

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間： 2008 ～ 2009

課題番号：20791051

研究課題名（和文） 破骨細胞分化制御における RANK ectodomain shedding の役割

研究課題名（英文） A role of ectodomain shedding of RANK in osteoclastogenesis

研究代表者

箱崎 彰裕（HAKOZAKI AKIHIRO）

慶應義塾大学・医学部・研究員（非常勤）

研究者番号：10365299

研究成果の概要（和文）：破骨細胞分化に必須の膜型受容体 receptor activator of NF- κ B (RANK) が、細胞膜近傍にてタンパク質分解作用により切断 (ectodomain shedding) されることを証明した。さらに破骨細胞分化シグナル (RANK ligand 刺激) が RANK の ectodomain shedding を誘導し、その結果 RANKL-RANK シグナルを抑制するというネガティブフィードバック経路を見出した。

研究成果の概要（英文）：We showed that receptor activator of NF- κ B (RANK), one of the most essential molecules in osteoclastogenesis, is proteolytically cleaved and released from the cell surface. Furthermore, we found that the cleavage of RANK is induced by binding to its cognitive ligand, RANKL, and that the ectodomain shedding of RANK potentially functions as a negative regulatory mechanism in osteoclastogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：(1) 破骨細胞 (2) receptor activator of NF- κ B (RANK) (3) TACE/ADAM17
(4) ectodomain shedding

1. 研究開始当初の背景

生体における骨・カルシウム代謝の恒常性維持のため、破骨細胞・骨芽細胞における細

胞間相互作用は極めて高度に調節されている。当然ながら、これらの細胞が外的環境と相互作用を図る上で、細胞膜上に発現される

膜型タンパク質が本質的な機能を担っている。これまで骨代謝に重要な役割を担う膜型タンパク質が数多く同定されてきたが、大別してレセプター、膜型リガンド、細胞接着分子などに分類される。一般的に膜型タンパク質は転写後さまざまな修飾・機能調節を受けるが、その一つとして ectodomain shedding (以下 shedding) が近年注目されてきている。その shedding の重要性を示す一例として TNF (tumor necrosis factor) の活性調節が挙げられる。TNF はまず膜型の前駆体として合成されるが、このままでは不活性であり、これが shedding を受け可溶性になることによって初めて炎症反応において生理活性を有することが知られている。また同様に TNF のレセプターである TNFR も shedding を受けることが知られているが、TRAPS (TNFR1 - associated periodic syndromes) と呼ばれる遺伝性疾患においてはこの機構の障害に病因があることが報告されている。今後も多くの shedding の重要性を示す報告がなされると考えられる。

2 . 研究の目的

RANK の shedding の破骨細胞分化・機能に及ぼす影響、役割を明らかとし、関節リウマチをはじめとする炎症性骨破壊、悪性腫瘍の骨転移、高代謝型骨粗鬆症等の新規治療法の確立を目指す。shedding とは膜型タンパク質が細胞膜上で受けるタンパク分解作用を指すが、これは単にライソゾームにおけるタンパク分解作用とは異なり、蛋白質の活性化・不活性化、細胞内シグナル伝達も含めた多岐にわたる機能調節の役割を持つ。我々は骨芽細胞からのシグナルを受ける必須のレセプターである RANK の shedding による破骨細胞分化・機能調節を解明する。

3 . 研究の方法

(1) RANK 発現ベクターの作製

RANK は生体における発現部位・細胞が限られ、発現の確認が比較的困難なこと、および実験の効率化を図るため細菌由来の抗原である HA 抗原 (以下 HA -RANK) もしくはヒト胎盤由来のアルカリフォスファターゼ (以下 AP) を N 端側に付加した RANK 発現ベクター (以下 AP -RANK) を設計、作製した。

(2) 強制発現系における RANK shedding の検討

HA -RANK 発現ベクターを COS7 細胞へ導入し、フォルボルエステルである PMA およびメタロプロテアーゼ阻害剤 GM6001 を添加し、RANK が shedding を受け RANK 細胞外領域が培養液中に放出されるか検討した。また、フローサイトメトリーにて、PMA 刺激による細胞膜上の RANK の発現量の変化を検討した。さらに、細胞外領域が切断された細胞内領域を免疫沈降を用いて検討した。

(3) RANK の切断酵素の検討

TNF converting enzyme (TACE) が PMA にて活性化されることから、RANK の切断に TACE が関与することを TACE ノックアウト細胞を用いて検討した。

(4) RANK 切断部位の同定

リコンビナントの RANK ペプチド (細胞膜近傍領域を含む) を作製し、活性型 TACE を作用させた際に生じるペプチド断片の質量解析を行うことで RANK の切断部位をアミノ酸レベルで検討した。

(5) RANK shedding の活性化シグナルの検討

RANK ligand (RANKL) 刺激により RANK shedding が活性化しうるかを破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7 細胞へ AP -RANK を導入し、検討した。また、RANKL 刺激時の内在性の RANK の挙動をフローサイトメトリーを用いて検

討した。

(6) 可溶性 RANK の破骨細胞分化に対する影響

RANKL 刺激による破骨細胞分化系において、RANK 切断部位の情報を元に作製した可溶性 RANK を添加することで、破骨細胞形成にどのような影響を与えるかを検討した

(7) TACE 欠損破骨細胞前駆細胞における破骨細胞形成

RANK の shedding 活性が著しく低下している TACE 欠損破骨細胞前駆細胞において、RANKL 刺激時の破骨細胞分化マスター転写因子 NFATc1 の発現および細胞培養系における破骨細胞形成を野生型破骨細胞前駆細胞と比較検討した。

4. 研究成果

Receptor activator of NF- κ B (以下 RANK) は破骨細胞の分化、生存および活性化に最も重要な分子の一つである。破骨細胞分化は骨芽細胞および破骨細胞前駆細胞の両者に発現する多様な膜型タンパク質が関与する高度に洗練された過程であり、その中でも破骨細胞前駆細胞の受容体 RANK と骨芽細胞と間質細胞に発現している RANK ligand の結合は破骨細胞分化において必須の現象である。

近年、shedding として知られる膜型分子の細胞外領域が蛋白質分解作用により切断され放出される機構が細胞膜分子の発現後機能調節メカニズムに重要であることが知られてきた。これまでに CSF-1 受容体と RANKL という破骨細胞分化に関連する膜型分子が細胞膜上において shedding を受けることが報告されている。本研究にて我々は破骨細胞分化において RANK が shedding による調節を

受けるかどうかを検討した。

初めに、作製した RANK 発現ベクターを COS7 細胞へ導入し、発現を確認した(図1)。

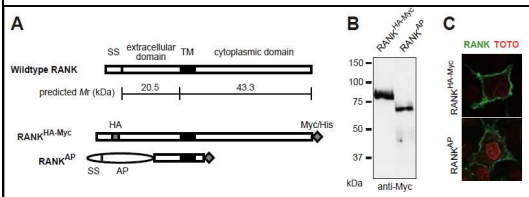


図1. RANK 発現ベクターの作製および発現確認

続いて RANK が細胞膜上にて shedding を受け、細胞外へ放出されることをウエスタンブロットおよびフローサイトメトリーにて証明した(図2)。

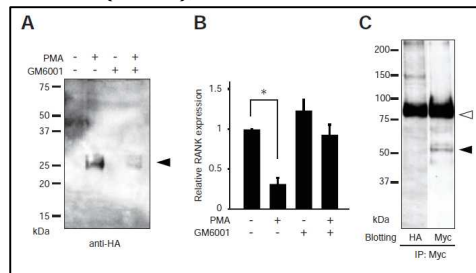


図2 A. B. PMA 刺激により細胞上清中へ RANK 細胞外ドメインが放出され、細胞膜における RANK の発現が減少した。C. 細胞溶解液において細胞外領域が切断された RANK 細胞内領域を検出した。

また、TNF converting enzyme(以下 TACE) を不活化したマウス線維芽細胞株にて RANK の shedding が著しく低下していることを示し、細胞膜上の効率的な切断に TACE が関与していることを発見した(図3)。

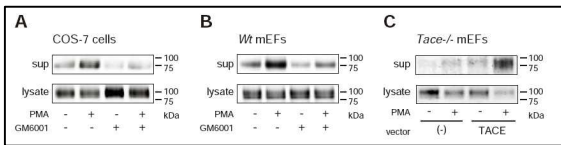


図3 A.B. COS7 細胞および野生型線維芽細胞において RANK は PMA 刺激により切断をうける。C. TACE 欠損線維芽細胞では RANK の shedding 活性が低下しているが、TACE を導入することで shedding 活性は回復した。

続いて、合成した RANK ペプチドをリコンビナント TACE と反応させることで得られたペプチド断片の質量解析および RANK 細胞膜直上領域の変異ベクターの切断効率を検討し、RANK の細胞膜直上における 2 カ所 (Met¹⁹⁹-Thr²⁰⁰(minorsite); Thr²⁰⁰-Leu²⁰¹(major site)) の切断部位を同定した (図 4)。

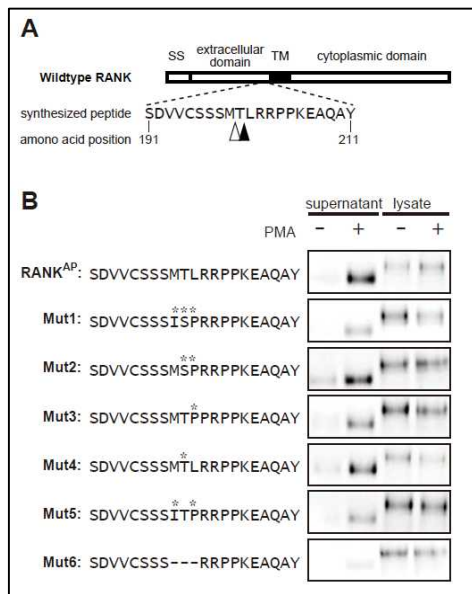


図4A. RANK ペプチドは TACE により細胞膜直上の 2 カ所で切断された。B. Mut1,5 および Mut6 にてシェディング活性に著明な低下を認めた。

以上を踏まえ、RANK シェディングの生理的な意義を検討した。破骨細胞前駆細胞株

RAW264.7 細胞においてリコンビナント RANKL 刺激が TNF receptor associated factor 6 および MAP キナーゼの活性化を介して RANK の shedding を引き起こすことを示した (図 5)。

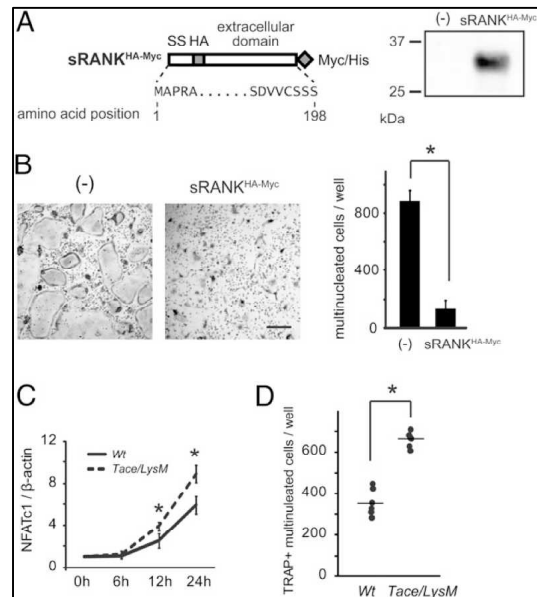


図5A. RANKL 刺激により AP-RANK の shedding は増強した。B. TRAF6 阻害ペプチドにより RANKL 刺激による RANK shedding は濃度依存的に抑制された。C. PMA 刺激による RANK shedding を TRAF6 阻害ペプチドは抑制しない。D. MEK1/2 阻害剤、p38 阻害剤にて RANKL 刺激による RANK shedding が抑制された。E. フローサイトメトリー PMA、RANKL 刺激により RANK の細胞膜における発現量は減少した。この反応はメタロプロテアーゼ依存的であった。

更に TACE を欠損した破骨細胞前駆細胞において、おそらくは shedding 障害による RANK の細胞膜における発現量上昇をきたし、その結果 RANKL 誘導性の破骨細胞形成が亢進していることを見出した (図 6)。

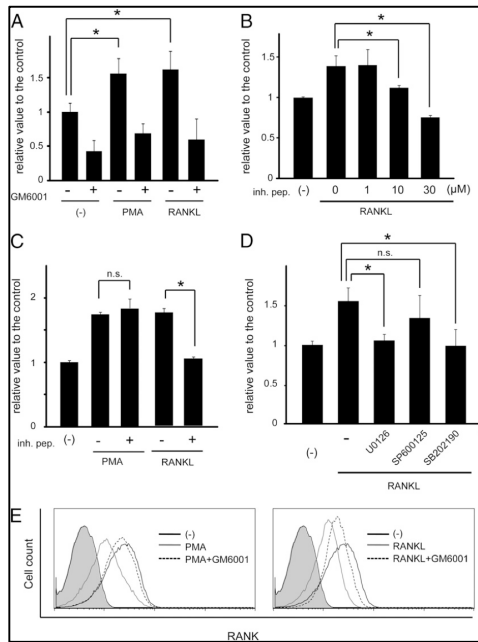


図 6A. 可溶性RANK発現ベクターを作成し COS7細胞へ導入した。翻訳されたタンパク質をc-Myc-tagged protein purification kit (Medical and Biological Laboratories)にて精製した。B. RANKL刺激による破骨細胞形成。sRANK^{HA-Myc}を添加すると破骨細胞形成は抑制された。C.D. TACE欠損破骨細胞前駆細胞は野生型に比し、NFATc1の発現、および破骨細胞形成が増強していた。

我々の発見は、shedding が RANK の機能を制御しうることを示唆しており、RANKL 刺激が RANK shedding を誘導し RANKL-RANK シグナルを減少させるというネガティブフィードバック経路の存在を示した破骨細胞分化メカニズムに関する新知見であると考えられた。

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 1 件)

著者名 Hakozaki A, Yoda M, Tohmonda T, Furukawa M, Hikata T, Uchikawa S, Takaishi H, Matsumoto M, Chiba K, Horiuchi K, and Toyama Y.

論文標題 Receptor Activator of NF- κ B Ligand Induces Ectodomain Shedding of Receptor Activator of NF- κ B in Murine RAW264.7 Macrophages

雑誌名 The Journal of Immunology.

査読 有り

発行年 2010 年 3 月

巻 1;184(5):2442-2448.

〔学会発表〕(計 3 件)

発表者: Akihiro Hakozaki, Keisuke Horiuchi, Tomohiro Hikata, Mitsuru Furukawa, Shinichi Uchikawa, Tomoaki Mori, Masaki Yoda, Takahide Tohmonda, Morio Matsumoto, Kazuhiro Chiba, Hironari Takaishi, and Yoshiaki Toyama

発表標題: TNF converting enzyme regulates proteolytic cleavage of receptor activator of NF- κ B

学会名: ASBMR 2009 Annual Meeting(会場: Colorado Convention Center Denver)

ポスター発表

開催日: 2009.9.11-15

発表者: 箱崎彰裕、堀内圭輔、依田昌樹、東門田誠一、日方智宏、内川伸一、古川満、松本守雄、高石官成、戸山芳昭

発表標題: RAW264.7 細胞において RANKL 刺激は RANK shedding を誘導する

学会名: 第 27 回日本骨代謝学会学術集会(会場: 大阪国際会議場)

開催日: 2009 年 7 月 23 日(木)~25 日(土)

発表者: 箱崎彰裕、堀内圭輔、依田昌樹、

東門田誠一、日方智宏、内川伸一、
古川満、松本守雄、高石官成、戸山芳昭
発表標題：RANK はADAM17 によりshedding を
受け可溶型となる。

学会名：第 26 回日本骨代謝学会学術集会

会場：大阪国際会議場

開催年月日：平成 20 年 10 月 29 日～31 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

箱崎 彰裕 (HAKOZAKI AKIHIRO)

慶應義塾大学・医学部・研究員 (非常勤)

研究者番号：10365299

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし