

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670675

研究課題名(和文)膜脂質動態に基づく破骨細胞融合機構の解明

研究課題名(英文)Phospholipid dynamics in osteoclast fusion

研究代表者

入江 敦 (IRIE, Atsushi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主任研究員

研究者番号：10280786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体内で骨を溶かす働きを持つ破骨細胞は、単核の破骨細胞前駆体同士が細胞融合することにより形成される。我々は、破骨細胞が融合する際に、リン脂質の一種であるホスファチジルエタノールアミン(PE)の生合成が増え、さらにPEが細胞表面に露出するようになることを見出した。細胞表面のPEの働きを止めると破骨細胞融合が阻害されたことから、PEの局在が細胞融合に重要であることがわかった。PEの量的・質的な変化を引き起こす分子を探したところ、LPEAT2とABCB4、ABCG1がその作用を担っていることを見出した。これらの結果から、PEの量的・質的な変化が破骨細胞融合に重要な働きを持つことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts, responsible for bone resorption, are formed by cell-cell fusion of mononuclear pre-osteoclasts. We found that the cellular content of phospholipids, phosphatidylethanolamine (PE) in particular, was increased during osteoclast differentiation. Furthermore, PE was greatly increased in the cell surface of the osteoclast precursors. Immobilisation of the cell surface PE blocked osteoclast fusion, revealing the importance of PE abundance and distribution. To identify the molecules responsible for these PE dynamics, we screened a wide array of lipid-related genes and found that LPEAT2, ABCB4 and ABCG1 are key players for PE biosynthesis and redistribution. Taken together, our findings demonstrate that the PE dynamics play an essential role in osteoclast fusion.

研究分野：生化学

キーワード：破骨細胞 リン脂質

1. 研究開始当初の背景

骨の新陳代謝は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収により厳密に制御されており、このバランスの破綻は大理石骨病や骨粗鬆症の原因となる。破骨細胞は、分化の最終段階において単核の破骨細胞前駆細胞同士が細胞融合することによって、多核の成熟破骨細胞が形成される。近年、破骨細胞分化に関わる分子が次々に同定され、受容体や細胞内情報伝達機構の概要が明らかにされつつあった。しかし、分化最終段階である破骨細胞前駆体同士の細胞融合に関しては、幾つかの関連分子の報告はあるものの、メカニズムの殆どの部分が未解明な状態で残されていた。

2. 研究の目的

細胞融合は、2つの細胞の細胞膜脂質二重層が1つの細胞膜二重層になる現象であり、細胞膜脂質の組成変化や局在変化を伴う脂質の動的変化が不可欠と予想される。このように脂質は細胞融合現象における重要な構成要素であるにも関わらず、従来の破骨細胞融合の研究はタンパク質分子の解析に偏っており、膜脂質の動態に視点を置いた研究がなされていなかった。本研究は、破骨細胞分化における膜脂質動態に焦点を当て、破骨細胞形成における脂質と脂質関連分子の役割を明らかにすることにより、脂質研究の視点から破骨細胞の融合機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

マウスより単離した骨髄細胞を M-CSF と TGF- β 存在下 3 日間培養して破骨細胞前駆体を得た。この細胞を RANKL と M-CSF 存在下 3 日間培養し、成熟破骨細胞を得た。

(2) TRAP 染色

破骨細胞形成は、破骨細胞分化マーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 活性を用いて、細胞を染色することにより解析した。

(3) リン脂質組成解析

Bligh & Dyer 法を用いて細胞からリン脂質を単離した後、2次元薄層クロマトグラフィーによりリン脂質分子種を分離した。各々のリン脂質のリン酸基を定量することにより組成を決定した。

(4) 質量分析

細胞から単離したリン脂質を液体クロマトグラフィーにて分離し、四重極型質量分析装置を用いてリン脂質分子種を定量した。

(5) 蛍光顕微鏡観察

細胞表面上のホスファチジルエタノールアミン (PE) は、PE 結合性ペプチド Ro09-0198 をストレプトアビジン-ビオチン化 (SA-Bio-Ro09-0198) した後に細胞に添加し、細胞を固定化後、FITC 標識化抗 SA 抗体を用いて可視化し、蛍光強度を定量した。

(6) 細胞融合阻害実験

破骨細胞前駆体に SA-Bio-Ro09-0198 を処理した後、培養を継続し、破骨細胞融合に対する影響を解析した。

(7) shRNA ノックダウン

shRNA 発現ベクターを作製し、エンベロープ発現ベクターとともにレトロウイルスパッケージング細胞に遺伝子導入し、shRNA 発現レトロウイルスを産生させた。このウイルスを破骨細胞前駆細胞に感染させ、RANKL と M-CSF 存在下培養して、機能的な解析に用いた。

(8) 定量的 PCR

細胞から全 RNA を単離し、逆転写酵素により cDNA を合成した。これを鋳型にして、定量的 PCR を行い、遺伝子発現量を定量した。

4. 研究成果

(1) 「破骨細胞分化にしたがって PE の組成が増加する」

破骨細胞分化過程において、分化前後の細胞から脂質を抽出し、分化前後のリン脂質組成を比較したところ、分化後の破骨細胞において、PE の組成が増加していた。次に、質量分析を用いて、分化前後のホスファチジルコリン (PC) と PE の分子種を定量した。その結果、分化した後の細胞においては、アラキドン酸やドコサヘキサエン酸といった高度不飽和脂肪酸を含有する PE が特に増加していた。

(2) 「破骨細胞が分化するにつれて細胞表面の PE が増加する」

SA-Bio-Ro09-0198 を用いて細胞表面の PE を可視化したところ、未分化の細胞においては、細胞表面に PE はほとんど観察されなかった。一方、分化した破骨細胞においては、細胞表面に強い PE の可視化シグナルが検出された。一般的な細胞において PE は、細胞膜脂質二重層において細胞膜内層に偏在しており、細胞膜外層 (即ち細胞表面) にはあまり存在しないことが知られており、分化した破骨細胞における PE の局在は極めてユニークなものである。次に、分化途中の細胞融合期の破骨細胞前駆体における PE の局在を解析した。融合期の前駆細胞は、偽足様突起を伸長し、隣り合う細胞同士の偽足様突起が接触することによって細胞融合が起こるが、この偽足様突起表面に PE は強く偏在することが明らかとなった。

(3)「細胞表面の PE は破骨細胞融合に必須である」

SA-Bio-Ro09-0198 は PE に対する結合が非常に強いので、細胞に添加すると細胞膜における PE の動きをブロックすることが知られている。未分化の単核破骨細胞前駆体に SA-Bio-Ro09-0198 を添加した後、培養を継続したところ、破骨細胞の多核化が阻害され、成熟破骨細胞が形成されなかった。この時、TRAP の酵素活性や、各種破骨細胞分化マーカーの遺伝子発現はあまり阻害されなかったことから、SA-Bio-Ro09-0198 処理した細胞は破骨細胞としての性質は持っているものの、細胞融合のみが阻害されたものと推察される。即ち破骨細胞融合には、細胞表面の PE が極めて重要であることが明らかとなった。

(4)「PE 動態に関わる脂質関連分子の探索」

今までの結果より、破骨細胞の分化過程において、PE の動態には PE の生合成の増加と、細胞表面への PE の移行の 2 つの要素からなりたっていることが明らかとなった。そこで次に PE 動態の責任分子の同定を試みた。脂質の代謝（生合成、分解）、脂質の輸送といった過程に関与する分子の中から 130 分子をピックアップし、定量的 PCR により、破骨細胞分化過程において発現量が増加する、あるいは減少することを指標としてスクリーニングを行い、めばしい分子については、さらにレトロウイルスを用いた shRNA により遺伝子発現をノックダウンし、機能的解析を行った。

(5)「LPEAT2 が PE 生合成と破骨細胞形成に必要である」

スクリーニングの結果、脂質生合成と脂質分解酵素のなかで、リン脂質合成のリモデリング経路の酵素の一種であるアシル CoA: リゾホスファチジルエタノールアミン アシル転移酵素 2 (LPEAT2) が、破骨細胞分化過程において、遺伝子発現が上昇することが明らかとなった。そして、この酵素をノックダウンしたところ、破骨細胞形成が著しく阻害されることが明らかとなった。この時、リン脂質分子種を質量分析により定量したところ、PE 分子種が顕著に減少していたのに対し、PC 分子種は僅かしか減少していなかった。さらに、細胞表面の PE を定量したところ、LPEAT2 ノックダウンにより減少していた。一方、PE 生合成の別の経路の律速酵素である CTP: ホスファチジルエタノールアミン シチジル転移酵素 2 や PS 脱炭酸酵素をノックダウンしても細胞表面の PE は減少せず、破骨細胞形成にも影響がなかった。以上の結果から、破骨細胞分化過程における PE 生合成の責任分子は LPEAT2 であることが明らかとなった。

(6)「ABCB4 と ABCG1 が PE の細胞表面への移行と破骨細胞形成に必要である」

続いて細胞表面への PE の移行の責任分子

の同定を行った。脂質二重層の内層から外層へのリン脂質の移行には、ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターファミリーに属する分子の幾つかが担っている。ABC トランスポーターのなかでも、ABCB4 と ABCG1 は、破骨細胞分化過程において遺伝子発現が上昇することがわかった。そして、これらの分子の遺伝子発現をノックダウンしたところ、破骨細胞形成が阻害され、さらに 2 つの輸送体を同時にノックダウンしたところ、破骨細胞形成が著しく阻害された。また、これら ABC トランスポーターのノックダウンにより、細胞表面の PE は減少した。一方、質量分析によりリン脂質分子種を定量したところ、細胞全体の PE の量はあまり変化しなかったことから、ABCB4 と ABCG1 のノックダウンによる細胞表面の PE の減少は、脂質二重層内層から外層への輸送が阻害されたためであることが明らかとなった。また、他の脂質輸送体分子である ABCA2 や ATP8B4、anoctamin 6 も破骨細胞分化にしたがって発現量が上昇するものの、これら分子の発現をノックダウンしても破骨細胞形成には影響がなかった。以上の結果から、破骨細胞分化過程において細胞表面に PE が移行する過程の責任分子は、ABCB4 と ABCG1 であることが明らかとなった。

(7)「得られた成果の国内外における位置づけとインパクト」

これまでの破骨細胞の研究は、主として整形外科や歯学部で骨代謝学の研究者によって切り開かれてきた。しかし、これらの領域の研究者にとって、脂質は研究材料としては扱いつらいものという認識が強く、研究対象としては敬遠されてきた。そのために、破骨細胞分化の最終段階が、細胞融合という、まさしく膜脂質が中心的役割を担う現象であるにもかかわらず、従来の破骨細胞融合の研究はタンパク性分子の解析に偏っており、脂質を研究ターゲットとして破骨細胞融合を解明する試みは、現状では国内外を通じて皆無であった。本研究成果は、従来までのタンパク性分子の研究のみでは滞っていた破骨細胞融合機構の研究領域に、「脂質」という新しい視点を提供し、今までの骨代謝学の研究領域には全く例を見ることがない、新しい切り口から破骨細胞融合機構を提示し、国内外の骨代謝学の基礎研究領域の発展に寄与した。

さらに本研究は、PE の局在変化が細胞の分化や機能に必須であることを示した国内外で初めての研究である。なぜリン脂質分子種が多用であるのか、なぜリン脂質分子種には脂質二重層において局在が厳密に制御されているのか、という問いは、脂質生物学の研究分野において、重要な研究課題であった。本研究は、これらの疑問に対する解答の一つとなり、脂質生物学の研究領域の展開に寄与した。

(8) 「今後の展望」

今後この研究成果を足がかりとして、破骨細胞融合との関連が示唆されていた分子の新たな役割の解明や、既存の破骨細胞関連分子と脂質との新しい機能的関連の発見につながる可能性もある。さらに、本研究を礎にして脂質関連分子が骨関連疾患の新たな創薬開発のターゲットとなる可能性もあり、将来的に LPEAT2、ABCB4 や ABCG1 の機能を制御する薬物を開発できれば、骨粗鬆症や関節リウマチの新しい予防・治療法につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Atsushi Irie, Kei Yamamoto, Yoshimi Miki, Makoto Murakami, Phosphatidylethanolamine dynamics are required for osteoclast fusion, Scientific Reports, 査読有, 7, 2017, 46715
DOI: 10.1038/srep46715

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 入江 敦、リン脂質動態に基づく破骨細胞融合機構の解明、第 34 回日本骨代謝学会学術集会、2016 年 7 月 22 日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)
2. 入江 敦、山本 圭、村上 誠、骨リン脂質動態に基づく破骨細胞融合機構の解明、第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会、2015 年 12 月 2 日、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)
3. 入江 敦、山本 圭、村上 誠、リン脂質動態に基づく破骨細胞融合機構の解明、第 57 回日本脂質生化学会、2015 年 5 月 29 日、一橋講堂(東京都千代田区)
4. Atsushi Irie, Kei Yamamoto, Makoto Murakami, Phosphatidylethanolamine dynamics in osteoclast fusion, 6th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators, 2015 年 2 月 10 日、京王プラザホテル(東京都新宿区)
5. 入江 敦、膜脂質動態に基づく破骨細胞融合機構の解明、TOBIRA 第 4 回研究交流フォーラム、2015 年 2 月 2 日、ソラシティカンファレンスセンター(東京都千代田区)

〔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〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/topics/2017/0424.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江 敦 (IRIE, Atsushi)

(公益財団法人) 東京都医学総合研究所・
生体分子先端研究分野・主任研究員

研究者番号: 1 0 2 8 0 7 8 6

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

村上 誠 (MURAKAMI, Makoto)

(公益財団法人) 東京都医学総合研究所・
生体分子先端研究分野・プロジェクトリー
ダー

研究者番号: 6 0 2 7 6 6 0 7

(4) 研究協力者

山本 圭 (YAMAMOTO, Kei)

三木 寿美 (MIKI, Yoshimi)