

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791366
 研究課題名（和文）
 内因性カルシニューリン抑制蛋白質RCAN1の破骨細胞分化制御因子としての役割
 研究課題名（英文）
 Role of regulators of calcineurin 1, RCAN1 as an endogenous calcineurin inhibitor, on osteoclast differentiation
 研究代表者
 小畑 孝二（OBATA KOJI）
 奈良県立医科大学・医学部・助教
 研究者番号：40378229

研究成果の概要（和文）：

破骨細胞分化誘導過程において RCAN の mRNA 発現が、分化が進むに従い、増大することを見出した。機能抑制実験では、予想に反して破骨細胞形成への影響はほとんど見られないため、RCAN ファミリーである RCAN2 および 3 の代償機構が働いている可能性を示した。一方、破骨形成分化過程において、交感神経系の $\alpha 1$ -アドレナリン受容体の発現が増加していること、 α -作動薬は破骨細胞の細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こすことを見出した。本研究により RCAN1 は、交感神経による骨代謝にも重要な役割を持つことが考えられる。

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨代謝、シグナル伝達、破骨細胞、カルシウム、カルシニューリン、骨吸収、RCAN

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでに心臓形成および病的な心臓における Ca^{2+} /カルモデュリン-カルシニューリン系の研究を行い、学術論文として発表している。平成 18-19 年度には科学研究費補助金（若手 B）を受け、内因性カルシニューリン抑制蛋白質 ZAKI-4 β （RCAN2）の心筋特異的過剰発現 TG マウスを作製し大変興味深い結果を得ている。RCAN 研究に関して、発見された組織によって様々な名称

を持っている蛋白質であり、ごく最近になって世界中の研究者によって RCAN (Regulators of calcineurin) と統一された (Davies et al., FASEB J. 2007)。RCAN1 は Down syndrome critical region (DSCR) 1 として、21 番染色体トリソミーであるダウン症候群の原因遺伝子座にある遺伝子の一つとして発見された。その後、DSCR1 は内因性カルシニューリン抑制蛋白質ファミリーの一つであることが知られるようになった

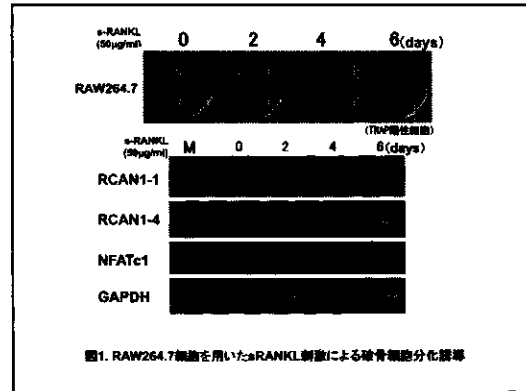
た。一方、破骨細胞において、RANKL や ITAM の下流に Ca^{2+} /カルモデュリン-カルシニューリン系の活性化による NFATc1 の核への移行による破骨細胞分化を促進するシグナル伝達系の重要性はよく知られている。免疫抑制剤でありカルシニューリン抑制剤であるサイクロスポリン A や FK506 を用いて、破骨細胞分化の抑制が報告されている (Hirotsani et al., J Biol Chem. 2004)。RCAN は ISPPXSPP box と言われる conserved motif を持ち、この配列がカルシニューリンの target molecule である NFAT の持つ SP repeat と競合的に働くことにより、カルシニューリンシグナリングを抑制していると言われている。そこで、本研究では RCAN1 がカルシニューリン-NFAT シグナル伝達系を内因性に抑制することで、破骨細胞分化を抑制する可能性が考えられる。これまでに破骨細胞形成における RCAN の関与を示す報告はない。

2. 研究の目的

カルシニューリン-NFAT シグナル伝達系は、免疫細胞での研究が主に進んでした。しかし、最近、心臓や骨研究分野において、その重要性が多く報告されている。破骨細胞は、造血幹細胞由来の単球・マクロファージ系前駆細胞を起源とし、RANKL の発見により、その分化誘導を促進するメカニズムについて、盛んに研究が行われている。一方、破骨細胞分化を負に制御するメカニズムは、ほとんど知られていない。本研究では、RCAN1 を利用した破骨細胞自身による内因性の分化抑制メカニズムの存在を明らかにすることを目的としている。破骨細胞自身が RCAN1 を産生することでカルシニューリン-NFATc1 系を抑制し、自らが分化（あるいは骨吸収活性）を負に調節する新規の破骨細胞分化のメカニズムの存在を提唱すること、さらにはそのメカニズムを制御することによって RCAN を利用した骨粗鬆症等の骨吸収が促進する疾患における新規の治療法の開発を目的としている。

3. 研究の方法

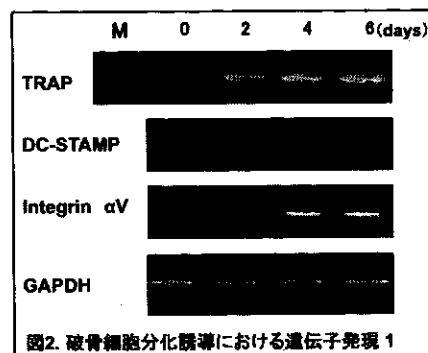
破骨細胞の分化誘導にはいくつかの方法があるが、本研究では、他の細胞の混入を避け、薬物などの直接的な影響をみる目的で、単球・マクロファージ系細胞株である RAW264.7 細胞を可溶性 RANKL ($50 \mu\text{g/ml}$) にて刺激することで、分化誘導し、得られる多核の TRAP 陽性細胞を破骨細胞として用いた。その他の薬物投与等は Hirotsani ら (J Biol Chem. 2004) の方法に従った。



本研究に至る予備試験としてマウス由来マクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を用いて、*in vitro*における sRANKL による破骨細胞分化誘導過程における RCAN の発現を RT-PCR 法によって調べた。大変興味深いことに、分化が進むに従い RCAN1-4 の mRNA 発現の増大を確認した。一方、RCAN1-1 の発現量はほとんど変化がみられなかった。このとき破骨細胞分化のマスターレギュレーターである NFATc1 の mRNA 発現の増大も確認している (図 1)。この結果からも、RCAN1-4 は破骨細胞分化過程において重要な役割を担っていることは疑う余地がない。本研究では、RCAN の役割を調べるために、siRNA 法による Loss-of-function 実験を行った。また、RANKL 刺激による分化過程において交感神経受容体の発現を RT-PCR 法によって調べ、さらに α 作動薬の効果カルシウムイメージングにより調べた。

4. 研究成果

破骨細胞分化における内因性カルシニューリン抑制蛋白質 RCAN1 の役割を明らかにするために、RANKL 刺激 0, 2, 4, 6 日目の細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法により RCAN の発現を調べたところ、分化が進むにつれて発現量が増加してくることから、分化促進を負に制御していると考えた。



そこで、siRNA による RCAN1-4 のノックダウンを行ったが、残念なことに影響が見られなかった。その理由として、手技的な問題も

考えられるが、RCAN はファミリーを形成しており、RCAN2 の mRNA を調べたところ、分化過程による変化は見られなかった。それら RCAN ファミリーによって、破骨細胞分化における RCAN1 の役割が代償されている可能性が示唆された。今後、それら RCAN ファミリーについても検討する必要性を示した結果となった。

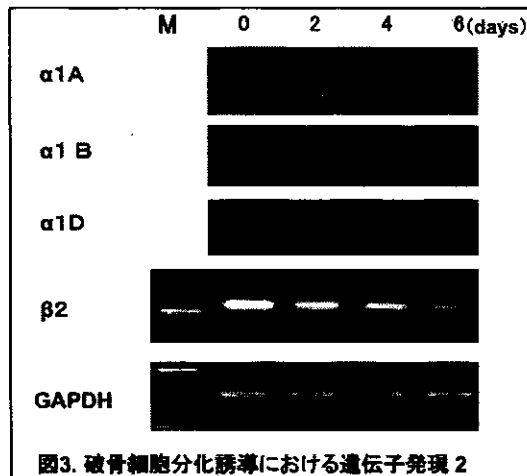


図3. 破骨細胞分化誘導における遺伝子発現 2

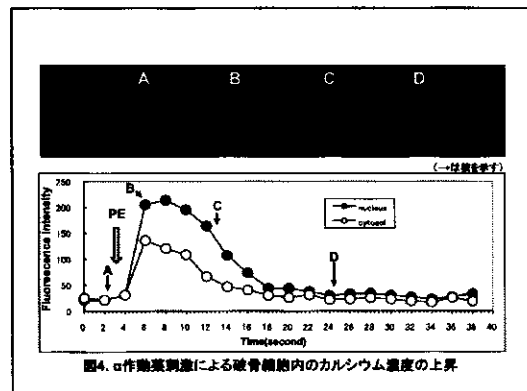


図4. α 作動薬刺激による破骨細胞内のカルシウム濃度の上昇

そこで、その他の分化段階で変化してくる遺伝子発現を調べたところ、既存の破骨細胞マーカー遺伝子の増加 (図 2) に比例して、 α 1-アドレナリン受容体の発現が増大してくることを突き止めた。 β 2-アドレナリン受容体は変化しておらず、他はほとんど検出されなかった (図 3)。

さらに、破骨細胞への α 作動薬による受容体の機能をカルシウムイメージングで見たところ、フェニレフリンによる刺激で Flou-3 による蛍光強度の増大、つまり細胞内カルシウム濃度の上昇が観察された (図 4)。現在、交感神経による RCAN の調節機構について検討中である。

本研究は、RCAN1 が Down syndrome critical (candidate) region (DSCR) 1 として、21 番染色体トリソミーであるダウン症候群の原因遺伝子座にある遺伝子の一つとして発見されたことから骨形成 (骨代謝) に重要な役割を持つと考え、さらには RCAN を利用

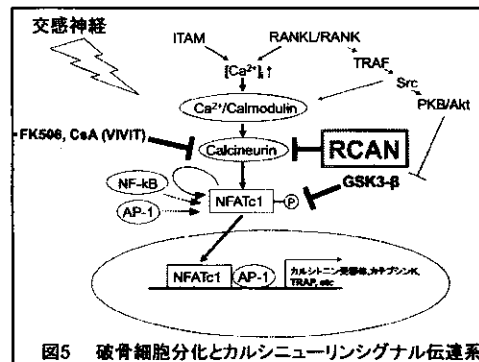


図5 破骨細胞分化とカルシニューリンシグナル伝達系

した骨粗鬆症等の骨吸収が促進する疾患における新規の治療法の開発を最終目標とした。最近、交感神経による骨吸収の促進作用が示されており、もしかしたら交感神経による破骨細胞への直接的な作用により RCAN を介した破骨細胞分化あるいは機能を調節するメカニズムが存在するかもしれない (図 5)。RCAN は大変興味深い分子であり、今後さらに研究を進めることで発展が期待される

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- 1) A 5-HT(4)-receptor activation-induced neural plasticity enhances in vivo reconstructs of enteric nerve circuit insult. Matsuyoshi H, Kuniyasu H, Okumura M, Misawa H, Katsui R, Zhang GX, **Obata K**, Takaki M. *Neurogastroenterol Motil.* 2010 Feb 8. in press. 査読有。
- 2) Cardioprotective effects of a novel calpain inhibitor SNJ-1945 for reperfusion injury after cardioplegic cardiac arrest. Yoshikawa Y, Zhang GX, **Obata K**, Ohga Y, Matsuyoshi H, Taniguchi S, Takaki M. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 Feb;298(2):H643-51. 査読有。
- 3) Inhibition of cytochrome c release by 10-N-nonyl acridine orange, a cardiolipin-specific dye, during myocardial ischemia-reperfusion in the rat. Zhang GX, Kimura S, Murao K, **Obata K**, Matsuyoshi H, Takaki M. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 Feb;298(2):H433-9. 査読有。
- 4) Left ventricular function of isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts perfused with blood: mechanical work and energetics. Nakajima-Takenaka C, Zhang GX, **Obata K**, Tohne K, Matsuyoshi H, Nagai Y, Nishiyama A, Takaki M. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Nov;297(5):H1736-43. 査読有。

- 5) Mechanism of diastolic stiffening of the failing myocardium and its prevention by angiotensin receptor and calcium channel blockers. Cheng XW, Okumura K, Kuzuya M, Jin Z, Nagata K, **Obata K**, Inoue A, Hirashiki A, Takeshita K, Unno K, Harada K, Shi GP, Yokota M, Murohara T. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009;47-56. 査読有。
- 6) Long-term administration of nifedipine attenuates cardiac remodeling and diastolic heart failure in hypertensive rats. Yamada T, Nagata K, Cheng XW, **Obata K**, Saka M, Miyachi M, Naruse K, Nishizawa T, Noda A, Izawa H, Kuzuya M, Okumura K, Murohara T, Yokota M. *Eur J Pharmacol.* 2009 615(1-3):163-70. 査読有。
- 7) 骨関連細胞と神経細胞の共培養実験法の確立と細胞間相互作用の検討
小畑孝二, 戸蒔彰史
口腔組織培養学会誌, 17:15-25. 2008. 査読無。
- 8) Dobutamine stress testing as a diagnostic tool for evaluation of myocardial contractile reserve in asymptomatic or mildly symptomatic patients with dilated cardiomyopathy. Kobayashi M, Izawa H, Cheng XW, Asano H, Hirashiki A, Unno K, Ohshima S, Yamada T, Murase Y, Kato TS, **Obata K**, Noda A, Nishizawa T, Isobe S, Nagata K, Matsubara T, Murohara T, Yokota M. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2008 1:718-26. 査読有。
- 9) Pioglitazone attenuates cardiac hypertrophy in rats with salt-sensitive hypertension: role of activation of AMP-activated protein kinase and inhibition of Akt. Kato MF, Shibata R, **Obata K**, Miyachi M, Yazawa H, Tsuboi K, Yamada T, Nishizawa T, Noda A, Cheng XW, Murate T, Koike Y, Murohara T, Yokota M, Nagata K. *J Hypertens.* 2008 26(8):1669-76. 査読有。
- 10) Superoxide-dependent cathepsin activation is associated with hypertensive myocardial remodeling and represents a target for angiotensin II type 1 receptor blocker treatment. Cheng XW, Murohara T, Kuzuya M, Izawa H, Sasaki T, **Obata K**, Nagata K, Nishizawa T, Kobayashi M, Yamada T, Kim W, Sato K, Shi GP, Okumura K, Yokota M. *Am J Pathol.* 2008 173(2):358-69. 査読有。
- 11) Xanthine oxidase inhibition improves left ventricular dysfunction in dilated cardiomyopathic hamsters. Hayashi K, Kimata H, **Obata K**, Matsushita A, Fukata A, Hashimoto K, Noda A, Iwase M, Koike Y, Yokota M, Nagata K. *J Card Fail.* 2008 14(3):238-44. 査読有。
- [学会発表] (計 11 件)
- 1) **Obata K**: Guo-Xing Zhang, Hiroko Matsuyoshi, Mitsuhiro Yokota, Miyako Takaki : Overexpression of calmodulin in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy by a calcineurin-dependent pathway. 第 102 回近畿生理学談話会 2009/12/13 大阪
- 2) Guo-Xing Zhang, Shoji Kimura, Koji Muraio, **Koji Obata**, Hiroko Matsuyoshi, Miyako Takaki : Possible mechanisms of AT1 receptor blockade on β -adrenergic receptor stimulation-induced cardiac hypertrophy. 第 102 回近畿生理学談話会 2009/12/13 大阪
- 3) 服部宇孜・竹下大輔・張国興・**小畑孝二**・松吉ひろ子・三澤裕美・高木 都 : イソプロテレノール誘導肥大心の左心室心筋スライスのカルシウムトランジェントの変化 第 102 回近畿生理学談話会 2009/12/13 大阪
- 4) **小畑孝二**、浅田啓嗣、青木久美子、高木 都 : 共培養実験系を用いた神経細胞と骨芽細胞の細胞間相互作用の検討 第 37 回自律神経生理研究会 2009/12/5 東京
- 5) **Obata K**: Effects of HMG-CoA reductase inhibitor, pitavastatin on cardiac function and survival in a rat model of hypertensive heart failure. BBSRC Japan Partnering Programme 2007-2011. The 36th International Congress of Physiological Science. Satellite Symposium #8. CARDIAC ELECTRO-MECHANICAL FUNCTION Cell-Organ Cross-Talk Revealed via Integration of Experiments and Models. 2-4 August 2009. In Benesse Art Site Naoshima. Kagawa
- 6) 共培養実験系を用いた神経細胞と破骨細胞の細胞間相互作用の検討 **小畑孝二**、須賀智子、後藤滋巳、戸蒔彰史 第 82 回日本薬理学会 2009. 3. 16-18. 横浜
- 7) Direct Neurite-osteoclastic Cell Communication in Co-culture System **Koji Obata**, Satoko Suga, Shigemi Goto, Akifumi Togari 第 56 回国際歯科研究学会日本部会学術大会 2008.11.29-30. 名古屋

- 8) 破骨細胞と神経細胞の共培養実験法の確立と細胞間相互作用の検討 小畑孝二、戸蒔彰史 第45回口腔組織培養学会
2008.11.15. 松本
- 9) 共培養実験系における骨芽細胞と神経細胞の機能的相互作用 小畑孝二、近藤久貴、新井通次、戸蒔彰史 第26回日本骨代謝学会学術集会 2008.10.29-31. 大阪
- 10) 共培養実験系における神経細胞と破骨細胞の相互作用 須賀智子、小畑孝二、古野忠秀、近藤久貴、新井通次、中西守、後藤滋巳、戸蒔彰史 第50回歯科基礎医学学会学術大会 2008.9.23-25. 東京
- 11) 骨芽細胞と神経細胞の共培養実験系における α -アドレナリン受容体を介した相互作用 小畑孝二、戸蒔彰史 第50回歯科基礎医学学会学術大会 2008.9.23-25. 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小畑 孝二

研究者番号：00033358

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

○高木 都 教授

(奈良県立医科大学医学部第二生理学)

研究指導・助言

研究者番号：40378229

○張 国興 (Guo-Xing Zhang) 助教

(奈良県立医科大学医学部第二生理学)

蛋白質解析

研究者番号：90444728

○松吉ひろ子 助教

(奈良県立医科大学医学部第二生理学)

遺伝子解析

研究者番号：10448772

○横田 充弘 客員教授

(愛知学院大学歯学部)

研究指導・助言

研究者番号：50201851