

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791980

研究課題名(和文) ユビキチンプロテアソームシステムの破骨細胞分化における役割

研究課題名(英文) Role of Ubiquitin-Proteasome System in Osteoclast Differentiation

研究代表者

福島 秀文 (Hidefumi, Fukushima)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：70412624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：ユビキチン経路の破骨細胞分化における役割について、必須分化シグナルであるNF- κ Bシグナル分子であるNF κ B2/p100がNIK/IKK α の活性化にともないb-TRCPによりユビキチン化され、NF κ B2/p52に部分的分解される事が破骨細胞分化に重要である事を報告してきた。今回、このNF κ B2の部分的分解にはAkt/Cot- IKK α 活性化にともなう経路が存在する事を明らかにした。さらにNF κ B2には、GSK3依存的にp100そのものをFBW7がユビキチン化し分解する経路が存在する事が明らかになった。以上のことから、NF κ B2は複数のユビキチン化による制御を受けている事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitin-Proteasome pathway has been recently shown to influence osteoclast formation and function, the precise molecular cascade underlying these effects is presently unclear. Recent our studies showed that b-TRCP induced processing of NF κ B2/p100 to p52 is the critical step in activation of RANKL induced alternative NF- κ B signaling pathway. This processing event is triggered by NIK- IKK α induced phosphorylation of NF κ B2. In this study, we found novel activation mechanism of b-TRCP induced NF κ B2/p100 processing pathway via Akt/Cot- IKK α activation. Furthermore, we identified Fbw7 as a physiological E3 ligase controlling NF κ B2/p100's stability. It further implicates that Fbw7 might exert osteoclast differentiation by regulating NF- κ B activity. These results suggested that NF κ B2 is the unique molecule regulated by multiple ubiquitin proteasomal pathways in osteoclast differentiation.

研究分野：機能系基礎歯科学

科研費の分科・細目：生理学

キーワード：破骨細胞 ユビキチン化 プロテアソーム SCF型ユビキチンリガーゼ NF- κ B FBW7 b-TRCP

1. 研究開始当初の背景

骨環境の恒常性は、ビタミン D3 や PTH、カルシトニンといった内分泌調節支配の下、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成によって営まれる骨リモデリングによって保たれている。骨粗鬆症や関節リウマチ、歯周病などではこの恒常性が崩れ、破骨細胞による骨吸収が優位になることにより骨破壊が引き起こされることが考えられている。

骨吸収を行う破骨細胞は骨芽細胞などの支持により、骨芽細胞に発現する RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand)が、破骨細胞前駆細胞の発現する RANK (Receptor activator of NF- κ B)に結合することにより分化する。RANKL により引き起こされる破骨細胞分化に必須な RANK シグナルは、古典的/非古典的 NF- κ B シグナル、c-fos/AP-1 シグナルを活性化させ、最終的にマスター転写因子である NFATc1 を活性化させる。これらのシグナルのなかで NF- κ B シグナルは、下流分子である TRAF6 のノックアウトマウスや、NF- κ B1、NF- κ B2 の2重欠損マウスが破骨細胞分化の欠損した大理石病という表現型を示すことなどから、破骨細胞の分化に必須のシグナルであると考えられている(図1)。

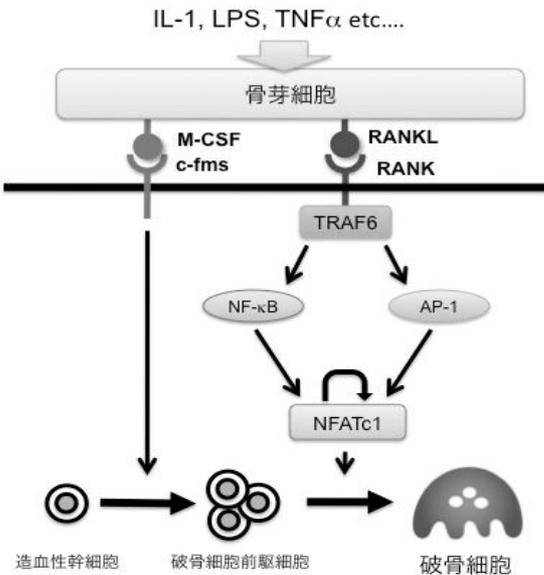


図1：破骨細胞の分化過程

NF- κ B は、炎症や免疫応答のみならず癌化や細胞分化などの様々な生命現象に関わる。NF- κ B の活性化機構は、主に炎症性サイトカイン刺激で見られる I κ B キナーゼ(I κ B κ) による I κ B のリン酸化と分解を伴う「古典的経路」と、CD40 リガンドやリンホトキシン などのリンパ節形成に関わるサイトカイン刺激で見られる NF- κ B-inducing kinase (NIK)による IKK の活性化とそれに続く NF- κ B2 の p100 から p52 へのプロ

セシングが関与する「非古典的経路」が存在する(Hayden MS, et.al. Cell. 2008)(図2)。破骨細胞分化誘導因子 RANKL は両活性化経路を活性化する。さらに -TRCP は、I κ B の分解および p100 のプロセシングに重要である。また、脱ユビキチン化酵素である CYLD は、NF- κ B シグナルの活性化に必要なユビキチン化を負に制御していることが知られている(Jin W, et.al. J Clin Invest. 2008)。しかしながら -TRCP ユビキチン・プロテアソーム システムの破骨細胞分化における役割は明らかになっていない。

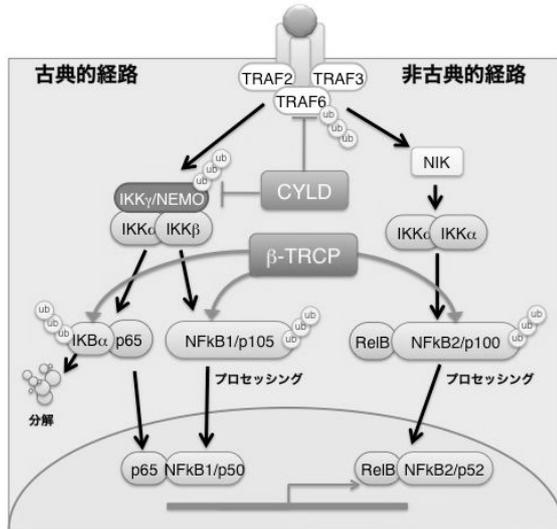


図2：NF- κ B シグナル経路

2. 研究の目的

近年、ユビキチン・プロテアソーム阻害剤が歯周病や関節リウマチなどの骨破壊性疾患の治療に有効であることが示唆されているが、その作用機序は明らかになっていない。しかしながら、ユビキチン・プロテアソーム阻害剤の主な抗炎症作用機序の1つにNF- κ B シグナルの抑制である事から、RANKL による NF- κ B シグナルの活性化を阻害する事が、破骨細胞に対する効果によるものと予想される。

そこで今回我々は、RANKL シグナルのうち、特に NF- κ B シグナルに着目し、破骨細胞分化におけるユビキチン・プロテアソーム システムの役割を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

In Vitro 解析： ユビキチン・プロテアソーム阻害剤を破骨細胞分化系に作用させ、シグナル伝達経路の解析を、cDNA マイクロアレイ法、PCR 法、ウェスタンブロッティング法を用いて行った。その後、変化の見られた分子のクローニングを行うと共に、分子特異的な shRNA を設計し、ウィルスベクターを構

築し過剰発現を行い、シグナル伝達および破骨細胞分化への効果について検討した。

In Vivo解析: In Vitro実験で同定した分子のノックアウトマウスなどのモデルマウスの骨量や、骨硬組織の解析を行い、個体レベルでの分子の骨代謝における役割について検討した。また、それぞれのマウスの骨髄を採集し、破骨細胞分化誘導を行いその分化シグナルに対する影響を解析した。

4. 研究成果

破骨細胞分化における ユビキチン・プロテアソーム システムによる NF- B 2の制御機構の解明

β-TRCPによるNF B 2プロセッシングの破骨細胞分化における役割: タンパク分解に関わるユビキチン経路の破骨細胞分化における役割について、破骨細胞分化において重要な役割をしているNF Bシグナルの分子の1つであるNF B 2のユビキチン化による制御機構に着目し検討を行った。

これまで我々は、NIKの機能欠失型の点変異を持つ *aly/aly* マウスを用いて解析を行ったところ、*aly/aly* マウスは破骨細胞の分化不全により骨硬化症状状態になっている事が明らかにしてきた。さらに NIKの基質であるNF B 2/p100は破骨細胞形成を負に制御しており、NIK/IKKαによるリン酸化にともないユビキチンリガーゼである β-TRCPによりユビキチン化され、NF B 2/p100がNF B 2/p52にプロセッシングされる事が破骨細胞分化に重要である事を報告してきた(Maruyama T, et.al., JBC. 2010)。

今回の検討で我々は、*aly/aly* マウスの破骨細胞分化障害を解除する方法を明かにするために NIK下流分子の過剰発現によるレスキュー実験を行った所、NF B 2/p52とヘテロダイマーを形成する転写因子 RelBにより *aly/aly* マウス由来の破骨細胞分化障害を解除できる事が明らかになった。しかしながら、RelBの過剰発現のみではその分化障害は解除されず、なんらかの機構によるNF B 2/p100のNF B 2/p52へのプロセッシングが必要である事が示唆された。そこで RelB依存的に発現する分子の網羅的解析を行った所、Aktシグナルに関わるMAPキナーゼであるCotが特異的に上昇している事が明らかになった。そこでCotを *aly/aly* マウス由来の破骨細胞に過剰発現した所、破骨細胞分化障害を解除できた。その分子メカニズムとして、CotはIKKαを活性化する事でNF B 2がリン酸化され、β-TRCPによるユビキチン化により、NF B 2/p100がNF B 2/p52へのプロセッシングが引き起こされる事が明らかになった。

以上のことから、破骨細胞分化におけるNF B 2のプロセッシングにはNIK非依存的なAkt-Cot経路を介しIKKαを活性化させ、NF B 2を部分分解する経路が存在する事を明らかにした(Taniguchi R, et.al. JBC. 2014) (図3)。

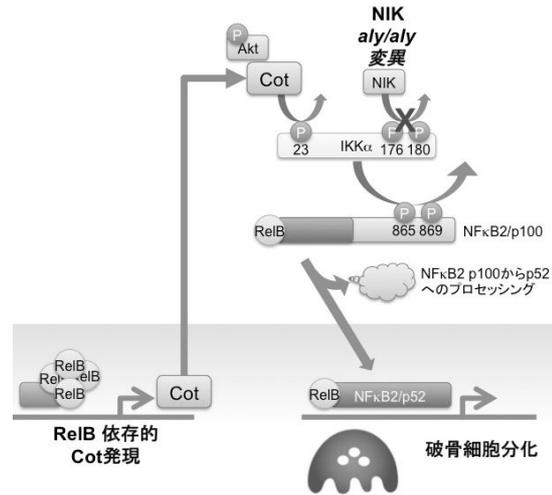


図3: Cotを介したNF B 2制御機構

FBW7によるNF B 2/p100分解機構: NF B 2は先ほど示したように不活性化型のNF B 2/p100と部分分解によって生じる活性化型のNF B 2/p52にわけられる。このプロセッシングは刺激依存性に起こることから、定常状態ではNF B 2/p100が存在し、シグナルを負に制御している。しかしながら多くの細胞においてNF B 2/p100は低いレベルで維持されており、過度な抑制を防ぐと考えられている(Sun SC, Oncogene. 2011)。しかしながら、その量的維持の分子メカニズムは明らかになっていなかった。今回我々は、NF B 2にはGSK3依存的にNF B 2/p100そのものをユビキチンライゲースであるFBW7がユビキチン化し分解する経路が存在する事が明らかになった。FBW7によるNF B 2/p100の分解は、β-TRCPによるNF B 2/p100のNF B 2/p52への部分分解による活性化とことなり、NF B 2/p100によるシグナルの抑制の解除を主に行っている事が明らかになった(Fukushima H, et.al. Cell Rep. 2012) (図4)。

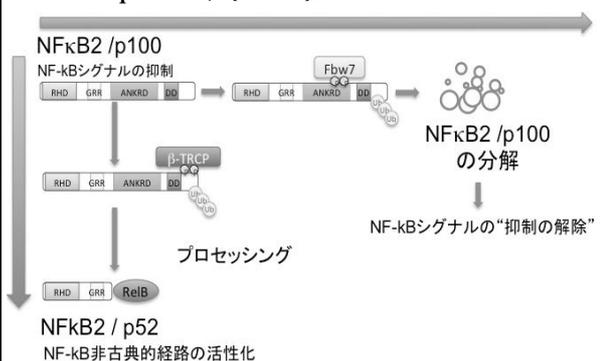


図4: NF B 2の複数の量的制御機構

これらのことから、NF- κ B2は複数のユビキチン化による制御を受けている事が明らかになった。今後は、 μ -TRCPとFBW7、2つのユビキチン化経路によるNF- κ B2制御の生理的役割の違いについて検討を行って行きたいと考えている。

破骨細胞分化における 脱ユビキチン化酵素 Cyld の 量的制御機構の解明

CYLD(cylindromatosis)は非 K48 結合性ポリユビキチン鎖に対する脱ユビキチン化を行う脱ユビキチン化酵素で、家族性円柱腫症で変異している腫瘍抑制因子として発見された。CYLDは、NF- κ Bシグナルの活性化の際に見られる TRAF6のユビキチン化と拮抗的に作用する事により、NF- κ Bシグナルを負に制御していることが知られている。近年、CYLDのノックアウトマウスの解析から、CYLDは破骨細胞分化の抑制因子である事が明らかになった。また、CYLDはPaget氏病の原因遺伝子の1つであると考えられている SQSTM1(p62)と相互作用して TRAF6を制御しており、p62のPaget氏病型の変異はTRAF6-p62-CYLDのコンプレックスの形成不全により破骨細胞の過度な分化の亢進を引き起こされる事が報告されている。

今回我々は、 μ -TRCPの新規基質のスクリーニングの中から、CYLDを同定した。CYLDはRANKL刺激でそのmRNAの発現が上昇する事から、RANKシグナルの後期でRANKシグナルの抑制を行っている事が示唆された。そこで μ -TRCPのノックダウンを行ったところCYLDの発現が安定化し、その際に破骨細胞分化は抑制された。また、IKK α およびIKK β のノックダウンにおいてもCYLDが安定化し、実際に μ -TRCPによるCYLDのユビキチン化および分解にはIKK α/β によるCYLDのリン酸化が必要であった。

μ -TRCPは前述のように破骨細胞の分化に必要なRANKシグナル、特にNF- κ Bシグナル分子の活性化に重要な役割を果たしている事から、破骨細胞におけるCYLDの μ -TRCPによる分解の役割を明らかにするために、CYLDをノックダウンした細胞に μ -TRCP認識部位に変異を入れたCYLDでレスキュー実験をした所、野生型でのレスキューに比べCYLDノックダウンによる破骨細胞形成の促進は抑制された。その際に、TRAF6のユビキチン化は抑制され、下流分子のIKKのリン酸化も抑制された。

以上のことから、 μ -TRCPはRANKのアダプター分子で破骨細胞分化に必須のTRAF6の量的制御を行う事により破骨細胞分化を制御している事が明らかになった(Wu X, et.al., Oncotarget 2014) (図5)

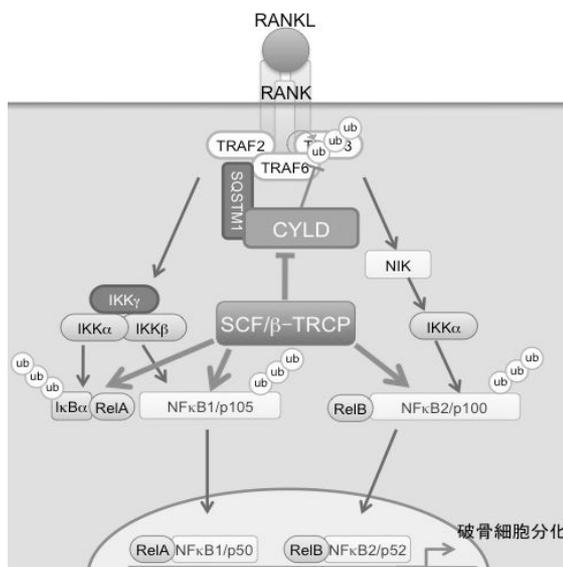


図5： μ -TRCPによるCYLD制御機構

まとめ

今回の検討から、ユビキチン・プロテアソーム経路、とくに μ -TRCPによるNF- κ Bシグナル分子群の量的制御機構は破骨細胞の分化に重要な役割を果たしている事が明らかになった。プロテアソーム阻害剤や μ -TRCPのノックダウンが破骨細胞形成を強力に抑制する事から、ユビキチン・プロテアソーム経路は骨破壊性疾患治療の分子ターゲットとして有望である事が考えられる。さらにリン酸化依存的な μ -TRCPのユビキチン化機構を制御する事ができれば、ピンポイントでリバーシブルな治療薬の開発につながる可能性がある。今後は μ -TRCPやFBW7などのコンディショナルノックアウトを用いたIn Vivo解析から、ユビキチン・プロテアソーム経路の破骨細胞分化における役割を明らかにし、本経路を標的とした阻害剤などの開発につなげて行きたいと考えている。

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10件)

1. Taniguchi R, Fukushima H, Osawa K, Maruyama T, Yasuda H, Weih F, Doi T, Maki K, Jimi E. RelB-induced expression of Cot, an MAP3K family member, rescues RANKL-induced osteoclastogenesis in alymphoplasia mice by promoting NF- κ B2 processing by IKK α . J Biol Chem. 289:7349-61. 2014. doi: 10.1074/jbc.M113.538314.
2. Fukushima H, Ogura K, Wan L, Lu Y, Li V, Gao D, Liu P, Lau AW, Wu T,

- Kirschner MW, Inuzuka H, Wei W. SCF-mediated Cdh1 degradation defines a negative feedback system that coordinates cell-cycle progression. *Cell Rep.* 4:803-16. 2013 doi: 10.1016/j.celrep.2013.07.031.
3. Lau AW, Inuzuka H, Fukushima H, Wan L, Liu P, Gao D, Sun Y, Wei W. Regulation of APC(Cdh1) E3 ligase activity by the Fbw7/cyclin E signaling axis contributes to the tumor suppressor function of Fbw7. *Cell Res.* 23:947-61. 2013 doi: 10.1038/cr.2013.67.
 4. Nagai Y, Osawa K, Fukushima H, Tamura Y, Aoki K, Ohya K, Yasuda H, Hikiji H, Takahashi M, Seta Y, Seo S, Kurokawa M, Kato S, Honda H, Nakamura I, Maki K, Jimi E. p130Cas, Crk-associated substrate, plays important roles in osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Res.* 28:2449-62. 2013. doi: 10.1002/jbmr.1936.
 6. Nakamura H, Aoki K, Masuda W, Alles N, Nagano K, Fukushima H, Osawa K, Yasuda H, Nakamura I, Mikuni-Takagaki Y, Ohya K, Maki K, Jimi E. Disruption of NF- κ B1 prevents bone loss caused by mechanical unloading. *J Bone Miner Res.* 28:1457-67. 2013. doi: 10.1002/jbmr.1866.
 7. Inuzuka H, Gao D, Finley LW, Yang W, Wan L, Fukushima H, Chin YR, Zhai B, Shaik S, Lau AW, Wang Z, Gygi SP, Nakayama K, Teruya-Feldstein J, Toker A, Haigis MC, Pandolfi PP, Wei W. Acetylation-dependent regulation of Skp2 function. *Cell.* 150(1):179-93. 2012. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.038.
 8. Shaik S, Nucera C, Inuzuka H, Gao D, Garnaas M, Frechette G, Harris L, Wan L, Fukushima H, Husain A, Nose V, Fadda G, Sadow PM, Goessling W, North T, Lawler J, Wei W. SCF(β -TRCP) suppresses angiogenesis and thyroid cancer cell migration by promoting ubiquitination and destruction of VEGF receptor 2. *J Exp Med.* 209:1289-307. 2012. doi: 10.1084/jem.20112446.
 9. Fukushima H, Matsumoto A, Inuzuka H, Zhai B, Lau AW, Wan L, Gao D, Shaik S, Yuan M, Gygi SP, Jimi E, Asara JM, Nakayama K, Nakayama KI, Wei W. SCF(Fbw7) modulates the NF κ B signaling pathway by targeting NF κ B2 for ubiquitination and destruction. *Cell Rep.* 1:434-43. 2012.
 10. Seo Y, Fukushima H, Maruyama T, Kuroishi KN, Osawa K, Nagano K, Aoki K, Weih F, Doi T, Zhang M, Ohya K, Katagiri T, Hosokawa R, Jimi E. Accumulation of p100, a precursor of NF- κ B2, enhances osteoblastic differentiation in vitro and bone formation in vivo in aly/aly mice. *Mol Endocrinol.* 26:414-22. 2012. doi: 10.1210/me.2011-1241.
- [学会発表](計 15 件)
1. 谷口 礼, 牧 憲司, 福島 秀文, 自見 英治郎. RelB の過剰発現は破骨細胞分化を誘導する. 第 52 回日本小児歯科学会大会. 2014 年 5 月 17 日. 東京.
 2. 谷口 礼, 福島 秀文, 牧 憲司, 自見 英治郎. RelB は NF- κ B2 のプロセッシングを誘導し、aly/aly マウスの破骨細胞分化抑制を解除する. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2013 年 9 月 21 日. 岡山.
 3. 多田 幸代, 福島 秀文, 大澤 賢次, 自見 英治郎. 新規 NF- κ B 選択的阻害剤は口腔癌による顎骨浸潤を抑制する. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2013 年 9 月 21 日. 岡山.
 4. 福島 秀文. 若手の口腔生理学研究最前線: 歯牙交換の分子生理学的メカニズムと歯牙交換異常の病態生理学. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2013 年 9 月 20 日. 岡山.
 5. 谷口 礼, 福島 秀文, 林 秀, 自見 英治郎, 牧 憲司. NF- κ B2 のプロセッシングと RelB の核移行は破骨細胞分化を誘導する. 第 31 回日本小児歯科学会九州地方会. 2013 10 月 20 日. 福岡.
 6. 中村 仁美, 福島 秀文, 自見 英治郎, 牧 憲司. 力学的非荷重による骨量減少は NF- κ B1 の欠損により抑制される.

第31回日本小児歯科学会九州地方会.
2013.10月20日. 福岡.

7. 多田 幸代, 福島 秀文, 大澤 賢次, 自見 英治郎. 口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤における NF- κ B の役割. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2012 年 9 月 15 日. 福島.
8. 平田 志津[土屋], 福島 秀文, 片桐 岳信, 諸富 孝彦, 青木 和広, 永野 健一, 大谷 啓一, 寺下 正道, 自見 英治郎. NF- κ B p65 は Smad4 と結合することで BMP2 による骨芽細胞分化を抑制する. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2012 年 9 月 15 日. 福島.
9. 大澤 賢次, 福島 秀文, Alles Neil, 青木 和広, 張 皿, 大谷 啓一, 自見 英治郎. NF- κ B2 の p100 のプロセッシングは骨代謝において重要である. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2012 年 9 月 15 日. 福島.
10. 中村 仁美, Alles Neil, 青木 和広, 増田 渉, 福島 秀文, 大谷 啓一, 牧 憲司, 自見 英治郎. NF- κ B1 の欠損は非荷重による骨量減少を抑制する. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2012 年 9 月 15 日. 福島.
11. 谷口 礼, 福島 秀文, 牧 憲司, 自見 英治郎. 破骨細胞分化には NF- κ B2 のプロセッシングと RelB の核移行が関与する. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2012 年 9 月 15 日. 福島.
12. 福島 秀文, 大澤 賢次, 増田 渉, 自見 英治郎. SCFFBW7 による NF- κ B2/p100 のユビキチン化は NF- κ B シグナル活性を制御する. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2012 年 9 月 15 日. 福島.
13. 谷口 礼, 高村 伊都子, 牧 憲司, 福島 秀文, 自見 英治郎. 破骨細胞分化には NF- κ B2 のプロセッシングと RelB の核移行が関与する. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2012 年 9 月 15 日. 福島.

〔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

福島 秀文 (Hidefumi Fukushima)
福岡歯科大学 口腔歯学部 准教授
研究者番号 : 70412624

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :