

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861297

研究課題名(和文)破骨細胞形成を制御する受容体RANKシグナルの機構解明とその応用

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of signal transduction emanated from receptor RANK which regulates osteoclastogenesis

研究代表者

田口 祐 (Taguchi, Yuu)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：20549472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨を溶かす破骨細胞は骨の健康維持のみならず骨粗鬆症や癌骨転移に関与するため、治療に応用できる分化メカニズムの解明は重要である。本研究によって申請者は、破骨細胞分化に必須な受容体RANKの機能領域HCRにおける結合タンパク質を同定し、新たな分化メカニズムを見出した。また、HCRに相同なペプチドを用いて破骨細胞分化を人為的に制御できることを見出し、骨疾患の新規治療方法を提案した。更に、破骨細胞分化を抑制する機能を持つ遺伝子を新規発見することができた。これらの成果は、既存の方法よりも効果的な骨疾患治療方法の新規開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Since excess formation and differentiation of osteoclasts, which have an ability to resorb bone matrix, cause bone diseases such as osteoporosis and bone metastasis, elucidating the molecular mechanism of osteoclastogenesis is very significant for developing the novel method for treating bone diseases. In this study, candidate proteins were identified as binding protein to HCR, which is essential region in receptor RANK for induction of osteoclastogenic signaling. As a result, I found the novel signaling pathway in RANK signaling for osteoclastogenesis. Treatment osteoclast precursor cells with peptides corresponding to amino acid sequences of HCR inhibit osteoclastogenesis, suggesting that osteoclastogenesis can be controlled artificially. Furthermore, the novel gene was identified as suppressor for osteoclastogenesis. These results should be helpful for developing the novel drug and treating methods against bone disease.

研究分野：骨免疫学

キーワード：骨免疫学 骨代謝 破骨細胞 RANK

1. 研究開始当初の背景

体型支持と造血の役割を担う骨は、骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞の適度な活性バランスによって、新陳代謝を繰り返しながら一定量に保たれている。そのため、両細胞の活性バランスの崩壊は骨粗鬆症・関節リウマチ性炎症性骨変形・癌の骨転移など、様々な骨疾患を引き起こすことが知られている。骨疾患の多くは加齢と共に発症することが多く、超高齢社会となった日本では骨疾患発症者の増加が進んでおり、その対応・対策の整備が急務となっている。

骨粗鬆症は破骨細胞の過形成・機能亢進が原因で発症する。また、関節リウマチの患者の炎症部位では、炎症性サイトカインによって破骨細胞が過形成されて異所的溶骨による骨変形が引き起こされていることが明らかになっている。更に、癌の骨転移は、癌細胞から産生されたサイトカインが破骨細胞の過形成を引き起こし、異常部位で溶骨活性を發揮させて癌細胞が増殖する空間を骨に作ることで成立すると考えられている。すなわち、破骨細胞は多くの骨疾患の原因であるため有用な治療標的であり、そのため破骨細胞を細胞死に導く骨吸収抑制剤 Bisphosphonate 製剤が様々な骨疾患治療において実際に使用されている。しかし、Bisphosphonate 製剤は治療効果が現れるまで長時間を要することや、多くの副作用があることが報告されており、新しいメカニズムによる新規治療方法の開発が待望されている。そのためには、破骨細胞分化の分子メカニズムを詳細に明らかにし、得られた結果を応用する必要がある。

破骨細胞の分化は、破骨前駆細胞に発現している受容体 RANK に破骨細胞分化因子 (RANKL) が結合することで誘導される。本研究代表者は以前に、受容体 RANK において異なる動物種間でアミノ酸配列が高度に保存されている領域 HCR (Highly Conserved region in RANK) を見出し、HCR は、アダプター分子 Gab2 との結合を介してシグナル複合体形成の足場となり、TRAF6 による NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路の活性化と、PLC $\gamma$ 2 を介した Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達経路の活性化を長時間維持することで、破骨細胞分化のマスター転写因子 NFATc1 の発現誘導に関与することが明らかになっており(図 1)、RANK において破骨細胞分化に必要な領域

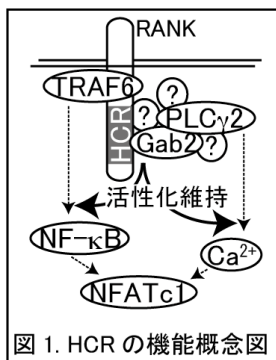


図 1. HCR の機能概念図

合体形成を阻害して(図 2) NFATc1 の発現誘導が起こらないようにして、破骨細胞分化を人為的に阻害することに成功していた(図 3)。しかし、HCR を欠失した RANK 変

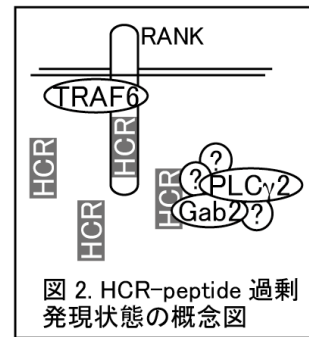


図 2. HCR-peptide 過剰発現状態の概念図

異体は破骨細胞分化誘導能が完全に失われているのに、HCR に結合する Gab2 の遺伝子欠損マウスでは破骨細胞が少ないながらも存在することが報告されており、HCR には Gab2 以外のタンパク質も結合して機能することが示唆されていた。すなわち、HCR における分子メカニズムは未解明の部分が多く残されている状態であった。

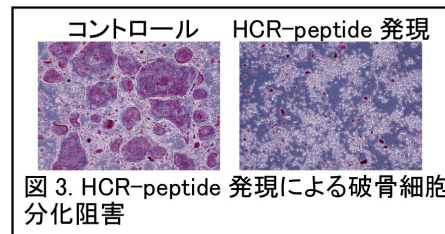


図 3. HCR-peptide 発現による破骨細胞分化阻害

2. 研究の目的

多くの骨疾患の原因が破骨細胞の過形成・機能亢進であるため、破骨細胞の分化メカニズムを詳細に明らかにすることで得られる知見を応用することで新規治療方法を開発することができる。また、本研究代表者が世界に先駆けて見出した受容体 RANK の HCR は破骨細胞分化誘導に必要な領域だが、その分子メカニズムは未解明な点が多い。従って、HCR の作用メカニズムをより詳細に明らかにするとともに、破骨細胞分化に関与する新規分子を同定してその作用メカニズムを明らかにし、得られた知見から骨疾患に対する新規治療方法を開発することが本研究の目的である。具体的には以下の3点について解析を進めた。

- (1) HCR を介した RANK シグナル伝達機構の解明  
HCR に結合する分子を同定することで、HCR における分子メカニズムを解明することを目指す。
- (2) HCR-peptide を用いた骨吸収抑制方法の新規開発  
HCR-peptide を臨床現場に応用し易い形で提案することを目指す。
- (3) 破骨細胞分化を制御する新規遺伝子の探索と機能解析  
RANKL による受容体 RANK への刺激依存的に発現量が変動する遺伝子を網羅

的に探索し、破骨細胞分化に關与する遺伝子を新規単離することを目指す。

### 3. 研究の方法

「2. 研究の目的」欄で記述した3点に関して、以下のように解析を進めた。

- (1) 質量分析機 LC/MS を用いて HCR に結合する分子を同定することを目指した。HCR-peptide を担体に固定したカラムを作成し、RANKL で刺激した破骨前駆細胞の溶解液をカラムに通し、HCR に結合する分子を精製した。また、HCR を bait として Yeast-2-hybrid 法を行い、HCR に直接結合する分子を探索した。
- (2) HCR-peptide を化学合成し、*in vitro* の破骨細胞分化実験系に加えることで、合成 HCR-peptide の分化抑制能を調べた。また、細胞膜を通過し易いように化学修飾を加えた HCR-peptide を合成し、同様に調べた。
- (3) 本研究代表者が持っている破骨前駆細胞を RANKL 刺激した際のマイクロアレイ解析データと、データベースに公表されているマイクロアレイデータを組み合わせて網羅的に解析し、RANKL 刺激依存的に発現量が減少する遺伝子を探した。また、候補遺伝子を破骨前駆細胞に強制発現させてから破骨細胞分化を誘導することで、候補遺伝子の破骨細胞分化への関与の有無を調べた。

### 4. 研究成果

「2. 研究の目的」欄で記述した3点に関して解析を行い、以下の成果を得た。

- (1) HCR-peptide を担体に固定したカラムを作成し、破骨前駆細胞の破砕液をカラムに通すことで HCR に結合するタンパク質を精製した。カラム溶出液を SDS-PAGE で解析したところ、RANKL 刺激を行った破骨前駆細胞の破砕液のみに特異的に存在するバンドが数本確認され、それぞれのバンドを SDS-PAGE 用ゲルから切り出して精製し、質量分析機 LC/MS を用いてタンパク質を同定した。この数種の候補タンパク質を 293T 細胞で過剰発現させて RANK との結合能を調べたが、RANK と結合するタンパク質は無く、この方法では HCR と直接結合する分子を見付けられなかった。  
上記の結果から HCR と候補分子の結合力は弱いと考えられたため、結合力が弱くとも検出し易いと考えられている Yeast-2 Hybrid 法を用いて HCR 結合タンパク質を探索した。HCR アミノ酸配列を bait として、RANKL 刺激を加えた破骨前駆細胞由来の total RNA を用いた

cDNA ラブラリーを prey として、Yeast-2 Hybrid 法を実施した。その結果、HCR に結合すると思われる候補分子が 10 種類同定された。現在、293T に候補分子を過剰発現させて HCR との結合を確認しているが、先行して 3 種類は HCR と直接結合することが確認された。そのうちの 1 種類は破骨細胞分化に關与することが既報の分子であるが RANK と会合することは知られておらず、3 種類とも新規シグナル伝達経路の存在を示唆している。今後、全ての候補分子と HCR の結合を確認し、その後に HCR の機能との関連を調べる予定である。また、候補分子それぞれの性質・機能に基づいて破骨細胞分化への関与を調べ、分子メカニズムを提唱する予定である。

- (2) HCR の全長は 60 アミノ酸残基と長いいため、*in vitro* の化学合成には適していない。そのため、HCR をいくつかの領域に分けてペプチド断片を合成し、破骨前駆細胞の培養液に添加することで分化抑制能を検討した。その結果、どの領域のペプチド断片においても破骨細胞分化を抑制することができなかった。これは、ペプチド断片が細胞膜を透過できなかったためだと考え、膜透過性を持ったアミノ酸配列を付与したペプチド断片を合成し、同様に分化抑制能を検討した。その結果、HCR 内の複数領域において、分化抑制能があることが明らかになった。これは、HCR における機能部位が複数あることを示唆している。今後、骨疾患モデルマウスの患部に直接投与して治療効果を検証すると共に、機能部位と推定される領域の分子メカニズムを詳細に解析する予定である。
- (3) 本研究代表者が持っている破骨前駆細胞を RANKL 刺激した際のマイクロアレイ解析データと、データベースに公表されているマイクロアレイデータを網羅的に調べ、全てのアレイデータにおいて RANKL 刺激依存的に発現量が減少する遺伝子を探索し、13 種の新規遺伝子を候補として同定した。これら 13 種の遺伝子をレトロウイルスを用いて破骨前駆細胞に強制発現させることで、RANKL で刺激されても遺伝子発現量が減少しない状態を作り出し、その際の破骨細胞の分化への影響を調べた。その結果、分化する破骨細胞数を減少させる遺伝子が 1 つ、増加させる遺伝子が 2 つ有ることがわかった。  
強制発現により分化する破骨細胞数を減少させる遺伝子は、分化抑制遺伝子と考えられる。抑制機能の分子メカニズムを明らかにするために候補遺伝子を強制発現させた破骨前駆細胞における

RANK シグナル伝達経路を解析したところ、RANK 下流の ERK1/2 の活性化が顕著に阻害されており、そのため、NFATc1 の発現誘導量が減少していた。また、候補遺伝子は kinase であることが報告されていたため、kinase 活性を欠損する変異体を作成して破骨前駆細胞に強制発現させたところ、分化を阻害する効果は現れなかった。更に、遺伝子欠損マウスの大腿骨を入手して $\mu$ CTを用いて解析したところ、わずかではあるが骨量の減少が認められた。これは候補遺伝子が破骨細胞分化の抑制遺伝子であるため、遺伝子欠損マウスでは破骨細胞分化が促進され、必要以上の溶骨が起きているためと考えられる。すなわち、同定された1つの候補遺伝子はその kinase 活性によって破骨細胞の分化を抑制する遺伝子であることが示唆された。現在、遺伝子欠損マウスを入手し、RANK シグナル伝達における候補分子の機能・役割を調べている。

#### 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 1 件)

- (1) Mizuki Yamamoto, Yuu Taguchi, Taku Ito-Kureha, Kentaro Semba, Noritaka Yamaguchi & Jun-ichiro Inoue  
NF- $\kappa$ B non-cell-autonomously regulates cancer stem cell population in the basal-like breast cancer subtype  
*Nature Communications* (2013) 査読有り  
vol. 4, Article Number:2299  
doi:10.1038/ncomms3299

[学会発表](計 13 件)

- (1) Takao Seki, Daisuke Ohshima, Yuu Taguchi, Taishin Akiyama, Kazuhisa Ichikawa, Jun-ichiro Inoue  
Transcriptional regulation by the oscillatory dynamics of non-canonical NF- $\kappa$ B  
がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動公開シンポジウム  
2015年1月27日-28日  
一橋講堂(東京都・千代田区)
- (2) 関 崇生、大島 大輔、田口 祐、秋山 泰身、市川 一寿、井上 純一郎  
非古典的 NF- $\kappa$ B 経路の振動による転写抑制メカニズムの解析  
第 37 回 日本分子生物学会年会  
2014年11月25日-27日  
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

- (3) 田口 祐、井上 純一郎  
受容体 RANK の刺激依存的な細胞内への局在と、破骨細胞分化におけるその役割  
第 37 回 日本分子生物学会年会  
2014年11月25日-27日  
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- (4) 田口 祐、井上 純一郎  
受容体 RANK の刺激依存的な細胞内への局在と、破骨細胞分化におけるその役割  
修飾シグナル病 若手ワークショップ  
2014年9月30日-10月2日  
ホテルあかね(神奈川県・足柄下郡)
- (5) Yuu Taguchi, Jun-ichiro Inoue  
The internalization of RANK is crucial for differentiation of osteoclast involved in bone metastasis  
第 73 回 日本癌学会学術集会  
2014年9月25日-27日  
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- (6) Yuu Taguchi, Jun-ichiro Inoue  
The stimulation dependent internalization of RANK is crucial for osteoclast differentiation  
ASBMR 2014 Annual Meeting  
2014年9月12日-15日  
Houston(アメリカ合衆国)
- (7) 田口 祐、井上 純一郎  
受容体 RANK の刺激依存的な細胞内への局在化と、その破骨細胞分化における役割  
第 32 回 日本骨代謝学会学術集会  
2014年7月24日-26日  
大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
- (8) Yuu Taguchi, Jun-ichiro Inoue  
Stimulation dependent internalization of RANK is required for the cell-cell fusion during osteoclastogenesis  
The 9th China-Japan Joint Laboratory Workshop  
2013年11月1日  
北京(中華人民共和国)
- (9) Yuu Taguchi, Jun-ichiro Inoue  
RANK has the unique domain that induces its internalization possibly required for osteoclastogenesis  
第 72 回 日本癌学会学術総会  
2013年10月3日-5日  
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- (10) 田口 祐、合田 仁、井上 純一郎  
RANK has the unique domain that induces its internalization possibly

required for osteoclastogenesis  
新学術領域 がん研究分野の特性等を踏  
まえた支援活動 がん若手研究者ワーク  
ショップ  
2013年9月4日-7日  
蓼科グランドホテル (長野県・茅野市)

(11) Kazuaki Tsumura, Yuu Taguchi, Masaaki  
Oyama, Hiroko Kozuka-Hata,  
Jun-ichiro Inoue  
Identification of protein binding to  
the unique domain in RANK required to  
establish osteoclastogenic signals  
International Bone & Mineral Society  
2nd Joint Meeting of the  
International Bone and Mineral  
Society and The Japanese Society for  
Bone and Mineral Research  
2013年5月28日-6月1日  
神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

(12) Fukutoshi Shirai, Jin Gohda, Shinya  
Watanabe, Kentaro Semba, Yuu Taguchi,  
Jun-ichiro Inoue  
Genetic screening of novel negative  
regulators in osteoclast  
differentiation  
International Bone & Mineral Society  
2nd Joint Meeting of the  
International Bone and Mineral  
Society and The Japanese Society for  
Bone and Mineral Research  
2013年5月28日-6月1日  
神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

(13) Yuu Taguchi, Jun-ichiro Inoue  
RANK harbors the specific cytoplasmic  
domain that regulates  
osteoclastogenic signaling and its  
subcellular localization  
International Bone & Mineral Society  
2nd Joint Meeting of the  
International Bone and Mineral  
Society and The Japanese Society for  
Bone and Mineral Research  
2013年5月28日-6月1日  
神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

〔その他〕

本研究成果に関する発表論文については、東  
京大学医科学研究所 分子発癌分野のホーム  
ページに掲載して公表。  
<http://www.traf6.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 祐 (Yuu Taguchi)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：20549472

(2) 研究分担者  
なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
なし ( )

研究者番号：