

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592165
 研究課題名（和文） 破骨細胞の酸分泌における Clcn7 と V-ATPase の分子機能カップリングの解明
 研究課題名（英文） Functional relationships between Clcn7 and V-ATPase in osteoclastic acid secretion
 研究代表者
 鍛冶屋 浩 (KAJIYA HIROSHI)
 福岡歯科大学・歯学部・講師
 研究者番号：80177378

研究成果の概要：

破骨細胞はプロトンポンプによるH⁺分泌とClcn7型Cl⁻チャネルによるCl⁻分泌により塩酸を分泌して骨を溶かして血中Ca²⁺濃度を調節する。本研究は、これら二つの酸分泌体は機能的、形態的カップリングをしていることが明らかとなった。さらに、Clcn7型Cl⁻チャネルの調節タンパク質と報告されている*Ostm1* (Osteoclast transmembrane protein1)以外に機能的な調節分子が存在する可能性があることが明らかになった。又常染色体優勢骨大理石病の病因として*Clcn7*の点変異がCl⁻分泌能を抑制することが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯学

キーワード：骨代謝、酸分泌、輸送体、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は骨基質側である波状縁に発現する液胞型H⁺-ATPase(V-ATPase)とClcn7型Cl⁻チャネル(*Clcn7*)を介するHCl(酸)分泌により骨ミネラルを溶解し血清Ca²⁺濃度を調節する。これらイオン輸送体の内、V-ATPaseのサブユニットである*ATP6i*欠損マウスでは骨吸収不全により大理石病を呈すること (Li,

1999)、ヒト悪性乳幼児大理石病や常染色体劣性大理石病などの重度の骨疾患はこの*ATP6i*の変異が原因であるという報告がある (Taranfa *et al.*, 2003; Michigami *et al.*, 2002)。一方、*Clcn7* に関しても、KOマウスが骨吸収不全により大理石骨病を呈すること (Kornak *et al.*, 2001)、さらに、最近では常染色体優性大理石病II型 (Autonomic

Dominant Osteopetrosis type II (ADO II)の患者に *Clcn7* の点変異が認められることが報告された (Cleiren *et al.*, 2001)。このように破骨細胞の酸分泌輸送体に関する解析はKOマウスやヒトゲノム解析などの分子生物学的アプローチによって明らかになりつつあるが、機能面からの裏付けは未だ少ない。即ち、V-ATPaseや *Clcn7* 遺伝子欠損由来の破骨細胞において酸放出能を直接的に機能解析した報告はなく、これらの構造と活性化、イオン選択性及びリン酸化酵素による修飾などの調節メカニズムに関する情報が無い。

現在まで、我々は破骨細胞のイオン輸送体と骨吸収能の調節に関する研究を続けており、これらに関して多くの成果を発表してきた。そして、マウス破骨細胞はClC7型Cl⁻チャンネル以外に数種のCl⁻輸送体が発現していること、骨吸収状態では分泌のためのCl⁻電流が活性されていること、これらのCl⁻輸送体阻害剤やsiRNA投与により骨吸収が抑制されることを報告してきた。さらに、私はマウス及びヒト破骨細胞より *Clcn7* をクローニングし、ClC7型Cl⁻チャンネルをHEK293細胞に過剰発現したところ、外液酸性化で活性化される外向き整流性をもつCl⁻電流の発現が認められた。さらに、ADOII患者で報告されている点変異型 *Clcn7* ではCl⁻分泌能が低下すること、中でも215番目のグリシンがアルギニンに置換された点変異体が最もCl⁻分泌が低下することが明らかになり、ClC7型Cl⁻チャンネル構造やその活性化調節メカニズムについて解析できる可能性が出てきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は酸分泌に関わる機能分子、*Clcn7* 遺伝子関連変異マウス (*gl/gl*マウス) と V-ATPase変異マウス (*oc/oc*マウス) を用いH⁺分泌とCl⁻分泌の活性化調節メカニズムの解析を行う。さらに、V-ATPaseと *Clcn7* の両輸送体分子は単にイオンカップリングで働くばかりでなく、これらの発現や活性化を調節する因子が存在し、これら分子の相互間における機能的クロストークを行うメカニズムや分子が存在すると考えた。そこで、これらの酸分泌輸送体相互間のクロストーク調節及びこれら輸送体に会合し調節する分子を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

ClC7型Cl⁻チャンネルを調節する分子報告されている *Ostm1* の点変異を持つ *gl/gl*マウスの骨髄及び脾臓細胞より破骨細胞を分化・誘導し、骨吸収時におけるHCl分泌能をwhole cell patch clamp法、形態染色法及び骨吸収能を検討した。さらに、RT-PCR法やWestren blot法によりCl⁻輸送体発現を野生型、ヘテロ型の破骨細胞と比較検討した。

又、V-ATPaseのサブユニット *ATP6i* の点変異を持つ *oc/oc* 及び野生型、ヘテロ型マウスの脾臓細胞より分化・誘導した破骨細胞において同様な方法を用いて、酸分泌輸送体活性能を検討した。又、常染色体優性骨大理石病 type II (ADO II) で報告されている *Clcn7* の点変異部分に対する抗体を作成しCl⁻分泌能及び骨吸収能への効果について検討した。

4. 研究成果

ClC7型Cl⁻チャンネルを調節する分子と報告されている *Ostm1* の点変異を持つ *gl/gl*マウス由来の破骨細胞における骨吸収能は野生型及びヘテロ型と比較して時間経過が緩やかであったものの予想に反して同程度の骨吸収能を有していた。さらに、破骨細胞の骨吸収時の特徴的な指標であるactin ringを有する細胞形態やその数も野生型及びヘテロ型と比較して優位な変化は認められなかった。次に *Clcn7* の特徴である酸誘発性Cl⁻電流を検討したところ、細胞外の酸性化(pH 6.5以下)によりどの遺伝子型由来の破骨細胞においてもCl⁻電流が活性化され、これらの電流量に大きな違いが認められなかった。さらに、Cl⁻輸送体 (*Clcn7*, K⁺/Cl⁻共輸送体1、Na⁺/K⁺/2Cl⁻共輸送体1) mRNAやタンパク質の発現量を比較してもどの遺伝子型由来の破骨細胞に違いは認められず、相補的な発現や機能には違いが認められなかった (Figure 1)。従って、*gl/gl*マウスを用いた解析からは *Ostm1* 以外に膜に発現する *Clcn7* の活性化を調節する分子が存在する可能性が考えられた。以上の結果より、*gl/gl*マウスを用いた解析からは *Ostm1* により破骨細胞のCl⁻分泌が調節される可能性は少ないと思われた。他方、*oc/oc*マウスの由来の破骨細胞は、H⁺分泌能ばかりでなく、Cl⁻分泌能も同時に抑制されていることが明らかになった。そこで、

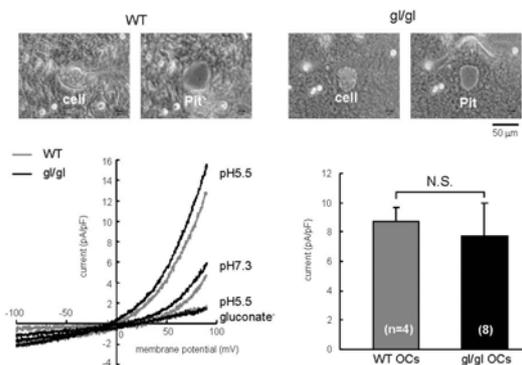


Figure 1: 野性型(WT)とgl/gi由来の破骨細胞の酸誘発性Cl⁻電流及び骨吸収能に違いはなかった。

野性型の破骨細胞における両輸送体のタンパク質相互間結合を免疫沈降法を用いて検討したところ、これら分子は結合可能なことが明らかになった。また、*Clen7*のポア部分を担うG215に対する抗体はCl⁻分泌能を有意に抑制したが、ADO IIで報告されている他の点変異部P249及びR286に対する抗体も高濃度で有意な抑制が認められた(**Figure 2**)。

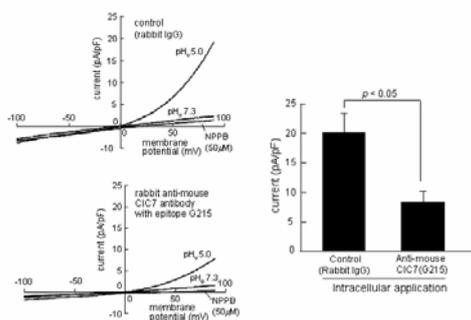


Figure 2: G215に対する抗体の細胞内投与により外液酸性化により活性化されるCl⁻電流は抑制された。

さらにP249及びR286に対する両抗体は、骨吸収活性も抑制した。以上結果より、破骨細胞V-ATPaseと*CICn7*は機能的、形態的カップリングをしている可能性が示唆された。又ADO IIの病因の1つとしてCl⁻分泌能の抑制であることが明らかになった。

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 4件)

- 1) Fukushima H, Nakao A, Okamoto F, Shin M, Kajiya H, Sakano S, Bigas A, Jimi E, Okabe K (2008). The association of Notch2 and NF-kappaB accelerates RANKL-induced osteoclastogenesis. *Mol Cell Biol.* 28: 6402-6412.
 - 2) Okamoto F, Kajiya H, Toh K, Uchida S, Yoshikawa M, Sasaki S, Kido MA, Tanaka T, Okabe K (2008). Intracellular CIC-3 chloride channels promote bone resorption in vitro through organelle acidification in mouse osteoclasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C693-701.
 - 3) Nakao A, Fukushima H, Kajiya H, Ozeki S, Okabe K (2007). RANKL-stimulated TNFalpha production in osteoclast precursor cells promotes osteoclastogenesis by modulating RANK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 357:945-950.
 - 4) Li J-P, Kajiya H, Okamoto F, Nakao A, Okabe K (2007). Three Na⁺/Ca²⁺ exchanger variants are expressed in mouse osteoclasts and mediate calcium transport during bone resorption. *Endocrinology* 148: 2116-2125, 2007
- [学会発表] (計 4件)
- 1) Kajiya H, Okamoto F, Nakao A, Okabe K: RANKL-induced expression of TRPV2, calcium permeable channel, is involved in osteoclastogenesis via calcium signaling activation. 29th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Honolulu, Hawaii, USA, 2007 September, 16-19.
 - 2) Nakao A, Kajiya H, Fukushima H, Okamoto F, Ozeki S, Okabe K: Endogenous TNFalpha in Osteoclast Precursor Cells Promotes Osteoclastogenesis Via c-Fos and NFATc1 Activation. 29th Annual Meeting of ASBMR, Honolulu, Hawaii, USA, 2007 September, 16-19.

- 3) 岡部幸司, 鍛冶屋浩, 岡本富士雄: 破骨細胞に出現するCl⁻チャンネル(C1C7)と骨吸収機能調節. 第49回歯科基礎医学会総会(シンポジウム), 2007年8月29日(札幌)
- 4) 岡部幸司, 岡本富士雄, 鍛冶屋浩: TRPV2を介する破骨細胞の分化調節機構. トランスポーターワークショップ IN 福岡(シンポジウム), 2008年11月2日. (福岡)

(3)連携研究者

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍛冶屋 浩(KAJIYA HIROSHI)
福岡歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 80177378

(2) 研究分担者

岡本 富士雄(OKAMOTO FUJIO)
福岡歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 60153938

岡部 幸司(OKABE KOJI)
福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 80224046