

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09516

研究課題名(和文) RANKL/OPGリソソーム選別輸送制御による骨代謝動態の解明

研究課題名(英文) Bone remodeling via RANL/OPG intracellular transportation

研究代表者

納富 拓也 (Notomi, Takuya)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70542249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症を含む骨疾患に関する研究は、骨吸収を抑制することを目的として、破骨細胞形成因子であるRANKL分子を中心に進展してきたが、反作用を持つ破骨細胞分化抑制因子OPGについては、応用研究は少ない。RANKLとOPGに異なる蛍光タンパクを付与した分子を遺伝子導入した骨芽細胞を用いて、伸展刺激を行ったところ、長期の力学的刺激により、明確な選別輸送が認められた。また、光照射により膜電位変動を生じさせて、選別輸送の条件検討を行った。長期の光誘導脱分極により、OPGとRANKL分子との細胞膜への移行を確認した結果、特定の条件下で明確な選別輸送が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、RANKLとOPGの細胞内輸送経路に焦点を当てて検討した。従来の研究では、RANKLについての輸送経路についての検討が行われてきたが、OPGについては不明確であった。本研究で明らかになった、RANKLとOPGの細胞内輸送経路の違いは、破骨細胞形成と骨芽細胞機能に関わる分子メカニズムの新知見であり、骨量回復のための、骨粗鬆症治療薬の新たな標的につながる。

研究成果の概要(英文)：The investigation for bone diseases was developed mainly via suppression of bone resorption including RANKL intracellular signaling. However, the application for OPG which is a RANKL-decoy receptor are not well examined. In osteoblasts expressing RANKL-venus or OPG-cherry, long-term stretch-mechanical stimulus induced the distinct intracellular transportation. Long-term light stimulus which induces the changes in membrane potential promoted the intracellular transportation of OPG but not RANKL, suggesting that specific condition of light stimulus or mechanical stimulus would occur the distinct intracellular transportation of OPG.

研究分野：骨生物学

キーワード：破骨細胞 OPG 光遺伝学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症・関節リウマチを代表とする骨疾患を治療・予防するために、骨代謝研究は、四半世紀の間に急速な進展を遂げた。特に、破骨細胞の分化機構に関する知見は、破骨細胞分化促進因子である RANKL (Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand) の同定により大きく進展して、その抗体医薬の開発に至った。この RANKL シグナル研究を中心として骨代謝研究は進展したが、生体内で反作用を持つ破骨細胞分化抑制因子 OPG (Osteoprotegerin) については、その生体内分泌条件が不明確なこともあり、骨疾患に応用する研究は進展していない。骨芽細胞における RANKL/OPG の細胞内輸送・分泌の主経路は、両者ともにリソソーム小胞が担っている。しかしながら、RANKL と OPG を含有するリソソーム小胞の細胞膜への輸送は不均一であり、生体・刺激状況に応じて細胞膜における RANKL/OPG 比率は増減する。これは、リソソーム小胞が刺激条件に応じて、分子毎に細胞膜へ選別輸送されることを示す。すなわち、生体内にて OPG を骨疾患に応用するには、RANKL/OPG の選別輸送を明らかにする必要がある

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、リソソーム小胞を介した RANKL/OPG 選別輸送のメカニズム解明である。特に、破骨細胞分化促進/抑制を制御する RANKL/OPG 選別輸送の骨芽細胞での検討を中心とする。オルガネラ選別輸送は、長年にわたり細胞生物学の核心的研究であるが、小さいオルガネラ・複雑な移行動態のため、未だ不明確である。我々が開発して用いてきた技術・経験(細胞への力学的刺激・光操作によるリソソーム膜電位変動)を応用して、この困難を克服する。近年、我々の報告を含めて、RANKL, OPG がリソソーム小胞により、特定刺激条件下にて、選別輸送されて分泌されることが明らかとなってきている。本研究は、我々の行ってきた骨代謝・力学的刺激伝達機構・光遺伝学研究を土台とした、従来の細胞生物学研究とは別観点から分子選別経路に迫るユニークでオリジナルな研究である。

### 3. 研究の方法

#### RANKL/OPG リソソーム選別輸送の発生条件スクリーニング

我々の先行報告で、副甲状腺ホルモン (PTH: Parathyroid hormone) 活性化型ビタミン D3 (VD3: Vitamin D3) 細胞の膜電位変化(脱分極)の刺激により、RANKL 含有リソソーム小胞は細胞膜に移行するが、OPG 含有リソソーム小胞の移行は少ないことを認めている。これを基盤として、OPG 分子の細胞膜移行を検討して、選別輸送の条件刺激をスクリーニングする。

骨芽細胞株(MC3T3-E1)・頭頂骨由来骨芽細胞を用いて、刺激条件による蛍光分子融合タンパクの移行をリアルタイムで観測・定量計測する。具体的には、半自動顕微鏡下にて、刺激直後から微小領域観察を行い、蛍光分子の移行を自動追尾しながら画像解析を行う。スクリーニングする刺激条件として、骨芽細胞の活性に関与する生体内分子・外部刺激(薬物、力学的刺激)を用いた。スクリーニングした条件での選別輸送を確認するために、細胞膜を分画してからウェスタンブロッティングを行い、刺激前、刺激 5-10 分後での標的分子(RANKL/OPG)タンパク量を定量する。以上の実験により、RANKL, OPG の選別輸送発生条件を探索する。

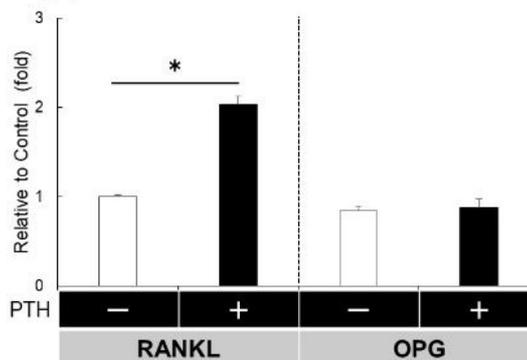
#### RANKL/OPG リソソーム選別輸送機構の光制御

次に、リソソーム膜上のイオンチャネルと微小領域の観点から検討する。リソソーム膜上のイオンチャネル TPC2 の骨代謝における役割を報告してきた。局所的領域において、RANKL もしくは OPG と TPC2 の関連性により、力学的刺激を介した膜電位変動を促進させる可能性がある。力学的刺激による選別輸送条件を土台として、骨芽細胞の細胞膜・リソソーム膜電位を変動させて、前述と同様に、細胞膜を分画してからウェスタンブロッティングを行い、標的分子の細胞膜移行を定量化する。さらに、各種イオンチャネル阻害薬を用いて、それら分子と細胞内選別輸送との関係を検討する。

### 4. 研究成果

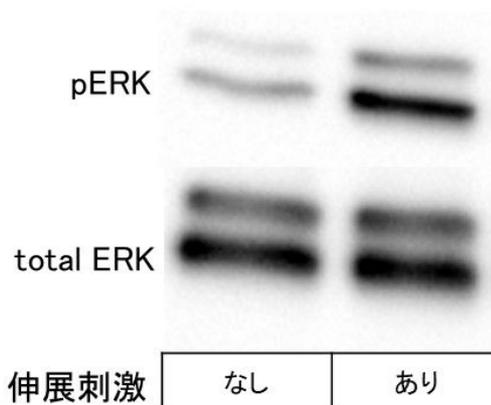
迅速なスクリーニングを可能とするために、RANKL と OPG 分子の N 末端に蛍光分子(Venus もしくは cherry) を付加した融合タンパク質を作成した。骨芽細胞株(MC3T3-E1)およびマウス頭頂骨由来骨芽細胞にそれらの遺伝子導入を行い、半自動顕微鏡下にて、微小領域を観察して、蛍光分子の移行を追跡した。PTH 刺激により、10 分間観察における RANKL 蛍光分子の細胞膜への移行数は非刺激と比べて増加したが、OPG 蛍光分子の移行数は変化がなかった(図 1)。同様に、活性化型ビタミン D3 の刺激においても RANKL 蛍

図 1



光分子の移行数は増加して、OPG 蛍光分子の移行数の変化は観察されなかった。次のスクリーニング条件として、伸展刺激を用いた。伸展刺激の刺激強度の決定には、リン酸化 ERK を指標として用いて、ウェスタンブロットングにて定量をおこない、各種条件を決定した(図2)

図2

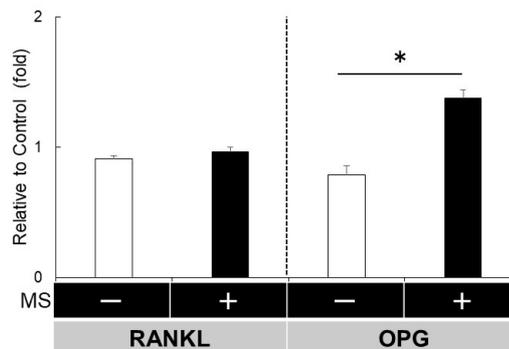


伸展刺激の強度依存的(5-30%)に、RANKL, OPG 蛍光分子のいずれも、細胞膜への移行が増加した。しかしながら、伸展刺激を長期間(1日1回, 7日間)実施後の移行を観察すると、OPG 蛍光分子の移行のみが増加した(図3)。これらの結果は、力学的刺激依存的な OPG 分子細胞内輸送の存在を示す。これらの結果を確認するために、刺激5-10分後にタンパク質を抽出して、細胞膜を分画した後、ウェスタンブロットングを行った。蛍光観察の結果と類似して、伸展刺激の強度依存的に、膜画分における RANKL, OPG タンパク量は増加したが、総タンパク量に変化はなかった。また、長期刺激後では、OPG タンパクの増加量が增大していた。これらの結果より、各種刺激は、OPG, RANKL タンパクの細胞内輸送を刺激して、細胞膜への移行を促していることが示唆された。

力学的刺激は、細胞膜の脱分極を促すことから、光感受性分子チャネルロドプシン(リソソーム移行シグナルを付加したものを含む)を安定発現させた骨芽細胞様株および骨細胞様細胞を用いて、光誘導脱分極との関係をウェスタンブロットングのタンパク定量により検討した。1回の光刺激後では、膜画分における RANKL タンパク量の増加が認められ、OPG タンパク量に変化なかった。しかしながら、1日1回刺激を10日間行った後の結果では、膜画分における OPG タンパク量のみ増加した。これは、長期力学的刺激と類似した、長期的な光刺激が特定分子の細胞内輸送に影響することを示す。

このメカニズムを検討するため、リソソーム膜分子である TPC2 に着目した。TPC2 欠損骨芽細胞では、長期間の力学刺激との関係性が不明確になるため、TPC2 阻害薬を伸展刺激時のみ加えて、実験を行った。その結果、対照薬(PBS)を添加した細胞では、長期力学的刺激後に、膜画分の OPG タンパク量が増加したが、TPC2 阻害薬の添加では、膜画分の OPG タンパク量に変化は認められなかった。RANKL タンパク量は、いずれの場合でも長期力学刺激後に変化はなかった。さらに、細胞膜とともにリソソーム膜にも局在する HCN 分子の影響をあわせて検討した。伸展刺激時の HCN の阻害薬添加により、膜画分の RANKL タンパク量、OPG

図3



タンパク量ともに変化が認められず、TPC2 阻害と同様の結果を得た。以上の結果から、特定の刺激条件下にて、RANKL, OPG の細胞内輸送が選別されることが示唆された。また、この選別輸送に、膜上イオンチャネルが関与していたことから、リソソームの膜電位変動の影響が考えられる。本研究結果の力学的刺激の一定条件にて、OPG 分子のみ選別輸送されることは、破骨細胞を標的とした薬物開発の新たな標的となり得る。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takuya Notomi, Ryuichiro Kobayashi, Miki Otsuka, Chie Kise, Yoshihiro Momota, Yoichiro Ezura, Takayoshi Kawazoe	4. 巻 30
2. 論文標題 Light-induced Membrane Hyperpolarization Promotes Osteoblast Differentiation in MC3T3 Osteoblast-like Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Hard Tissue Biol	6. 最初と最後の頁 347-354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takuya Notomi, Chie Kise, Ryuichiro Kobayashi, Miki Otsuka, Yoshihiro Momota, Yoichiro Ezura, Takayoshi Kawazoe	4. 巻 30
2. 論文標題 TPC1 and TPC2 Promote Osteoclastogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Hard Tissue Biol	6. 最初と最後の頁 333-338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takuya Notomi, Miki Otsuka, Chie Kise, Ryuichiro Kobayashi, Yoshihiro Momota, Takayoshi Kawazoe	4. 巻 55
2. 論文標題 Delivery of plasmid DNA into pre-osteoclast-like and mature osteoclast-like cells using cationic peptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Osaka Dent Univ	6. 最初と最後の頁 239-243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takuya Notomi, Masakazu Inubushi, Tadashige Nozaki	4. 巻 53
2. 論文標題 Synaptotagmin VII affects RANKL-lysosomal vesicle fusion to the cell membrane in osteoblast-like cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Osaka Dent Univ	6. 最初と最後の頁 141-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18905/jodu.53.2_141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Msakazu Inubushi, Takuya Notomi, Tadashige Nozaki	4. 巻 53
2. 論文標題 Retinoic acid promotes migration of MC3T3-E1 osteoblast-like cells via RAR signaling-mediated upregulation of profilin-1 expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Osaka Dent Univ	6. 最初と最後の頁 149-156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18905/jodu.53.2_149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takuya Notomi, Akiko Hiyama, Tadashige Nozaki	4. 巻 6
2. 論文標題 Establishment of RANKL-highly sensitive RAW264 subclones in accordance with high expression of TPC2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Transl Sci	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/JTS.1000357	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takuya Notomi, Akiko Hiyama, Tadashige Nozaki	4. 巻 6
2. 論文標題 Role of zinc and zinc-modulated ion channels, ORAI1 and HCN in osteoclasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Transl Sci	6. 最初と最後の頁 5-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/JTS.1000359	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 納富拓也、野崎中成
2. 発表標題 コンピュータ・シミュレーション/iPS細胞を用いて動物に代替する薬理学実習の試み
3. 学会等名 第39回歯科医学教育学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 犬伏正和、納富拓也、野崎中成
2. 発表標題 レチノイン酸はRAR シグナル経路を介してprofilin1 遺伝子発現調節により骨芽細胞様細胞遊走能を向上させる
3. 学会等名 第38回日本歯科医学教育学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中純生、納富拓也、鈴田真裕、小島千尋、野崎中成、川添堯彬
2. 発表標題 破骨細胞における力学的刺激伝達機構の探索
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Notomi, Akiko Hiyama, Tadashige Nozaki
2. 発表標題 Stretch-stimulus activates the mechano-sensitive channel, Piezo1 and the subsequent Ca <sup>2+</sup> influx via L-type and T-type voltage-gated Ca <sup>2+</sup> channels in osteocyte-like cells
3. 学会等名 ASBMR2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Notomi, Akiko Hiyama, Tadashige Nozaki, Masaki Noda
2. 発表標題 Stretch-stimulus activates the mechano-signaling via opening of the mechano-sensitive channel, Piezo1 and the subsequent calcium influx in osteocyte-like cells
3. 学会等名 ASBMR 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------