

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791566

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答経路を介した破骨細胞分化制御機構の解明

研究課題名(英文)ER stress-mediated regulation of osteoclast differentiation

研究代表者

東門田 誠一(Takahide, Tohmonda)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：40415237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、IRE1-XBP1経路を中心とした小胞体ストレス応答機構の破骨細胞分化における機能解明である。骨髄細胞にてIRE1を不活化したIre1^{-/-}Mx1creマウスでは、野生型と比べて、海綿骨表面の破骨細胞数の減少とともに、骨量の増加が観察された。この知見をもとに生化学的な解析を行ったところ、XBP1がNfatc1のプロモーターに結合し、Nfatc1の転写因子として機能することを見出した。以上の結果からIRE1-XBP1経路は、破骨細胞分化の過程で活性化され、その結果産生された活性型XBP1は核へ移行しNfatc1遺伝子の転写を正に制御し、破骨細胞の分化を促進することが示された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to clarify the IRE1-XBP1 pathway, one of the major branch of UPR pathways, in the regulation of osteoclast differentiation. First, we generated Ire1^{-/-}Mx1cre mice, in which the Ire1 locus can be excised in hematopoietic cells by injecting pl-pC. The analyses showed a significant increase in bone volume in Ire1^{-/-}Mx1cre mice compared to wild type due to a decrease in osteoclast number and activity. Next, transcriptional analysis revealed that IRE1-deficient osteoclast precursors are defective in inducing Nfatc1, the master regulator of osteoclast differentiation. Most importantly, we found that XBP1, a transcription factor that is activated by IRE1, binds to the promoter of Nfatc1 gene and promotes its transcription. These observations indicate that the IRE1-XBP1 pathway is a novel regulator of Nfatc1 transcription.

研究分野：骨代謝

キーワード：小胞体ストレス 破骨細胞 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

小胞体ストレス応答とは、小胞体に不良タンパク質が蓄積した際に、不良タンパク質を解消するために動員される細胞の防御機構である。分泌性タンパク質を活発に産生する細胞では、不良タンパク質の生成量が增大しており、これに対応するために小胞体ストレス応答機構が活発に働いている。

骨代謝を担う主要な細胞である骨芽細胞と破骨細胞は、骨基質と骨分解酵素を、それぞれ大量に分泌しており、小胞体ストレス応答機構が、大量に産生される不良タンパク質に対処し、細胞の生理機能の維持に働いている。

研究代表者は、これまで骨芽細胞における小胞体ストレス応答機構の機能解析を行ってきたが、その結果、2011年に主要な小胞体ストレス応答経路である IRE1 -XBP1 経路が、不良タンパク質の解消だけでなく、骨芽細胞分化決定因子である *Osterix* 遺伝子の転写を制御していることを明らかにした (Tohmonda et al. EMBO report 2011)。この成果により、「小胞体ストレス応答機構が細胞分化を直接制御する」という新しい概念が初めて示された。

小胞体ストレス応答機構による細胞分化の直接的制御は、骨芽細胞以外の細胞でも機能している可能性がある。しかしながら、この観点に立った研究は、代表者の研究により、緒についたばかりであり、基礎的理解のほとんどが未解明であった。そこで本課題において、骨基質分解酵素を活発に分泌する破骨細胞を研究の対象として、小胞体ストレス応答機構と細胞分化の関係を明らかにすることを計画した。

特に破骨細胞は、骨粗鬆症や関節リウマチの際の骨破壊に重要な役割を担っている細胞である。従って破骨細胞の分化に関する新しい仕組みを明らかにすることは、臨床研究に多大な成果をもたらすことが予想される。

2. 研究の目的

小胞体ストレス応答機構 IRE1 -XBP1 経路による破骨細胞分化制御機構を明らかにすることが目的であり、さらには破骨細胞が主要な役割を担っている骨関連疾患に対する創薬の研究基盤を提供することを視野入れて研究を実施した。以下の項目を明らかにすることを主要な研究目標とした。

- (1)破骨細胞分化過程での IRE1 -XBP1 経路の活性化機構の解明
- (2)転写因子 XBP1 が調節する破骨細胞分関連遺伝子の同定及び作用機序の解明
- (3)破骨細胞特異的 IRE1 欠損マウスを用いた組織学的解析

- (4) IRE1 阻害剤の破骨細胞分化に対する効果の検討及び評価

3. 研究の方法

- (1)破骨細胞分化における IRE1 -XBP1 経路活性化のしくみの解明

これまでに研究代表者は、マウスの骨髄由来のマクロファージにおいて、破骨細胞分化の初期に IRE1 -XBP1 経路が活性化され、活性型(スプライス型)の *XBP1*mRNA の産生量が一活性に上昇することを見いだしていた。そこで本研究項目では IRE1 -XBP1 経路の活性化の原因について以下の二つの観点から活性化の究明を行うことにした。

小胞体内腔のカルシウム濃度の関与

特定の分泌タンパク質の産生量の増加、

である。破骨細胞分化の際に、IP3 レセプターを通して、小胞体から細胞質へ Ca^{2+} の流入が生じるが、このことにより小胞体内腔の Ca^{2+} 濃度が変化し、小胞体ストレスが発生することが考えられた。そこで IP3 レセプター欠損細胞を用いて、IRE1 -XBP1 経路の動態を解析することにした。

一方、破骨細胞特異的な分泌性タンパク質の産生状態の網羅的な解析を行い、IRE1 -XBP1 経路の活性化の時期と比較検討を行った。

以上の二つの観点から、IRE1 -XBP1 経路活性化のしくみを明らかにすることを計画した。

- (2)XBP1 分子のターゲット遺伝子の同定、及び破骨細胞分化における役割の明確化

本研究課題実施以前に研究代表者は、マウス骨髄由来マクロファージにおいて IRE1 -XBP1 経路を RNA 干渉法により欠損させると、破骨細胞の分化が抑制されるとともに、破骨細胞分化の最終決定因子である *Nfatc1* mRNA の発現が、顕著に低下することを見いだしていた。そこで本研究項目では、IRE1 -XBP1 経路による *Nfatc1* の発現制御機構を調べることにした。*NFATc1* プロモーターを用いたレポーターアッセイ並びに、抗 XBP1 抗体を用いて *NFATc1* プロモーターに対するクロマチン免疫沈降実験等を行い、分子作用機序の詳細を明らかにすることを計画した。

- (3)破骨細胞特異的 IRE1 欠損マウスの解析

In vivo における IRE1 -XBP1 経路の役割とその重要性を知るためには、破骨細胞

において IRE1 遺伝子を欠損させたときの、生体組織の解析が必須である。そこで pl-pC の投与により破骨細胞を含む血球系の細胞で Cre を発現するマウス (Mx1-Cre) と、IRE1 flox マウスとの交配により、破骨細胞で IRE1 分子を欠損させたマウスの作成を行った。

(4)破骨細胞特異的 IRE1 欠損マウスを用いた組織解析及び破骨細胞分化能の検討

作出された破骨細胞特異的 IRE1 欠損マウスの骨形態計測、uCT 解析を行い、骨代謝における IRE1 -XBP1 経路の役割と、その重要性を明らかにすることを計画した。さらに IRE1 欠損マウスの骨髄由来マクロファージを用いて、破骨細胞分化能の検討を試みた。

(5)IRE1 阻害剤の破骨細胞分化に対する効果の検討及び評価

数種類の IRE1 特異的に作用するエンドリボヌクレアーゼ阻害剤の開発が報告されている (Papandreou et al. Blood 2011)。そこで、IRE1 阻害剤が破骨細胞分化に関して、どのような影響をもつかについて検討を行った。

4. 研究成果

(1)破骨細胞分化における IRE1 -XBP1 経路活性化機構の解明

破骨細胞分化過程における小胞体からのカルシウム流入は、Type2 及び Type3 IP3 受容体に担われている。小胞体からのカルシウム流入と IRE1 -XBP1 経路の活性化の関係を調べるため、Type2, 3-IP3 受容体欠損細胞を用いて、破骨細胞分化を試みたところ、小胞体からのカルシウム流入が停止するとともに、IRE1 -XBP1 経路の活性化が抑制されることが明らかとなった。

(2)XBP1 分子のターゲット遺伝子の同定、及び破骨細胞分化における役割の明確化

骨髄細胞において IRE1 を不活化するため、*Ire1* flox/flox マウスを Mx1-Cre マウスと交配した遺伝子改変マウス (*Ire1*^{Mx1cre} マウス) を作出した。*Ire1*^{Mx1cre} マウスの骨髄細胞を用いて、破骨細胞分化を誘導したところ、破骨細胞分化が抑制されるとともに、*Nfatc1* 遺伝子の発現が有意に減少していた。そこで野生型の骨髄細胞を用いたクロマチン免疫沈降実験と、*Nfatc1* プロモーターによる *in vitro* 転写解析実験をしたところ、

XBP1 が *Nfatc1* のプロモーターに結合し、発現を正に制御していることが示された。

(3)破骨細胞特異的 IRE1 欠損マウスの組織学的解析

Ire1^{Mx1cre} マウスの骨組織を uCT 及び骨形態計測法により詳しく解析を行ったところ、野生型と比較して、海綿骨表面の破骨細胞数が減少するとともに、骨量が増加していることが明らかとなった。

(4)破骨細胞特異的 IRE1 欠損マウスを用いた組織解析及び破骨細胞分化能の検討

野生型マウス骨髄細胞を用いて、破骨細胞分化に対する IRE1 阻害剤の効果の検討を行った。その結果、IRE1 阻害剤は、破骨細胞分化を阻害する効果があることが示された。その分化抑制効果に関して、IRE1 -XBP1 経路による *Nfatc1* の転写誘導が抑制されていることが原因であることが明らかとなった。

以上の研究成果から、以下の知見が得られた。

IRE1 -XBP1 経路は、破骨細胞分化の過程で発生する生理的な小胞体ストレスにより活性化され、その結果産生された活性型 XBP1 は核へ移行し *Nfatc1* 遺伝子の転写を活性化することにより、破骨細胞分化を促進することが明らかとなった。また IP3 受容体を介した小胞体内腔のカルシウム濃度の変化が、破骨細胞分化過程における IRE1 -XBP1 経路の活性化要因の一つであることが明らかになった。

小胞体ストレス応答経路が破骨細胞分化を制御していることを示したのは、これまでのところ最初の報告であり、非常に重要な意義を持っていると考えられる。今後、骨粗しょう症、関節リウマチの骨破壊を抑える治療システムとして、小胞体ストレス応答経路に対する介入という新しい選択肢が期待できる。

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 1 件)

- (1)The IRE1 -XBP1 pathway positively regulates parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor expression and is involved in pth-induced osteoclastogenesis Tohmonda T, Yoda M, Mizuochi H, Morioka H, Matsumoto M, Urano F,

Toyama Y, Horiuchi K. Journal of
Biological Chemistry 査読有 2013 Jan
18;288(3):1691-5. doi:
10.1002/jor.22091. Epub 2012 Feb 22

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1)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 IRE1 -XBP1 経路の機能解析 第32回日本骨代謝学会学術集会 2014年7月24日 大阪府立国際会議場 大阪府大阪市北区
- (2)Tohmonda T., Yoda M., Toyama Y., Horiuchi K. The IRE1 -XBP1 pathway induces osteoclast differentiation via promoting transcription of *Nfatc1*. *The 5th EMBO meeting* 2013年9月22日 アムステルダム - ライ国際会議場 アムステルダム、オランダ
- (3)東門田誠一 小胞体ストレス応答機構 IRE1 -XBP1 経路は新規の破骨細胞分化制御因子である 第14回 運動器科学研究会 2013年9月15日 汐留カンファレンスセンター 東京都港区
- (4)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ホルモン受容体の発現を制御する 第46回日本整形外科学会学術総会 2013年5月24日 リーガロイヤルホテル広島 広島県広島市中区
- (5)東門田誠一, 堀内圭輔, 戸山芳昭 BMP2を用いた骨芽細胞分化系において、XBP1はPTH/PTHrPレセプターの発現を正に制御する 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月14日 福岡国際会議場マリノメッセ福岡 福岡県福岡市中区
- (6)東門田誠一, 堀内圭輔, 戸山芳昭 BMP2を用いた骨芽細胞分化系において、XBP1はPTH/PTHrPレセプターの発現を正に制御する 第30回日本骨代謝学会学術総会 2012年7月19日 京王プラザホテル 東京都新宿区

6. 研究組織

- (1)研究代表者
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