

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07362

研究課題名(和文)破骨細胞融合の新たな制御機構

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanism underlying Dok-3-mediated suppression of osteoclast fusion

研究代表者

山内 茜(井上茜) (Inoue-Yamauchi, Akane)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：90541970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞は骨恒常性の維持に必須の骨吸収を担う細胞であり、効率的な骨吸収には細胞融合による破骨細胞の高度な分化・成熟が必要である。事実、破骨細胞融合の阻害は骨吸収の低下による骨量増加を引き起こす。しかしながら破骨細胞融合制御の分子機構は不明のままである。本研究では破骨細胞融合の負の制御因子であるアダプター分子Dok-3に着目し、破骨細胞融合の制御機構の解明を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、これまでに報告のない破骨細胞の融合を担うシグナル伝達の解明に取り組むことで、破骨細胞融合制御の新たなメカニズムを理解するための手がかりを得た点、また、これまでにない視点での破骨細胞融合を標的とする骨代謝性疾患治療法開発へ向けた基礎的な知見を得た点において意義深い。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts are responsible for bone resorption, which is essential for maintaining bone homeostasis. Efficient bone resorption requires differentiation and maturation of osteoclasts including cell-to-cell fusion; indeed, the absence of osteoclast fusion reduces bone-resorbing activity, leading to increased bone mass. In the present study, I investigated the mechanism underlying osteoclast fusion, focusing on adaptor protein Dok-3.

研究分野：骨代謝学

キーワード：破骨細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨は身体の物理的な支持、ミネラル貯蔵、内分泌などの生命活動に必須の役割を担う臓器である。その構造と機能を支える骨代謝は、主に骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う多核の破骨細胞により制御される。破骨細胞はマクロファージ系前駆細胞に由来し、M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) による増殖シグナルの活性化、RANKL (receptor activator for nuclear factor- κ B ligand) による分化シグナルの活性化を介して単核の破骨細胞となり、互いに融合し、多核の成熟破骨細胞へと分化する。破骨細胞は骨吸収を担う唯一の細胞であり、その機能亢進は骨量減少性の疾患を惹起する。したがって破骨細胞制御の理解は、当該疾患の病因・病態の理解と治療開発に必須の分子基盤を与える。

破骨細胞は細胞融合により巨大な多核細胞となることで、骨との接着面積の拡大を含めた機能的分化を進める。それ故、破骨細胞の融合は骨量の調節に直結すると考えられており、事実、その融合阻害は骨吸収の低下による骨量増加を引き起こす。これまでに破骨細胞融合の正の制御因子として、DC-STAMP や OC-STAMP、v-ATPase 等の膜タンパク質が報告されていることから (*J Exp Med* 202:345, 2005; *Nat Med* 12:1403, 2006; *J Bone Miner Res* 27:1289, 2012) 破骨細胞融合の分子機構に関する研究はそれらの発現調節機構の解析を中心に進められている。しかしながらその全容は不明のままである。

2. 研究の目的

本研究代表者の所属する研究室では、破骨細胞融合の負の制御因子として細胞内アダプタータンパク質 Dok-3 を報告している (*Biochem Biophys Res Commun* 498:967, 2018)。前述の通り融合制御因子として報告されている分子の多くが膜タンパク質であるのに対し、Dok-3 は細胞内で機能するアダプタータンパク質であることから、その作用機序の解明には破骨細胞の融合を担うシグナル伝達経路に関する全く新しい発見が期待される。そこで本研究では、Dok-3 による破骨細胞融合の抑制機構を明らかにすることで破骨細胞の融合に関わる新たなシグナル伝達経路の解明を目指す。

3. 研究の方法

1) 破骨細胞融合の抑制に重要な Dok-3 のアミノ酸領域の同定

Dok-3 変異体を過剰発現する RAW264.7 細胞の作製

単球/マクロファージ系の細胞株である RAW264.7 細胞は RANKL 刺激に応答し、機能的に成熟した多核の破骨細胞へ分化することが知られ、破骨細胞分化の細胞モデル系として広く用いられている。そこで当該モデル系を用い、Dok-3 による破骨細胞融合の抑制に重要なアミノ酸領域の同定をおこなった。Dok-3 は N 末端側からリン脂質との相互作用を介して細胞膜への局在化に関わる PH (pleckstrin homology) ドメイン、NPXpY モチーフ (pY: リン酸化チロシン) との相互作用に重要な PTB (phosphotyrosine-binding) ドメイン、その下流にチロシンリン酸化を受け SH2 ドメインの標的となるモチーフ 4 つを有するアダプター分子である。そこで Dok-3 による破骨細胞融合の抑制に重要なアミノ酸領域を絞り込むために、各領域の変異による Dok-3 の融合抑制機能に対する影響を検討した。各領域の変異体として PH ドメイン欠失変異体 (PH)、NPXpY モチーフとの相互作用に重要な PTB ドメイン内の 2 つのアルギニン (R) をアラニン (A) に置換した変異体 (R209/224A: RA)、SH2 ドメイン標的モチーフ内のチロシン (Y) をフェニルアラニン (F) に置換した変異体 (Y325/343/378/399F: 4F) を発現するウイルスベクターを作製し、変異体安定発現細胞を作製した。

Dok-3 変異体過剰発現による破骨細胞融合に対する影響の検討

で作成した Dok-3 野生型または各変異体を導入した RAW264.7 細胞を RANKL 存在下で 3 日間培養し、破骨細胞マーカー TRAP の染色をおこない、TRAP 陽性多核 (5 核以上) 細胞あたりの核数と細胞面積を計測することで各細胞における細胞融合を評価した。

Dok-3 変異体過剰発現による RANK 下流シグナルに対する影響の検討

で作成した Dok-3 野生型または各変異体を導入した RAW264.7 細胞を RANKL で短時間刺激し、破骨細胞の分化誘導に重要な RANK 下流シグナル応答についてウエスタンブロットや定量 PCR にて解析した。

2) Dok-3 会合分子の検討

前項 1) で絞り込んだ Dok-3 による破骨細胞融合の抑制に必要なアミノ酸領域依存的に Dok-3 に会合する分子を免疫沈降法により解析した。

3) Dok-3 欠損 RAW264.7 細胞の樹立

Dok-3 各変異体は Dok-3 欠損により生じた破骨細胞融合の亢進を回復させる能力を有するかどうか検証するために、Dok-3 欠損 RAW264.7 細胞株の樹立を試みた。Dok3 遺伝子の開始コドン直下の配列を guide RNA (gRNA) の標的とし、CRISPR/Cas9 システムにより Dok3 遺伝子を変更した。

4. 研究成果

1) Dok-3 による破骨細胞融合の抑制に重要なアミノ酸領域の同定

前述のとおり、所属研究室ではこれまでの個体を用いた解析により Dok-3 欠損は破骨細胞融合を亢進させることを示し、Dok-3 が破骨細胞融合の負の制御因子であることを明らかにしている (Biochem Biophys Res Commun 498:967, 2018)。そこでまず RAW264.7 細胞における Dok-3 の過剰発現が RANKL 依存的な破骨細胞の融合を抑制可能であるかどうかを検討した。その結果、Dok-3 の過剰発現は TRAP 陽性多核細胞あたりの核数を有意に減少させることが分かった。同様に、Dok-3 過剰発現破骨細胞のサイズ (面積) もコントロール細胞と比較して有意に減少した。これらのことから、RAW264.7 細胞において Dok-3 の過剰発現は破骨細胞の融合を抑制することを確認した。一方、Dok-3 各変異体のうち、PH、4F は細胞融合を抑制したのに対し、RA は細胞融合を抑制しないことが判明した。これらの結果から、PTB ドメインが RANKL 依存的な破骨細胞の融合に重要であることが明らかになった。

Dok-3 による融合抑制機構の手掛かりを得るために、破骨細胞分化のマスター転写因子 NFATc1 の RANKL 依存的な発現誘導について遺伝子レベル・タンパク質レベルの発現解析をおこなった。しかしながら Dok-3 過剰発現は *Nfatc1* 遺伝子・NFATc1 タンパク質の発現誘導や当該分子の標的遺伝子である融合因子 *Dcstamp* を含めた破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現誘導に影響を与えなかった。次に、破骨細胞の分化誘導に重要な RANKL 刺激依存的な MAPK 経路や NFκB 経路の活性化に対する Dok-3 過剰発現による影響を調べたところ、ERK、p38、IκBα のリン酸化レベルはコントロールと比較して有意な差を認めなかったのに対し、JNK のリン酸化は有意に低下した。以上の結果から、Dok-3 は JNK のリン酸化抑制を介して破骨細胞融合を抑制する可能性が示唆された。一方、融合抑制機能を欠損することが明らかになった RA 過剰発現は JNK のリン酸化を抑制しなかった。本結果から、Dok-3 は PTB ドメイン依存的な JNK のリン酸化抑制を介して破骨細胞融合を抑制する可能性が示された。しかしながら、融合抑制可能な ΔPH 過剰発現が野生型の過剰発現と同様に JNK のリン酸化を抑制したのに対し、同じく融合抑制可能な 4F 過剰発現は JNK のリン酸化を抑制しなかった。これらの結果から、PTB ドメインを介した融合抑制は JNK のリン酸化に依存しないと考えられた。今後は、リン酸化プロテオミクスを用いた解析により PTB ドメイン依存的かつ PH ドメイン及び 4Y 非依存的にリン酸化レベルの変動する分子を網羅的に解析し、破骨細胞融合抑制因子の候補となるリン酸化タンパク質の同定及びそれらの検証をおこなっていきたいと考えている。

2) Dok-3 会合分子の検討

1) の解析により、PTB ドメインが Dok-3 の破骨細胞融合抑制に重要であることが示されたことから、当該ドメイン依存的に Dok-3 へ会合する分子について検討した。その結果、PTB ドメインの標的配列である NPXpY モチーフを有する分子 X が、RANKL 刺激依存的に PTB ドメインに会合することが明らかになった。現在、分子 X 野生型または NPXpY モチーフ変異体を過剰発現する RAW264.7 細胞の作製に着手しており、それらを用いた RANKL 依存的な破骨細胞融合の検討を予定している。

3) Dok-3 欠損 RAW264.7 細胞の樹立

Dok3 遺伝子を標的とする gRNA 発現プラスミドが導入された単一細胞を分取し、コロニーを形成させた。合計 80 個の単一コロニーを分離し、Dok-3 の C 末端領域 (370 番目のアミノ酸から 390 番目のアミノ酸に相当する領域) を認識する抗体を用いたウエスタンブロットにより各コロニー (クローン) における Dok-3 タンパク質の発現を検討した。その結果、単離した 80 個のクローンうち 71 個において Dok-3 タンパク質の消失を確認した。そのうち 2 個 (細胞株 A、細胞株 B) の Dok3 遺伝子改変細胞株候補において gRNA 標的配列を含むゲノム領域のシーケンス解析をおこなったところ、細胞株 A では gRNA 標的配列内に 1 塩基欠失変異が導入されていることが確認され、その結果 18 番目のコドン (Dok-3 は 444 アミノ酸からなる) が終止コドンに変化することが明らかになった。細胞株 B では gRNA 標的配列内に 4 または 5 塩基欠失変異が導入された結果、17 番目または 48 番目のコドンが終止コドンに変化することが明らかになった。樹立した Dok-3 欠損 RAW264.7 細胞株 (RAW Dok-3KO #A、RAW Dok-3KO #B) が Dok-3 欠損初代破骨細胞と同様の表現型、すなわち破骨細胞融合の促進を示すことを確認するために、両 Dok-3 欠損細胞株において RANKL 刺激による破骨細胞の融合を検討し、少なくとも 1 株において破骨細胞融合の亢進を確認した。今後は当該細胞株に RA 変異体を導入し、当該変異体には Dok-3 欠損により生じた破骨細胞融合の亢進を回復させる能力がないことを確認予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------