

令和元年6月13日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11494

研究課題名(和文) Pkn3が制御する破骨細胞骨吸収機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of bone-resorption in osteoclasts regulated by Pkn3.

研究代表者

上原 俊介 (Uehara, Shunsuke)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90434480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞は、骨を吸収する細胞である。歯周炎や関節リウマチなどの炎症性疾患における破骨細胞の過剰な活性化は、骨破壊をもたらす。我々は、サイトカインWnt5aの破骨細胞機能に対する作用を解析し、Wnt5a-Ror2シグナルがDaam2というアダプタータンパク質を介してRhoを活性化すること、Rhoの下流でプロテインキナーゼN3 (Pkn3)を介してc-Src活性が亢進することで破骨細胞機能が促進されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

破骨細胞の機能を促進するメカニズムとして、Wnt5a-Ror2シグナルの下流で、Rho-Pkn3-c-Src経路が重要であることを明らかにした。破骨細胞の機能亢進は、骨粗鬆症や炎症性疾患(関節リウマチや歯周病)における骨破壊の進行に重要である。そのため、破骨細胞の機能を分子レベルで明らかにすることは、破骨細胞の機能を抑制する低分子の探索につながる。これにより、骨粗鬆症や炎症性骨破壊の新たな治療薬の開発が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts are responsible for bone resorption. In inflammatory disease such as arthritis and periodontitis leads to bone destruction due to the excess bone-resorbing activity of osteoclasts. We investigated roles of Wnt5a, a cytokine, in the osteoclast function. We have shown that Wnt5a-Ror2 signaling promotes osteoclast function through the activation of Daam2-Rho-protein kinase N3 (Pkn3)-c-Src signaling pathways.

研究分野：口腔生化学

キーワード：破骨細胞 骨吸収 Wnt非古典経路 Pkn3 細胞骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞が骨に密着する際、アクチン骨格の再編成が起こり、明帯(アクチンリング)が形成される。明帯に囲まれた領域には、波状縁が形成される。これらの構造は酸による骨ミネラルの溶解と骨基質タンパク質の分解、すなわち骨吸収に必須である。アクチンリングの形成には、アクチンを中心とするタンパク質複合体であるポドソームの再配置が必要である。ポドソームの再配置は、接着によるインテグリンシグナルの活性化を必要とする。インテグリンシグナルの下流で、c-Src や Pyk2 のようなチロシンキナーゼ、Rho、Rac 及び cdc42 のような低分子量 G タンパク質が関与すると報告されているが、詳細なメカニズムについては、不明な点が多い。

Wnt は、発生過程における体軸形成やがんなどに関わるサイトカインである。Wnt は、これまでに 19 種類が報告されているが、その細胞内シグナルは、大きく古典経路と非古典経路に分けられる。どちらの経路が活性化されるかは、リガンドである Wnt と受容体である Frizzled、共受容体である LRP5/6、Ror1/2 の組み合わせにより決定される。Wnt5a 及び Ror2 の組み合わせは、Wnt 非古典経路を活性化する。

我々は、破骨細胞に Ror2 が発現しており、Wnt5a-Ror2 シグナルが破骨細胞分化を亢進することを明らかにしていた(Maeda et al. Nat Med, 2012)。さらに、Wnt5a-Ror2 シグナルの破骨細胞機能に対する役割を解析し、Wnt5a-Ror2 シグナルが Rho を活性化することで、破骨細胞の機能を亢進させることを見出した。しかし、Rho の下流で、どのようなシグナル経路が骨吸収機能を亢進させるかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、破骨細胞において Wnt5a-Ror2 シグナルがどのように Rho を活性化するか、また、Rho がどのように破骨細胞のアクチンリング形成を制御し、骨吸収を調節するか分子メカニズムを解明することを目的とする。そのために、Wnt5a-Ror2 シグナルの下流で Rho 活性化に関わる分子を同定すること及び Rho の下流でアクチンリング形成に関与する分子を同定し、その作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)破骨細胞の形成

マウス脛骨より骨髓を採取し、M-CSF 存在下で 1 日培養し、浮遊細胞を骨髓マクロファージ(BMM)とした。BMM を M-CSF 存在下で 3 日間培養し、さらに、M-CSF と RANKL 存在下で 3 日間培養することで、破骨細胞へと分化させた。

(2)アクチンリング及び吸収窩の形成

BMM を象牙切片上に播種し、M-CSF 及び RANKL 存在下、破骨細胞へと誘導した。ローダミン-ファロイジン染色により、アクチンリングを可視化し、計数した。細胞を除去後、象牙切片をヘマトキシリン染色することで吸収窩を可視化した。吸収窩面積の定量には、画像解析ソフト Image J を用いた。

(3)リアルタイム RT-PCR

BMM 及び破骨細胞から、精製キットを用いて RNA を抽出し、cDNA 合成に供した。cDNA をテンプレートとして、リアルタイム RT-PCR を実施した。

(4)Rho 活性測定

破骨細胞を、2% FBS を含む培養液で 8 時間培養した後、ヒトリコンビナント Wnt5a で 15 分刺激した。回収したセルライゼートの Rho 活性は、G-LISA キットを用いて測定した。

(5)Short-hairpin(sh)RNA による遺伝子発現阻害

標的とする遺伝子に対する shRNA の配列は、Clontech 社のサイトを利用して設計した。shRNA を含むオリゴヌクレオチドを、pSIREN につなぎ、U6 プロモーターと shRNA の配列を含む領域を増幅し、pAdenoX に導入した。得られたプラスミドを HEK293T 細胞に導入し、アデノウイルスを形成させた。精製したアデノウイルスを破骨細胞に加え、標的遺伝子のノックダウンを行った。

(6)マイクロ CT

8 週齢マウスの大腿骨及び腰椎を採取し、マイクロ CT にて海綿骨量を測定した。

(7)骨形態計測

マウス大腿骨の骨形態計測は、伊藤骨形態計測研究所に依頼した。

(8)抗 II 型コラーゲン抗体誘導性関節炎モデル

8 週齢メスマウスに Chondrex 社の Athrogen-CIA5-Clone cocktail (CIA5) と LPS を投与することにより、関節炎を誘導した。CIA5 を Day0、3、10 に尾静脈より注射した。LPS は、Day3 及び 10 に腹腔投与した。Day17 に後肢及び血液を採取した。

(9)血清中の骨吸収マーカーである CTX-1 は、RatLaps を用いて、血清中の骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性は、ALP 活性測定キットを用いて、それぞれ定量した。

4. 研究成果

Wnt 非古典経路の下流で Rho を活性化するのに必要なアダプター分子として、Daam1 が報告さ

れていた。しかし、破骨細胞には、Daam1が発現しておらず、そのアイソフォームであるDaam2が、破骨細胞分化に伴い高発現することがリアルタイム RT-PCRにより、明らかになった。

アデノウイルスを用いて、Daam2をノックダウンすると、Wnt5a誘導性のRho活性化が顕著に抑制された。また、アクチンリング形成及び吸収窩形成も抑制された。これらの抑制は、恒常活性型のRhoを発現させることにより回復した。以上の結果から、破骨細胞において、Wnt5a-Ror2シグナルは、Daam2を介してRhoを活性化することで、破骨細胞の骨吸収活性を亢進することが明らかとなった。

Rhoの下流で働くRhoエフェクターは、現在、13種類同定されている。これらの遺伝子発現をリアルタイム RT-PCRにより調べたところ、プロテインキナーゼ N3(Pkn3)の発現が破骨細胞分化に伴い顕著に増加することが判明した。破骨細胞におけるshRNAによるPkn3のノックダウンは、アクチンリング形成と吸収窩形成を抑制した。Pkn3のin vivoにおける役割を明らかにするため、Pkn3欠損マウス(Pkn3 KO マウス; 神戸大学 向井秀幸教授より供与)の骨をマイクロCTにより調べた、Pkn3 KOマウスの大腿骨の海綿骨量は、野生型マウスと比べて、顕著に増加していた(図1)。骨形態計測により、破骨細胞数は減少していないが、吸収窩の深さが浅いことが明らかになった。骨芽細胞数や骨形成速度といった骨形成系のパラメーターには差が無かった。これらの結果と一致して、血清CTX-Iは低下している一方、血清ALP活性には差を認めなかった。これらの結果は、in vivoにおいても、Pkn3が破骨細胞の骨吸収活性に重要な役割を果たしていることを示唆する。

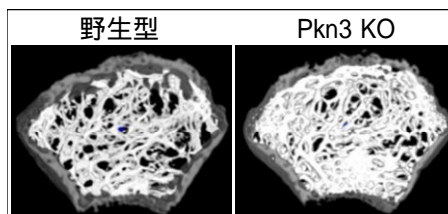


図1 大腿骨のマイクロCT像
Pkn3 KOマウスの方が海綿骨量が多い。

Pkn3がどのようにアクチンリング形成を制御するか明らかにするために、免疫沈降によりPkn3と結合するタンパク質を調べた。破骨細胞のアクチンリング形成に重要なチロシンキナーゼであるc-SrcがPkn3とRor2シグナル依存的に結合していた。Daam2のノックダウンにより、この結合が消失したことから、RhoによるPkn3の活性化が結合に重要であると示唆された。また、Pkn3 KOマウスの破骨細胞において、c-Src活性が低下していることも明らかにした。これらの結果は、破骨細胞において、Wnt5a-Ror2シグナルは、Daam2-Rho-Pkn3経路を介してc-Src活性を亢進させることで、骨吸収を促進することを示している(図2)。これらの研究成果は、Science Signaling誌に掲載された[主な発表論文の(3)]

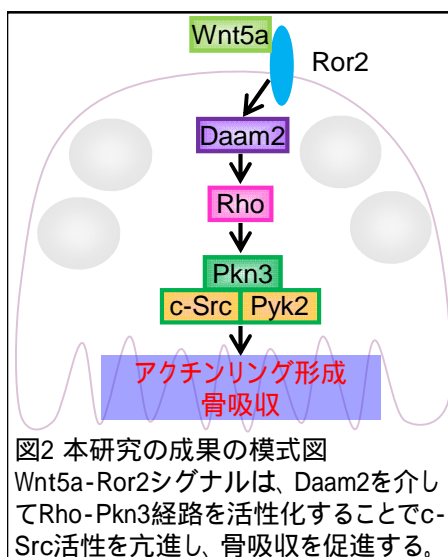


図2 本研究の成果の模式図
Wnt5a-Ror2シグナルは、Daam2を介してRho-Pkn3経路を活性化することでc-Src活性を亢進し、骨吸収を促進する。

病態モデルにおけるRor2シグナルの役割を明らかにするため、破骨細胞特異的Ror2欠損マウス(Ror2 cK0マウス)に抗II型コラーゲン抗体を注射して関節炎を誘発させた。コントロールマウスとRor2 cK0マウスにおいて、足の腫れや炎症の状態には差が認められなかった。しかし、マイクロCTにより、骨を解析すると、Ror2 cK0マウスにおいて骨破壊が顕著に抑制されていた。これらの結果は、関節炎により亢進する骨吸収においても、Wnt5a-Ror2シグナルが重要な役割を果たしていることを示唆する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

原著論文

- (1) Murakami K, Kikugawa S, Kobayashi Y, Uehara S, Suzuki T, Kato H, Udagawa N, Nakamura Y. Olfactomedin-like protein OLFML1 inhibits Hippo signaling and mineralization in osteoblasts. (2018) *Biochem Biophys Research Communications* 28: 419-425 (査読有)
doi: 0.1016/j.bbrc.2018.09.112
- (2) Lee JW, Hoshino A, Inoue K, Saitou T, Uehara S, Kobayashi Y, Ueha S, Matsushima K, Yamaguchi A, Imai Y, Iimura T. The HIV co-receptor CCR5 regulates osteoclast function. (2017) *Nature Communications* 8: 2226 (査読有) doi: 10.1038/s41467-017-02368-5.
- (3) Uehara S, Udagawa N, Mukai H, Ishihara A, Maeda K, Yamashita T, Murakami K, Nishita M, Nakamura T, Kato S, Minami Y, Takahashi N, Kobayashi Y. Protein kinase N3 promotes bone resorption by osteoclasts in response to Wnt5a-Ror2 signaling. (2017) *Science Signaling* 10: eaan0023 (査読有) doi: 10.1126/scisignal.aan0023.
- (4) Murakami K, Kobayashi Y, Uehara S, Suzuki T, Koide M, Yamashita T, Nakamura M, Takahashi N, Kato H, Udagawa N, Nakamura Y. A Jak1/2 inhibitor, baricitinib, inhibits osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression in osteoblasts in vitro. (2017) *PLoS One* 12: e0181126 (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0181126.

(5) Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T, Uehara S, Nakamura M, Hiraoka BY, Ozaki Y, Iimura T, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N. Bone Formation Is Coupled to Resorption Via Suppression of Sclerostin Expression by Osteoclasts. (2017) *Journal of Bone and Mineral Research* 32:2074-2086 (査読有) doi: 10.1002/jbmr.3175.

(6) Yamashita T, Udagawa N, Thirukonda GJ, Uehara S, Yamauchi H, Suzuki N, Li F, Kobayashi Y, Takahashi N. Platypus and opossum calcitonins exhibit strong activities, even though they belong to mammals. (2017) *General and Comparative Endocrinology* 246: 270-278 (査読有) doi: 10.1016/j.ygcen.2017.01.001.

(7) Thirukonda GJ, Uehara S, Nakayama T, Yamashita T, Nakamura Y, Mizoguchi T, Takahashi N, Yagami K, Udagawa N, Kobayashi Y. The dynamin inhibitor dynasore inhibits bone resorption by rapidly disrupting actin rings of osteoclasts. (2016) *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 34:395-405 (査読有) doi: 10.1007/s00774-015-0683-1.

総説

(1)Uehara S, Udagawa N, Kobayashi Y. Non-canonical Wnt signals regulate cytoskeletal remodeling in osteoclasts. (2018) *Cellular and Molecular Life Sciences* 75: 3683-3692 (査読有) doi: 10.1007/s00018-018-2881-1.

(2)Kobayashi Y, Uehara S, Udagawa N, Takahashi N. Regulation of bone metabolism by Wnt signaling. (2016) *The Journal of Biochemistry* 159: 387-39 (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) Wnt5a-Ror2 シグナルによる破骨細胞の骨吸収活性制御は、Rho-Pkn3-c-Src 経路を介する：上原俊介，山下照仁，村上康平，小出雅則，宇田川信之，高橋直之，小林泰浩 (第2回オーラルサイエンス研究会抄録集：p15，一般講演 3-6) オーラルサイエンス研究会 (第2回) 2018年11月 **優秀演題賞受賞**

(2) Wnt5a-Ror2 シグナルは、Pkn3 を介して破骨細胞の骨吸収を促進する
上原俊介 (第60回歯科基礎医学会学術大会抄録集 J Oral Biosci Suppl: p50, Y-4) **第30回歯科基礎医学会奨励賞受賞講演**

(3) Rho-Pkn3-c-Src pathways promote the bone-resorbing activity of osteoclasts under Wnt5a-Ror2 signaling pathways: Uehara S, Yamashita T, Murakami K, Koide M, Nakamura T, Kato S, Udagawa N, Takahashi N, Kobayashi Y (第15回 Bone Biology Forum プログラム抄録集: 別冊 p5, P-5) Bone Biology Forum (第15回) 2018年8月 **優秀ポスター発表賞受賞**

(4) Wnt5a-Ror2 シグナルは、Daam2-Rho-Pkn3-c-Src 経路を介して破骨細胞の骨吸収を促進する：上原俊介，山下照仁，村上康平，小出雅則，中村貴，加藤茂明，宇田川信之，高橋直之，小林泰浩 (第36回日本骨代謝学会プログラム抄録集: p156, O-56) 日本骨代謝学会学術集会 (第36回) 2018年7月

(5) Pkn3阻害薬による破骨細胞の骨吸収制御：上原俊介，山下照仁，小出雅則，村上康平，中村貴，加藤茂明，宇田川信之，高橋直之，小林泰浩 (第4回日本骨免疫学会プログラム: p24, P9-2) 日本骨免疫学会 (第4回) 2018年6月

(6) Wnt5a-Ror2シグナルによるPkn3を介した破骨細胞機能促進：上原俊介，村上康平，山下照仁，小出雅則，高橋直之，宇田川信之，小林泰浩 (第3回日本骨免疫学会ウインターセミナー抄録集: p18, WO9) 日本骨免疫学会ウインターセミナー (第3回) 2018年1月

(7) Ror2-Rho-Pkn3シグナルは破骨細胞の骨吸収活性を促進する：上原俊介，山下照仁，宇田川信之，高橋直之，小林泰浩 (第59回歯科基礎医学会学術大会抄録集 J Oral Biosci Suppl: p237, O2-D6) 歯科基礎医学会学術大会 (第59回) 2017年9月

(8) Wnt5a-Ror2 シグナルによる骨吸収活性調節の病態モデルにおける役割：上原俊介，山下照仁，中村貴，加藤茂明，宇田川信之，高橋直之，小林泰浩 (第35回日本骨代謝学会プログラム抄録集: p158, O-014) 日本骨代謝学会学術集会 (第35回) 2017年7月

(9) Wnt5a-Ror2-Rho-Pkn3シグナルによる破骨細胞の骨吸収機能制御：小林泰浩，上原俊介，山下照仁，中村貴，加藤茂明，宇田川信之，高橋直之 (第3回日本骨免疫学会プログラム: p23, P6-1) 日本骨免疫学会 (第3回) 2017年6月

(10) 破骨細胞における Ror2 シグナルは炎症性骨破壊を増悪する：上原俊介，山下照仁，中村貴，加藤茂明，宇田川信之，高橋直之，小林泰浩 (第2回日本骨免疫学会ウインターセミナー抄録集: p23, WO4) 日本骨免疫学会ウインターセミナー (第2回) 2017年1月

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

本研究成果の概略をまとめたものが、松本歯科大学の研究所のホームページに掲載されている。<https://www.mdu.ac.jp/laboratory/activity/treatise.html>

また、論文の発刊に合わせて記者発表を行った模様と、本研究業績により歯科基礎医学会奨励賞を受賞した時の模様が本学広報誌「Campus Today」の2017年10月号(No. 405)の3ページ及び2018年11月号(No. 418)の2ページにそれぞれ掲載され、松本歯科大学のホームページで公開されている。https://www.mdu.ac.jp/outline/upload/405_new.pdf及びhttps://www.mdu.ac.jp/outline/upload/418_new.pdf

さらに、日本骨代謝学会のホームページ内の1st Authorのコーナーでも本研究成果が紹介されている。http://www.jsbmr.jp/1st_author/291_suehara.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小林 泰浩

ローマ字氏名：Yasuhiro Kobayashi

所属研究機関名：松本歯科大学

部局名：総合歯科医学研究所

職名：教授

研究者番号（8桁）：20264252

研究分担者氏名：細矢 明宏

ローマ字氏名：Akihiro Hosoya

所属研究機関名：北海道医療大学

部局名：歯学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70350824

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。