

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09553

研究課題名(和文) スクレロスチン制御に関わる核蛋白質による骨形成及び骨細胞の機能調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of bone formation and osteocyte function by nuclear protein involved in sclerostin regulation

研究代表者

馬渡 正明 (Mawatari, Masaaki)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80202357

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)：転写制御機能を持つ核蛋白質Nupr1の骨芽細胞と骨細胞における働きを明らかにすることを目的とした。Nupr1は、骨組織においてスクレロスチンを強く発現する骨細胞や骨芽細胞で高い発現がみられた。Nupr1過発現はスクレロスチンの発現を亢進し、Nupr1を欠損した骨芽細胞では、スクレロスチンが作用するWntシグナル因子の発現が亢進した。さらに、Nupr1を欠損した骨細胞では、細胞骨格制御に関わるタンパク質や骨形成に関わるプロテアーゼの発現が低下した。Nupr1は、細胞骨格制御によって骨細胞の機能を調節し、スクレロスチンやプロテアーゼ産生制御を介して骨形成に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会に伴い、骨粗鬆症などの骨・関節疾患の患者数が増加し、重大な社会問題となっている。近年、骨吸収を行う破骨細胞と骨形成を行う骨芽細胞に加えて、骨の中に最も多く存在し、神経細胞のようなネットワークを形成する骨細胞が骨代謝や骨のホメオスタシスに重要な役割を持つことが考えられている。本研究では、マウスで遺伝子を欠損すると骨形成が亢進するNupr1という転写制御因子の骨芽細胞と骨細胞での発現とNupr1による骨形成の新たな制御機構を明らかにした。本研究の結果は、骨粗鬆症や変形性関節症などの骨・関節疾患の病態の解明や新たな治療法の開発などに将来的に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the role of transcriptional regulator Nupr1 in osteocytes and osteoblasts. Nupr1 was highly expressed in osteocytes and osteoblasts expressing sclerostin. Nupr1 overexpression promoted sclerostin expression, and the expression of Wnt signaling molecules was reduced in osteoblasts derived from Nupr1 knockout mice. In addition, expression of cytoskeleton proteins, its regulatory proteins, and proteases which are thought to be involved in bone formation, was decreased in osteocytes derived from Nupr1 knockout mice. The results suggest that Nupr1 is involved in bone formation by regulating the function of osteocytes through the control of cytoskeleton organization and protease production.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨代謝 骨細胞 転写制御因子 骨粗鬆症

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会に伴い、骨粗鬆症などの骨・関節疾患の患者数が増加し、重大な社会問題となっている。骨には、骨吸収を行う破骨細胞と RANKL を発現し骨形成を行う骨芽細胞が存在し骨のリモデリングを行っているが、近年、骨細胞が骨代謝において重要な働きを持つことが明らかとなってきた。骨細胞は骨全体にネットワークを形成し、スクレロスチンを介した骨形成抑制や RANKL を産生し骨吸収制御にも関わっているがその作用の詳細は不明の点が多い。申請者らは、転写制御機能を持つ核蛋白質 Nupr1 の遺伝子欠損 (KO) マウスの解析から、Nupr1KO マウスでは骨芽細胞の増殖さらに分化が促進しており骨形成が亢進し、骨芽細胞の培養系でスクレロスチンの発現が低下することを見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では、Nupr1 による新たな骨形成促進機構や骨細胞における作用を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスの骨組織の免疫染色

大腿骨を単離し 4%PFA を用いて固定後 10%EDTA で 3 週間脱灰したのち OCT コンパウンドに包埋した。凍結切片を作成し 10%アルブミンでブロッキングしたのち、さらに 15%ロバ血清で 2 時間ブロッキングを行った。次に切片を Nupr1 とスクレロスチン抗体でインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、二次抗体および DAPI と 30 分間、室温でインキュベートした。C2si 共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞観察を行った。

### (2) レンチウイルスの作成

Nupr1 遺伝子のコーディング領域を PCR により増幅し、pT7-Blue ベクターにクローニング後 Nupr1 コード領域をレンチウイルスプラスミドに挿入し Nupr1-TagRFP 融合タンパク質を発現する組み換えレンチウイルスを作成した。293T 細胞にパッケージングプラスミドとともにトランスフェクションし、レンチウイルス粒子を作成した。

### (3) 初代骨芽細胞の単離培養及びトランスフェクション

野生型 (WT) 及び Nupr1KO 新生児マウスの頭蓋冠からコラゲナーゼ、ディスパーゼ処理により骨芽細胞前駆細胞を単離し、ascorbic acid 及び  $\alpha$ -glycerophosphate を添加した石灰化培地で 6~18 日間培養し、骨芽細胞の分化を誘導した。細胞から RNA を単離し RT-PCR 解析を行った。骨芽細胞への感染については、7 日間培養した WT 初代骨芽細胞にレンチウイルスを導入した。この細胞をさらに 2 週間培養した。

### (4) 骨細胞の単離と RT-PCR 及び DNA アレイ解析

WT 型及び Nupr1KO マウス的大腿骨と脛骨から骨髓細胞を除き、骨表面の骨芽細胞を単離した後、骨を粉碎して骨細胞の RNA を単離し RT-PCR 解析を行った。また、RNA を DNase I で 37、30 分間処理後、RNA をカラム精製し、シアニン-3 で標識し Agilent DNA マイクロアレイを用いて骨細胞が発現する遺伝子の比較解析を行った。

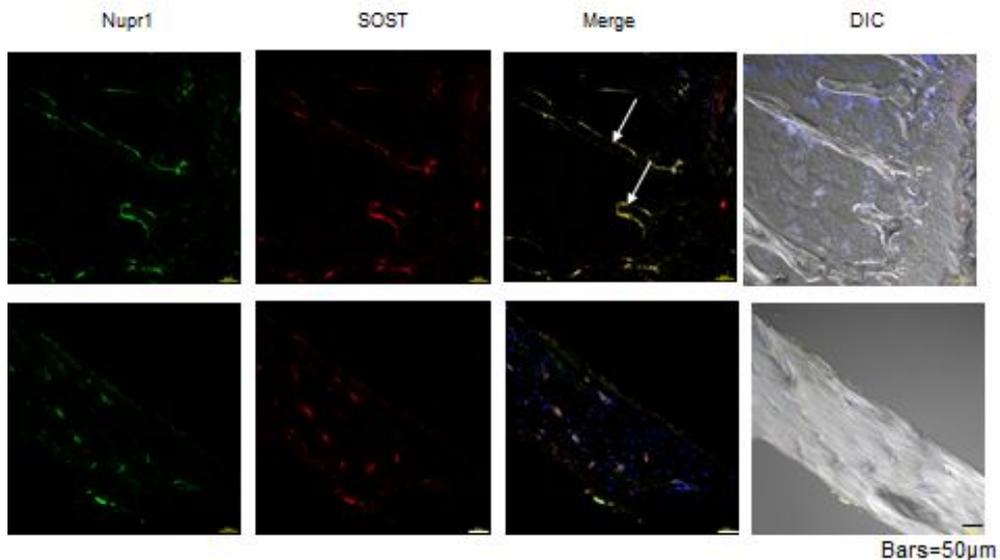
### (5) 卵巣摘出手術による骨粗鬆症モデルの作成と $\mu$ CT による骨量解析

WT 型及び Nupr1KO マウス (8 週令、 ) に卵巣摘出 (OVX) または偽手術 (Sham) を行い、4 週間後、12 週齢のマウス的大腿骨の骨構造を  $\mu$ CT で解析した。

#### 4. 研究成果

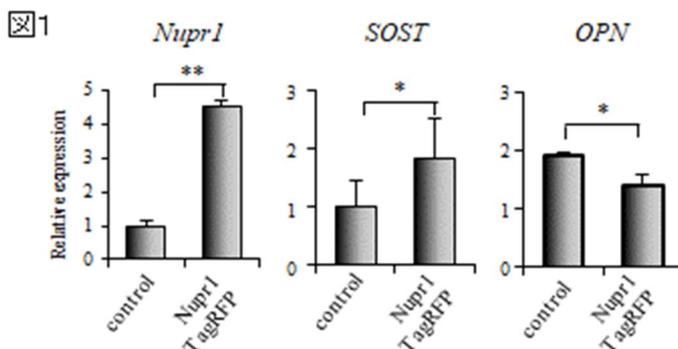
##### (1) 骨組織の Nupr1 の免疫染色

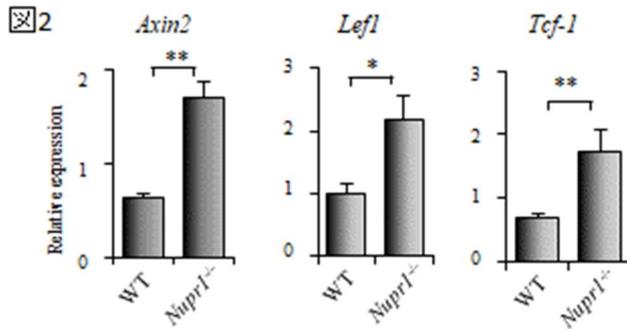
免疫染色を用いて *in vivo* での骨組織における NUPR1 の発現を解析した。NUPR1 のシグナルは、スクレロスチンを強く発現している骨内部の骨細胞に検出された。また、NUPR1 はスクレロスチンを発現し海綿骨を覆っている骨芽細胞の一部の集団にも検出された。WT および Nupr1 KO マウスの骨組織について、スクレロスチン抗体による免疫染色を行い発現の強度を比較した。その結果、Nupr1 KO マウスでは、スクレロスチンの発現が低下する傾向があることがわかった。また、単離骨細胞画分では、Nupr1 KO マウスでは SOST mRNA およびタンパク質の発現が WT と比較し減少していた。



##### (2) 骨芽細胞における Nupr1 強発現によるスクレロスチンと Nupr1 欠損による Wnt シグナルへの作用

スクレロスチンの発現における Nupr1 の役割を調べるために、Nupr1-TagRFP レンチウイルスを初代骨芽細胞に感染させ、Nupr1 を過剰発現させた。Nupr1 を過剰発現させた初代骨芽細胞は、スクレロスチンの発現を著しく増加させたが、オステオポンチンの発現は減少させた（図 1）。さらに、WT および Nupr1 KO マウスの骨芽細胞における Wnt シグナルの標的遺伝子の発現量を解析した（図 2）。その結果、Axin2、Lef1、Tcf-1 の発現が Nupr1 KO 骨芽細胞で有意に増加しており、Wnt シグナルの亢進が骨形成の促進に関与することが示唆された。





### (3) 骨細特異的な遺伝子の発現解析

E11/gp38 糖タンパク質は骨細胞で発現しており、樹状突起の伸長を制御していることが知られている。Nupr1 KO 骨細胞では、E11/gp38 の発現が有意に低下していた。また、細胞突起の形成に参与すると考えられるβ-actin の発現も Nupr1 KO 骨細胞では低下していた。また、骨細胞の成熟に参与する dentin matrix protein (Dmp-1) と matrix extracellular phosphoglycoprotein (Mepe) の発現も Nupr1 KO 骨細胞では低下していた。一方、骨細胞周囲のリモデリングに参与する MMP-13 とカテプシン K の発現は、WT と Nupr1 KO の骨細胞で有意な差は見られなかった。これらの結果から、Nupr1 欠失により骨細胞の成熟を低下させた可能性が示唆された。

### (4) 骨細胞の DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

WT 及び Nupr1KO マウスの骨から骨細胞を単離し、DNA マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現の比較解析を行った。WT と比較すると Nupr1KO マウスの骨細胞では Survival に関連する Bcl-XL やオートファージ関連タンパク質 Foxo3 の発現が亢進していた。また、Dstn などの骨細胞が発現する遺伝子の発現の低下もみられた。さらに、アクチンやミオシンおよびその結合タンパク質の発現が減少していた。WT と KO マウスの骨細胞で発現に差がある 6 個の遺伝子を見出した。そのうちの 2 つ、細胞骨格制御に関わるタンパク質 Tacc2 と骨形成に関わる可能性があるプロテアーゼについて、初代骨芽細胞培養系を用いた RT-PCR 解析により Nupr1KO 骨芽細胞で発現が低下することを確認した。また、初代骨芽細胞で Nupr1 を強発現するとプロテアーゼも発現が上昇した。さらに WT と Nupr1KO で 4 倍以上発現の差がみられた遺伝子 275 個について GO 解析及びクラスタリング解析を行った。その結果、老化にも関与することが知られているミオシンやアクチン、トロポミオシン等の細胞骨格に関わる遺伝子群が Nupr1KO 骨細胞で低下していた。

### (5) 卵巣摘出による骨粗鬆症モデルにおける骨量減少

OVX による骨粗鬆症モデルマウスを作成し、WT と KO マウスの骨量の減少を比較した。WT と同様に KO マウスでは OVX により骨量が低下していたが、骨量の減少率には大きな違いが見られなかった。

以上のことから Nupr1 は、細胞骨格制御によって骨細胞の機能を調節するとともに、スクレロスタチンやプロテアーゼ産生制御を介した新たな骨形成制御機構に関与することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirata H, Xu X, Nishioka K, Matsuhisa F, Kitajima S, Kukita T, Murayama M, Urano Y, Miyamoto H, Mawatari M, Kukita A	4. 巻 35
2. 論文標題 PMEPA1 and NEDD4 control proton production of osteoclasts by regulating vesicular trafficking	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 e21281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202001795R	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 Shiraki M, Xu X, Iovanna JL, Kukita T, Hirata H, Kamohara A, Kubota Y, Miyamoto H, Mawatari M, Kukita A.	4. 巻 33
2. 論文標題 Deficiency of stress-associated gene Nupr1 increases bone volume by attenuating differentiation of osteoclasts and enhancing differentiation of osteoblasts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 8836-8852.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201802322RR.	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 該当する
1. 著者名 Xu X, Hirata H, Shiraki M, Kamohara A, Nishioka K, Miyamoto H, Kukita T, Kukita A.	4. 巻 33
2. 論文標題 Prostate transmembrane protein androgen induced 1 is induced by activation of osteoclasts and regulates bone resorption.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 4365-4375.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201801573R.	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 Kobatake T, Miyamoto H, Hashimoto A, Ueno M, Nakashima T, Murakami T, Noda I, Shobuie T, Sonohata M, Mawatari M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Antibacterial Activity of Ag-Hydroxyapatite Coating Against Hematogenous Infection by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in the Rat Femur.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Res.	6. 最初と最後の頁 2655-2660
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24431	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 Kamohara A, Hirata H, Xu X, Shiraki M, Yamada S, Zhang JQ, Kukita T, Toyonaga K, Hara H, Urano Y, Yamashita Y, Miyamoto H, Kukita A.	4. 巻 32
2. 論文標題 1 IgG immune complexes with Staphylococcus aureus protein A enhance osteoclast differentiation and bone resorption by stimulating Fc receptors and TLR2.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 89-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz063.	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 村山雅俊、平田寛人、久木田明子、馬渡正明
2. 発表標題 Nupr1はマウスモデルで加齢による骨量減少と老化関連遺伝子発現に関与する
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田寛人、蒲原麻菜、村山雅俊、馬渡正明、久木田明子
2. 発表標題 shRNAライブラリースクリーニングによる新たな破骨細胞骨吸収制御因子の網羅的探索とその候補遺伝子の作用機構の解析
3. 学会等名 第23回日本骨粗鬆症学会・第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山雅俊、平田寛人、馬渡正明、久木田明子
2. 発表標題 Nupr1は加齢による骨量減少と老化関連遺伝子発現に関与する
3. 学会等名 第23回日本骨粗鬆症学会・第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田寛人、村山雅俊、白木誠、久木田敏夫、馬渡正明、久木田明子
2. 発表標題 Pmepa1は小胞輸送に関わり骨吸収中の破骨細胞で酸の分泌を制御する
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田寛人、村山雅俊、白木誠、久木田敏夫、久木田明子、馬渡正明
2. 発表標題 Pmepa1は骨吸収中の破骨細胞で小胞輸送に関わり酸の分泌を制御する
3. 学会等名 第35回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirohito Hirata, Xianghe Xu, Masatoshi Murayama, Makoto Shiraki, Toshio Kukita, Mawatari Masaaki, Akiko Kukita
2. 発表標題 Prostate transmembrane protein androgen induced-1 and Nedd4 Regulate Bone Resorption by Promoting Proton Production in Osteoclasts
3. 学会等名 The ASBMR 2021 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田 寛人、久木田明子、白木誠、 蒲原 麻菜、園畑素樹、 馬渡 正明
2. 発表標題 1型膜蛋白質Pmepa1は骨吸収を制御し、破骨細胞でNedd4と共局在する
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田寛人、徐祥赫、白木誠、蒲原麻菜、久木田敏夫、馬渡正明、久木田明子
2. 発表標題 Pmepa1は破骨細胞でNedd4とLAMP 2 と共局在し骨吸収を制御する
3. 学会等名 第37回 日本骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiraki M, Xu X, Iovanna JL, Kukita T, Hirata H, Kamohara A, Kubota Y, Miyamoto H, Mawatari M, Kukita A.
2. 発表標題 Deficiency of stress-associated gene Nupr1/p8 increased bone volume by enhancing differentiation of osteoblasts
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H.Hirata, X. Xu, M. Shiraki, M. Murayama, A. Kamohara, K. Nishioka, F. Matsuhisa, S. Kitajima, Y. Urano, H. Miyamoto, T. Kukita, M. Mawatari, A. Kukita
2. 発表標題 Prostate transmembrane protein androgen induced-1 is localized to lysosome with Nedd4 in osteoclasts, and regulates bone resorption
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	久木田 明子  (Kukita Akiko)  (30153266)	佐賀大学・医学部・寄附講座教授    (17201)	

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			
フランス	INSERM			