

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590374

研究課題名(和文) 破骨細胞による骨分解機構の解明ー 骨破壊性疾患の克服に向けて

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanism of osteoclast function

研究代表者

通山 由美 (Tohyama, Yumi)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：70362770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト末梢血単球およびヒト白血病細胞株HL60を分化誘導した破骨細胞モデルを用いて破骨細胞活性化の分子機構の解明に取り組んだ。標的分子として、1)PKC、2)KIF20A、3)Vimentin、4)snRNPタンパク質、SMNの関与について検討した。各分子のshRNAを導入し、ノックダウン型の破骨細胞モデルを作成した。PKCおよびVimentinのノックダウンではF-アクチン再構築の抑制、KIF20AおよびSMNノックダウンでは多核化の亢進が認められた。SMNの場合にはリソソームの輸送に関わる α -チューブリンのアセチル化も亢進しており、破骨細胞活性化プロセスを制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To determine the molecular mechanism of osteoclast activation, human monocytes and human leukemic cell line, HL60 were used after differentiation into osteoclast-like cells. To analyze the role of target molecules on osteoclast function, knocked down cells of PKC-delta, KIF20A, Vimentin, or SMN, were established by lentiviral transfection containing each shRNA. Knockdown of PKC-delta or Vimentin led to decreased podosome (F-actin structure) formation. Knockdown of both KIF20A and SMN increased multinuclear cells resulting from cell to cell fusion. In addition, SMN-knockdown promoted α -tubulin acetylation (K40), which is essential for lysosomal transport, suggesting that SMN is a regulator of osteoclast activation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 健全な骨は、破骨細胞による骨溶解と骨芽細胞による再形成の適切なサイクルにより維持されており、そのバランスの崩れは重篤な疾患や病態をもたらす。とりわけ、骨破壊が亢進した骨粗鬆症や関節リウマチ、がんの骨髄転移は、骨痛や骨折、脊髄圧迫など患者に多大な苦痛と Quality of Life (QOL) の低下を招き、破骨細胞を制御する分子機構の解明が重要である。

(2) 研究代表者はこれまで、マクロファージによる食作用および破骨細胞についての研究に取り組み、ATP が、破骨細胞表面に発現する核酸受容体、P2X₇ を介して、骨分解開始因子としてはたらき、F-アクチンからなる環状の接着帯 (シーリングゾーン) の形成と骨分解酵素を含むリソソームの輸送を協調的におこなうこと、さらにこれらの変化には、微小管を構成する α -チューブリンのアセチル化の制御が重要な役割を果たす事を見いだした。

2. 研究の目的

骨破壊性疾患の本質的治療に繋ぐ分子基盤を確立するため、破骨細胞の活性化と制御の分子メカニズムを明らかにする。具体的には、ATP 刺激による骨分解において、P2X₇ 受容体の下流で、F-アクチンの再構築を誘導するシグナル伝達分子の同定、リソソームの輸送に必須の、微小管構成分子、 α -チューブリンのアセチル化を制御する分子機構の解明、骨分解酵素を含むリソソームが、最終的に放出される際の分子機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト末梢血由来の単球およびヒト白血病細胞株を破骨細胞へと分化誘導し、骨分解の開始刺激として ATP を利用して骨分解過程を *in vitro* に解析した。その際、破骨細胞

の活性化プロセスを、F-アクチンの再構築、即ちドッド状の F-アクチン複合体である podosome の集積による環状の接着帯 (シーリングゾーン) の形成と、リソソームの細胞内輸送とその輸送に関わる微小管のダイナミクス、骨分解酵素の骨表面への放出の 3 段階に分けて解析した。

(2) 標的分子として、セリンスレオニンキナーゼ、PKC、キネシンファミリータンパク質、KIF20A、中間径フィラメントのビメンチン、脊髄性筋萎縮症 (SMA) の原因遺伝子産物である snRNP タンパク質、SMN に注目し、各分子の shRNA を導入してノックダウン型の破骨細胞モデルを作成してその影響を検討した。

4. 研究成果

(1) セリンスレオニンキナーゼ、PKC のノックダウン細胞では、分化により誘導される接着分子、インテグリンの発現に抑制が認められ、podosome の集積が減少した。

(2) KIF20A のノックダウン細胞では、破骨細胞の特徴である多核化が亢進して巨細胞化した。F-アクチンの再構築による podosome の集積、および微小管構成成分、 α -チューブリンのアセチル化については、有意な差異を見出せなかった。

(3) ビメンチンのノックダウンでは、分化により誘導される個々の podosome が小さくなり、その結果、シーリングゾーンの環状形態も不明瞭であった。

(4) SMN ノックダウンでは、細胞融合にともなう多核化、環状の接着帯の形成が亢進しており、活性化型の破骨細胞に近い半球状の構造も多く認められた。リソソームの輸送に関わる微小管構成成分、 α -チューブリンのアセチル化の亢進 (脱アセチル化の遅延) も確認

した。これらの結果より、SMN が F-アクチンの再構築から、リソソームの輸送に至る破骨細胞活性化プロセスを制御している可能性が示唆された。

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7件)

Kawakami T, He J, Morita H, Yokoyama K, Kaji H, Tanaka C, Suemori S, Tohyama K, Tohyama Y: Rab27a is essential for the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in neutrophil-like differentiated HL60 cells PLoS One 9(1):e84704. 2014 DOI: 10.1371/journal.pone.0084704 査読有

Ejlervskov P, Rasmussen I, Nielsen TT, Bergström AL, Tohyama Y, Jensen PH, Vilhardt F: Tubulin Polymerization Promoting Protein (TPPP/p25) promotes unconventional secretion of α -synuclein through exophagy by impairing autophagosome-lysosome fusion. J Biol Chem. 288 (24):17313-35 2013 DOI: 10.1074/jbc.M112.401174 査読有

Tsujioka T, Yokoi A, Kishimoto M, Kuyama A, Suemori S, Tohyama Y, Tohyama K: Effects of DNA methyltransferase inhibitors (DNMTIs) on MDS-derived cell lines. Exp Hematol 41(2):189-97 2013 DOI: 10.1016/j.exphem.2012.10.006 査読有

Tanaka C, Kaji H, He J, Hazama R, Yokoyama K, Kinoshita E, Tsujioka T, Tohyama K, Yamamura H, Nishio H, Tohyama

Y. Rab27b regulates c-kit expression by controlling the secretion of stem cell factor. Biochem Biophys Res Commun. 2012 419 368-73. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.030 査読有

[学会発表](計18件)

加地弘明, 通山薫, 通山由美 マクロファージによる補体介在性 Candida Albicans 貪食における Syk の関与とその役割 第60回日本臨床検査医学会学術集会(神戸, 2013.10.31-11.3)

森田寛之, 朝本茂友, 加地弘明, 通山由美 好中球の補体依存性貪食と NETs 形成における PKC の機能の検討 第86回日本生化学会大会(横浜, 2013.9.11-13)

川上辰三, 森田寛之, 加地弘明, 通山由美 Neutrophil extracellular traps(NETs) 形成における Rab27a の機能の検討 第60回日本生化学会近畿支部例会(大阪大学吹田キャンパス, 2013.5.18)

通山由美, 加地弘明, 通山薫 Rab27a promotes phagosome maturation and neutrophil extracellular traps (NETs) formation 第41回日本免疫学会学術集会(神戸, 2012.12.5-12.7)

川上辰三, 大口千穂, 波多野亜紀, 加地弘明, 通山由美 好中球の Netosis における Syk の機能の検討 第59回日本生化学会近畿支部例会(京都大, 2011.5.19)

田中千都, 通山由美 Rab27b による c-kit の発現調節を介した巨核球分化/成熟のメカニズムの検討 第58回日本生化学会近畿支部例会(関西医科大学, 守

口, 2011.5.21)

Yumi Tohyama, Kunio Yokoyama, Kaoru Tohyama Rab27a negatively regulates phagocytosis during the actin-coating stage in HL60-derived macrophages 第 73 回日本血液学会学術集会 (名古屋国際会議場, 2011.10.16)

加地弘明, 通山薫, 通山由美 マクロファージにより補体受容体を介して貪食されたカンジダ菌の細胞内殺菌メカニズムに関する基礎検討第 58 回日本臨床検査医学会学術集会 (岡山コンベンションセンター, 2011.11.20)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.himeji-du.ac.jp/faculty/dp_pharm/pharm/pt2/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

通山 由美 (TOHYAMA, Yumi)
姫路獨協大学・薬学部・教授
研究者番号: 70362770

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

加地 弘明 (KAJI, Hiroaki)
姫路獨協大学・薬学部・講師
研究者番号: 10368706

田中 千都 (TANAKA, Chisato)
姫路獨協大学・薬学部・助手
研究者番号: 30461122

(平成 23 年度まで連携研究者)

(4) 研究協力者

森田 寛之 (MORITA, Hiroyuki)
姫路獨協大学・薬学部・助手
研究者番号: 90648594

(平成 24 年度から研究協力者)