

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592071

研究課題名（和文） 破骨細胞カルシウム流入特性を利用した骨量管理

研究課題名（英文） The regulation of bone mass by calcium influx properties of osteoclasts.

研究代表者

増山 律子（MASUYAMA RITSUKO）

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：60297596

研究成果の概要（和文）：破骨細胞の分化・成熟化には細胞内カルシウムシグナルの活性化と、それに続く様々な転写因子の作用、遺伝子発現誘導、タンパク機能が必須である。そこで、細胞機能の主軸となるカルシウムシグナルを駆動される機構に注目し、そのきっかけとなる細胞内カルシウム濃度の上昇はどのように引き起こされるのか、細胞内にカルシウムを流入させる膜局在カルシウムチャンネル Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) の破骨細胞における機能調節機構を検討した。TRPV4 の作用によりカルシウムカルモジュリン複合体が細胞内で増加し、それが TRPV4 のカルモジュリン結合領域に応答すること、さらに非筋型ミオシンがカルモジュリン結合領域の構成分子となり、細胞の遊走性に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Osteoclast differentiation is critically dependent on calcium (Ca<sup>2+</sup>) signaling. Transient receptor potential vanilloid (TRPV) 4, mediates Ca<sup>2+</sup> influx in the late stage of osteoclast differentiation, thereby regulates Ca<sup>2+</sup> signaling. However, the system-modifying effect of TRPV4 activity remains to be determined. Bone loss due to TRPV4 activation was abrogated by loss of interactions between Ca<sup>2+</sup>/calmodulin signaling and TRPV4. Finally, modulators of TRPV4 interactions with the calmodulin-binding domain were investigated by proteomic analysis. Non-muscle myosin IIa was then identified by LC-MS/MS analysis, which was confirmed by immunoblotting following coimmunoprecipitation with TRPV4. These results indicate that TRPV4 activation reciprocally regulates Ca<sup>2+</sup>/calmodulin signaling, which involves an association of TRPV4 with myosin IIa, and promotes sufficient osteoclast function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：カルシウムチャンネル・破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内カルシウム濃度の維持は、いかなる細胞においても細胞の生存や機能発現に極めて重要である。破骨細胞には細胞内カルシウム貯蔵庫である小胞体 (ER) から一定の間隔でカルシウムが放出される「カルシウムオシレーション機構」が存在し、細胞内カルシウム濃度を厳格に調整することで細胞内カルシウムシグナリングをサポートしている<sup>1)</sup>。そして、カルシウムオシレーションが障害されると破骨細胞の機能は著しく低下して骨吸収が減少し、その結果大理石病様の骨量増加が引き起こされる。カルシウムチャンネルによる恒常的なカルシウム流入は、破骨細胞の生涯を通じて常に重要な機構と考えられるが、カルシウムオシレーションの誘発や破骨細胞分化の契機としてのカルシウムチャンネルの役割については検討されていない。さらに、ER カルシウムオシレーションが障害された状態でも破骨細胞は分化すること、細胞が分化する過程でオシレーションが消失してゆくにもかかわらず、細胞の分化は継続されることから、カルシウムオシレーション非依存的な破骨細胞分化誘導経路の存在も示唆されているため、細胞活動の中核であるカルシウムシグナルを支持するカルシウム供給機構の複雑性が提示されている。したがって、細胞分化段階毎の、細胞内カルシウム濃度調節を担当するカルシウム流入分子の同定ならびに活性化機構の解明が求められている。

## 2. 研究の目的

(1) 破骨細胞各分化ステージで機能するカルシウムチャンネルをスクリーニングし、それぞれのチャンネルについて、ER カルシウム貯蔵に貢献するオシレーション型として機能しているか、あるいはオシレーションが消失した後で直接細胞内カルシウム濃度を上昇させるカルシウム流入型として機能するかを検討する。

(2) カルシウムチャンネルの活性化機構の追及には、破骨細胞活性の促進作用が報告されている TRPV1 ならびに TRPV4 をモデル分子として、共通に保存されている活性化調節候補領域に注目し、破骨細胞の分化に応じてチャンネル機能が変化する際に必要な領域を決定する。カルシウムチャンネルはタンパク合成修飾後に細胞膜上に移行して他の膜局在分子による安定化制御を受ける。TRPV4 細胞膜安定化や活性化に影響する細胞内分子は何か。それは TRPV4 分子の細胞内領域に応答するか注目する。

(2) (1)の検討項目より、破骨細胞の生涯を通じて細胞内カルシウム濃度調節を担当する細胞膜カルシウムチャンネル情報が整

理される。この結果に基づき、分化後期で機能するカルシウムチャンネルの活性型変異体や、チャンネル活性化領域の欠損変異体を作成、それらを破骨細胞特異的に発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作成し、破骨細胞による骨吸収が骨量に影響を及ぼすかを検討する。

## 3. 研究の方法

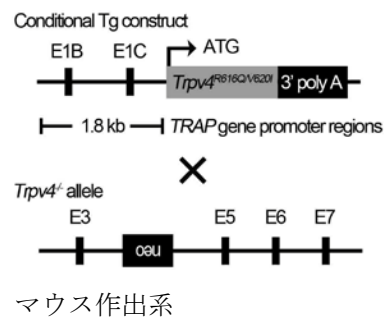
### (1) TRPV4 活性化変異体発現細胞の作成

TRPV4 の活性型変異体は、ヒト TRPV4 gain-of-function mutant として報告された変異 (R616Q/V620I)<sup>2)</sup> をマウス TRPV4 の膜間通孔領域に導入し、レトロウイルスベクター pMXneo へと組み込んだものを、TRPV4KO マウス由来骨髄マクロファージに感染し、安定に発現する細胞を選出、株化した。RANKL と MCSF の刺激により破骨細胞へと分化させ実験に用いた。

### (2) TRPV4 活性化変異体トランスジェニックマウスの作出

(1)のレトロウイルス変異体ベクターを作成する過程で構築した TRPV4 変異体を、TRAP5b プロモーター領域の後部につなぎ、トランスジェニックマウス作出用の発現ベクターを構築し(図 1)、C57BL/7 マウスを用いてトランスジェニックマウスを作出した。さらに、TRPV4KO マウスと交配を重ね、破骨細胞にのみ TRPV4 を活性型で発現するマウスを作出した。

図 1 活性型変異 TRPV4 トランスジェニック



### (3) TRPV4 活性化調節領域変異体の作出

TRPV4 の細胞内領域の機能調節ドメインについて、それらの欠損体を作成した。これを(1)と同様に骨髄マクロファージにレトロウイルスベクターを用いて発現させ、TRPV4 の機能を評価し、活性化調節領域の評価を行った。

(4) TRPV4 応答分子の同定

(3)で調べられた活性化調節領域の欠損体を HEK 細胞に発現させ、TRPV4 抗体による免疫沈降を行なった。TRPV4 に結合する分子を SDSPAGE 後に LC/MS-MS を用いて解析を行ない候補分子を選出し、それらの TRPV4 との結合はウェスタンブロットにより確認した。

4. 研究成果

(1)TRPV4 活性化による破骨細胞分化への影響。

骨髄マクロファージに TRPV4 の活性化型変異体を発現させ、細胞内カルシウム濃度の変化と、TRPV4 アゴニスト投与によるカルシウム流入活性を評価した (図 2)。

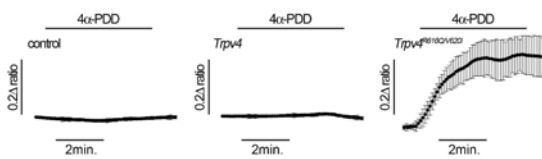


図 2 TRPV4 活性化型変異体のカルシウム流入活性

TRPV4 の活性化により破骨細胞の分化初期から細胞内カルシウム濃度の上昇が観察され、分化マーカーの発現量は増加した。またカルシウムオシレーションは、TRPV4 活性化を誘導することで、通常のアシレーション出現のタイミングより早く検出されたことから、カルシウムチャンネルの活性化による細胞内カルシウム濃度の上昇は、小胞体内のカルシウム貯蔵を高め、アシレーション出現に影響することが示唆された。

(2) TRPV4 活性化によるマウス骨量の変化

TRPV4 活性化型変異トランスジェニックマウスは、野生型マウス、および、TRPV4KO マウスと比較して骨量は減少した (図 3)。この変化は、破骨細胞の骨吸収が原因であることを、組織学的検討、ならびに血中の骨吸収マーカーの変化から確認された。

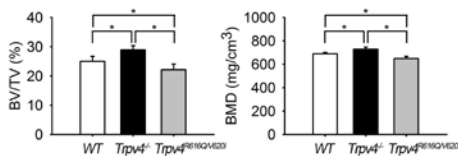


図 3 TRPV4 活性化によるマウス骨量の減少

(3) TRPV4 活性化調節細胞内領域の同定ならびに、トランスジェニックマウスの骨量の変化

TRPV4 の活性化の維持に必要な領域について、TRPV4 活性化型変異体の細胞内領域の欠損体を作成し、それらのカルシウム流入活性

を比較した。チャンネルタンパクの C 端側に局在するカルモジュリン結合領域を欠損させたところ、カルシウム流入活性は著しく減少したことから、この領域を TRPV4 活性化調節領域と予測し、トランスジェニックマウスを作成した。マウスの骨量は、TRPV4 の活性化型変異で減少するが、そのカルモジュリン結合領域を欠くことにより骨表現型は改善され、TRPV4 活性化による骨量減少ならびに破骨細胞増加が見られなくなった。

(4) TRPV4 活性化調節領域 (カルモジュリン結合領域) に結合し、機能を修飾する分子の同定

TRPV4 のカルモジュリン結合領域に反応する分子群を同定するため、カルモジュリン結合領域欠損 TRPV4、および、正常 TRPV4 を発現ベクター pcDNA3.1 に組み込み HEK293 細胞に導入し、2日間培養後に細胞を回収、細胞内のタンパクを抽出し、TRPV4 抗体にて免疫沈降を行なった。回収されたタンパクサンプルは、SDSPAGE で展開し、広範囲の分子量領域にわたり LC-MS/MS を用いてペプチドの同定を行なった。候補分子として、免疫沈降サンプルのウェスタンブロットで発現確認されたものは、非筋型ミオシンであった(図 4)。

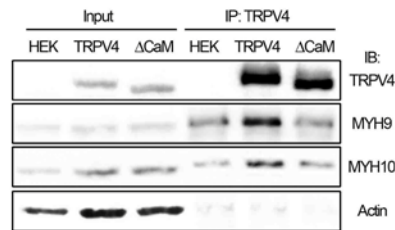


図 4 TRPV4 カルモジュリン結合領域応答分子の同定 (免疫沈降/ウェスタンブロット)

そこで、骨髄マクロファージにおいて非筋型ミオシン分子を siRNA により発現制御したところ、破骨細胞への分化が減弱され (図 5)、細胞の遊走性が低下し、TRPV4 によるカルシウム流入活性も著しく低下した。

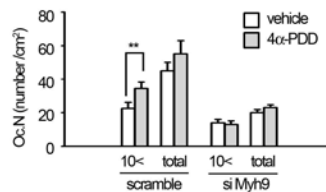


図 5 ミオシン発現抑制による TRPV4 の破骨細胞分化誘導能の変化

また、非筋型ミオシンは、細胞内でミオシン軽鎖がリン酸化され、活性化されることから、培養破骨細胞をミオシン軽鎖キナーゼ MLCK の阻害剤で処理すると、予想通り破骨細胞の分化成熟化は抑制された。

#### (5) ミオシン非活性化による破骨細胞機能の変化の検討

ミオシンは軽鎖サブユニットのリン酸化により活性化されることから、ミオシン脱リン酸化による非活性化を試みた。Rho キナーゼは通常ミオシンの脱リン酸化に抑制的に作用するため、Rho キナーゼ阻害剤で破骨細胞を処理し、ミオシン分子の脱リン酸を促進させてミオシンの非活性化を試みた。骨髄マクロファージの破骨細胞への分化過程において、Rho キナーゼ阻害剤処理は破骨細胞の成熟化を若干低下させるが、多核化した破骨細胞は出現していた。しかしながらこの細胞の TRPV4 活性は低下しており、ミオシンの脱リン酸が破骨細胞の TRPV4 機能に影響していることを示唆する結果が得られた。興味深いことに、Rho キナーゼ阻害剤の投与では細胞分化の初期段階から細胞の遊走性が低下し、これは TRPV4KO マウス由来の培養破骨細胞でも観察されたことから、カルシウムチャンネルの機能と破骨細胞の遊走性には何らかの関係があると考えられる。遊走性の変化が細胞の融合に影響することで、融合し、多核化しながら分化巨大化する破骨細胞の機能に影響することが予測される。

破骨細胞では細胞内カルシウム濃度の維持が細胞の分化・成熟化には必須であり、カルシウムチャンネルによる外液からのカルシウム流入で支持される細胞特性である。本申請研究では、破骨細胞の分化後期に機能する TRPV4 の活性化による破骨細胞機能の変化を観察し、このしくみをマウス個体で再現した。TRPV4 は破骨細胞機能を増強し、骨吸収を調節することが見出された。またチャンネルの活性化調節領域には、破骨細胞の分化により発現量が増加するカルモジュリン分子が結合し、さらなる活性化を調節することがわかった (図 6)。

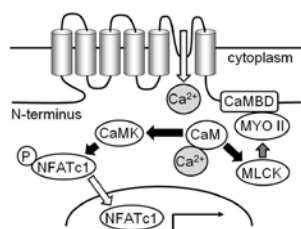


図 6 TRPV4 のカルシウム流入機構では、カルモジュリン結合領域へのミオシンの応答によりチャンネル活性が維持される。

また、ミオシン分子の機能調節が細胞遊走性に影響することは容易に予測されるが、ミオシン分子と TRPV4 チャンネルが細胞内で応答し、破骨細胞の分化を制御している機構は、非常に興味深い発見であった。細胞の遊走時にカルシウムシグナルが駆動するしくみや、カルシウムチャンネルの作用がより重要な細胞 (神経細胞、筋、内皮細胞等) の機能がミオシン分子のはたらきで変化する可能性も有る。今後は細胞の動きと、細胞局所のカルシウム濃度の変化を探り、本申請研究で見出した細胞内機構が、生体の他の組織の機能にもあてはめられるかを検討し、細胞内シグナルを追求する。

#### 参考文献

- 1) Masuyama R, Vriens J, Voets T, Karashima Y, Owsianik G, Vennekens R, Lieben L, Torrekens S, Moermans K, Vanden Bosch A, Bouillon R, Nilius B, Carmeliet G. TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts. *Cell Metab.* 2008;8:257-265.
- 2) Rock MJ, Prenen J, Funari VA, Funari TL, Merriman B, Nelson SF, Lachman RS, Wilcox WR, Reyno S, Quadrelli R, Vaglio A, Owsianik G, Janssens A, Voets T, Ikegawa S, Nagai T, Rimoin DL, Nilius B, Cohn DH. Gain-of-function mutations in TRPV4 cause autosomal dominant brachyolmia. *Nat Genet.* 2008;40(8):999-1003.

#### 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 5 件)

- ① Moriishi T, Maruyama Z, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Kitaura H, Ohnishi H, Furuichi T, Kawai Y, Masuyama R, Komori H, Takada K, Kawaguchi H, Komori T. Overexpression of Bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and induces osteocyte apoptosis. *PLoS One* 査読有り vol6、2011、e27487
- ② Wang Y, Liu W, Masuyama R, Fukuyama R, Ito M, Zhang Q, Komori H, Murakami T, Moriishi T, Miyazaki T, Kitazawa R, Yoshida CA, Kawai Y, Izumi S, Komori T. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 induces bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis. *Bone* 査読有り、vol50、2012、409-419
- ③ Masuyama R, Mizuno A, Komori H, Kajiya H, Uekawa A, Kitaura H, Okabe K, Ohyama K, Komori T. Calcium/calmodulin-signaling supports TRPV4 activation in osteoclasts and

regulates bone mass. Journal of Bone and Mineral Research 査読有り、vol27、2012、1708-1721

- ④ Lieben L, Masuyama R, Torrekens S, Van Looveren R, Schrooten J, Baatsen P, Lafage-Proust MH, Dresselaers T, Feng JQ, Bonewald LF, Meyer MB, Pike JW, Bouillon R, Carmeliet G. Normocalcemia is maintained in mice under conditions of calcium malabsorption by vitamin D-induced inhibition of bone mineralization. Journal of Clinical Investigation 査読有り、vol122、2012、1803-1815
- ⑤ 増山律子 骨恒常性の維持における局所カルシウム輸送とビタミン D の役割 ビタミン、査読有り、87 巻、2013、38-43

[学会発表] (計 4 件)

- ① 増山律子 The Importance of Vitamin D Signaling for Calcium and Bone Homeostasis 2011 年 7 月 29 日、日本骨代謝学会、大阪
- ② 増山律子 骨恒常性の維持における局所カルシウム輸送とビタミン D の役割、日本ビタミン学会、2012 年 6 月 22 日、岐阜市
- ③ 増山律子 局所でのビタミン D 作用と骨ミネラル代謝、2012 年 7 月 21 日、日本骨代謝学会、東京都
- ④ 増山律子 Calcium/calmodulin-signaling regulates TRPV4 action by the process supporting myosin IIa association in osteoclasts. 2012 年 10 月 12 日、米国骨代謝学会、ミネアポリス

[図書] (計 0 件)  
該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
該当なし

○取得状況 (計 0 件)  
該当なし

[その他]  
ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増山 律子 (MASUYAMA RITSUKO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：60297596

(2) 研究分担者

小守 壽文 (KOMORI TOSHIHISA)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00252677

(3) 連携研究者

該当なし