

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11046

研究課題名(和文)膜トラフィック制御分子による破骨細胞分化と骨吸収の新たな調節機能の解明

研究課題名(英文) Novel function of osteoclastogenesis and bone resorption by membrane trafficking regulatory molecule

研究代表者

久木田 明子 (Kukita, Akiko)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：30153266

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)：膜トラフィックの調節因子であるNedd4アダプタータンパク質Pmepa1の破骨細胞分化における発現と機能の解析を行なった。Pmepa1はRANKLを添加すると破骨細胞の前駆細胞に発現が見られ、象牙質切片上や骨面上の破骨細胞の細胞内小胞において強く発現していた。shRNAによる発現のノックダウン及びCrisper-Cas9システムを用いたノックアウトマウスの解析から、Pmepa1は破骨細胞前駆細胞においてはRANKの細胞表面の輸送、破骨細胞においては骨吸収の制御に関わるタンパク質であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Regulator of membrane trafficking play an important role in osteoclastogenesis and bone resorption. We analyzed expression and role of Nedd4 adaptor protein in differentiation and function of osteoclast. Nedd4 adaptor protein was induced in mononuclear osteoclast precursor cells by RANKL via p38MAPK pathway. Nedd4 adaptor protein was also expressed in osteoclasts formed on dentin slices. In addition, expression of the protein was detected in osteoclasts of bone tissues of adjuvant-induced arthritis rat. Knockdown experiment with shRNA lentivirus revealed that Nedd4 adaptor protein regulates transport of RANK to cell surface in osteoclast precursor cells. In addition, analysis of osteoclasts derived from knockout mice which were prepared using the CRISPR/Cas9 system showed that Nedd4 adaptor protein regulates bone resorption of osteoclasts.

研究分野：細胞生物学、骨代謝、分子生物学

キーワード：破骨細胞分化 小胞輸送 骨吸収

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は造血幹細胞に由来したマクロファージが融合することにより形成される多核の骨吸収能を有する細胞であり、骨代謝及び病的な骨破壊において重要な役割を持っている。破骨細胞分化因子 RANKL が明らかとされ、受容体 RANK 下流のシグナル及び転写に関わるタンパク質が報告されてきた。しかしながら、破骨細胞分化における融合、極性化、骨吸収などについてはまだ、不明な点が多い。破骨細胞は酸や酵素を盛んに分泌することにより骨を吸収する多核細胞で、その分化や活性化には小胞同士による膜トラフフィングが重要な役割をもっている。近年、このような細胞内の trafficking の制御にはユビキチンリガーゼによるタンパク質のユビキチン化のシグナルが重要な役割をもつことが明らかとなってきた。

申請者は、ラット骨髄から形成した単核の破骨細胞前駆細胞の DNA マイクロアレイ解析から、破骨細胞の前駆細胞で高い発現がある可能性のある遺伝子を解析した結果、HECT E3 ユビキチンリガーゼである Nedd4 ファミリーの活性制御に関わるアダプタータンパク質の仲間 Pmepa1 を同定した。Nedd4 は、タンパク質のユビキチン化による分解の他に、シグナル受容体、膜チャネル等の膜タンパク質の trafficking を制御しているおり、Nedd4 アダプタータンパク質は Nedd4 との相互作用を介して、細胞の分泌、分化、活性化を調節していることが報告されている。破骨細胞の分化や骨吸収の機能においては膜トラフフィングが重要な役割を持っていると考えられ Nedd4 による細胞内 trafficking 制御機構が大きく関わると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内 trafficking の制御タンパク質の 1 つである Nedd4 ファミリー-HECT E3 ユビキチンリガーゼとそのアダプタータンパク質 Pmepa1 の破骨細胞の分化における発現と骨吸収における役割及びそのメカニズムを *in vitro* の破骨細胞培養系を用いて

明らかにする。さらに、ノックアウトマウスを作成し、*in vivo* における破骨細胞の骨吸収における役割について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞分化系

マウスマクロファージ細胞株 RAW-D に RANKL を添加し 3 日間培養し破骨細胞を形成した。また、マウスから骨髄を採取し、骨髄細胞に M-CSF を添加し 3 日間培養し形成した骨髄マクロファージに、RANKL を添加してさらに 2 日間培養し破骨細胞を形成した。形成した破骨細胞を象牙質切片上で培養し、骨吸収能を測定した。骨吸収ピットは走査型顕微鏡を用いて解析した。

(2) Real-time PCR

細胞から Isogen(Nippon Gene)を用いて RNA を単離し、PrimeScript RT-PCR キット (Takara Bio)を用いて cDNA を合成後、SYBR Ex Taq により PCR 反応を行い StepOnePlus real-time PCR system により mRNA の発現のレベルを解析した。

(3) 免疫染色

細胞を 4 %PFA で固定後、TritonX を用いて permeabilize を行い、3%goat serum で blocking を行った後、1次抗体を添加した。さらに 2 次抗体を添加し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM780 を用いて解析を行った。

(4) ラットアジュバント関節炎の誘導と組織染色

5 W Lewis ラットに CFA と heat-killed *M. butyrium* を注射し関節炎を起こした。21 日後、足関節を単離し、包埋後凍結切片を作製した。ブロッキング後カテプシン K 及び Pmepa1 抗体と反応させた後 2 次抗体を反応させ Nikon 蛍光顕微鏡で観察を行った。

(5) ノックアウトマウスの作成

gRNA をデザインし、ゲノム編集用プラスミドを作成した。*In vitro* で RNA の転写を行い、Cas9 たんぱく質とともに受精卵にインジェクションした。1 日後、2 分割の卵を偽妊娠マウスの卵管に導入した。産仔の尾からゲノム DNA を単離、塩基配列の解析を行

いゲノム編集を確認した。

4. 研究成果

(1) Nedd4 アダプタータンパク質の破骨細胞分化における発現と機能の解析

Nedd4 アダプタータンパク質 Pmepa1 はマウスマクロファージ細胞及び骨髄マクロファージに RANKL を添加すると mRNA 及びタンパク質の発現が 24 時間で誘導され、72 時間では低下した。Nedd4 アダプタータンパク質、N4wbp1, N4wbp3, N4wbp4(Pmepa1), N4wbp5, N4wbp5a の中で Pmepa1 が特に高く RANKL によって発現上昇していた。また、Nedd4 ファミリータンパク質では Nedd4, Nedd4-2, WWP2 及び Smurf1 の発現が RANKL で上昇していた。さらに細胞の免疫染色をしたところ、単核のや2核の破骨細胞前駆細胞の細胞質にシグナルが検出された。一方破骨細胞には発現が認められなかった。Pmepa1 の発現誘導に関わるシグナルを検討するために p38MAPK, ERK, NF- κ B 及び NFATc1 の阻害剤を添加したところ、p38MAPK 阻害剤である SB203580 によって発現が阻害され、p38MAPK を介するこをがわかった。さらに、Pmepa1 siRNA を RAW-D 細胞に導入して破骨細胞分化に対する影響を解析したところ、破骨細胞の分化が阻害され c-fos, NFATc1 mRNA が低下した。さらに、細胞表面の RANK の発現を FACS で解析したところ、RANK の発現の低下が認められた。これらのことから、Nedd4 アダプタータンパク質 Pmepa1 は RANKL により p38MAPK の経路を介して誘導され、RANK の細胞表面への輸送に関わることが示された。

(2) Nedd4 アダプタータンパク質の破骨細胞における発現と機能の解析

Nedd4 アダプタータンパク質 Pmepa1 の *in vivo* における発現をラットアジュバント関節炎の骨破壊部位の破骨細胞での発現を調べたところ、*in vitro* の結果に反し破骨細胞で発現が認められた。そこで、*in vitro* で形成した破骨細胞を象牙質切片上で培養して、その発現を mRNA, Western 及び免疫染色によ

り調べると plastic 上で形成された破骨細胞には発現が認められなかったが、象牙質切片上の破骨細胞で強い発現が認められた。さらに、細胞内の局在を免疫染色により解析したところ、細胞内のエンドソーム、リソソームの局在が認められた。発現誘導に関わる可能性のある細胞外マトリックスとしてコラーゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチンを添加したが発現誘導は見られなかった。またインテグリンの阻害剤 RGD ペプチドを添加しても発現の低下が見られなかった。一方、骨吸収阻害薬である Bafilomycin A1 及び Alendronate を添加すると mRNA が低下し、骨吸収と Pmepa1 の発現の関連が考えられた。さらに、s hRNA レンチウイルスを作成し破骨細胞に感染したところ、破骨細胞の骨吸収が低下し骨吸収に関わるタンパク質であると考えられた。また、Crispr-Cas9 システムにより作成したノックアウトマウスを使用し、破骨細胞の骨吸収について野生型と比較した結果、同様に骨吸収の低下が認められた。これらのことから、Pmepa1 は骨吸収中の骨面上の破骨細胞で特異的に発現し骨吸収を制御するタンパク質であることが考えられた。

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 5 件)

Funakubo N, Xu X, Kukita T, Nakamura S, Miyamoto H, Kukita A. Pmepa1 induced by RANKL-p38 MAPK pathway has a novel role in osteoclastogenesis. 査読有 *J Cell Physiol.* 2018 Apr;233(4):3105-3118.

Shiratori T., Kyumoto-Nakamura Y., Kukita A., Uehara N., Zhang J., Koda K., Kamiya M., Badawy T., Tomoda E., Xu X., Yamaza T., Urano Y., Koyano K., Kukita T. IL-1 β induce pathologically activated osteoclasts bearing extremely high level of resorption activity imaged by pH-sensitive fluorescence probes: A possible pathological subpopulation of osteoclasts, accompanied with suppressed

expression of integrin regulating molecule kindling-3 and talin-1. 査読有 *J. Immunology* 2018 Jan 1;200(1):218-228. doi: 10.4049/jimmunol.1602035.

Uehara N, Kukita A, Kyumoto-Nakamura Y, Yamaza T, Yasuda H, Kukita T. Osteoblast-derived Laminin-332 is a novel negative regulator of osteoclastogenesis in bone microenvironments. 査読有 *Lab Invest.* 2017 Oct;97(10):1235-1244.

Li YJ, Kukita A, Kyumoto-Nakamura Y, Kukita T. Extremely high expression of antisense RNA for Wilms' Tumor 1 in active osteoclasts: Suppression of Wilms' Tumor 1 protein expression during osteoclastogenesis. 査読有 *Am J Pathol.* 2016 Sep;186(9):2317-25.

Ota Y., Niuro H., Ota S., Ueki N., Tsuzuki H., Nakayama T., Mishima K., Higashioka K., Jabbarzadeh-Tabrizi S., Mitoma H., Akahoshi M., Arinobu Y., Kukita A, Yamada H., Tsukamoto H., Akashi K. Generation mechanism of RANKL⁺ effector memory B cells: its relevance to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. 査読有 *Arthritis Reseach & Therapy* 18(1)2016 Mar 16;18:67.

〔学会発表〕(計 8 件)

徐祥赫、蒲原麻菜、久木田敏夫、久木田明子 Pmepa1 は骨基質成分によって破骨細胞で発現が誘導され、骨吸収を制御する 第 59 回歯科基礎医学会 2017. 09 16 18 J. Oral Biosci. Suppl. 1 p416

Xu X., Shiraki M., Kamohara A., Nishioka K., Matsuhisa F., Kitajima S., Kukita T., Kukita A. Pmepa1 is Specifically Induced by Bone Components in Osteoclasts and Regulates Bone Resorption Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research 2017.09.10 Journal of Bone and Mineral Research vol.32 suppl. 1 p237

徐祥赫、白木誠、蒲原麻菜、菖蒲池健夫、久木田敏夫、久木田明子 zBTB タンパク質 LRF/OCZF の BCL-X のスプライシング制御因子

Sam68 を介した破骨細胞の生存調節 第 35 回日本骨代謝学会 2017.07.28 プログラム抄録集 p188

Xu X., Shiraki M., Kamohara A., Kukita T., Kukita A. Nedd4 adaptor protein Pmepa1 is induced by bone components and involved in bone resorption 第 35 回日本骨代謝学会 2017.07.27 29 プログラム抄録集 p162

久木田明子、徐祥赫、白木誠、蒲原麻菜、菖蒲池健夫、久木田敏夫 zBTB タンパク質 LRF/OCZF の Bcl-X のスプライシング制御因子 Sam68 を介した破骨細胞の生存調節 第 3 回日本骨免疫学会 2017.06.27 29 抄録プログラム集 p59

徐祥赫、白木誠、蒲原麻菜、菖蒲池健夫、久木田敏夫、久木田明子 zBTB タンパク質 LRF/OCZF の破骨細胞分化における機能と骨吸収中の破骨細胞における発現の解析 第 34 回日本骨代謝学会 7 月 20-23 日 2016 (大阪) プログラム抄録集 p221

久木田明子、徐祥赫、菖蒲池健夫、武智香織、古賀貴子、白木誠、蒲原麻菜、久木田敏夫、高柳広 POZ-ZF 転写制御因子 LRF/OCZF の破骨細胞の分化と機能における役割 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会(ワークショップ) 12 月 1-4 日 2015 (神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市))

Xianghe Xu, Noboru Funakubo, Makoto Shiraki, Toshio Kukita, Akiko Kukita Novel Role of Nedd4 adaptor protein, Pmepa1 in the differentiation and function of osteoclasts. 第 33 回日本骨代謝学会 7 月 23-25 日 2015 (東京) プログラム抄録集 p157

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久木田明子 (KUKITA, Akiko)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号：30253266

(2) 研究分担者

久木田敏夫 (KUKITA, Toshio)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号：70150464

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()