

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293396

研究課題名(和文) c-Src-p130Cas axis下流に存在する骨吸収調節因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of bone resorbing molecules downstream of c-Src-p130Cas axis

研究代表者

自見 英治郎 (Eijiro, Jimi)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40276598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、c-Src-p130Casの下流に存在する破骨細胞の「活性化」分子を同定し、その機能を *in vitro* でさらに明確にすることを目指した。c-Src-p130Cas欠損マウス由来の破骨細胞を用いて網羅的解析を多量に実施した。いくつかの候補タンパク質を破骨細胞の「活性化」分子として同定した。そのうち、タンパク質ホスファターゼ1調節サブユニット18 (PPP1r18) とBif-1の2つの分子を対象とした。PPP1r18はc-Src-p130Cas軸に依存的に骨吸収の負の制御因子として働き、Bif-1は破骨細胞の生存を調節することでアクチンリング形成および骨吸収活性を制御した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated to identify the "activation" molecule of osteoclast associated with c-Src-p130Cas axis and further clarify its function *in vitro*. A comprehensive analysis was performed using osteoclasts derived from c-Src- or p130Cas-efficient mice. We have identified some candidate proteins as "activation" molecule of osteoclast. Among them, we focused two molecules, protein phosphatase 1 regulatory subunit 18 (PPP1r18) and Bif-1. PPP1r18 serves as a negative regulator of c-Src-p130Cas axis-dependent bone resorption. Bif-1 modulates osteoclastic bone resorption by regulating c-Src-p130Cas axis-dependent osteoclastic survival.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：p130Cas c-src 破骨細胞 骨吸収

1. 研究開始当初の背景

我が国では人口の急速な高齢化に伴い骨粗鬆症の患者が年々増加している。骨量は思春期までに増加し、20歳前後にピークを迎え、その後はその骨量を初老期まで維持する。しかし、閉経時の女性や60歳以降の男性でも、破骨細胞による骨吸収が亢進して骨量減少がおきる。骨粗鬆症は、高齢者の腰痛や骨折の原因となり、高齢者のQOLを左右するだけでなく、骨折による寝たきりは「医療費の増加」や「介護」といった大きな社会問題となっている。

骨粗鬆症の治療には、破骨細胞による骨吸収を制御することが重要であり、破骨細胞の「分化」か「活性化」による骨吸収の過程が治療標的と考えられる。破骨細胞の骨吸収を標的とした骨吸収抑制剤として、ビスホスホネート(BP)製剤が広く用いられ、骨粗鬆症による骨折防止に高い効果を示している。しかし、近年、BP服用患者に抜歯などの観血的処置を行うことで顎骨壊死(BRONJ)を引き起こすことが報告され、歯科界で重大な問題となっている。BRONJの発症頻度は低いですが、根治療法は確立していない。今後、本疾患への関心の高まりとともに症例数は増えることが予想される。骨粗鬆症患者への歯科医療を安全に行うためには、歯科界からもBPに代わる骨吸収抑制剤の開発に取り組むことが重要である。

破骨細胞による一連の骨吸収過程は、前駆細胞から破骨細胞への「分化」と、分化した破骨細胞が骨を認識して吸収する「活性化」の2つに分けられる。破骨細胞はマクロファージ系の細胞から分化し、その分化機構は詳細に検討されている。骨芽細胞が産生するマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL)、およびそのデコイ受容体オステオプロテジェリン(Osteoprotegerin:OPG)の3者により分化は制御される。またDC-STAMPが

多核化を促し、細胞内ではNFATc1が活性化して破骨細胞の分化を更に誘導する。大理石骨病を呈するマウスは、多くが破骨細胞の分化過程が障害されている。一方、1991年に*c-src* 遺伝子欠損マウスでは、破骨細胞が存在するにもかかわらず、骨吸収能不全によって大理石骨病を呈することが報告された。このことは、*c-Src* は破骨細胞分化には影響せず、活性化による骨吸収過程に重要な役割を担っていることを示唆する。しかし、*c-Src* が破骨細胞による骨吸収過程をどの様に制御しているか不明であった。

我々は、アクチンリングの形成に伴ってチロシンリン酸化が亢進するタンパク質としてp130Casを同定した。*c-src* 欠損マウス由来の破骨細胞ではp130Casのリン酸化が見られず、アクチンリングを形成しないことから、p130Casが*c-Src*の下流分子として骨吸収に関与すると考えた。しかし、p130Cas欠損マウスは胎生致死であったので、破骨細胞特異的にp130Casを欠損する(OC-p130CasKO)マウスを作製したところ、予想通り破骨細胞の骨吸収不全による大理石骨病を呈し、p130Casが破骨細胞の分化ではなく、骨吸収に重要であることを明らかにした。この結果は、破骨細胞の活性化に*c-Src*とp130Casを介したシグナルが必須であることを示し、我々が樹立したOC-p130CasKOマウス由来の破骨細胞を用いることで*c-Src*-p130Cas axisの下流で骨吸収に関わる分子を同定することができると考えた。

2. 研究の目的

破骨細胞による骨吸収は、破骨細胞への「分化」と、分化した破骨細胞が骨を吸収する「活性化」の2つのプロセスに大別できる。*c-Src* は「活性化」に関わる重要な因子である。我々は、*c-Src*の下流で機能するアダプター分子としてp130Cas(Crk-associated substrate)を同定し、破骨細胞特異的

p130Cas 欠損 (OC-p130CasKO) マウスが *c-src* 欠損マウス同様に骨吸収不全による大理石骨病を呈することを明らかにした。

そこで本研究では、*c-Src*-p130Cas axis に関わる破骨細胞の「活性化」分子を同定し、さらにその機能を *in vitro* で明らかにすることを目指す。目的達成に向けて我々が樹立した OC-p130CasKO マウスの破骨細胞を用いてマイクロアレイおよびタンパク質相互作用による網羅的解析を行い、両解析結果に共通する分子群を選別する。加えて、破骨細胞「活性化」調節因子の生理機能の解明と調節因子を標的とした新たな骨吸収阻害効果をもつ化合物の開発を目指す。

3. 研究の方法

1. *c-Src*-p130Cas axis の下流分子として骨吸収に関わる分子群の選別:

(1) マイクロアレイ解析

野生型 *c-src* 欠損および OC-p130CasKO マウス由来の破骨細胞から全 RNA を抽出し、3群間の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイで網羅的に比較検討することで、骨吸収に関わる候補遺伝子群を解析する。*c-src* 欠損および OC-p130CasKO マウス由来の破骨細胞では、骨吸収に重要なアクチンリング形成が抑制されることから、まず、野生型マウス由来破骨細胞より発現量が 1/2 以下まで減少している遺伝子群を選別した。この中から細胞骨格に関わる分子やチロシンキナーゼおよびその基質になりうる分子を選別し、さらに既にノックアウトマウスが作製され、全く骨の表現型が報告されていないものを除外した。また、この時点で得られる DNA 情報を加味して、候補遺伝子群を絞り込みリスト化する。

(2) *c-Src* と会合する分子の解析:

p130Cas は他分子と会合するアダプタータンパク質である。p130Cas が欠損すると、*c-Src* を中心に形成される破骨細胞の活性化に重

要な複合体形成が損なわれる可能性が考えられる。そこで、免疫沈降法を用いて、野生型の破骨細胞において特異的に *c-Src* と会合する分子を探索する。OC-p130CasKO を対照とすることで、p130Cas の存在下で形成される複合体を解析できる。野生型および OC-p130CasKO マウス由来の破骨細胞からタンパク質を調製し、抗 *c-Src* 抗体で免疫沈降を行い、野生型のみで *c-Src* と会合するタンパク質のスポットを切り取り、ペプチドマスフィンガープリント法などのプロテオーム解析により、p130Cas に依存的な候補分子群を選別する。また、この時点で得られるタンパク質情報を加味して、候補分子群を絞り込みリスト化する。

(3) 候補分子群の絞り込み

マイクロアレイ解析で差の見られる遺伝子群は数百以上も存在し、機能分類や文献の情報のみでは、候補分子の絞り込みが難しい。そこでマイクロアレイ解析および *c-Src* と会合する分子群の解析の結果、共通して候補分子群として挙げてきた分子群を最優先して、以下の実験を進める。

2. *c-Src*-p130Cas axis の下流分子の骨吸収への機能解析

(1) 候補分子群のクローニング

上記実験結果から絞り込んだ分子群の中で、組み換えタンパク質等の試薬として入手できるものは購入し、購入できない場合には野生型マウス由来破骨細胞の cDNA を用いて候補遺伝子をクローニングし、レトロウイルスを用いた発現ベクターを構築する。

(2) 候補分子の骨吸収への関与の検証

構築したレトロウイルスベクターを用いて、候補遺伝子を OC-p130CasKO マウス由来の破骨細胞に導入し、骨吸収に重要なアクチンリングの形成を指標に機能回復能 (Gain of

function)を検討する。さらに、野生型マウス由来破骨細胞を用いて、候補遺伝子に対する siRNA や shRNA を用いた機能喪失(Loss of function)実験を行い、骨吸収能に対する役割を検討する。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイによる c-Src-p130Cas axis の下流分子の選別結果

野生型 c-src 欠損および OC-p130CasKO マウス由来の破骨細胞から全 RNA を抽出し、3群間の遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイで網羅的に比較検討し、野生型マウス由来破骨細胞より発現量が 1/2 以下まで減少している遺伝子群を選別し、さらに文献的検討を行った上で候補遺伝子群として6個の分子を選別した。

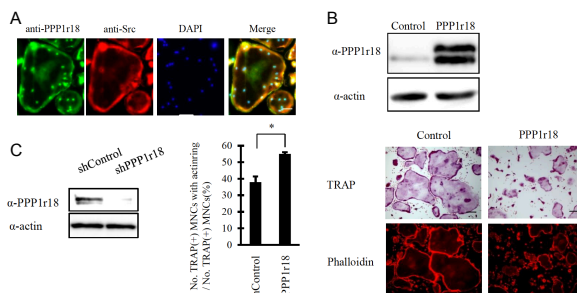
(2) c-Src と会合する分子の解析結果

c-Src 抗体で免疫沈降を行い、野生型のみで c-Src と会合するタンパク質として5個の分子を同定し、さらに文献的検討を行った上で候補遺伝子群として3個の分子を選別した。上記(1)、(2)に共通する分子は存在しなかったため、まず c-Src と会合するタンパク質 PPP1r18 および Bif-1 について解析することにした。

(3) PPP1r18 の骨吸収における役割

4-8週齢の野生型マウスより骨髄細胞を調製し、M-CSF および RANKL を添加して破骨細胞を分化誘導したところ、破骨細胞分化に伴って PPP1r18 の発現量が減少した。また PPP1r18 は、核およびアクチンリングに局在した(図1A)。破骨細胞に PPP1r18 を過剰発現すると、アクチンリング形成(図1B)と象牙切片上における吸収窩形成が抑制された。さらに、ホスファターゼ PP1 との結合部位を変異させた PPP1r18 は破骨細胞のアクチンリング形成および骨吸収活性を抑制しなかった。shRNA

を用いて PPP1r18 の発現を抑制すると、in vitro において破骨細胞明帯に相当するアクチンリング形成が亢進した(図1C)。



(図1) PPP1r18の破骨細胞内の局在と機能の検討
A: PPP1r18はc-Srcと共局在する B: 破骨細胞にPPP1r18を過剰発現するとアクチンリングを持った破骨細胞が減少する C: 破骨細胞のPPP1r18の発現を抑制するとアクチンリングを持った破骨細胞が増加する

(4) Bif-1 の骨吸収における役割

4-8週齢の野生型マウス骨髄細胞を採取し、M-CSF および RANKL を添加して破骨細胞を分化させ、Real-time PCR 法および Western Blot 法で Bif-1 の発現量の変化を検討した結果、破骨細胞の分化に伴い Bif-1 の発現量が増加した。破骨細胞における Bif-1 の過剰発現は、破骨細胞性アポトーシスを増強することによってアクチンリング形成および骨吸収活性を阻害した。shRNA による Bif-1 発現の阻害は、破骨細胞の生存を促進することによってアクチンリング形成および骨吸収活性を増強した。

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 0件)

〔学会発表〕(計 7件)

- (1) 松原琢磨、金原正敬、前田敏弘、吉澤光弘、中富千尋、古株彰一郎、自見英治郎、山本照子
破骨細胞アクチンリングに局在する新規分子 PPP1r18の同定
第 57 回歯科基礎医学会学術大会、朱鷺メッセ(新潟)、9/11-9/13
- (2) Matsubara T, Nakatomi C, Urata M, Ogawa M, Toyama K, Kunihiro H, Kokabu S, Jimi E
A novel protein actin ring regulator PPP1r18 in osteoclasts
Asia-Pacific conference in Fukuoka 2016,

Kitakyushu, 2016/5/11

(3) 松原琢磨, 中富千尋, 古株彰一郎, 浦田真梨子, 自見英治郎
新規アクチン結合分子PPP1r18による破骨細胞のアクチン細胞骨格制御
九州歯科学会, 北九州, 2016/5/28-29

(4) 松原琢磨, 中富千尋, 古株彰一郎, 自見英治郎
新規アクチン結合分子PPP1r18による破骨細胞のアクチンリング形成制御
日本骨免疫学会, 沖縄, 2016/7/6-8

(5) 松原琢磨, 中富千尋, 古株彰一郎, 山本照子, 自見英治郎
破骨細胞のアクチンリング形成を制御する新規アクチン結合分子PPP1r18
日本骨代謝学会, 大阪, 2016/7/21-23

(6) 松原琢磨, 中富千尋, 古株彰一郎, 山本照子, 自見英治郎
新規アクチン結合分子PPP1r18は破骨細胞のアクチンリング形成を阻害する
日本歯科基礎医学会, 北海道, 2016/8/24-26

(7) 松原琢磨, 中富千尋, 古株彰一郎, 自見英治郎
破骨細胞アクチンリング形成を制御する分子PPP1r18の同定
Skeletal Science Retreat, 箱根, 2016/11/25-26

〔図書〕(計 1件)

骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典
日本骨代謝学会編集
自見英治郎 「Srcファミリー」(p150-151)
羊土社 2015年

〔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

自見 英治郎 (Eijiro Jimi)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 40276598

(2) 研究分担者

福島 秀文 (Hidefumi Fukushima)
東北大学・歯学部・准教授
研究者番号: 70412624

(3) 研究分担者

片桐 岳信 (Takenobu Katagiri)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80245802

(4) 研究分担者 (H27年度のみ)

杉山 悟郎 (Goro Sugiyama)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 00722828