

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11263

研究課題名(和文) 新規骨代謝疾患治療薬開発に向けた グルカンによる破骨細胞分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms involved in inhibition of osteoclast formation by beta-glucan

研究代表者

有吉 渉 (Ariyoshi, Wataru)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40405551

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)：破骨細胞前駆細胞RAW264.7のdectn-1過剰発現株を樹立し、curdlanを添加して培養を行ったところ、Sykタンパクの発現が著明に減少した。この減少は、bafilomycin A1の前処理により回復することから、curdlanによるSykタンパクの分解が、オートファジーに依存している可能性が示唆された。さらに、オートファゴソームによるバルク分解系の誘導に、PI3-kinaseの活性化が関与している可能性が示唆された。その一方で、この分解系の誘導には、clathrin、caveolin、もしくは脂質ラフトを介したエンドサイトーシスも必須である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)： In the previous study, we have demonstrated that the dectin-1 agonist curdlan inhibits osteoclast formation through autophagy-induced Syk protein degradation.

To clarify the detailed molecular mechanisms of curdlan on osteoclast formation, we examined the Syk expression in dectin-1 over expressing RAW264.7 cells (d-RAWs) and observed the time-dependent Syk protein degradation in the presence of curdlan. Pretreatment with the autophagy/lysosome inhibitor, bafilomycin A1 markedly blocked the Syk degradation induced by curdlan. We also found that curdlan stimulation increased autolysosome formation and the expression of autophagy marker, LC3-II. These results indicate that autophagy plays an important role in inhibition of osteoclast formation by curdlan via degradation of Syk protein. Furthermore, present study revealed that activation of phosphoinositide 3-kinase and internalization of curdlan-dectin-1 complex are required for the curdlan-induced syk degradation in d-RAWs.

研究分野：分子生物学

キーワード：破骨細胞 curdlan dectin-1 オートファジー spleen tyrosine kinase エンドサイトーシス PI3-kinase

1. 研究開始当初の背景

ピロリン酸化合物であるビスフォスフォネート製剤 (BP 製剤) は、投与経路に関わらず骨に沈着して破骨細胞に選択的に取り込まれ、アポトーシスを誘導し、骨吸収を抑制することから、わが国における骨粗鬆症治療の第一選択薬となっている。しかし、2003 年に Marx が BP 製剤の投与により発生した難治性の顎骨壊死 (ビスフォスフォネート関連顎骨壊死: BRONJ) を報告して以来、相次いで同様の報告がなされ、歯科臨床上の大きな問題となっている。BRONJ の発症機序については統一見解が得られておらず、この疾患の爆発的な増大が懸念されている。こうした契機からより特異性が高く、かつ副作用の少ない骨吸収抑制薬の開発が急務である。

近年の骨代謝研究の成果から、破骨細胞の分化機構に関連する分子が次々に同定されてきた。その一方で、細胞外マトリックスを構成する多糖は、足場としての役割のほかに、細胞内シグナル伝達経路を介して、接触する細胞の増殖、移動、形態形成、代謝等に影響を与えていることが証明され、創傷治癒や炎症反応との関わりが指摘されている。このような背景から申請者は、糖鎖が破骨細胞の分化・骨吸収活性におよぼす影響について研究を行ってきた。

そのなかで、糖鎖ヒアルロン酸は低分子体では、破骨細胞前駆細胞膜上の受容体 CD44 を介して、破骨細胞形成・骨吸収活性を増強することを報告した (Ariyoshi W, J Biol Chem, 2005)。さらに、ヒアルロン酸の代謝には、CD44 を介するエンドサイトーシス機構が関与していることを証明した (Ariyoshi W, J Biol Chem, 2010)。こうした結果から、破骨細胞には糖鎖に特異的な認識機構と代謝機構が具備されていることが証明され、骨吸収抑制薬の開発への応用の可能性が示唆された。しかし、CD44 は生体内にユビキタスに発現しているため、薬剤のターゲット分子としては、選択性という面に問題点がある。

そこで、破骨細胞前駆細胞を含めた抗原提示細胞上に特異的に発現する糖鎖認識タンパクである dectin-1 に注目した。dectin-1 は、多糖である グルカン を特異的に認識することが報告されている。われわれは、1-3 グルカンの 1 つ curdlan が、dectin-1 を介して破骨細胞前駆細胞に作用して、破骨細胞への分化および骨吸収活性を負に制御することを見出した。さらに、その抑制メカニズムとして、非受容体型のチロシンキナーゼである Syk のタンパク発現抑制を介した破骨細胞分化のマスター転写因子である Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1 (NFATc1) の負の制御が関与していることを証明した (Yamasaki T and Ariyoshi W, J Biol Chem, 2014)。

本申請に先駆けて行った研究で、curdlan による Syk タンパクの負の制御には、遺伝子の発現抑制は関与しておらず、プロテアソ

ーム系と並んで細胞成分の代謝に働いているオートファジーを介したタンパク分解機構が関与していることが推測された。そこで、curdlan の破骨細胞分化抑制メカニズムの分子レベルでの解析が、未だ明らかでない破骨細胞分化制御機構の解明、および選択性の高い骨代謝疾患治療薬の創薬にきわめて有効であると考えて、今回の研究に至った。

2. 研究の目的

今回、curdlan による破骨細胞分化抑制機構の解明と臨床応用への展開のため、破骨細胞前駆細胞株を用いて、オートファジー阻害実験、オートファジー関連分子の発現や機能の同定を行い、curdlan による Syk の分解にオートファジーを介したタンパク分解機構が関与していることを証明する。

また、細胞外の物質を取り込むエンドサイトーシスは、オートファジーと協調していることが近年見出され、curdlan も同様のメカニズムで代謝されている可能性が十分に考えられる。そこで、膜トラフィック関連分子の局在を明らかにし、curdlan の代謝経路に関する知見を得る。

3. 研究の方法

(1) curdlan によるオートファジーを介した Syk タンパク分解機構の解明

細胞培養

in vitro における破骨細胞分化誘導系として、破骨細胞前駆細胞株である RAW264.7 細胞 (RAW) を使用した。同細胞の dectin-1 過剰発現株を樹立し (d-RAW) 併せて研究に用いた。同培養系に対し、curdlan を添加して培養を行い、培養後の細胞よりサンプルを回収し、生化学的分析に用いた。

生化学的分析

a. Western blotting 分析

培養後の細胞より、タンパクを抽出し、細胞内分子の発現について評価を行った。

b. オートリソソームのイメージング

培養後の細胞のオートリソソームを DAL Green で蛍光標識し、蛍光顕微鏡視下にオートファジーの誘導を観察した。

(2) オートファジーとエンドサイトーシスの協調による Syk タンパク分解機構の解明

細胞培養

上述の RAW 細胞の培養系に対して、各種エンドサイトーシス阻害剤、および PI3 キナーゼ阻害剤で前処理を行った後、curdlan を添加して培養を行った。培養後の細胞よりサンプルを回収し、生化学的分析に用いた。

生化学的分析

a. Western blotting 分析

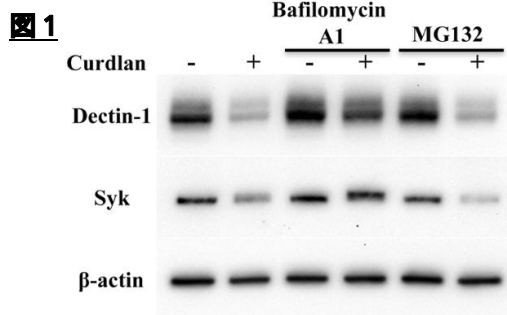
培養後の細胞より、タンパクを抽出し、細胞内分子の発現について評価を行った。

4. 研究成果

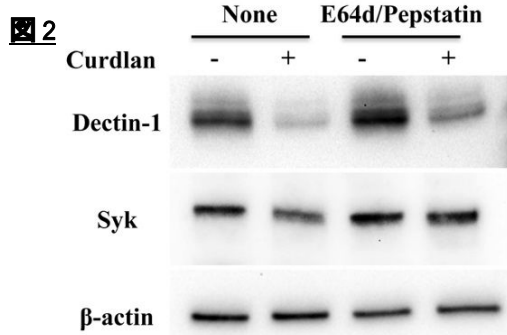
(1) curdlan によるオートファジーを介した

Syk タンパク分解機構の証明

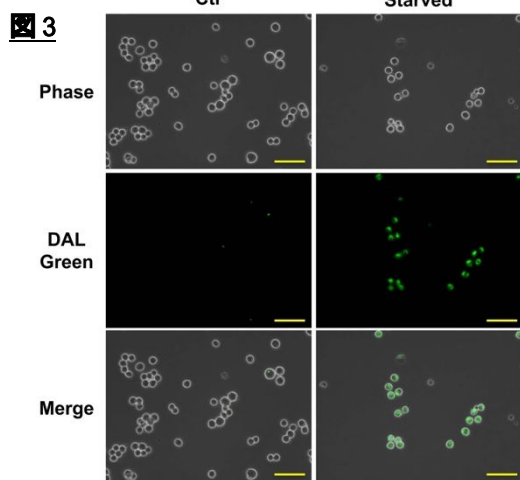
curdlan による Syk タンパク分解は、オートファジー阻害剤 (Bafilomycin A1) により阻害される一方、プロテアソーム阻害薬 (MG132) では変化しなかった。(図 1)



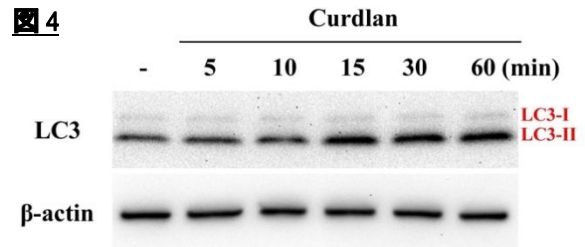
さらに、curdlan による Dectin-1 および Syk タンパクの分解は、リソソームプロテアーゼ阻害剤である E64d と Pepstatin A によっても阻害された(図 2)。このことから、curdlan はオートファジーを介したタンパク分解系を活性化することで、dectin-1 および Syk タンパクの分解が誘導されることが示唆された。



また、蛍光色素を取り込んだ d-RAW 細胞を通常培地 (Ctr; 10%FBS 添加 MEM) および飢餓培地 (Starved; HBSS) で、それぞれ 6 時間培養し、オートリソソームの観察を行なった。その結果、飢餓培養にてオートファジーを誘導した d-RAW 細胞において、有意にオートライソソーム (DAL Green; 緑色) が検出された(図 3)。

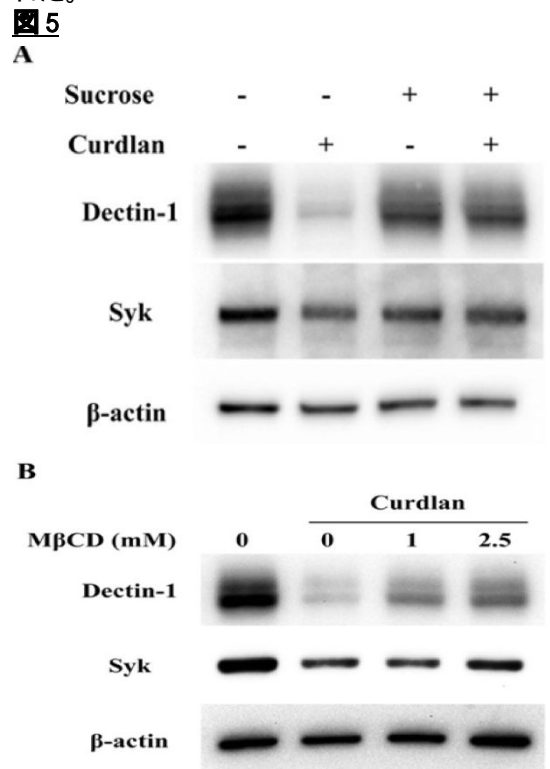


オートファジー制御機構の研究で、オートファゴソーム形成に関わる Atg 遺伝子群が同定された。そのなかで、atg8 の哺乳類ホモログの 1 つ LC3 は、オートファゴソームに局在して膜成分の一部として機能しており、オートファジーマーカーとして頻用されている。我々は curdlan 刺激後の d-RAW において、LC3 が誘導されることを見出した(図 4)。



(2) オートファジーとエンドサイトーシスの協調による syk 分解機構の解明

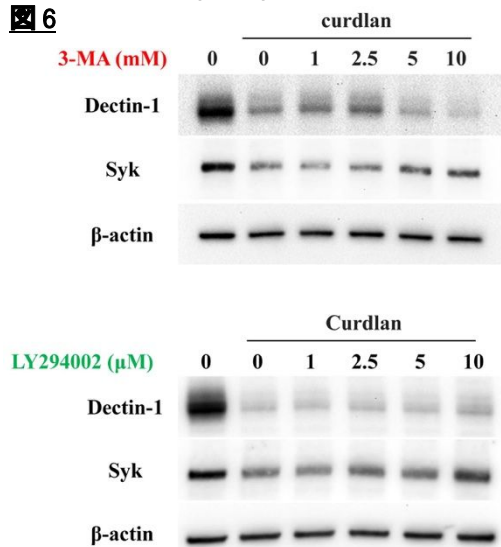
sucrose によるクラスリン依存性 (A)、methyl-β-cyclodextrin によるカベオラおよび脂質ラフト依存性エンドサイトーシス (B) の阻害より、curdlan に誘導される Syk タンパクの分解が回復することを見出した(図 5)。このことから、curdlan によるオートファジーを介した分解系の誘導にエンドサイトーシスが関与していることが示唆された。



オートファゴソーム膜にはフォスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3P) というリン脂質が含まれ、それを産生する型 PI3 キナーゼ (PI3K) がオートファゴソーム形成に必須である。

curdlan による Dectin-1 および Syk タンパクの分解は、Ⅱ型 PI3 キナーゼ選択的阻害剤である 3-MA の前処理により、回復した。その一方で、Ⅰ～Ⅲ型 PI3 キナーゼ全ての活性化を阻害する LY294002 前処理群では、curdlan による Syk タンパクの分解は回復するものの、Dectin-1 タンパクの分解に関しては、明らかな変化は観察されず、タイプ別 PI3 キナーゼの活性化経路による複雑なオートファジー/エンドサイトーシス制御機構の存在が伺われた (図 6)。

図 6



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 4 件)

Furuta J, Ariyoshi W, Okinaga T, Takeuchi J, Mitsugi S, Tominaga K, Nishihara T, High Molecular Weight Hyaluronic Acid Regulates MMP13 Expression in Chondrocytes via DUSP10/MKP, *Journal of Orthopaedic Research*, 査読有, 2017, 35 (2): 331-339, DOI: 10.1002/jor.23266

Ariyoshi W, Okinaga T, Chaweewannakorn W, Akifusa S, Nishihara T, Mechanisms Involved in Enhancement of Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Macrophages by Interleukin-33. *Journal of Cellular Physiology*, 査読有, 2017 232 (12): 3481-3495, DOI: 10.1002/jcp.25809

Chaweewannakorn W, Ariyoshi W, Okinaga T, Morikawa K, Saeki K, Maki K, Nishihara T, Ameloblastin and Enamelin prevent osteoclast formation by suppressing RANKL expression via MAPK signaling pathway, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 2017 485 (3): 621-626, DOI: 10.1016/j.bbrc

Kajita T, Ariyoshi W, Okinaga T, Mitsugi S, Tominaga K, Nishihara T, Mechanisms involved in enhancement of osteoclast formation by activin-A, *Journal of Cellular Biochemistry*, 査読有, 2018, in print, DOI: 10.1002/jcb.26906

[学会発表](計 18 件)

古田 絢也、三次 翔、金氏 毅、沖永敏則、吉賀大午、宮本郁也、有吉 渉、吉岡 泉、富永和宏、西原達次: ヒト軟骨細胞株 C28/I2 における TNF 誘導 MMP13 発現に対するヒアルロン酸の影響、第 75 回九州歯科学会総会学術大会、北九州市、2015 年 5 月 23 日-24 日

有吉 渉、沖永敏則、西原達次: Curdlan による破骨細胞分化抑制メカニズムの解明、第 26 回日本生体防御学会学術総会、東京、2015 年 7 月 10 日-12 日

有吉 渉、沖永敏則、西原達次: Curdlan 誘導オートファジーによる syk の分解を介した破骨細胞分化制御機構、第 57 回歯科基礎医学会学術大会、新潟市、2015 年 9 月 11 日-13 日

古田 絢也、沖永敏則、有吉 渉、西原達次: ヒアルロン酸は生物学的活性により C28/I2 細胞の MMP13 発現を抑制する、第 57 回歯科基礎医学会学術大会、新潟市、2015 年 9 月 11 日-13 日

Furuta J, Ariyoshi W, Okinaga T, Mitsugi S, Tominaga K, Nishihara T: High molecular weight hyaluronic acid regulates MMP13 expression in chondrocytes via DUSP10/MKP5, *Interdisciplinary Medical, Dental and Soft-material Researches on the move -Showcase Review in Kitakyushu-*, Kitakyushu, Japan, January 22-23, 2016

Ariyoshi W: Mechanisms involved in regulation of osteoclastogenesis by curdlan, *Promising Researcher's Lecture, Interdisciplinary Medical, Dental and Soft-material Researches on the move -Showcase Review in Kitakyushu-*, Kitakyushu, Japan, January 22-23, 2016

Ariyoshi W, Chaweewannakorn W, Okinaga T, Nishihara T, Interleukin-33 up-regulates matrix metalloproteinase-9 expression via ERK-CREB-AP-1 axis, *IADR/APR General Session & Exhibition, Seoul, Republic of Korea*, June 22-25, 2016

Chaweewannakorn W, 有吉 渉、沖永敏則、西原達次: Ameloblastin and enamel regulate osteoclastogenesis by modifying RANKL expression via p38 and Erk1/2 MAPKs

signalling pathways、第 58 回歯科基礎医学学会学術大会、札幌市、2016 年 8 月 24 日-26 日

有吉 涉、Chaweewannakorn Wichida、沖永敏則、西原達次：Interleukin-33 (IL-33) による matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 発現増強メカニズムの解明、第 58 回歯科基礎医学学会学術大会、札幌市、2016 年 8 月 24 日-26 日

Wichida Chaweewannakorn、牧憲司、有吉 涉、沖永敏則、西原達次：Biological Effects of Enamel Related Proteins (ERPs) on Bone Metabolism in Human Being、第 23 回日本歯科医学会総会、福岡市、2016 年 10 月 21 日-23 日
Kajita T, Ariyoshi W, Okinaga T, Nishihara T: Activin-A Induces Osteoclast Differentiation in Murine Bone Marrow Cultures, IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition, San Francisco, Calif, United States, March 22-25, 2017

Kajita T, Ariyoshi W, Okinaga T, Mitsugi S, Tominaga K, Nishihara T: Activin-A promotes RANKL-induced osteoclast differentiation, Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2017-International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu, Kitakyushu, Japan, May 11, 2017

Ariyoshi W, Okinaga T, Takeuchi J, Nishihara T: Mecanisms involved in inhibition of tnf- α -induced mmp13 expression by high molecular weight hyaluronic acid, Hyaluronan 2017, Cleveland, United States, June 11-15, 2017

梶田倫功、有吉 涉、沖永敏則、三次 翔、富永和宏、西原達次：破骨細胞の分化過程における Activin-A の誘導機能の解明、第 77 回九州歯科学会総会学術大会、北九州市、2017 年 5 月 20 日-21 日

Wichida Chaweewannakorn、有吉 涉、沖永敏則、牧 憲司、西原達次：The Biological Effects of Ameloblastin on Osteoclast Differentiation、第 55 回日本小児歯科学会、北九州市、2017 年 5 月 25 日-26 日

有吉 涉、西原達次：Cudlan は syk の分解を介して、破骨細胞分化を抑制する、第 35 回日本骨代謝学会学術集会、福岡市、2017 年 7 月 27 日-29 日

梶田倫功、有吉 涉、沖永敏則、西原達次：Activin は RANKL 誘導の破骨細胞分化を亢進する、第 59 回歯科基礎医学学会学術大会、塩尻市、2017 年 9 月 16 日-18 日

有吉 涉、沖永敏則、西原達次：cudlan-dectin-1 の相互作用により誘

導される syk の分解を介した破骨細胞分化制御機構、第 59 回歯科基礎医学学会学術大会、塩尻市、2017 年 9 月 16 日-18 日

〔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.kyu-dent.ac.jp/research/lecture/infection_molecule

6 . 研究組織

(1)研究代表者

有吉 涉 (ARIYOSHI, Wataru)
九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：40405551

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし