

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17004

研究課題名（和文）膜輸送系を主軸とする新規分子による骨粗鬆症モデルマウスの病態解明

研究課題名（英文）Elucidating the Pathophysiology of Osteoporosis Model Mice Using Novel Molecules Targeting Membrane Transport Systems

研究代表者

山口 優（YAMAGUCHI, Yu）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・助教

研究者番号：50823308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、Rab44の膜輸送を主軸とした機能を解明することである。Rab44がアクチン結合タンパク質Coronin1CとRab44野生型とGDP型でのみ相互作用することが判明した。GTP型は破骨細胞の分化を抑制し、GDP型は分化を促進することも示された。in vitroでCoronin1Cによる破骨細胞形成制御作用、マクロファージ様細胞の運動能と遊走能制御機能を確認した。in vivoでも、Coronin1Cが破骨細胞形成に影響を及ぼすことが示された。以上より、Coronin1CはGDP型Rab44と結合し、マクロファージの細胞運動を調節することで破骨細胞形成を制御することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、Rab44の膜輸送に関する新しい機能を解明し、特に破骨細胞の形成における役割を明らかにした。Rab44とアクチン結合タンパク質Coronin1Cとの相互作用による破骨細胞形成の新しい調節機構が見出された。さらに、Coronin1Cがマクロファージの運動能と遊走能を調節し、破骨細胞形成に影響を及ぼすことが明らかになった。この知見は、骨粗鬆症などの骨疾患の治療戦略に新しいターゲットを提供する可能性がある。特に、Rab44とCoronin1Cの相互作用を制御することで、破骨細胞の過剰な活性化を抑制し、骨密度の維持や骨量減少の予防に寄与する治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the function of Rab44, focusing on its role in membrane transport. It was found that Rab44 interacts with the actin-binding protein Coronin1C only in its wild-type and GDP-bound forms. The GTP-bound form was shown to inhibit osteoclast differentiation, while the GDP-bound form promoted it. In vitro experiments confirmed that Coronin1C regulates osteoclast formation and controls the motility and migration ability of macrophage-like cells. In vivo experiments also demonstrated that Coronin1C affects osteoclast formation. These findings suggest that Coronin1C binds to the GDP-bound form of Rab44 and regulates osteoclast formation by modulating the cell motility of macrophages.

研究分野：常態口腔学

キーワード：Rab44 Rab GTPase 破骨細胞 Rab44ノックアウトマウス 骨粗鬆症

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は低骨量、低骨質に起因して骨が脆弱化し、骨折しやすくなる疾患である。骨形成より骨吸収が促進されることが主原因であり、特に閉経後の女性に多くみられ、女性ホルモンの減少や加齢との関連性が高いとされている。日本骨粗鬆症学会の報告では、高齢化に伴い患者数が急増し、現在総人口の約10%である1300万人が骨粗鬆症と診断されている。研究代表者は破骨細胞の骨吸収機能を制御する新規遺伝子を同定するため、マクロファージから破骨細胞への分化過程で発現が上昇する遺伝子群を独自に分析し、これまで全く論文報告されていなかった新規遺伝子 **Rab44** を同定した(引用文献①)。**Rab** タンパク質は一般的にエフェクタータンパク質と結合することによって機能する。そこで研究代表者はプロテオーム解析を行い、結合候補分子である **Coronin1C** を見出した。**Coronin1C** はアクチンに関与する分子だと報告されている。**Rab44** の活性によって結合に変化があることも免疫沈降実験によって新たに知見が得られた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、**Rab44** の欠失が骨粗鬆症モデルへ与える影響を調べ、その機能を明らかにすることである。研究代表者は **Rab44** の遺伝子異常が骨粗鬆症に関与するのではないかと考え、本遺伝子ノックアウトマウスに以下の環境因子を加えて骨粗鬆症モデルを作製し解析する。食事環境に関してはカルシウム欠乏食モデル、性ホルモン異常に関しては卵巣摘出(OVX)モデル、薬物療法に関してはステロイド投与などの薬物投与モデル、運動の影響に関しては尾部懸垂モデルを作製する。また、*in vitro* での **Coro1c** との相互機能に対する実験を行うことにより、その分子メカニズムも解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Rab44 遺伝子欠損マウスの表現型解析

・可視的表現型解析: マウス形態異常を調べるための表現型解析フローチャートに則り、自然状態での観察、刺激に対する反応・反射観察、肉内臓解剖による形態異常を解析する。  
・血液の血算検査および生化学的検査: 野生型と Rab44 ノックアウトマウスの血清および血球数の検査を実施する。血算検査では項目ごとに野生型マウスの正常値を元にヒートマップを作製し、ノックアウトマウスでの異常個体を視覚的に表現する。生化学検査では骨に関連した項目の測定を行う。

#### (2) Rab44 ノックアウトマウスでの骨組織・骨代謝解析

Rab44 不活性型細胞で破骨細胞分化が促進していることから、Rab44 ノックアウトマウスは骨粗鬆症様病変を呈することが予測される。そこで胎生期マウスあるいは生後数日後のマウスの透明骨格標本作製し全身形態を評価する。アルシアンブルー染色で青色に染まった軟骨組織とアリザリンレッドで赤色に染まった石灰化硬組織の範囲を比較し、マウス個体レベルでの硬骨形成の比較を行う。さらに成長したマウスの大腿骨、椎骨等の  $\mu$ CT 撮影により骨量、海綿骨数、海綿骨厚を測定する。同時に、固定後脱灰パラフィン切片や非脱灰樹脂切片を作製し、HE 染色、TRAP 染色を行い、骨形成を比較する。またカルセインを段階投与し、非脱灰樹脂標本作製して骨組織の動的状態を評価する。

#### (3) Rab44 ノックアウトマウスを用いた骨粗鬆症モデル実験

・カルシウム欠乏食モデル: 生体内のカルシウムが欠乏すると破骨細胞が活性化し、骨からカルシウムが溶出する。カルシウム欠乏食をマウスに給餌させて、正常と欠損マウスの病態について(2)の方法で解析する。  
・卵巣摘出(OVX)モデル: エストロゲン欠乏により骨代謝回転が亢進し、長管骨の骨端部や椎体の海綿骨が顕著に減少する。以上2つのモデルの解析で効果が出ない場合は以下のモデルと併用し、増強作用を期待して変化を見る。  
・薬物投与モデル: ステロイドであるプレドニゾロンペレットを腹腔に投与することで骨粗鬆症を誘導する。  
・尾部懸垂モデル: 1週間非荷重によって、廃用性委縮による急速な骨吸収を誘導する。

#### (4) Rab44, Coronin1C の細胞内解析

Rab44 と Coronin1C が細胞内でどのように局在し発現するかを解析することによって、Rab44 による極性輸送と Coronin1C の破骨細胞における機能を明らかにする。

#### 4. 研究成果

質量分析の結果、Rab44 がアクチン結合タンパク質である Coronin1C と相互作用することを見出した。免疫沈降実験では Coronin1C との結合は Rab44 の野生型と不活性型 (GDP 型) 変異体発現細胞で起こり、Rab44 の活性型 (GTP 型) 変異体発現細胞では起こらないことが明らかになった。これらの知見と一致するように、GTP 型変異体の発現は破骨細胞の分化を抑制し、GDP 型変異体の発現は分化を促進することがわかった (図 1)。Coronin1C ノックダウン実験では、破骨細胞は顕著に多核形成が阻害されていた (図 2)。さらに、Coronin1C ノックダウンにより、RAW-D マクロファージの運動能 (図 3) と遊走能が阻害された。in vivo の実験系でも Coronin1C ノックダウンが破骨細胞形成を抑制することが明らかになった (図 4)。従って、Coronin1C ノックダウン細胞において破骨細胞の細胞形成と融合が減少するのは、マクロファージの運動性が減少したことに起因している可能性が考えられた。以上の結果から、Coronin1C は GDP 特異的 Rab44 エフェクターでありマクロファージの細胞運動を調節することで破骨細胞形成を制御することが明らかになった (引用文献②)。

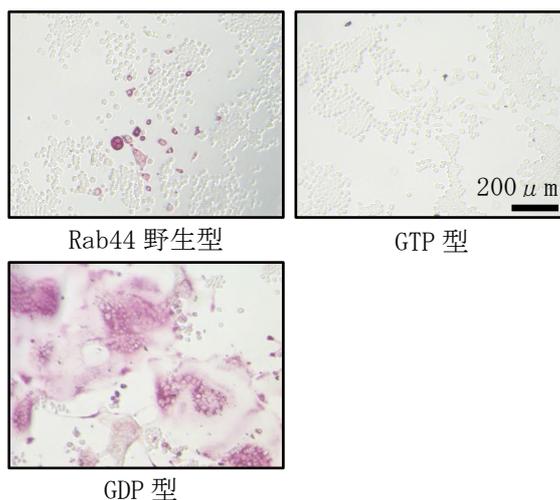


図 1 : Rab44 活性が分化に与える影響

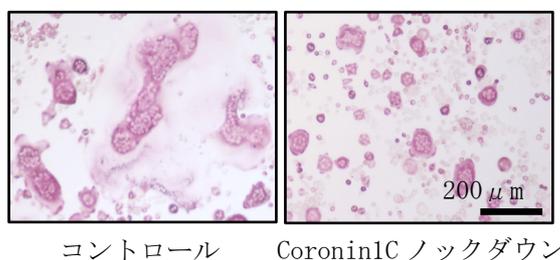


図 2 : Coronin1C ノックダウンによる分化促進

#### <引用文献>

① **Yamaguchi Y**, Sakai E, Okamoto K, Kajiya H, Okabe K, Naito M, Kadowaki T, Tsukuba T.: Rab44, a novel large

Rab GTPase, negatively regulates osteoclast differentiation by modulating intracellular calcium levels followed by NFATc1 activation. *Cell Mol Life Sci.* 75, 33-48 (2018).

② **Yu Yamaguchi**, Tomoko Kadowaki, Nozomi Aibara, Kaname Ohyama, Kuniaki Okamoto, Eiko Sakai, Takayuki Tsukuba, Coronin1C is a GDP-specific Rab44 effector that controls osteoclast formation by regulating cell motility in macrophages, *Int. J. Mol. Sci.*, 23(12) 6619, 2022

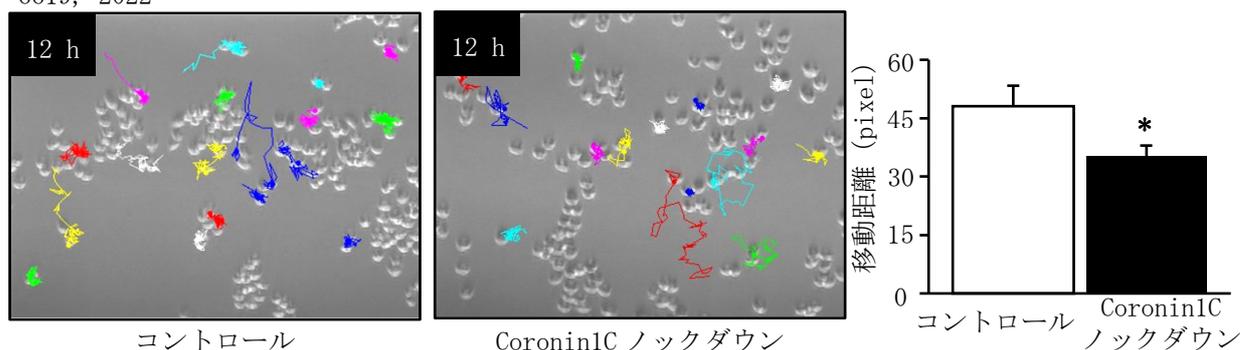


図 3 : Coronin1C ノックダウンによる運動能阻害

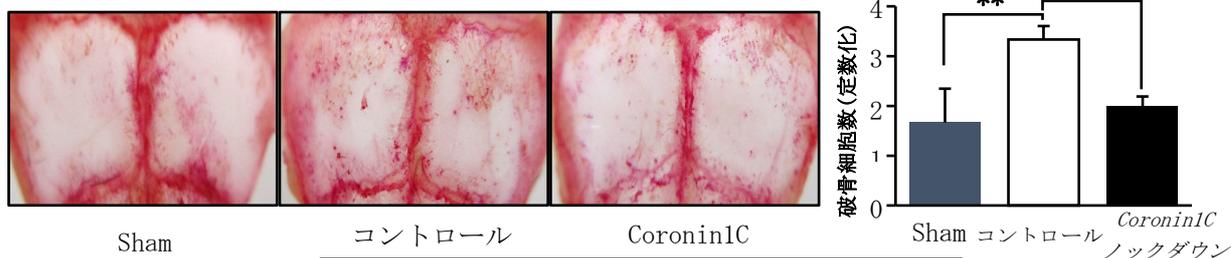


図 4 : in vivo における Coronin1C ノックダウン

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Yu Yamaguchi, Tomoko Kadowaki, Nozomi Aibara, Kaname Ohyama, Kuniaki Okamoto, Eiko Sakai, Takayuki Tsukuba                | 4. 巻<br>23         |
| 2. 論文標題<br>Coronin1C is a GDP-specific Rab44 effector that controls osteoclast formation by regulating cell motility in macrophages | 5. 発行年<br>2022年    |
| 3. 雑誌名<br>Int. J. Mol. Sci.   | 6. 最初と最後の頁<br>6619 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/ijms23126619   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山口優 門脇知子 相原希美 大山要 岡元邦彰 坂井詠子 筑波隆幸                              |
| 2. 発表標題<br>Coronin1CはGDP特異的Rab44エフェクターでありマクロファージの細胞運動を調節することで破骨細胞形成を制御する |
| 3. 学会等名<br>第95回 日本生化学会大会   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|