 1) ADAM17 regulates longitudinal bone growth via indirectly regulating osteoclastic bone resorption, that 2) ADAM17 specifically cleaves the decoy receptor IL-1R2 and thereby positively regulates IL-1 signaling, and that the activity of ADAM17 is not dependent on transcriptional or translational regulation. As for ADAM10, we found that ADAM10 plays an indispensable role in maintaining satellite cells in skeletal muscle. In addition to these study, we also investigated the potential role of ER stress in osteoclasts and identified a stress sensor IRE1 as a novel regulator of osteoclastogenesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨軟骨代謝 筋代謝 ADAM遺伝子 小胞体ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

骨代謝、造血の調節など成体における恒常性は種々の細胞のクロストークの上に成り立っているものと考えられる。その細胞間の情報伝達には細胞膜上に発現する種々の膜型タンパク質、および分泌タンパク質が本質的な機能を担う。これらの膜型タンパク質、分泌タンパク質は小胞体で産生され、ゴルジ体を経て細胞膜上、細胞外に輸送される。興味深いことに、多くの膜型タンパク質は、"ectodomain shedding"と呼ばれる蛋白質分解作用を受けその蛋白質の細胞外領域が可溶性蛋白質として放出されることが知られている。しかしながら、この骨代謝・筋代謝領域における、ectodomain sheddingの機能は十分に明らかにされていない。また、小胞体内で産生・高次構造を獲得するこれらのタンパク質が小胞体内でどのような機能的修飾を受け、細胞の機能恒常性維持に機能するのか知見に乏しい。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は1) ADAM 遺伝子による ectodomain shedding、および小胞体ストレスに注目し、骨代謝、筋発生・代謝、造血における膜型タンパク質、分泌タンパク質の機能調節機構の一端を明らかにし、2) 得られた知見をもとに、骨粗鬆症、筋萎縮症などの病態に対する新規治療法の可能性を検討することである。

### 3. 研究の方法

ADAM10, ADAM17, および小胞体ストレスセンサーIRE1 $\alpha$ の遺伝子改変動物を作成し、表現型の解析を行った。それらの表現型解析を *in vitro* の実験系で施行した。

### 4. 研究成果

**(1) ADAM17 は長管骨の正常な発育に必須である。**過去の研究から ADAM17 が軟骨細胞に発現していることが明らかとなっていたが、ADAM17 の骨格系発達における機能に関しては従来不明であった。そこで、軟骨細胞特異的に ADAM17 を欠失した遺伝子改変動物 (*Adam17-Col2* マウス) を作成し、表現型解析を行った。*Adam17-Col2* マウスは長期生存可能であり、外見上は大きな異常を認めなかったが、野生型マウスと比較して長管骨が約 10%程度短縮し、組織学的には成長板肥大層の肥厚が認められた。また、*Adam17-Col2* マウスマウスでは軟骨細胞の増殖および分化には明らかな異常は観察されなかったが、軟骨骨移行部において破骨細胞数の減少していることが明らかとなった。そこで、成長板における *Rankl*, Osteoprotegerin および *Mmp13* の発現を検討したところ、*Adam17-Col2* マウスマウスでは、野生型マウスと比較して *Rankl* と *Mmp13* の低下、並びに Osteoprotegerin の上昇が認められた。さらに、

ADAM17 を欠損した軟骨組織では EGFR のリン酸化が抑制されており、ADAM17-EGFR シグナルの低下がこれらの遺伝子発現異常の原因であると考えられた。次に初代軟骨細胞を利用し、これらの遺伝子の発現制御機構を検討したところ、EGFR シグナルが *Rankl* と *Mmp13* に対しては正、Osteoprotegerin に対しては負の制御因子であることが明らかとなった。これらの結果を *in vivo* で確認するため、EGFR を軟骨細胞から欠損した遺伝子改変マウスを作成したところ、*Adam17-Col2* マウスと極めて類似した成長板の異常を呈することが確認された。これらの所見から、ADAM17 は EGFR シグナルを介し、破骨細胞の促進することにより、成長軟骨の吸収を制御していることが明らかとなった (発表論文 12)。

### (2) ADAM17 の活性は転写・翻訳レベルの調節に非依存である。

ADAM17 は TNF $\alpha$ , EGFR リガンドの活性化に必須であり、関節リウマチ、乳がんなどでその発現が亢進していることが報告されている。こうした疾患の病因解明のうえで ADAM17 の活性化機構を理解することは重要であるが、ADAM17 の発現亢進が実際にその活性に相関するのか不明であった。そこで本研究では ADAM17 を全身性に過剰発現する遺伝子改変マウス (*Adam17-tg* マウス) を作成し、ADAM17 の過剰発現が生体に及ぼす影響の解明を試みた。極めて意外なことに *Adam17-tg* マウスは正常に生まれ、また成長過程においても明らかな異常を呈しなかった。また、*Adam17-tg* マウスを *Adam17* ノックアウトマウスと交配し、内因性のプロモーター制御下で発現する ADAM17 を欠失した遺伝子改変マウスも同様に明らかな異常が観察されなかった。さらに *Adam17-tg* マウス由来の細胞は野生型細胞とほぼ同様のレベルの TNF $\alpha$ , EGFR リガンド活性化能を有していることが確認された。これらの所見から、ADAM17 の活性は転写・翻訳レベルではほぼ非依存性であり、翻訳後の調節が主体であると考えられた。また ADAM17 の過剰発現が必ずしも ADAM17 の活性亢進につながらないことから、従来報告されている ADAM17 の発現上昇と病態との解釈には注意を要するものと示唆された (発表論文 10)。

### (3) ADAM17 はデコイ受容体 IL-1R2 を細胞膜より放出し、IL-1 シグナルを正に制御する。

本研究では細胞生物学的手法を用いて、膜型のタンパク質分解酵素である ADAM17 が IL-1R2 のシェディングに関わる主要な分子であることを同定した。興味深いことに、IL-1R1 は ADAM17 によるシェディングに対し高い抵抗性を示し、IL-1R1 細胞膜近傍部位を IL-1R2 に導入することにより、IL-1R2 もシェディング抵抗性を獲得しうることを見出した。このことから ADAM17 によるシェ

ディングの感受性の違いによって、細胞膜上の IL-1R1 とデコイ受容体である IL-1R2 との発現比率が制御されているものと推測された。そこで、IL-1R2 を過剰発現した細胞株を作成し、ADAM17 の刺激の有無で IL-1 シグナルの強度を比較したところ、ADAM17 刺激後では細胞膜上の IL-1R2 の発現量が低下し、その結果、IL-1 による細胞内シグナルがより増強されることが観察された。またこの効果は siRNA による ADAM17 の発現を抑制することにより、有意に抑えられることが確認された。このことから、ADAM17 は IL-1R2 のシェディングを介して IL-1 による細胞内シグナルを正に制御するものと考えられた（発表論文 4）。

**（4）ADAM10-Notch シグナルは筋衛星細胞の恒常性維持に必須である。**筋衛星細胞は筋線維と基底膜に介在する筋特異的な幹細胞である。通常は停止状態にあるが、筋の成長、筋損傷において活性化され、筋肉量維持、筋再生に寄与する。しかしながら、その機能・細胞数は加齢とともに低下し、高齢者における筋機能低下の一因であると考えられている。本研究では筋衛星細胞における ADAM10 の機能解明を試みた。ADAM10 を筋衛星細胞特異的に欠失した遺伝子改変マウス（*Adam10-Pax7* マウス）は通常の飼育状態では明らかな異常を呈さず、筋重量、筋組織ともに野生型マウスと差を認めなかった。しかしながら、*Adam10-Pax7* マウスでは筋衛星細胞がほぼ完全に消失しており、筋損傷後の筋再生が著しく障害されることが明らかとなった。極めて興味深いことに筋衛星細胞から ADAM10 を欠失を誘導すると、筋衛星細胞が未分化状態を維持できなくなり、筋芽細胞へと分化が進むことが観察された。さらに、ADAM10 を欠失した筋衛星細胞では、筋衛星細胞未分化能維持に必須と考えられている Notch シグナルが低下しており、Notch の活性化障害が生じていることが確認された。このことから、筋衛星細胞の Notch シグナル維持には ADAM10 が必須であり、ADAM10 は Notch の活性化を介して、衛星細胞の未分化能維持に機能していることが明らかとなった（発表論文 7）。

**（5）骨芽細胞における不良蛋白質応答は副甲状腺受容体の発現を亢進し、間接的に破骨細胞分化を制御する。**骨芽細胞分化過程において、IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の制御を受ける分子の網羅的な検索を行う目的にて、野生型および IRE1 $\alpha$  を欠損したマウス胎児繊維芽細胞を利用し、遺伝子発現の解析を行った。その結果、IRE1 $\alpha$  欠損細胞では PTHR の発現が極めて強く減少していることが明らかとなった。PTHR は PTH および PTHrP 共通の受容体であり、カルシウム代謝、軟骨細胞分化、骨転移などに関与する重要な分子であることから、さらに解析を試みた。遺伝子改変マウス

由来の細胞、および siRNA を用いて実験を行ったところ、IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路は PTHR の発現を正に制御していることが確認された。さらに PTHR のプロモーター領域のルシフェラーゼ実験および染色体免疫沈降実験から、XBP1 が直接 PTHR のプロモーター領域に結合し、その転写を促進することが明らかとなった。IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路を抑制した骨芽細胞では PTHR の発現不全のため、PTH に対し不応答性であり、このため、PTH による RANKL 遺伝子の発現、および破骨細胞分化支持能が著しく低下していることが観察された。以上の結果から、小胞体ストレス応答機構である IRE1-XBP1 経路は PTHR の発現制御を介して、破骨細胞分化を間接的に制御していることが示された（発表論文 11）。

**（6）小胞体ストレス応答は破骨細胞分化を正に制御する。**野生型マウスから骨髓細胞を採取し in vitro における破骨細胞分化実験を行ったところ、IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の抑制にて破骨細胞形成が著明に低下することが観察された。そこで骨髓細胞から IRE1 $\alpha$  を欠損した遺伝子改変マウスを作成し、その表現型を解析したところ、野生型マウスと比較して、破骨細胞数が減少し、骨量が有意に増加していることが明らかとなった。これらの結果から、IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路は破骨細胞分化に対し正に作用することが考えられた。IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路は破骨細胞分化過程において一過性に活性化しており、in vitro の詳細な検討から、破骨細胞分化過程で生じる小胞体からのカルシウム放出によって小胞体ストレス応答が惹起されることが示された。興味深いことに、IRE1 $\alpha$  を欠損した骨髓細胞においては破骨細胞分化に必須の転写因子である NFATc1 の発現が低下しており、IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路と Nfatc1 遺伝子の転写活性を検討したところ、XBP1 は Nfatc1 の転写因子として機能することが明らかとなった。以上から、破骨細胞分化初期に生じる小胞体からのカルシウム放出が小胞体ストレス応答を惹起し、IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路を介して NFATc1 の発現を促進することで、破骨細胞分化を促進することが示された（発表論文 6）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件) 2, 5 以外全て査読あり

1. Shimoda M, Horiuchi K, Sasaki A, Tsukamoto T, Okabayashi K, Hasegawa H, Kitagawa Y, Okada Y. 2016. Epithelial Cell-Derived  $\alpha$  Disintegrin and Metalloproteinase-17 Confers Resistance to Colonic Inflammation Through EGFR Activation. *EBioMedicine* 5: 114-24
2. 堀内圭輔. 破骨細胞分化における

不良タンパク質応答 . 2016 . Clinical Calcium . 26 : 601-608 .

3. Horiuchi K, Tohmonda T, Morioka H. 2016. The unfolded protein response in skeletal development and homeostasis. Cell Mol Life Sci

4. Uchikawa S, Yoda M, Tohmonda T, Kanaji A, Matsumoto M, Toyama Y, Horiuchi K. 2015. ADAM17 regulates IL-1 signaling by selectively releasing IL-1 receptor type 2 from the cell surface. Cytokine 71: 238-45

5. 堀内圭輔, 水野早希子, 松本守雄, 中村雅也. 2015 . 筋衛星細胞の機能と恒常性維持 . 関節外科 34 : 88-97 .

6. Tohmonda T, Yoda M, Iwawaki T, Matsumoto M, Nakamura M, Mikoshiba K, Toyama Y, Horiuchi K. 2015. IRE1alpha/XBP1-mediated branch of the unfolded protein response regulates osteoclastogenesis. J Clin Invest 125: 3269-79

7. Mizuno S, Yoda M, Shimoda M, Tohmonda T, Okada Y, Toyama Y, Takeda S, Nakamura M, Matsumoto M, Horiuchi K. 2015. A Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10) Is Indispensable for Maintenance of the Muscle Satellite Cell Pool. J Biol Chem 290: 28456-64

8. Kobayashi T, Glatz M, Horiuchi K, Kawasaki H, Akiyama H, Kaplan DH, Kong HH, Amagai M, Nagao K. 2015. Dysbiosis and Staphylococcus aureus Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. Immunity 42: 756-66

9. Cui D, Arima M, Takubo K, Kimura T, Horiuchi K, Minagawa T, Matsuda S, Ikeda E. 2015. ADAM12 and ADAM17 are essential molecules for hypoxia-induced impairment of neural vascular barrier function. Sci Rep 5: 12796

10. Yoda M, Kimura T, Tohmonda T, Morioka H, Matsumoto M, Okada Y, Toyama Y, Horiuchi K. 2013. Systemic overexpression of TNFalpha-converting enzyme does not lead to enhanced shedding activity in vivo. PLoS One 8: e54412

11. Tohmonda T, Yoda M, Mizuochi H, Morioka H, Matsumoto M, Urano F, Toyama Y, Horiuchi K. 2013. The IRE1alpha-XBP1 pathway positively regulates parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor expression and is involved in pth-induced osteoclastogenesis. J Biol Chem 288: 1691-5

12. Saito K, Horiuchi K, Kimura T, Mizuno S, Yoda M, Morioka H, Akiyama H, Threadgill D, Okada Y, Toyama Y, Sato K. 2013. Conditional inactivation of TNFalpha-converting enzyme in chondrocytes results in an elongated growth plate and shorter long bones. PLoS One 8: e54853

〔学会発表〕(計 16 件)

1. Horiuchi K, A Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10) Is Indispensable for Maintenance of the Muscle Satellite Cell Pool. Gordon Research Conference. 2015-6-21 . Barga, (Italy).

2. 水野早希子, 依田昌樹, 松本守雄, 中村雅也, 堀内圭輔. ADAM10-Notch シグナルは筋衛星細胞の恒常性維持に必須である. 日本骨代謝学会 .2015-7-24. 京王プラザホテル (東京都, 新宿).

3. 水野早希子, 依田昌樹, 松本守雄, 中村雅也, 堀内圭輔. 筋衛星細胞における ADAM10 の機能解析 .日本整形外科学会基礎学術集会 . 2015-10-22 . 富山国際会議場 (富山県, 富山市).

4. 堀内圭輔, 東門田誠一, 依田昌樹, 松本守雄, 戸山芳昭. 小胞体ストレス応答は破骨細胞分化を正に制御する 日本整形外科学会基礎学術集会. 2014-9-10. 城山観光布ホテル (鹿児島県, 鹿児島市).

5. 木場健, 湯浅和樹, 東門田誠一, 戸山芳昭, 中村雅也, 堀内圭輔. 廃用性筋萎縮症における小胞体ストレス応答の機能解析 日本整形外科学会基礎学術集会. 2014-9-10. 城山観光布ホテル (鹿児島県, 鹿児島市).

6. 堀内圭輔, 水野早希子, 戸山芳昭, 中村雅也. Notch シグナリングによる筋衛星細胞恒常性維持 日本整形外科学会基礎学術集会. 2014-9-10. 城山観光布ホテル(鹿児島県, 鹿児島市).

7. 堀内圭輔, 東門田誠一, 依田昌樹, 松本守雄, 戸山芳昭. 不良タンパク質応答に機能する IRE1a-XBP1 経路は新規の破骨細胞分化誘導因子である 日本整形外科学会学術総会. 2014.5.23. 神戸ポートピアホテル(神戸市, 兵庫県).

8. 東門田誠一, 依田昌樹, 松本守雄, 戸山芳昭, 堀内圭輔. 破骨細胞分化における IRE1a-XBP1 経路の機能解析 日本骨代謝学会. 2014-7-25 . 大阪国際会議場 (大阪府, 大阪市).

9. 依田昌樹, 水野早季子, 秋山治彦, 松本守雄, 戸山芳昭, 堀内圭輔. 軟骨細胞特異的な ADAM10-Notch シグナルの抑制は顕著な成長障害を来す 日本骨代謝学会. 2014-7-25 .大阪国際会議場(大阪府, 大阪市).

10. 日方智宏, 堀内圭輔, 藤田順之, 石井賢, 遠藤弘一, 斎藤一史, 戸山芳昭, 松本守雄. ヒト腰椎骨組織におけるミニモデリング 日本骨形態計測学会. 2014-6-12. さっぽろ芸文館(札幌市, 北海道).

11. 水野早季子, 堀内圭輔, 木村徳宏, 岡田保典, 松本守雄, 戸山芳昭. 軟骨細胞特異的に ADAM10 を欠損したマウスは著明な成長障害を呈する 日本軟骨代謝学会. 2013-3-2 .千歳ライフサイエンスセンター(大阪府, 豊中市).

12. 堀内圭輔, 斎藤憲太, 佐藤和毅, 松本守雄, 戸山芳昭. TNF $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM17)は EGFR を介して成長板肥大層の吸収を間接的に制御する 日本整形外科学会基礎学術集会. 2013-10-18 .幕張メッセ.(千葉県, 千葉市).

13. 堀内圭輔 東門田誠一 戸山芳昭. 骨芽細胞における不良蛋白質応答は副甲状腺受容体の発現を制御する 日本整形外科学会学術総会. 2013-5-23 . 広島グリーンアリーナ(広島県, 広島市).

14. 東門田誠一 戸山芳昭 堀内圭輔. 小胞体ストレス応答機構 IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路は新規の破骨細胞分化制御因子である 運動器科学研究会. 2013-9-13. 汐留コンファレンスセンター(東京都, 港区).

15. 堀内圭輔 東門田誠一 戸山芳昭. 骨芽細胞に発現する TACE は EGFR を介して間接的に破骨細胞を誘導する 運動器科学研究会. 2013-9-13. 汐留コンファレンスセンター(東京都, 港区).

16. 湯浅和樹, 戸山芳昭, 堀内圭輔. 筋萎縮関連候補因子の探索 運動器科学研究会. 2013-9-13. 汐留コンファレンスセンター(東京都, 港区).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

## 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

依田 昌樹 (YODA, Masaki)  
慶應義塾大学・医学部・特任助教  
研究者番号: 30464994

東門田 誠一 (TOHMONDA, Takahide)  
慶應義塾大学・医学部・特任助教  
研究者番号: 40415237

### (3)連携研究者

戸山 芳昭 (TOYAMA, Yoshiaki)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号: 40129549