

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10055

研究課題名(和文)酸化ストレスと骨吸収に関連した新規オートファジー制御因子の機能解明

研究課題名(英文)Elucidation of the function of novel autophagy regulators related to oxidative stress and bone resorption

研究代表者

坂井 詠子 (Sakai, Eiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：10176612

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)：新規オートファジー制御因子Rufy4の破骨細胞分化と骨吸収に対する役割を解明するため、Rufy4遺伝子ノックダウンおよび過剰発現細胞を用いて解析を行った。siRNAによりRufy4遺伝子発現を抑制しても破骨細胞形成に異常はなかったが、骨吸収は顕著に抑制された。逆にRufy4野生型遺伝子の過剰発現細胞では破骨細胞形成に異常はなかったが骨吸収は促進した。RUNドメイン欠失遺伝子過剰発現では破骨細胞形成が促進されたが骨吸収は減少した。以上の結果はRab7と相互作用するRUNドメインを介してRufy4が骨吸収の調節を担っていることを示唆しており、本研究によってRufy4の新たな役割が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってRufy4がオートファジー制御因子としての機能のみならず破骨細胞分化と骨吸収においても重要な役割を持つことが明らかになった。学術的には、RUNドメインの欠失体過剰発現細胞でosteomorph様構造が多数観察され、破骨細胞のfissionやfusionに対するRUNドメインの重要性が示唆された。今回の成果を基にしたRufy4のRUNドメインによる新たな破骨細胞分化制御機構の更なる解明が期待される。社会的には、特にRufy4のRUNドメイン構造が骨吸収活性を制御しているという知見は、骨粗鬆症や関節炎リウマチなどの硬組織疾患に対する創薬を考える上で有意義な情報であると思われる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the roles of the novel autophagy regulator Rufy4 on osteoclast differentiation and bone resorption, we have performed analysis using Rufy4 gene knockdown and overexpressing cells. Suppression of Rufy4 gene expression by the siRNA shows no abnormalities in osteoclast formation, but bone resorption was markedly inhibited. Conversely, in cells overexpressing the Rufy4 wild-type gene, there was no abnormality in osteoclast formation, but bone resorption was promoted. Moreover, overexpression of the RUN domain deletion mutant of Rufy4 promoted osteoclast formation but decreased bone resorption. These results suggest that Rufy4 is responsible for the regulation of bone resorption through the RUN domain that interacts with Rab7, and this study revealed a new function of the novel autophagy regulator Rufy4 in osteoclastogenesis.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：破骨細胞 骨吸収 オートファジー 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は生体内で唯一骨を溶かす細胞であり、過剰な骨吸収は骨粗鬆症の原因となる。破骨細胞の分化や活性化は様々な因子で調節されているが、活性酸素などの「酸化ストレス」も分化を促進することが報告されてきた。我々の体には Keap1/Nrf2 という酸化ストレス応答系が存在する。通常、Keap1 は抗酸化酵素の転写因子である Nrf2 と結合し、Nrf2 の核移行を阻害している。酸化ストレス状態下では、Keap1 は Nrf2 から離れ、Nrf2 は核へ移行し抗酸化酵素の転写を促進して酸化ストレスを減少させる。これまでに Nrf2 遺伝子欠損では酸化ストレスレベルが高く、破骨細胞分化が促進されることが複数の研究室から報告されていた。研究代表者は萘ポリフェノールフィセチンを用いて、Nrf2 を活性化すると破骨細胞分化が阻害されること (Sakai et al. J Pharmacol Sci 2013)、および Keap1 遺伝子欠損マウス由来細胞では Nrf2 が恒常的に活性化され、破骨細胞分化抑制因子の発現が上昇するため、破骨細胞が形成されないことを明らかにした (Sakai et al. FASEB J 2017)。研究代表者は DNA マイクロアレイ法で Keap1 遺伝子欠損細胞に比べて Nrf2 遺伝子欠損破骨細胞に増加している遺伝子の解析を行い、その過程で新規遺伝子 Rufy4 を見出した。これまでに Rufy4 がオートファジー関連分子であることは報告されていたが、硬組織関連細胞での機能に関しては全く情報がなかった。Rufy4 は構造上の特徴として Rab7 と結合する RUN ドメインを持つ。Rab7 は破骨細胞で発現が高く、骨吸収に重要な低分子量 G タンパク質である。Rufy4 が RUN ドメインを介して Rab7 と相互作用する可能性が考えられることから、Rufy4 が破骨細胞の骨吸収活性に何らかの役割を持つ可能性が予想された。そこで研究代表者は予備実験として Rufy4 遺伝子を siRNA 法でノックダウンし Rufy4 の発現を抑制したところ、破骨細胞は形成されたものの骨吸収が阻害されることを見出した。

2. 研究の目的

Rufy4 が骨吸収にどのように関与しているのか、骨吸収制御メカニズムを分子レベルでの解明を行った。まず siRNA 法で Rufy4 遺伝子発現を抑制した場合の骨吸収と、破骨細胞形成を観察した。さらに Rufy4 と Rab7 が破骨細胞内で相互作用しているかを明らかにし、Rab7 との結合ドメインを欠損させた Rufy4 の変異体を過剰発現させた破骨細胞での骨吸収活性を比較した。さらに Rufy4 が骨吸収を促進させる結果が得られた場合、これまでに我々が破骨細胞において Nrf2 を活性化することを明らかにした化合物を用いて、これらの化合物が Rufy4 の発現を抑制するのかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞分化過程における Rufy4 の発現確認

破骨細胞前駆細胞である RAWD 細胞に RANKL を添加し TRAP 陽性多核細胞が形成される 4 日間の RNA を TRIzol で回収し、QPCR で発現を確認した。

(2) Rufy4 遺伝子を発現抑制した破骨細胞における分化と骨吸収の解析

siRNA 法によって Rufy4 遺伝子発現を抑制した細胞の破骨細胞分化を TRAP 染色で確認し、骨吸収活性は骨吸収プレートを用いて Rufy4 遺伝子が与える影響について検討した。

(3) Rufy4 遺伝子過剰発現破骨細胞における分化と骨吸収の解析および RUN ドメインの関与

Rufy4 野生型遺伝子のレトロウイルスベクターと、Rufy4 の Rab7 結合部位 (RUN ドメイン) を欠失させたレトロウイルスベクターを構築し、それらのウイルス粒子を前駆細胞である RAWD 細胞に導入し、Rufy4 野生型遺伝子および Rufy4RUN ドメイン欠失遺伝子を過剰発現させた場合における破骨細胞分化と骨吸収活性に与える影響について検討した。タイムラプス撮影による破骨細胞形成過程における Rufy4 遺伝子の与える影響を観察した。

(4) Rufy4 による Rab7 およびカテプシン K の発現や細胞内局在への関与の検討

蛍光タグおよび FLAG タグをつけた Rufy4 野生型遺伝子および Rufy4RUN ドメイン欠失遺伝子を過剰発現させた破骨細胞における Rab7 およびカテプシン K の細胞内発現や局在から Rufy4 の機能について検討した。

(5) Nrf2 を活性化させる化合物による Rufy4 発現抑制の検討

我々がこれまでに Nrf2 を活性化することを確認している化合物を破骨細胞形成系に添加し、Nrf2 の活性化を NQO1 の mRNA の発現上昇と Rufy4 の mRNA の発現を QPCR で確認した。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞分化過程における Rufy4 の発現確認

破骨細胞前駆細胞である RAWD 細胞と RAWD 細胞に RANKL を添加して 1 日、2 日、3 日後の細胞における Rufy4 の mRNA の発現を QPCR で確認した。RANKL 添加 2 日後から徐々に TRAP 染色陽性細胞が観察され 3 日後には TRAP 染色陽性多核細胞が多数観察された。RAWD 細胞に比べて 2 日後には顕著な Rufy4 の発現上昇が確認され、それは 3 日後まで続いた。

(2) Rufy4 遺伝子を発現抑制した破骨細胞における分化と骨吸収の解析

siRNA 法によって Rufy4 遺伝子発現を抑制したところ、TRAP 染色陽性多核破骨細胞数には顕著な差は認められなかった。同様に siRNA 法によって骨吸収活性に与える Rufy4 遺伝子の影響を検討したところ、骨吸収プレート上に形成される骨吸収ピットの数には Rufy4 発現抑制細胞の方が顕著に減少していた。

(3) Rufy4 遺伝子過剰発現破骨細胞における分化と骨吸収の解析および RUN ドメインの関与

GFP タグを付した Rufy4 野生型遺伝子を RAWD 細胞に導入し、恒常的に過剰発現する細胞株を得た。破骨細胞への分化と骨吸収を、対象の GFP 遺伝子単独発現細胞と比較した。TRAP 染色像では形成された破骨細胞の大きさや数は対象群と著しい差は認められなかった。しかし、Rufy4 野生型遺伝子過剰発現細胞での、骨吸収活性が上昇していた。また、FLAG タグをつけた Rufy4 野生型遺伝子および Rufy4RUN ドメイン欠失遺伝子を過剰発現させたところ、FLAG タグのみのベクターを導入した対象細胞と Rufy4 野生型遺伝子を過剰発現させた細胞では破骨細胞形成に顕著な差は認められなかったが、Rufy4RUN ドメイン欠失遺伝子を過剰発現させた場合には、破骨細胞の形態に変化が見られ形成された破骨細胞数も顕著に増加していた。タイムラプス撮影を行ったところ、Rufy4RUN ドメイン欠失遺伝子を過剰発現させた場合に osteomorphs 様構造体 (McDonald et al. 2021, Cell 184, 1330-1347) が多数観察された。また、骨吸収プレート上に形成される骨吸収ピットの数には Rufy4 野生型遺伝子を過剰発現させた破骨細胞では顕著に増加していたが、Rufy4RUN ドメイン欠失遺伝子を過剰発現させた破骨細胞の骨吸収ピットは小さく骨吸収活性が弱いことが明らかになった。

(4) Rufy4 による Rab7 およびカテプシン K の発現や細胞内局在への関与の検討

ウェスタンブロッティング法で、Rufy4 遺伝子過剰発現細胞内のタンパク発現を比較したところ、骨吸収に関与するプロテアーゼであるカテプシン K の発現の有意な上昇が確認された。免疫沈降では電気泳動法で結合する分子が確認できた。蛍光免疫染色による Rab7 の局在はコントロール破骨細胞で Rab7 が peripheral な局在を示したのに対し、野生型 Rufy4 を過剰発現している破骨細胞では核周辺に Rab7 が局在していた。

(5) Nrf2 を活性化させる化合物による Rufy4 発現抑制の検討

破骨細胞において Nrf2 の発現を上昇することを以前確認していたスルフォラファンと tBHQ を用いて Rufy4 とカテプシン K の mRNA の発現を QPCR にて確認したところ、どちらも Rufy4 とカテプシン K の mRNA の発現抑制を認めた。

これらの結果は、Rufy4 を介した破骨細胞における骨吸収の調節機構の存在を示しており、Rufy4 が破骨細胞の骨吸収に必要な分子であることが明らかになった。Rufy4 の分子内構造の中で、RUN ドメインが欠失すると骨吸収活性がなくなることから、この構造が重要な役割を担っていることが示唆された。

またタイムラプス観察で認められた osteomorph 様の構造物が RUN ドメインの欠失した Rufy4 過剰発現細胞で多かったことは、破骨細胞の fission および fusion に Rufy4 が何らかの役割を担っていること、特に RUN ドメインが重要であることが示唆された。この点は、今後さらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Eiko Sakai, Mari Sato, Nassirhadjy Mently, Takayuki Tsukuba, and Chikara Sato	4. 巻 11:5722
2. 論文標題 Liquid-phase ASEM imaging of cellular and structural details in cartilage and bone formed during endochondral ossification: Keap1-deficient osteomalacia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84202-z	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤主税、坂井詠子、笠畑尚喜、佐藤真理、杉本真也
2. 発表標題 大気圧走査電子顕微鏡 ASEM による免疫電顕法による組織の最近観察とcryo-TEM
3. 学会等名 第76回日本顕微鏡学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eiko Sakai, Mari Sato, Nassirhadjy Mently, Takayuki Tsukuba, and Chikara Sato
2. 発表標題 Endochondral ossification observed in liquid by atmospheric scanning electron microscopy during skeletal development
3. 学会等名 Gordon Research Conferences poster presentation at the 2020 meeting of Liquid Phase Electron Microscopy（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Eiko Sakai, Fatima Farhana, Yu Yamaguchi, and Takayuki Tsukuba	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 481
3. 書名 Studies in Natural Products Chemistry Volume 72	

〔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	筑波 隆幸 (Tsukuba Takayuki) (30264055)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授 (17301)	
研究 分担者	山口 優 (Yamaguchi Yu) (50823308)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教 (17301)	

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
---------	---------