

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790265  
 研究課題名(和文) カルシウムオシレーション非依存的破骨細胞分化を担う分子群の探索と  
 同定  
 研究課題名(英文) The investigation and identification of key molecules in the calcium  
 oscillation-independent osteoclastogenesis  
 研究代表者  
 黒田 有希子 (KURODA YUKIKO)  
 慶應義塾大学・医学部・特任助教  
 研究者番号：70455343

## 研究成果の概要(和文)

本研究期間内では、骨芽細胞と破骨細胞が直接接触することによりカルシウムオシレーション非依存的な破骨細胞分化シグナルが活性化すること、この分化シグナルを誘導する分子は骨芽細胞の膜画分に存在することが明らかとなった。また、骨芽細胞との接触により破骨細胞内のCot kinase(リン酸化酵素)が活性化され、破骨細胞分化のマスター分子であるNFATc1をカルシウム非依存的に活性化する分子機構を明らかにした。これらの結果は、新たなNFATc1活性化機構を通じた破骨細胞分化制御機構を発見した、という点で非常に興味深い知見といえる。

## 研究成果の概要(英文):

In this study, I found that direct contact between osteoclasts and osteoblasts, especially membrane fraction molecule(s) of osteoblasts, is required for the induction of  $Ca^{2+}$  oscillation-independent osteoclastogenesis. Moreover, I revealed that Cot, a serine/threonine kinase, existing in osteoclast, was activated by cell-cell interaction with osteoblasts, and directly phosphorylates NFATc1 which is a critical transcription factor for osteoclastogenesis. The phosphorylation by Cot increased the stability of NFATc1 resulting in up-regulation of their protein levels. Taken together, we propose the new activation mechanism of NFATc1 followed by osteoclastogenesis, that is increasing NFATc1 stability by Cot-mediated phosphorylation in the  $Ca^{2+}$  oscillation-independent manner.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：シグナル伝達・分化・破骨細胞・リン酸化・イノシトール三リン酸受容体・NFATc1・Cot kinase

## 1. 研究開始当初の背景

転写因子 NFATc1 (nuclear factor of activated T cells)が破骨細胞分化のマスター遺伝子として報告 (Takayanagi H. et al. (2002) Dev. Cell 3, 889-901)されて以降、ITAMモチーフをもった DAP12/FcR (Koga T. et al. (2004) Nature 428, 758-63)、PLC 2 (Mao D. et al. (2006) J. Clin. Invest. 116, 2869-79) や RGS10 (Yang S. and Li YP. (2007) Genes Dev. 21, 1803-16) といった細胞内カルシウム動態 (カルシウムオシレーション)に関わる分子のノックアウトマウスに関する報告が次々となされ、いずれも *in vitro*, *in vivo*ともに破骨細胞分化に異常があることが証明された。転写因子 NFAT ファミリーは、カルシウム/カルモジュリンによって活性化される脱リン酸化酵素カルシニューリンによって脱リン酸化され、核内へ移行することでその転写活性が発揮されることから、破骨細胞分化制御機構の主軸はカルシウムオシレーション/カルシニューリン依存性な NFATc1 の活性制御であると考えられていた。

一方、破骨細胞などの非興奮性細胞の細胞内カルシウム動態は小胞体膜上に存在するカルシウムチャネル、イノシトール3リン酸受容体 (IP3R)からのカルシウム放出が中心的な役割を果たす。実際、NFATがIP3Rの下流で活性化されることが複数の実験系で報告されている (Sugawara H. et al. (1997) EMBO J. 16, 3078-3088, Saneyoshi et al. (2002) Nature. 417, 295-9)。こうした今までの知見から、申請者は IP3R ノックアウトマウスでも「破骨細胞分化誘導時に観察されるカルシウムオシレーションが消失し、破骨細胞分化に異常が認められるであろう」と予想していた。しかしながら、予想に反し、IP3R ノックアウトマウスの生体内では破骨細胞の分化が正常に誘導されており、骨量、破骨細胞数ともに野生型マウス間との差は認められなかった。さらに解析を進め、IP3R ノックアウトマウス由来の細胞は、破骨細胞の単独培養条件下では分化が阻害されるが、骨芽細胞との共存培養条件下では分化が誘導されること、分化した破骨細胞でもカルシウムオシレーションが全く観察されないことを発見した。以上のことから、申請者は、「生体内の破骨細胞分化はカルシウムオシレーション依存性分化メカニズムに加え、全く報告のなかったカルシウムオシレーション非依存性分化メカニズムが存在する」という新しい概念を提唱した (Kuroda Y. et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 105, 8643-8)。IP3R ノックアウトマウスの生体内における破骨細胞分化が正常であった、という結果はカルシウムオシレーション非依存性破骨細胞分化メカニズムが生体内の破

骨細胞分化においてむしろ主軸として働いていることを強く示唆している。現在までに申請者はいくつかの分子に関してカルシウムオシレーション非依存性破骨細胞分化における役割を調べているが、未だその分化メカニズムにおいて中心的な役割を担う分子を見つけれられていない。そこで、本研究ではカルシウムオシレーション非依存性破骨細胞分化メカニズムにおいて重要な役割を担う分子をスクリーニングによって探索することを目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究は、骨芽細胞との共存培養によって誘導されるカルシウムオシレーション非依存性破骨細胞分化メカニズムに焦点を絞り、その分子機構を明らかにすることを目的とした。申請者は、生体内の破骨細胞分化がカルシウムオシレーション依存性経路とカルシウムオシレーション非依存性経路の2つの経路によって制御されていることを発見した。しかしながら、カルシウムオシレーション非依存性経路についてはほとんど研究がされておらず、この経路の分子機構は未知である。そこで、本研究ではこのカルシウムオシレーション非依存性破骨細胞分化シグナルの中心として働く分子を探索・同定することを目標とした。

## 3. 研究の方法

カルシウムオシレーション非依存性破骨細胞分化メカニズムを担う分子に焦点を絞ってスクリーニングを行なうにあたり、申請者は IP3R ノックアウトマウス由来の骨髄細胞の破骨細胞分化を指標とすることにした。哺乳類では3つのサブタイプのIP3Rが報告されているが、破骨細胞ではIP3R type2の発現量が最も多く、また、type2単独のノックアウトで破骨細胞分化誘導時に観察されるカルシウムオシレーションが消失し、単独培養条件下での破骨細胞分化が阻害される (Kuroda Y. et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 105, 8643-8)。つまり、IP3R2K0細胞ではRANKLの刺激条件下でカルシウムオシレーション依存性分化メカニズムが全く動かないと考えられる。本研究のスクリーニングではカルシウムオシレーション依存性分化メカニズムを完全に排除したいので、その機構を失っているIP3R2K0由来の骨髄細胞を用いることとした。また、カルシウムオシレーション非依存性破骨細胞分化メカニズムは骨芽細胞との共存培養によって誘導されることから、スクリーニングで使用する骨芽細胞様細胞は破骨細胞分化支持能を有するST2 cell lineを用いることとした。スクリーニングによって得られた候補分子が実際にカルシウムオシレーション非依存

的破骨細胞分化メカニズムを介して破骨細胞分化を誘導するかどうかは候補分子のノックアウトマウス、および IP3R2 ノックアウトマウスと掛け合わせたダブルノックアウトマウスを用いた解析によって明らかにすることを試みた。

(1) 骨芽細胞に発現し、カルシウムオシレーション非依存的破骨細胞分化メカニズムを担う分子のスクリーニング

カルシウムオシレーション非依存的破骨細胞分化メカニズムの誘導には破骨細胞と骨芽細胞の接着が必要であることから、骨芽細胞の膜上に存在する分子が候補分子であることが強く示唆された。予備実験として、ST2 細胞の膜画分を IP3R2KO 細胞の単独培養に加えた所、破骨細胞分化が誘導された(未発表)。そこで候補タンパク質を膜タンパク質に絞り、ST2 細胞を超音波破壊した後に膜画分を回収、この膜画分を用いてスクリーニングを行なうことを計画した。

(2) 破骨細胞に発現し、カルシウムオシレーション非依存的破骨細胞分化メカニズムを担う分子のスクリーニング

骨芽細胞からのシグナルを受け取り、破骨細胞内でカルシウムオシレーション非依存的に破骨細胞分化を誘導する分子を NFATc1 の活性化を指標にしてスクリーニングした。カルシウムオシレーション依存的分化メカニズムを失っている IP3R2KO 由来の骨髄細胞は骨芽細胞との共存培養によって初めて NFATc1 の活性化が誘導される。そこで、破骨細胞内に発現し、カルシウム/カルシニューリン非依存的に NFATc1 の発現を誘導する分子、または活性を調節するリン酸化修飾を行なう分子に注目してスクリーニングを行なった。カルシウム/カルシニューリン依存的な NFATc1 活性化機構はカルシニューリン阻害剤を、または IP3R2KO 細胞を用いることで阻害した。

(3) 候補分子のノックアウトマウスの作製および生体内における生理機能の解析

スクリーニングによって得られた候補分子のノックアウトマウスの解析を、破骨細胞分化・および骨形態計測を中心に行なった。また、カルシウムオシレーション依存的破骨細胞分化メカニズムが阻害されている IP3R2KO マウスとかけ合わせ、生体内の破骨細胞分化が完全に阻害されるかどうかを調べた。

#### 4. 研究成果

本研究はカルシウムオシレーション非依存的な破骨細胞分化シグナルの中心として働く分子を探索・同定することを目標とし、

カルシウムオシレーション依存的破骨細胞分化メカニズムが阻害されているイノシトール3リン酸受容体 type2 ノックアウトマウス(IP3R2KO マウス)を用いて破骨細胞分化誘導因子のスクリーニングを行なった。

本研究期間内では、骨芽細胞培養株である ST2 細胞の膜画分と IP3R2KO 細胞を用いた実験結果から、カルシウムオシレーション非依存的な破骨細胞分化を誘導する分子は骨芽細胞の膜画分に存在すること、カルシウムオシレーション非依存的な破骨細胞分化シグナルが活性化するためには骨芽細胞と破骨細胞が直接接触することが重要であることが明らかとなった。また、骨芽細胞からのシグナルを受け、破骨細胞分化を促進する破骨細胞内因子として Cot kinase に注目し、その役割を調べた。申請者は Cot kinase と IP3R2 のダブルノックアウトマウスの骨形態計測を行なった結果、Cot kinase が生体内における破骨細胞分化に関与していることを明らかにした。Cot kinase 単独のノックアウトマウスでは野生型マウスと比べ、生体内の骨形態や破骨細胞分化に顕著な差は認められなかった。IP3R2KO マウスも野生型マウスとの間に有意な差は認められないことから、カルシウムオシレーション依存的・非依存的破骨細胞分化メカニズムはお互いに補償し合う機構が生体内において強く働いているのかもしれないと考えられた。これら2つの破骨細胞分化機構がどのように使い分けられているのかを明らかにすることは今後の課題であると考えている。また、Cot kinase と IP3R2 のダブルノックアウトマウスにおいても破骨細胞が完全に消失することはなかった。この結果より、カルシウムオシレーション非依存的破骨細胞分化メカニズムにおいて重要な働きを担う分子の探索は今後も続けるべきであると考えている。

カルシウムオシレーション非依存的破骨細胞分化メカニズムの分子機構としては、破骨細胞内の Cot kinase が骨芽細胞との接触により活性化され、破骨細胞分化のマスター分子である NFATc1 を直接リン酸化すること、そのリン酸化によって NFATc1 タンパク質の安定性が増すことが明らかとなった(図 1、Kuroda Y. et al. (2012) Mol Cell Biol. 32:2954-63.)。最も一般的であるカルシウムオシレーション依存的な NFATc1 活性化経路ではカルシウム/カルモジュリンによって活性化される脱リン酸化酵素カルシニューリンによる脱リン酸化によって NFATc1 が核内へ移行し、その転写活性が発揮されることが知られている。これに対し、Cot kinase によってリン酸化された NFATc1 はリン酸化を受ける事でタンパク質の安定性が増す、つまりカルシウムオシレーション依存的な経路とは逆にリン酸化が NFATc1 に対して正の制御

を与えていることになる。Cot kinase による NFATc1 のリン酸化部位とカルシニューリンによる脱リン酸化部位は違うアミノ酸である事は明らかになったものの、詳細なリン酸化部位の特定には至っていない。NFATc1 を制御するリン酸化部位のうち、正の制御を与えるアミノ酸部位の特定が今後の課題であると考えている。

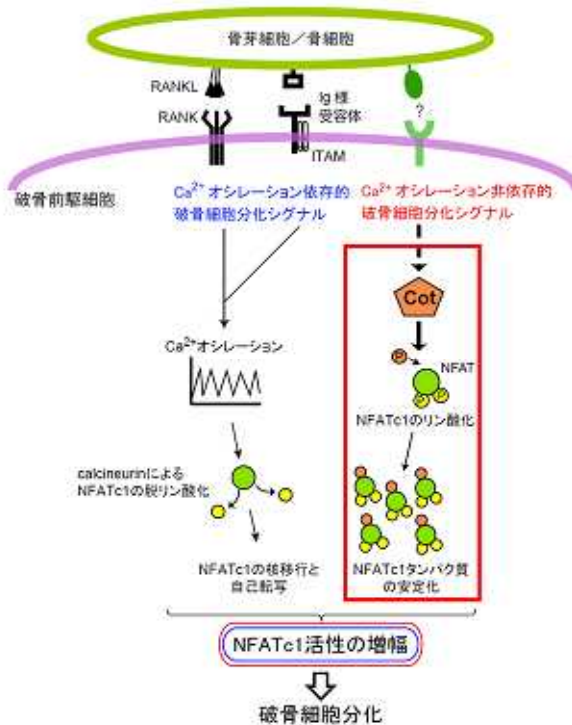


図 1 本研究によって明らかになったカルシウムオシレーション非依存的破骨細胞分化メカニズムの分子機構

本研究の結果は Cot kinase がカルシウム非依存的に NFATc1 を活性化する分子機構の一端を明らかにしたものであり、新たな NFATc1 活性制御機構を発見した、という点で非常に興味深い知見といえる。また、生体内における破骨細胞分化制御機構の新たな分子機構を明らかにしたことは様々な骨疾患を正しく理解する上で重要な意義があると言える。

#### 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3件)

1. Oikawa T, Kuroda Y, Matsuo K. Regulation of osteoclasts by membrane-derived lipid mediators. Cell Mol Life Sci. 2013 [Epub ahead of print] 査読有  
doi: 10.1007/s00018-012-1238-4

2. Kuroda Y, Matsuo K. Molecular mechanisms of triggering, amplifying and targeting RANK signaling in osteoclasts. World J Orthop. 2012;3(11):167-74. 査読有  
doi: 10.5312/wjo.v3.i11.167.

3. Kuroda Y, Hisatsune C, Mizutani A, Ogawa N, Matsuo K, Mikoshiba K. Cot kinase promotes Ca<sup>2+</sup> oscillation/calcineurin-independent osteoclastogenesis by stabilizing NFATc1 protein. Mol Cell Biol. 2012(14):2954-63 査読有  
doi: 10.1128/MCB.05611-11.

[学会発表](計2件)

1. Yukiko Kuroda, Chihiro Hisatsune, Akihiro Mizutani, Naoko Ogawa, Koichi Matsuo, Katsuhiko Mikoshiba  
Cot kinase promotes Ca<sup>2+</sup> oscillation/calcineurin-independent osteoclastogenesis by stabilizing NFATc1 protein

The American Society for Bone and Mineral Research

2012年10月12日 ~ 2012年10月15日

Minneapolis, Minnesota USA

2. 黒田 有希子、久恒 智博、水谷 顕洋、小川 直子、松尾 光一、御子柴 克彦

Ca<sup>2+</sup> oscillation/Calcineurin 非依存的破骨細胞分化メカニズム ~ Cot

kinase によるリン酸化がNFATc1 のタンパク質安定化、発現量増加を誘導する

日本骨代謝学会学術集会

2012年07月19日 ~ 2012年07月21日

東京、日本

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 有希子 (KURODA YUKIKO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 70455343