

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462829

研究課題名(和文) Notch2 Hajdu-Cheney 症候群型変異の病態分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathological molecular mechanism of Notch2-Hajdu Cheney Syndrome type mutation

研究代表者

福島 秀文(Hidefumi, Fukushima)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：70412624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：非常に稀な常染色体優性の結合織の先天性疾患である Hajdu-Cheney 症候群は(HCS)、末節骨の骨吸収、進行性の骨粗鬆症、頭蓋骨変形がみられる。これまでの報告から Notch2 が HCS 症候群の原因分子であることが確立された。しかしながら、Notch2 の HCS 症候群の発症に関わる分子メカニズムには不明な点が多い。今回我々は、本発症メカニズムとして Notch2 HCS 型変異が Notch2 の量的制御を逸脱し、Notch2 の細胞内の蓄積が起こることにより破骨細胞の分化が亢進することにより、骨吸収が引き起こされることを細胞レベル、動物モデルおよび臨床サンプルにて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Hajdu-Cheney syndrome (HCS) is a rare autosomal disorder caused by heterozygous mutations in NOTCH2, clinically characterized by acroosteolysis, severe osteoporosis, short stature and polycystic kidneys. Recent studies have identified that aberrant NOTCH2 signaling and consequent osteoclast hyperactivity are closely associated with pathogenesis of the bone-related disorder, but exact molecular mechanisms remain largely elusive. We found that the sustained osteoclast activity is largely due to elevated protein abundance of C-terminus truncating mutant of NOTCH2 that escapes FBW7-mediated ubiquitination and proteolysis events. Mice with osteoclast-specific Fbw7 ablation revealed osteoporotic phenotypes reminiscent of HCS owing to elevated Notch2 signaling. Importantly, administrations of Notch inhibitors in the Fbw7 conditional knockout mice alleviated progressive bone resorption. Our findings highlight the molecular basis for the pathogenesis of HCS.

研究分野：骨代謝

キーワード：Hajdu-Cheney症候群 ユビキチン プロテアソーム FBW7 Notch2 破骨細胞 Osteolysis 骨融解症

1. 研究開始当初の背景

非常に稀な常染色体優性の結合織の先天性疾患である Hajdu-Cheney 症候群 (Hajdu-Cheney syndrome: HCS) は、末節骨の骨吸収、進行性の骨粗鬆症、頭蓋骨変形がみられ、歯科領域においては、乳歯の早期脱落および重度の歯周病を発症することが知られている。2011年に本症候群の原因遺伝子として2つのグループから Notch2 の変異が報告され、Notch2 の転写活性調節に重要な PEST ドメインを含んだ C 末端領域の欠失型変異であることが示された^{(1),(2)}。さらに、2016年に Canalis らのグループから Notch2 の HCS の変異を模倣したノックインマウスが作出され、破骨細胞分化・吸収活性の上昇をはじめとした HCS 様の表現型を示したことから、本疾患の責任遺伝子が Notch2 であるという知見が確立された⁽³⁾。

これまで我々は、RANKL による破骨細胞形成の際に、Notch リガンドである Jagged1 によって Notch2 が活性化され、NF-κB シグナルとともに破骨細胞分化を正に制御していることを報告した⁽⁴⁾。また、これまでの報告からも HCS の骨破壊には破骨細胞の関与が示唆されて来た。しかしながら、破骨細胞分化における Notch2 の役割および HCS 型変異の HCS における骨破壊に至る分子メカニズムは不明な点が多い。

2. 研究の目的

今回我々は、HCS の病態形成に関わる分子メカニズムの解析を通して、Notch2 の HCS 変異の分子病態を明らかにするとともに、その骨吸収に対する役割を解明することを目的とし研究をおこなった。

3. 研究の方法

これまで報告のある、Notch2 遺伝子の HCS 変異型タンパクと野生型のタンパクの比較をタンパク質翻訳後修飾に着目し行った。

破骨細胞中で Notch2 の野生型及び HCS 型変異体を過剰発現させ、破骨細胞形成能の比較を行った。さらに、HCS 患者から採取した血液サンプルから破骨細胞形成を行い、健康者から採取したサンプルとの破骨細胞形成効率の比較を行った。

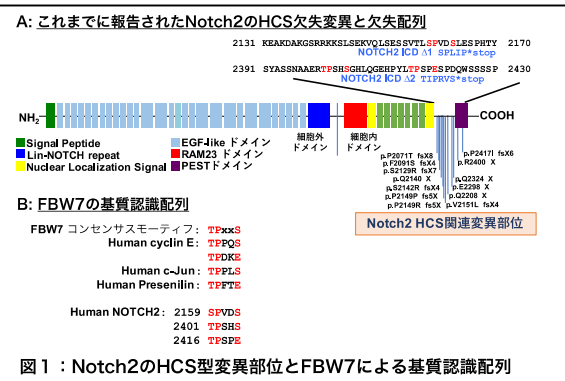
Notch2 の HCS 型変異に起因する HCS 病態発症の分子メカニズムを分子生物学的手法により明らかにするとともに、Notch2 の活性制御を行う分子のノックアウトマウスを作出することで、Notch2 変異と HCS 発症との関連を生体レベルで明らかにした。

4. 研究成果

野生型 Notch2 と HCS 型 Notch2 変異体の遺伝子配列比較を行った結果、HCS 型 Notch2

変異体で欠失した PEST ドメインの部位に特徴的なセリン・スレオニンリン酸化モチーフが含まれていることが明らかになった (図 1A)。

分子生物学的解析により、この欠失部位に存在するリン酸化モチーフが、SCF (Skp1 / Cullin-1 / F-box protein) 型ユビキチンリガーゼ SCF^{FBW7} の基質受容体サブユニット FBW7 の認識部位であることが明らかになった (図 1B)。さらなる解析の結果、Notch2 の HCS 型変異は、この FBW7 認識部位を欠失することで SCF^{FBW7} による量的制御機構から逸脱し、その結果、細胞内での Notch2 の蓄積が引き起



こされることが明らかになった。

この分子機構の破骨細胞分化に対する役割の検討をおこなったところ、Notch2 の HCS 型変異体発現細胞では Notch2 の蓄積とともに破骨細胞形成の促進が見られた。また、野生型マウスの破骨細胞分化系において FBW7 のノックダウンを行うと、破骨細胞内に Notch2 の蓄積が引き起こされ、破骨細胞形成が促進された。

また、HCS の患者から採集した血液サンプルから破骨細胞形成をおこなったところ、健康者サンプルと比較して破骨細胞形成の亢進が認められた。さらに、HCS 患者由来破骨細胞において Notch2 タンパク質半減期の延長と、それに伴う Notch2 タンパク質の蓄積が認められた。

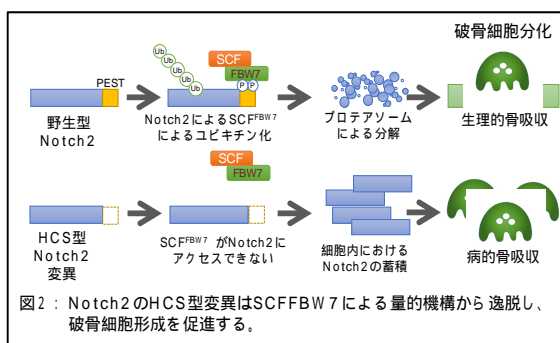
最近の報告から、Notch2 の HCS 変異ノックインにより作出された HCS 疾患モデルマウスにおいて、HCS 症候群患者で見られる骨破壊の亢進と同様の表現型が認められたことから、この骨破壊の亢進が SCF^{FBW7} による量的制御機構からの逸脱によるものかを明らかにするために、破骨細胞特異的な FBW7 ノックアウトマウス (FBW7 cKO) を作出した。

その結果、FBW7 cKO において、Notch2 HCS 変異マウスと同様に、破骨細胞分化の亢進とそれともなう骨量の減少が認められた。FBW7 cKO マウス脾臓から誘導した破骨細胞に対して Notch2 のノックダウンや Notch

シグナルの阻害剤処理をおこなったところ、破骨細胞形成の抑制が認められた。

以上のことから、HCS 発症に関わる Notch2 の欠失型変異では、SCF^{FBW7} によるタンパク質分解制御から逸脱することで Notch2 変異体が蓄積し、その結果、破骨細胞分化の亢進を伴う骨量の減少を引き起こすことが明らかになった(図2)。

現在、本知見をまとめ論文投稿中である。



また、本検討課題を行う過程で、SCF^{FBW7}と同タイプであるSCF型ユビキチンリガーゼSCF^{β-TRCP}の基質同定と基質分解制御の生理的意義の検討を行ったところ、皮膚線維毛包腫、腎腫瘍、肺嚢胞及び気胸を三徴候とする常染色体優性遺伝性疾患Birt-Hogg-Dubé (BHD) 症候群に関与する分子であるFNIPタンパク質のSCF^{β-TRCP}を介した量的制御機構(発表論文1)や、脂肪肝発症に関わるLipin1タンパク質のSCF^{β-TRCP}による量的制御機構(発表論文2)、及びNotch2同様に遺伝子欠失により骨粗鬆症を示すCYLDのSCF^{β-TRCP}による量的制御機構(発表論文6)などについて明らかにすることができた。

さらに、Notch2の破骨細胞形成誘導に重要な役割を果たしているNF-κBシグナルの新規阻害剤の骨破壊の抑制作用および骨芽細胞による骨形成の促進作用についての効果について明らかにした(発表論文3,4,5)。

<引用文献>

(1). Simpson MA, Irving MD, Asilmaz E, Gray MJ, Dafou D, Elmslie FV, Mansour S, Holder SE, Brain CE, Burton BK, Kim KH, Pauli RM, Aftimos S, Stewart H, Kim CA, Holder-Espinasse M, Robertson SP, Drake WM, Trembath RC. Mutations in NOTCH2 cause Hajdu-Cheney syndrome, a disorder of severe and progressive bone loss. *Nat Genet.* 2011 43:303-5. doi: 10.1038/ng.779.

(2). Isidor B, Lindenbaum P, Pichon O, Bézieau S, Dina C, Jacquemont S, Martin-Coignard D, Thauvin-Robinet C, Le Merrer M, Mandel JL, David A, Faivre L, Cormier-Daire V, Redon R, Le Caignec C. Truncating mutations in the last exon of NOTCH2 cause a rare skeletal disorder with osteoporosis. *Nat Genet.* 2011. 43(4):306-8. doi: 10.1038/ng.778.

(3). Canalis E, Schilling L, Yee SP, Lee SK, Zanotti S. Hajdu Cheney Mouse Mutants Exhibit Osteopenia, Increased Osteoclastogenesis, and Bone Resorption. *J Biol Chem.* 2016. 291(4):1538-51. doi: 10.1074/jbc.M115.685453.

(4). Fukushima H, Nakao A, Okamoto F, Shin M, Kajiya H, Sakano S, Bigas A, Jimi E, Okabe K. The association of Notch2 and NF-kappaB accelerates RANKL-induced osteoclastogenesis. *Mol Cell Biol.* 2008. 28:6402-12. doi: 10.1128/MCB.00299-08.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Nagashima K, Fukushima H, Shimizu K, Yamada A, Hidaka M, Hasumi H, Ikebe T, Fukumoto S, Okabe K, Inuzuka H. Nutrient-induced FNIP degradation by SCF^{β-TRCP} regulates FLCN complex localization and promotes renal cancer progression. *Oncotarget.* (査読有). 2017. 8. 9947-9960. doi: 10.18632/oncotarget.14221.

2. Shimizu K, Fukushima H, Ogura K, Lien EC, Nihira NT, Zhang J, North BJ, Guo A, Nagashima K, Nakagawa T, Hoshikawa S, Watahiki A, Okabe K, Yamada A, Toker A, Asara JM, Fukumoto S, Nakayama KI, Nakayama K, Inuzuka H, Wei W. The SCF^{β-TRCP} E3 ubiquitin ligase complex targets Lipin1 for ubiquitination and

- degradation to promote hepatic lipogenesis. *Sci Signal.* (査読有) 2016. 10(460). doi: 10.1126/scisignal.aah4117.
- Jimi E, Fukushima H. NF- κ B signaling pathways and the future perspectives of bone disease therapy using selective inhibitors of NF- κ B. *Clin Calcium.* (査読有) 2016. 26:298-304. doi: CliCa1602298304.
 - Tada Y, Kokabu S, Sugiyama G, Nakatomi C, Aoki K, Fukushima H, Osawa K, Sugamori Y, Ohya K, Okamoto M, Fujikawa T, Itai A, Matsuo K, Watanabe S, Jimi E. The novel I κ B kinase β inhibitor IMD-0560 prevents bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* (査読有) 2014. 5:12317-30. doi: 10.18632/oncotarget.2640
 - Hirata-Tsuchiya S, Fukushima H, Katagiri T, Ohte S, Shin M, Nagano K, Aoki K, Morotomi T, Sugiyama G, Nakatomi C, Kokabu S, Doi T, Takeuchi H, Ohya K, Terashita M, Hirata M, Kitamura C, Jimi E. Inhibition of BMP2-induced bone formation by the p65 subunit of NF- κ B via an interaction with Smad4. *Mol Endocrinol.* (査読有) 2014. 28:1460-70. doi: 10.1210/me.2014-1094.
 - Wu X, Fukushima H, North BJ, Nagaoka Y, Nagashima K, Deng F, Okabe K, Inuzuka H, Wei W. SCF β -TRCP regulates osteoclastogenesis via promoting CYLD ubiquitination. *Oncotarget.* (査読有) 2014. 5:4211-21. doi: 10.18632/oncotarget.1971
- [学会発表](計10件)
- 永嶌 勝之, 福島 秀文, 星川 聖良, 綿引 麻美, 福本 敏, 岡部 幸司, 犬塚 博之. SCF -TRCP 依存的な FNIP2 タンパク質の量的変化はmTORCシグナル制御とBHD症候群の病態発症に寄与する. 歯科基礎医学会. 2016年8月24日. 北海道・札幌市.
 - 犬塚 博之, 福島 秀文, 清水 康平, Wei Wenyi, 福本 敏. 脂質代謝における SCF -TRCP ユビキチンリガーゼ複合体の役割. 歯科基礎医学会. 2016年8月24日. 北海道・札幌市.
 - 永嶌 勝之, 福島 秀文, 岡本 富士雄, 緒方 佳代子, 長岡 良礼, 岡部 幸司. BHD 複合体分子 FNIP2 タンパクの量的制御機構は mTORC シグナル活性を制御する. 歯科基礎医学会. 2015年9月11日. 新潟県・新潟市.
 - 平田 志津, 福島 秀文, 片桐 岳信, 大手 聡, 進 正史, 永野 健一, 青木 和広, 諸富 孝彦, 杉山 悟郎, 中富 千尋, 古株 彰一郎, 土井 貴裕, 竹内 弘, 大谷 啓一, 寺下 正道, 平田 雅人, 北村 知昭, 自見 英治郎. NF- B p65 は Smad4 と結合することで BMP2 誘導性の骨形成を抑制する. 歯科基礎医学会. 2015年9月11日. 新潟県・新潟市.
 - 谷口 礼, 福島 秀文, 牧 憲司, 自見 英治郎. ReIB が誘導する MAP3K ファミリー分子である Cot は IKK を活性化し NF- B2 のプロセッシングを誘導することによりリンパ節形成不全マウスの破骨細胞分化抑制を解除する. 歯科基礎医学会. 2014年9月25日. 福岡県・福岡市.
 - 福島 秀文, 長岡 良礼, 永嶌 勝之, 鍛冶屋 浩, 岡本 富士雄, 岡部 幸司. ユビキチンリガーゼ SCF/ -TRCP は、脱ユビキチン化酵素 CYLD の量的制御を介し破骨細胞分化を制御する. 歯科基礎医学会. 2014年9月25日. 福岡県・福岡市.
 - 古株 彰一郎, 土屋 志津, 福島 秀文, 杉山 悟郎, 片桐 岳信, 自見 英治郎. 骨吸収と骨形成の共役機構 骨芽細胞分化における BMPシグナルと NF Bシグナルのクロストーク. 歯科基礎医学会. 2014年9月25日. 福岡県・福岡市.
 - 福島 秀文. ユビキチン プロテアソーム

システムの生命現象と疾患における役割.
歯科基礎医学会. 2014年9月25日. 福岡
県・福岡市.

9. 福島 秀文, 岡本 富士雄, 鍛冶屋 浩,
自見 英治郎, 岡部 幸司. ユビキチン
リガーゼ SCF/ -TRCP は、脱ユビキチン
化酵素 CYLD の量的制御を介して破骨細
胞分化を促進する. 日本骨代謝学会.
2014年7月24日. 大阪市・大阪府

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

自見 英治郎 (Eijiro Jimi)
九州大学歯学研究院・教授
研究者番号: 40276598

岡部 幸司 (Koji Okabe)
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授
研究者番号: 80224046

岡本 富士雄 (Fujio Okamoto)
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師
研究者番号: 60153938

鍛冶屋 浩 (Hiroshi Kajiya)
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号: 80177378

(3) 連携研究者

犬塚 博之 (Hiroyuki Inuzuka)
東北大学歯学研究科・歯学部・准教授
研究者番号: 20335863

(4) 研究協力者

Wenyi Wei
ハーバード大学医学部・教授