

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462873

研究課題名(和文)破骨細胞融合時の情報交換：その構造と機能

研究課題名(英文)Structure and function of the zipper-like structure

研究代表者

滝戸 次郎 (Takito, Jiro)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00197237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞は、単核細胞の融合により形成される多核細胞であり、その機能は骨を分解することである。その細胞融合に関する構造として、我々は新規のアクチン超構造体を報告してきた。本研究では、その構造の構成タンパク質の空間配置を決定し、前駆体であるPodosome beltとの違いを明らかにした。また、その構造保持に関するシグナル伝達経路を解明した。アクチンの動態を観察し、超構造体内で内向きのアクチン流動が起きている事を発見した。これらの知見を統合し、破骨細胞間の接着に働く力の釣り合いを考察した。本研究により、アクチン超構造体は、破骨細胞同士の融合時の接着に寄与することが示された。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts are multinucleated giant cells that resorb bone. We previously reported that the podosome belt transforms into another superstructure, called the zipper-like structure (ZLS), at the cell contact site of two osteoclasts. To assess the role the ZLS in osteoclast fusion, we examined the static and dynamic structure of the ZLS in the osteoclast-like cells differentiated from RAW 264.7 cells. Immunofluorescence showed that the transformation of the podosome belt into the ZLS was associated with a rearrangement of component proteins. Live-cell imaging using EGFP-actin showed that the ZLS exhibited consistent symmetrical retrograde actin flow. We next examined signaling network that forms or maintains the ZLS. M-CSF, Rac1, Src and dynamin were positive regulators of the ZLS formation, whereas RhoA was a negative regulator. These molecules also affect osteoclast multinucleation. Thus, we concluded that the ZLS was positively involved in osteoclast fusion.

研究分野：細胞生物学

キーワード：破骨細胞 細胞骨格 細胞内小器官 細胞融合 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

(1) 生理的な細胞融合は、限定された細胞のみで観察される現象であり、筋細胞、精子と卵の受精、骨の破骨細胞、胎盤の合胞体栄養細胞の細胞融合が知られている。本研究は、破骨細胞の融合におけるアクチン構造体の構造と機能を明らかにし、細胞融合に対するアクチン細胞骨格の役割を確立することを目指す。

(2) 破骨細胞は、破骨細胞分化促進因子 M-CSF と RANKL により Monocyte/Macrophage 系の単核細胞が融合し、形成される多核細胞であり、生理的には骨吸収を担当する。生理的破骨細胞融合は、マスター転写因子 NFATc1 の支配下にあり、細胞膜融合過程に関与する分子として多数の候補膜タンパク質が報告されている。その中で、DC-STAMP と ATPv60d2 のみが遺伝子欠損マウスを用いた解析から、*in vivo* における破骨細胞融合に必須であることが示されている(Kutita et al, *J Exp Med*, 200:941, 2004; Yagi et al, *J Exp Med*, 202:345, 2005; Lee et al, *Nat Med*, 12:1403, 2006)。残念ながら、細胞膜融合における両分子の作用機構は不明である。また破骨細胞融合に、中心的役割を果たす融合タンパク質 (Fusion protein) が存在するかどうか不明であり、融合の機構については全くの白紙状態である。

(3) 我々は、細胞骨格の変化を研究する過程で、培養細胞 RAW264.7 細胞の細胞融合時にアクチンを主成分とする新しい超構造体 (Zipper-like structure) を発見した (Takito et al, *J Cell Sci*, 125:662, 2012)。凝集する細胞群の底面あるいは隣接する多核細胞の接触部において前駆体であるアクチン超構造体 (podosome belt) は Zipper-like structure に転換する。同構造は *in vitro* の破骨細胞で

観察されるだけでなく、マウス頭蓋骨の破骨細胞でも観察された。Zipper-like structure は 5-10 μm の幅で両細胞をまたぎ、その長さは数 10 μm に達する。同構造は Arp3, Cortactin, Integrin β 3, Paxillin, Vinculin 等のアクチン修飾タンパク質を含む。そして Podosome と同じく、Zipper-like structure の構造は 1 分以内の時間軸で再構築される動的特性を持つ。

(4) 申請者がこのアクチン超構造体を報告した直後に、他のグループも破骨細胞同士あるいは破骨細胞とガン細胞の融合時の、細胞接触面でアクチンが特異的構造を取ることを発表した (Oikawa et al, *J Cell Biol*, 197:553, 2012)。以前からショウジョウバエの筋芽細胞の融合時には、細胞間で特異的なアクチン集積構造 (融合シナプス) の形成が知られていた (Kesper et al, *Dev Dyn*, 236:404, 2007; Kim et al, *Dev Cell*, 12:571, 2007)。また免疫系では、抗原提示細胞による T 細胞の活性化の際に、細胞境界面で“免疫シナプス”と呼ばれるアクチン超構造体が形成され、細胞間の接着とシグナル伝達を担っている (Billadeau et al, *Nat Rev Immuno*, 7:131, 2007)。

(5) これらの事例は、細胞融合時の細胞間認識にアクチン超構造体が関与することを示唆している。では、これら多種のアクチン構造が共通の機能を持つのか、あるいは細胞特異的な機能を持つのか不明である。破骨細胞融合の場合、ひとつの有力な仮説が提唱されている。上で述べたように、Podosome は動的構造である。その実態は、繰り返されるアクチンの重合と脱重合である。この重合・脱重合反応が一定の方向性を持った集団としてのアクチン繊維で発生した場合、重合方向と逆向きに強い推進力 (張力) を生む

(Mogliner, Curr Opin Cell Biol, 18:32, 2006)。この張力が細胞膜融合に関与すると仮定されている。事実、Podosome は、細胞接着面である底面に対して張力を発生する (Labernadie et al, Proc Natl Acad Sci USA, 107:21016, 2010)。この張力は、癌細胞の組織への浸潤、破骨細胞の骨への接着時に有効に働くと考えられている。しかし、podosome が発生する張力は Z 軸方向であり、細胞膜融合の際には X-Y 軸方向の力が必要と考えられるので、さらなる研究が必要である。

2. 研究の目的

(1) 細胞融合におけるアクチン構造体の役割を評価するため、破骨細胞融合時に出現する Zipper-like structure の静的構造および動的構造を明らかにする。同構造の形成・維持のための細胞内シグナル経路を解明する。破骨細胞融合に対する Zipper-like structure の役割を物理的に理解するため細胞内微細領域における張力関係を推定する。

3. 研究の方法

(1) Zipper-like structure の構造

実験系として、マウスマクロファージ様培養株細胞 RAW264.7 細胞を RANKL(Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand)で刺激して、多核の破骨細胞を分化誘導し破骨細胞モデルとして用いた。Zipper-like structure の静的構造を決定するためアクチン、Non-muscle myosin IIA, Podosome の構成タンパク質 (Vinculin, Paxillin, Zyxin, Cortactin, Arp3) に対する抗体を用い共焦点レーザー顕微鏡による免疫蛍光観察を行なった。取得した画像から、それぞれのタンパク質が占有する空間情報を計測した。画像解析ソフトとして、Nikon NIS-Elements AR-3.0 (Nikon)と Image J (NIH)を用いた。

破骨細胞内で形成されたアクチン構造体の高さを測定した。従来型共焦点レーザー顕

微鏡を用いた観察では、Z 軸の解像度が低く 1 μ m 以下の高さを正確に決定できないことが判明した。そこで N-SIM (Nikon)を用いて、アクチン構造体の高さを測定した。N-SIM で得られた画像から、0.5 – 2.5 μ m 間の構造物の高さを正確に決定できた。

(2) Zipper-like structure の動的構造を記録するため、RAW264.7 細胞へ EGFP-actin を遺伝子導入し、Olympus FV10i (Olympus)を用いた生細胞観察を行なった。以前の研究では、1分おきの画像を取得し破骨細胞融合の過程を追ったが、本研究では予備検討結果より4秒間隔で画像を取得した。得られた画像から、Image J (NIH)を用いてキモグラフを作製し、Zipper-like structure 内におけるアクチンの流動速度を決定した。

(3) Zipper-like structure の機能

Zipper-like structure の破骨細胞融合に対する役割を検討した。RANKLによる分化誘導3日目の細胞へ各種阻害剤を添加し、24時間培養後、TRAP染色に供し、形成された多核の破骨細胞数、多核細胞の大きさを評価した。同様の実験をガラス上で行い、rhodamine-phalloidin と DAPI で染色後、共焦点レーザー顕微鏡観察に供し、多核細胞の核数あるいはアクチン超構造体数を計測した。

(4) 統計解析

得られた実験結果は、student's t-test, ANOVA 検定、Fisher の W-検定を用いて統計検定を実施した。P < 0.05 を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞のアクチン細胞骨格は、ネットワークを形成する情報伝達シグナルにより制御されることが知られている。そこで、

同ネットワークを攪乱する各種薬剤を用いて、破骨細胞の多核化に対するアクチン細胞骨格の関与を検討した。重合したアクチン繊維の安定化剤である **Jasplakinolide** は、小さい破骨細胞を生じさせた。**Src** 阻害剤 **SU6656** とダイナミン阻害剤 **Dynasore** は、**Zipper-like structure** の形成を阻害し、小さい破骨細胞を生じさせた。**Small GTPase Rho** の阻害剤 **Y27632** は大きな破骨細胞を生じさせたのに対し、**Rho** の活性化剤 **Rho activator II** は小さな破骨細胞を生じさせた。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫抗体法による観察から **Rac1** と **Rho** は **Zipper-like structure** の中心部、すなわち2個の破骨細胞の接触部に局在することが判明した。**M-CSF** による刺激は、癌遺伝子 **c-Src** を介して **Rac1** の活性化と **Rho** の不活性化を引き起こし、**Zipper-like structure** の形成を調節すると推定された。以上より、アクチン細胞骨格の変化が破骨細胞の融合に関与する結果が得られた。

(2) **Zipper-like structure** の静的構造の特徴を明らかにするため、固定細胞を用いて **Podosome** を構成するタンパク質群の分布を、**Podosome belt** と **Zipper-like structure** 間で比較した。G-アクチンは、細胞接触部に幅 $8.4 \mu\text{m}$ 、高さ $2.9 \mu\text{m}$ 、長さ $159 \mu\text{m}$ の領域に、2細胞間で対称的に分布していた。F-アクチンは、その領域内で粒状あるいは縞模様状に不均一分布していた。アクチン重合因子 **Cortactin** の分布は、G-actin の分布と一致した。**Podosome** の接着タンパク質 **Vinculin** と **Paxillin** は、アクチン領域の下部に位置していた。一方、**Podosome** 接着部に分布する **Zyxin** は、細胞接着部に局在していた。収縮タンパク質 **Non-muscle myosin IIA** は、アクチン領域の内側に沿って束を形成していた。このように **Zipper-like structure** は、その前駆体である **Podosome belt** と比べ、構成タンパク質の分布が大きく異なることが示された。細胞

接着刺激が、**Podosome** 接着部に存在するタンパク質群の超構造内配置を組み替え、**Zipper-like structure** に進化したことが示唆された(図1)。

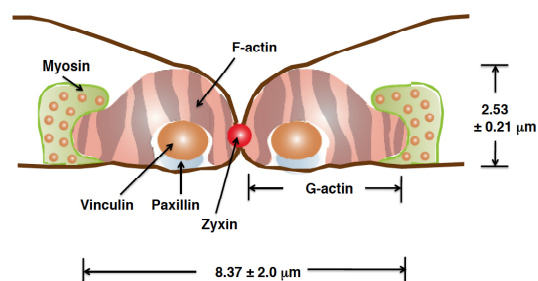


図1 zipper-like structure 内の構成タンパク質の空間分布: 断面図

(3) F-アクチンの密度分布を解析した結果、**Zipper-like structure** 内における F-actin は $1.5 \mu\text{m}$ の間隔で分布することが判明した。この間隔は、ポドゾームクラスターにおけるポドゾーム間距離に等しく、ポドゾーム由来のアクチン超構造は保存された基本構造を持つ可能性が示唆された。この構造が、ポドゾームの集団的行動(**Collective behavior**)を保証する基本であり、より大きな超構造体を形成する構成単位であると推察された。

(4) **Podosome** 由来のアクチン超構造体の高さを **N-SIM** で測定した。 $\text{Podosome} < \text{Podosome ring} < \text{Podosome belt} = \text{Zipper-like structure}$ の順に、構造はその高さを増した。これらの構造は、構成要素がほぼ同じであるため、どのような機構でより大きな超構造体を構築するのか、今後の研究が必要である。

(5) 当初実験計画では、細胞接触部に蓄積する **Cx43**(コネクシン 43)の動態および微細構造を解明することを企図した。**Real-time PCR** の結果から、**Cx43** の mRNA 量は **RAW264.7** 細胞を用いた破骨細胞分化に伴って、変化しなかった。同細胞へ

EGFP-Cx43 プラスミドの導入を様々な方法を用いて試みたが、相関電子顕微鏡解析に供するには十分な導入効率が得られず初期の計画を断念した。その間、後述する Zipper-like structure 内のアクチン流動を発見した。同現象は、破骨細胞では世界初となるもので非常に価値が高いと判断し、研究の方向を転換した。

(6) アクチン超構造体 (zipper-like structure) の破骨細胞融合における役割を明らかにするため、その動的構造を解析した。RAW264.7 細胞へ EGFP-actin を導入しアクチンの動的構造を生細胞観察した。その結果、Zipper-like structure 内で、細胞接触面から細胞体側へ対称的なアクチンの流れ (Retrograde actin flow) が観察された。このアクチン流動は観察時間中 (20分) に一貫した方向性を維持し、その平均流速は、3.3 $\mu\text{m}/\text{min}$ であった。一方、ポドゾームクラスター、Podosome belt でも、アクチンの運動は観察されたが、一貫した方向性は示されなかった。この結果は、zipper-like structure 内のみで、方向性を持ったアクチン流動が発生することを示す。持続するアクチン流動は、細胞に外向きの張力を発生すると考察した (図2)。

(7) 張力発生に関与する収縮タンパク質 Non-muscle myosin IIA は上述のように Zipper-like structure の外側に局在する。Non-muscle myosin IIA の破骨細胞融合に対する関与を検討した。Myosin light chain kinase の阻害剤である ML-7 は、TRAP 陽性の破骨細胞数を低下させた。しかし、形成された破骨細胞は大きなものであり、Non-muscle myosin IIA の活性阻害は破骨細胞形成を促進すると結論された。我々は既に small GTPase RhoA の活性化は、破骨細胞融合に抑制的に作用する事を報告してい

る (Takito et al, J Cell Physiol, 230:395, 2015)。RhoA の活性化は、myosin light chain をリン酸化する ROCK を活性化し non-muscle myosin II の活性を上昇させることが確立されている (Kimura et al., Science, 273:245,1996)。以上の知見から、RAW264.7 細胞では RhoA - ROCK - Non-muscle myosin IIA のシグナル経路が破骨細胞融合の抑制系シグナルとして機能していることが考察された。破骨細胞融合において、Zipper-like structure 内側に位置するアクトミオシンの収縮により発生する力は、Zipper-like structure 内におけるアクチン流動による細胞膜を押し付ける力と拮抗すると考えられた (図2)。このモデルは、破骨細胞融合における zipper-like structure

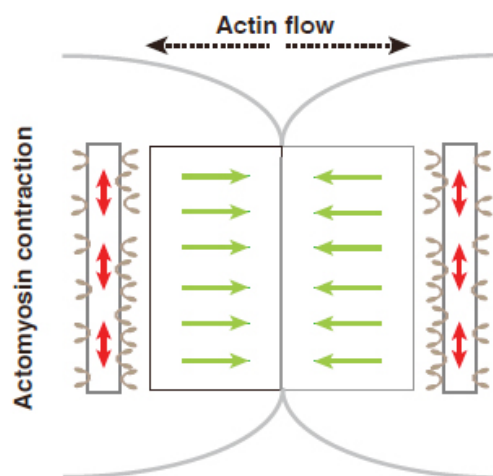


図2 破骨細胞接触部における、力の釣り合い(平面図)。アクチン流動による外向きの力(緑色)と、アクトミオシン収縮による接線方向の力(赤色)が拮抗する。

の役割の理解を格段に進めるものであると同時に、破骨細胞融合を物理的に考察した世界初のモデルである。

(8) 本研究から、Zipper-like structure は、準安定状態にある振動する散逸構造であり、同構造内におけるアクチンの運動性は他のポドゾーム由来構造体と異なることが明

らかとなった。また、Zipper-like structure 内の方向性を持ったアクチン流動が、細胞融合時に接着を促進するのに対し、アクトミオシンによる収縮力は細胞間接着を弱める作用を示す物理モデルを構築できた。

(9) 科学研究費の助成があり、Zipper-like structure という特異な超構造体を解析することができた。その成果は、破骨細胞融合の新しい一面を開くものである。我々は、本研究の結果を、日本発のオリジナル研究として世界に発信できると確信している。ゆえに、日本学術振興会に謝意を表すものである。

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 1 件)

- ① Takito J, Otsuka H, Yanagisawa N, Arai H, Shiga M, Inoue M, Nonaka N, Nakamura M. Regulation of Osteoclast Multinucleation by the Actin Cytoskeleton Signaling Network. J Cell Physiol. 査読あり、230:395-405, 2015.
DOI: 10.1002/jcp.24723

[学会発表] (計 5 件)

- ① 瀧戸二郎、中村雅典
破骨細胞に見られるアクチン超構造体の静的構造、第 121 回日本解剖学会総会、2016 年 3 月 28 日—30 日、郡山、ビッグパレットふくしま
- ② Jiro Takito and Masanori Nakamura,
The anatomy of the zipper-like structure. 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. October 30-31, 2015, Fukuoka, Fukuoka International Congress Center

- ③ 瀧戸二郎、中村雅典
エンドサイトーシスと細胞融合に関与するアクチン再構築系の分離、第 120 回日本解剖学会総会、2015 年 3 月 21 日—23 日、神戸、神戸国際会議場

- ④ 瀧戸二郎、中村雅典
アクチン細胞骨格を制御するシグナルネットワークによる破骨細胞多核化の調節、第 119 回日本解剖学会総会、2014 年 3 月 27 日—29 日、栃木、自治医科大学

- ⑤ Jiro Takito, Hirotsada Otsuka, Nobuaki Yanagisawa, Hiroshi Arai, Masayasu Shiga, Mitsuko Inoue, Naoko Nonaka, Masanori Nakamura.
Regulation of osteoclast multinucleation by the signaling network of actin cytoskeleton Annual Meeting of The American Society for Cell Biology. 2013 年 12 月 14 日—18 日、New Orleans, Louisiana, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者
瀧戸 次郎 (TAKITO, Jiro)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：00197237

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
中村 雅典 (NAKAMURA, Masanori)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：50180394