

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592811

研究課題名(和文)破骨細胞のRANKLのシグナルプラットフォーム形成におけるカルデクリンの抑制機構

研究課題名(英文)Inhibitory mechanism of caldecrin on RANKL-stimulated signaling platform formation in the osteoclasts

研究代表者

友村 明人 (TOMOMURA, Akito)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：60188810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞の分化における血清カルシウム降下因子カルデクリンの抑制機構を検討した。RAW264.7細胞ではRANKL刺激によりラフト非依存性シグナル経路(ERK, NF- $\kappa$ B, JNK)とラフト依存性シグナル経路(Fyn, Syk, PLC $\gamma$ )が活性化される。カルデクリンはラフト依存性経路のみを抑制した。細胞膜ラフト膜画分のFynのリン酸化はRANKLにより増加したが、カルデクリンで抑制された。ラフト画分を破壊するとRANKL応答能とカルデクリン抑制効果が消失した。従ってカルデクリンはRANKLシグナルの細胞膜プラットフォームにおけるFynの活性化を抑制し破骨細胞分化を抑制することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Inhibitory mechanism of serum calcium-decreasing factor, caldecrin, on the osteoclastogenesis was investigated. RANKL activates raft-independent signaling pathways (NF- $\kappa$ B, ERK and JNK), and raft-dependent signaling pathway (Fyn, Syk and PLC $\gamma$ ) in the RAW264.7 cells. Caldecrin inhibited only the raft-dependent signaling pathway. The phosphorylation of Fyn on the raft domain of plasma membrane was increased by RANKL but not in the presence of caldecrin. Disruption of raft domain impaired the RANKL-stimulated and caldecrin-inhibited phosphorylation of Fyn. These results suggest that caldecrin inhibits the osteoclastogenesis by the inhibition of the RANKL-stimulated activation of Fyn on the signal platform on the plasma membrane.

研究分野：生化学、分子生物学、骨代謝学

キーワード：カルシウム 破骨細胞 分化 プロテアーゼ ラフト

## 1. 研究開始当初の背景

破骨細胞はマクロファージ前駆細胞が骨芽細胞と結合し、骨芽細胞の RANKL 刺激と免疫受容体刺激で分化が開始され成熟破骨細胞となる。また、骨表面への接着を起点として細胞内にアクチンリングを形成し骨吸収を行う。国内外の多数の報告をもとに以下のモデルが提示されている。

### (1)破骨細胞分化シグナル

骨髄由来のマクロファージは RANKL 刺激により受容体 RANK に結合するアダプター分子 TRAF6 を介して NF- $\kappa$ B, MAPK などが活性化され、c-Fos の発現が誘導される。RANKL 刺激は免疫受容体 (TREM2, OSCAR) に会合している ITAM 配列を持つアダプター分子 DAP12 や FcR をリン酸化する。リン酸化 ITAM にはチロシンキナーゼ Syk やアダプター分子 SLP76, さらに PLC と複合体を形成し、PLC により  $Ca^{2+}$  振動が発生する。細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇はカルモジュリンとカルシニューリンを活性化し、細胞質内 NFAT を核移行させ NF- $\kappa$ B と c-Fos の共同で破骨細胞分化遺伝子の発現を促進する。RANKL 刺激はチロシンキナーゼ Tec を活性化し、これらは SLP76, BLNK と結合し  $Ca^{2+}$  シグナルに合流する。RANK による Src family kinase (SFK) の活性化が Tec や ITAM モチーフのリン酸化を促進することが示唆されている。SFK である Lyn は破骨細胞の分化を負に制御をしている報告があり、正の制御をするチロシンキナーゼの同定が待たれる。

### (2)成熟破骨細胞の骨吸収シグナル

Integrin にはチロシンキナーゼ c-Src が結合しており、さらに Pyk2 が結合し複合体を形成し FAK, Vav, Rac の活性化により Integrin を起点としたアクチンリングが形成される。アクチンリング形成は RANKL 刺激による  $Ca^{2+}$  チャネル TRPV を介した細胞内  $Ca^{2+}$  上昇が関与する。アクチンリング形成によるシーリングゾーンにプロトンが分泌され骨吸収が開始される。これらのレセプターは細胞膜上のコレステロールとスフィンゴ脂質に富む生体膜マイクロドメイン (ラフト) に集合し、シグナルを効率化するプラットフォームを形成する。以上の報告を総合すると、RANKL による破骨細胞分化および成熟破骨細胞の機能維持において、RANK を中心とした免疫受容体、接着受容体 Integrin とのシグナルプラットフォームが細胞膜上「ラフト」で効率よく集合する機構とその時空的関係の包括的解明が待たれていた。

## 2. 研究の目的

Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) による破骨細胞の分化と成熟破骨細胞の骨吸収機能にはリン酸化・脱リン酸化シグナル、 $Ca^{2+}$  シグナルなどが協調的に関係している。これらのシグナルは 2 種類の受容体 (RANK,

immunoreceptor) と接着受容体 integrin のシグナルが協調的に働き、細胞膜シグナルプラットフォームを形成するが、時空的関係が明らかでない。血清カルシウム降下因子カルデクリンは研究代表者等が膵臓から精製クローニングしたプロテアーゼである。これまでの研究で、血清カルシウム降下活性にはプロテアーゼ活性が関与しておらず、プロテアーゼでありながら破骨細胞の形成抑制と成熟破骨細胞の骨吸収抑制作用を併せ持つ機能性タンパク質であることが明らかになってきた。本研究では、破骨細胞の受容体シグナルが細胞膜上で集合しシグナルプラットフォームを形成する過程をカルデクリンが抑制する機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) RAW264.7 細胞の破骨細胞への細胞内分化シグナルを検討した。RANKL (10 ng/ml) で刺激後、経時的に細胞を SDS 化バッファーあるいは RIPA バッファーで反応停止し、細胞内シグナルの活性化を Western blot で検出した。免疫沈降は RANKL 刺激後の RIPA バッファーセルライゼートを抗 Fyn 抗体、あるいは抗 Lyn 抗体で免疫沈降し Western blot を行った。Fyn と Lyn のリン酸化は Y416 のリン酸化を認識する抗 p-c-Src family (Y416) 抗体を用いた。

(2) ラフト画分は RAW264.7 細胞を RANKL で刺激した後、細胞を 1% Triton X-100 で可溶化後、ショ糖密度勾配超遠心することで浮遊してくる膜画分を界面活性剤不溶性膜画分 (ラフト画分) として回収し、Western blot 解析を行った。

(3) ラフト画分に含まれるコレステロールを引き抜く  $\beta$ -メチルシクロデキストリンを RANKL 刺激前に RAW264.7 細胞に前処理することでラフト構造を破壊し RANKL シグナルにおけるラフトの関与を検討した。

## 4. 研究成果

(1) RANKL による破骨細胞分化シグナルは NF- $\kappa$ B p65, JNK, ERK の活性化経路と SFK-Syk-PLC -カルシウムオシレーション経路に大別される。そこでカルデクリンの破骨細胞分化抑制経路を検討した。RANKL による RAW264.7 細胞の破骨細胞分化シグナルに対し、カルデクリンは NF- $\kappa$ B p65, JNK, ERK のリン酸化を抑制しなかった一方、Syk, PLC のリン酸化を抑制した。この抑制は PLC シグナル下流のカルシウムオシレーションや破骨細胞分化マスター転写調節因子 NFATc1 の核内移行と自己遺伝子活性化の抑制にリンクし、破骨細胞の分化の抑制を引き起こした。従って、RANKL の分化シグナル経路において、カルデクリンは NF- $\kappa$ B や MAPK 経路には影響せず、Syk-PLC -Calcium oscillation-NFATc1 経路を抑制した。

(2)RANKL 受容体 RANK は SFK を活性化し、シグナル下流の Syk-PLC の活性化にリンクする。成熟破骨細胞では c-Src が破骨細胞の分化とともに発現し KO マウスでは破骨細胞分化には障害がみられないが骨吸収機能が障害される。一方、分化初期には c-Src 以外の SFK が発現している。Fyn KO マウスでは破骨細胞分化が障害される。Lyn KO マウスでは破骨細胞分化が促進される。そこで RANKL による RAW264.7 細胞の破骨細胞分化初期における Fyn と Lyn のリン酸化に対するカルデクリンの効果を検討した。RANKL 刺激後の抗 Fyn 抗体あるいは抗 Lyn 抗体による免疫沈降と Western blot の結果、Fyn は Lyn と比較し RANKL(R)によりリン酸化が顕著に亢進した。一方、RANKL 共存下におけるカルデクリン(R+C)は RANKL による Fyn のリン酸化を無処理(N)レベルまで抑制した。従って、カルデクリンは RANKL による Fyn のリン酸化を抑制し、下流の Syk-PLC -NFATc1 経路を抑制することが明らかになった。

(3)ラフト画分(1% Triton X-100 不溶性膜画分)はショ糖密度勾配超遠心により分離された。ラフト画分にはラフトマーカである Flotillin が検出され、ラフト画分に局在しないトランスフェリン受容体は可溶性画分に検出された。RANKL 刺激によりラフト画分の Fyn のリン酸化は促進された。また、Syk は RANKL 刺激によりラフト画分への移行が亢進した。一方、ERK は Triton X-100 可溶性膜画分(非ラフト画分)に局在し RANKL 刺激によってリン酸化が促進された。カルデクリン処理によりラフト画分での Fyn のリン酸化は抑制された。

(4)細胞膜ラフト形成にはコレステロールが必須であり、コレステロールを引き抜く -メチルシクロデキストリンによってラフト形成は抑制される。RANKL 刺激によりラフト画分の Fyn のリン酸化は促進された一方、RANKL による Fyn のリン酸化はカルデクリンにより抑制された。他方、 -メチルシクロデキストリンの前処理により RANKL 刺激による Fyn のリン酸化は抑制され、Fyn のリン酸化にラフトが必要であることが明らかになった。一方、RANKL による ERK のリン酸化は可溶性膜画分でおこり、RANKL でリン酸化が促進されたが、カルデクリン処理は抑制しなかった。

以上の結果から、RANKL の結合により RANK は ERK や NF- $\kappa$ B, JNK などを活性化した後、ラフト画分で Fyn を活性化し Syk をラフト画分へリクルートすることで下流シグナルのカルシウムオシレーションを引き起こすことが示唆された。カルデクリンはラフト画分で Fyn のリン酸化を抑制し、下流のカルシウムシグナルを抑制した。カルデクリンはラフトを中心としたシグナルプラットフォームを直

接抑制することが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Tomomura M, Suzuki R, Shirataki Y, Sakagami H, Tamura N, Tomomura A, Rhinacanthin C Inhibits Osteoclast Differentiation and Bone Resorption: Roles of TRAF6/TAK1/MAPKs/NF- $\kappa$ B/NFATc1 Signaling. PLoS One, 2015, 10(6), e0130174, DOI: 10.1371/journal.pone.0130174.

Horii H, Suzuki R, Sakagami H, Tomomura M, Tomomura A, Shirataki Y. New biological activities of Rhinacanthins from the root of Rhinacanthus nasutus. Anticancer Res, 2013, 33(2), 453-459, <http://ar.iijournals.org/>

Suzuki R, Tanaka T, Yamamoto M, Sakagami H, Tomomura M, Tomomura A, Satoh K, Shirataki Y. In search of new biological activities of isolates from Odontoglossum Harvengtense 'Tutu'. In Vivo, 2012, 26(6), 993-999, <http://iv.iijournals.org/>

Matsuta T, Sakagami H, Tanaka S, Machino M, Tomomura M, Tomomura A, Yasui T, Itoh K, Sugiura T, Kitajima M, Oizumi H, Oizumi T. Pilot clinical study of Sasa senanensis Rehder leaf extract treatment on lichenoid dysplasia. In Vivo, 2012, 26(6), 957-962, <http://iv.iijournals.org/>

Inoue H, Miyazaki Y, Kikuchi K, Yoshida N, Ide F, Ohmori Y, Tomomura A, Sakashita H, Kusama K. Podoplanin promotes cell migration via the EGF-Src-Cas pathway in oral squamous cell carcinoma cell lines. J Oral Sci, 2012, 54(3), 241-250, <http://jos.dent.nihon-u.ac.jp/>

Tomomura M, Hasegawa H, Suda N, Sakagami H, Tomomura A. Serum calcium-decreasing factor, caldecrin, inhibits receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling and actin ring formation in mature osteoclasts via suppression of Src signaling pathway. J Biol Chem, 2012, 287(22), 17963-17974, DOI: 10.1074/jbc.M112.358796.

〔学会発表〕(計 10 件)

Tomomura M, Suzuki R, Shirataki Y, Sakagami H, Tomomura A. Geranyl-geraniol enhances osteoblast differentiation, while it suppresses osteoclast differentiation, 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月、横浜

友村明人, 長谷川紘也, 田村暢章, 須田直人, 友村美根子. 血清カルシウム降下因子カルデクリンはRANKLによる細胞膜ラフト画分のFynの活性化を抑制して破骨細胞の分化を抑制する. 第87回日本生化学会大会, 2014年10月, 京都

友村美根子, 鈴木龍一郎, 渡部美緒, 白瀧義明, 坂上宏, 友村明人. リナカンチンCはRANKLによるTRAF6-TAK1複合体形成を阻害し、破骨細胞の分化を抑制する. 第87回日本生化学会大会, 2014年10月, 京都

Tomomura A, Tomomura M. Serum calcium-decreasing factor, caldecrin, suppresses osteoclastogenesis by regulation for the RANKL-mediated Src family kinase. 36th Annual Meeting The American Society for Bone and Mineral Research, 2014年9月, Houston, USA

Tomomura M, Suzuki R, Shirataki Y, Sakagami H, Tomomura A. Rhinacathin C inhibits RANKL-induced Osteoclast differentiation by suppressing MAPKs/NF-kB/NFATc1 pathways through preventing TRAF6-TAK1 formation. 36th Annual Meeting The American Society for Bone and Mineral Research, 2014年9月, Houston, USA

Tomomura A, Hasegawa H, Suda N, Sakagami H, Tomomura M. Serum Calcium- decreasing Factor, Caldecrin, Inhibits RANKL-mediated Ca<sup>2+</sup> Signaling and Actin Ring Formation in Mature Osteoclasts via Suppression of the Src Signaling Pathway. 35th Annual Meeting The American Society for Bone and Mineral Research, 2013年10月, Minneapolis, USA

友村明人, 坂上宏, 友村美根子. 血清カルシウム降下因子カルデクリンはRANKLによるSrc family kinaseを介する破骨細胞の分化を抑制する. 第86回日本生化学会大会, 2013年9月, 横浜

友村明人, 長谷川紘也, 須田直人, 坂上宏, 友村美根子. Serum calcium- decreasing factor, caldecrin, inhibits bone resorption of mature osteoclasts via inhibition of RANKL-mediated TRAF6/Src signal transduction. 第85回日本生化学会大会, 2012年12月, 福岡

友村美根子, 鈴木龍一郎, 鈴木里奈, 二瓶春菜, 白瀧義明, 坂上宏, 友村明人. In vitroでの破骨細胞分化におけるrhinacanthin Cの抑制効果. 第85回日本生化学会大会, 2012年12月, 福岡

長谷川紘也, 友村美根子, 友村明人, 須田直人. 成熟破骨細胞に対する血清カルシウム降下因子カルデクリンの影響. 第71回日本矯正歯科学会, 2012年9月, 盛岡

〔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:

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

友村 明人 (Tomomura, Akito)  
明海大学・歯学部・教授  
研究者番号: 60188810

### (2) 研究分担者

友村 美根子 (Tomomura, Mineko)  
明海大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 30217559