

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592821

研究課題名(和文)骨代謝における転写因子NFATc1を制御する新規メカニズムの解明

研究課題名(英文) Novel mechanism of regulating the activity of the transcription factor NFATc1 in bone metabolism

研究代表者

山下 照仁 (YAMASHITA, Teruhito)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授

研究者番号：90302893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに我々は、RANKLシグナルによって誘導される破骨細胞分化において、アルクチゲニンがNFATc1の転写機能の活性化を抑制することを見出した。本研究は、これまで知られていた核移行の阻害によるNFATc1の機能抑制とは異なる、新しいNFATc1転写活性の制御機構を明らかにした。骨芽細胞に依存したNFATc1の転写活性にも、カルシニューリンシグナルに依存したNFATc1の転写活性にもアルクチゲニンは阻害的に作用した。リン酸化制御を介してNFATc1をドミナントネガティブ型に変換することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Arctigenin was previously shown to inhibit osteoclastogenesis; however, this inhibitory mechanism has yet to be elucidated. In this study, we showed that arctigenin inhibited the action of NFATc1 by novel mechanism. Arctigenin strongly inhibited RANKL-induced osteoclast formation in mouse bone marrow macrophage (BMM) cultures, in which the calcineurin-dependent NFATc1 pathway was activated. Arctigenin, but not cyclosporin A suppressed osteoclast formation in co-cultures of osteoblastic cells and bone marrow cells, in which the osteoblastic cell-dependent NFATc1 pathway was activated. CHIP analysis confirmed that arctigenin inhibited the recruitment of NFATc1 to the promoter region of the NFATc1 target gene. These results suggest that arctigenin induces a dominant negative species of NFATc1, which inhibits osteoclast differentiation and function by suppressing both calcineurin-dependent and osteoblastic cell-dependent NFATc1 pathways.

研究分野：口腔生化学

キーワード：破骨細胞 転写因子 NFATc1 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症を始めとする骨減少疾患は、破骨細胞の過剰な機能亢進による。骨吸収を抑制する化合物が臨床的にも使われているが、副作用などの点から骨吸収に対し特異性の高い抑制効果を持つ安全性の高い化合物が求められている。これまで我々は、漢方由来成分のスクリーニングにおいて、抗癌作用を持つアルクチゲニンが破骨細胞の分化特に機能を抑制することを見出した。さらに、その標的因子が転写因子NFATc1であることを明らかにした。しかし、その阻害機構は明らかではなかった。

2. 研究の目的

アルクチゲニンの標的因子NFATc1に対する転写活性抑制の機構を生化学的・細胞生物学的な手法で明らかにする。また、NFATc1を必須とする骨芽細胞や免疫系細胞に対する作用との比較を行い、細胞特異性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) NFATc1の転写活性に影響を与える機構の解析

アルクチゲニン処理した破骨細胞からNFATc1を免疫沈降方により精製し、マトリックス支援型質量分析計およびナノ液体クロマトグラフ飛行時間型タンデム質量分析計を用いて、活性制御に必要なリン酸化部位の同定を行った。クロマチン免疫沈降法を用いてNFATc1の標的遺伝子に対する結合能を解析した。同定したリン酸化部位に変異を導入したNFATc1遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて破骨細胞前駆細胞に導入し、アルクチゲニンによる分化阻害、転写活性阻害を回復できるかどうか解析した。

(2) NFATc1が関与する細胞系譜の分化・機能に対するアルクチゲニンの影響の解析

骨芽細胞の分化や骨形成に対するアルクチゲニンの作用を、マーカー遺伝子発現や骨ノジュール形成法で解析した。樹状細胞の分化におけるアルクチゲニンの作用を、フローサイトメータで解析した。T細胞に対するアルクチゲニンの作用を、活性化遺伝子の発現やサイトカインの分泌測定によって解析した。

(3) RANKLが誘導する分化シグナルに対するアルクチゲニンの抑制作用の解析

以下の破骨細胞分化系でサイクロスポリンA(CsA)との抑制作用の比較を行なった。マウス骨髄マクロファージをM-CSFとRANKLで破骨細胞分化を誘導し、TRAP染色によって多核破骨細胞の形成を定量化した。マウス頭蓋冠由来骨芽細胞とマウス骨髄細胞の共存培養を活性型ビタミンDで破

骨細胞分化を誘導し、TRAP染色によって多核破骨細胞の形成を定量化した。

(4) マウスを用いた骨代謝におけるアルクチゲニンの作用の解析

アルクチゲニンの腹腔内投与による骨量変動を、小動物用マイクロCTを用いて骨量の定量、血清カルシウム濃度の測定を行なって調べた。また骨の組織切片を作製してTRAP陽性破骨細胞数の計測を行った。

(5) 骨吸収機能に対するアルクチゲニンの作用機構の解析

細胞骨格に関わる因子の遺伝子発現を定量的RT-PCR法で解析した。細胞骨格因子の細胞内局在を蛍光免疫組織学的に解析した。抗リン酸化抗体を用いて、アルクチゲニン処理における細胞骨格タンパクのリン酸化修飾を解析した。

4. 研究成果

(1) リン酸化部位の同定を試みた結果、NFATc1のDNA結合領域に新規リン酸化部位の候補をいくつか同定することが出来た。

RANKL刺激によってNFATc1はOSCARのプロモータ領域に結合したが、アルクチゲニンの存在下では結合が見られなかった(図1)。9種類のリン酸化修飾模倣型NFATc1を作成し、レトロウイルス遺伝子導入法を用いて破骨細胞前駆細胞に発現させ、破骨細胞分化を検討した。いずれの変異型NFATc1も、アルクチゲニンによる分化抑制を回復することができなかった。また、恒常活性型NFATc1も、アルクチゲニンによる抑制を解除することができなかった。以上の結果から、NFATc1は高度にリン酸化修飾されている為、1箇所ごとにリン酸化を修飾しても抑制効果から回復させるのは困難であることが明らかとなった。

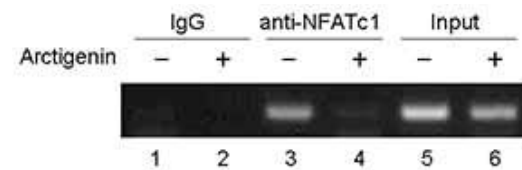


図1: OSCARプロモータ領域への結合

(2) 骨芽細胞の*Alpl*、*Bglap*、*Runx2*、*Osterix*などの骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現は、アルクチゲニン添加によって変動しなかった。高濃度のアルクチゲニン存在下であっても、骨芽細胞増殖を抑制することは無かった。さらに、活性型ビタミンD添加による*Rankl*や*Opg*など破骨細胞支持に関連する発現にも影響を与えないことが判った(図2)。IL-4/GM-CSFで分化誘導した樹状細胞に対して、アルクチゲニンはCD80/CD86の成熟マーカーの発現に影響を

与えなかった(図3)。脾臓由来のT細胞前駆細胞を用いてNFATc1のリン酸化状態や標的遺伝子の発現を検討した。イオノマイシンおよびTPA刺激によるT細胞分化はアルクチゲニンによって阻害されなかった。また、NFATc1のリン酸化状態には差がなかった。さらに、活性化T細胞の指標であり、NFATc1の標的である*IL-2*や*GM-CSF*などの遺伝子発現は、アルクチゲニンによって抑制されなかった(図4)。以上より、アルクチゲニンによるNFATc1の転写活性抑制は破骨細胞系譜に特異的に観察される現象であることが示唆された。

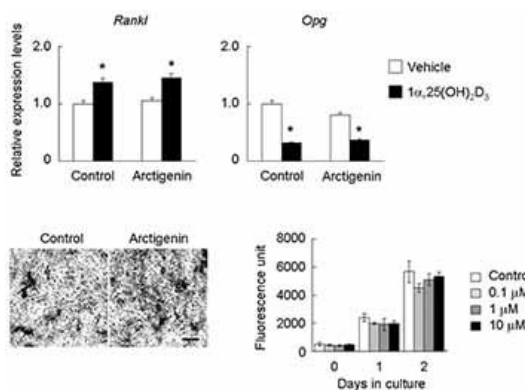


図2：骨芽細胞への影響

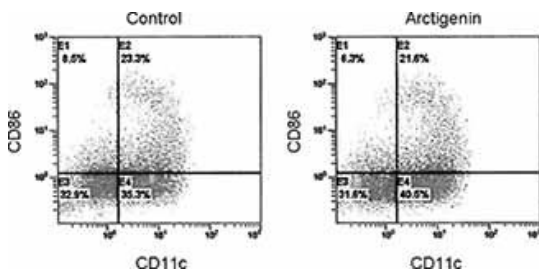


図3：樹状細胞分化への影響

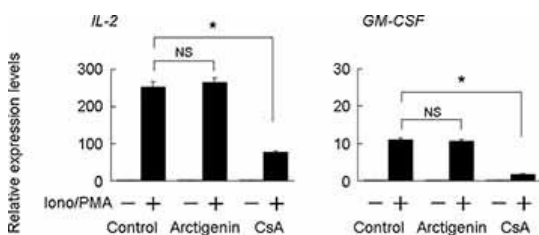


図4：T細胞分化への影響

(3) RANKL添加で誘導される骨髄マクロファージからの破骨細胞分化は、アルクチゲニンもCsAいずれも強く抑制した(図5)。

骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養における破骨細胞分化に対しては、CsAは抑制をしなかったが、アルクチゲニンは強く抑制していた(図6)。以上から、NFATc1の制御において、カルシニユリン依存的な経路と、骨芽細胞を介するカルシニユリン非依存的経路の両者を、アルクチゲニンは抑制することが明らかとなった。アルクチゲニンはNFATc1の

核移行を促進することから、アルクチゲニンの作用によってドミナントネガティブ型のNFATc1が誘導されていることが示唆された。

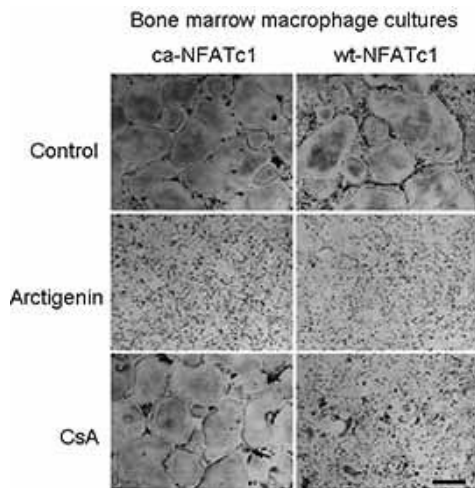


図5：骨髄マクロファージ系における破骨細胞分化への作用

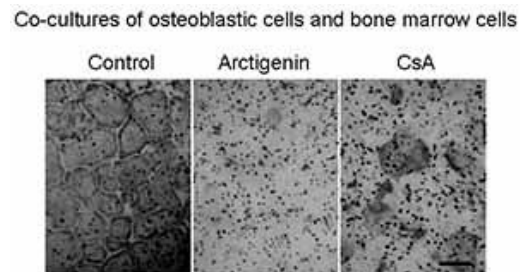


図6：共存培養系における破骨細胞分化への影響

(4) 低カルシウム食で誘導される骨吸収モデルを用いてアルクチゲニンの骨減少抑制作用を解析した。その結果、血清カルシウム値の亢進はアルクチゲニン投与群においても観察された。*In vivo*での作用は、*in vitro*に較べると弱いようであった。

(5) 細胞骨格に関わる*Pyk2*、*Src*、*Cbl*、*FAK*、*3-integrin*などの遺伝子発現はアルクチゲニン添加で変動しなかった。アルクチゲニン添加した破骨細胞ではアクチンリングが存在し、*Src*はアクチンリングに局在していた。ウェスタン解析の結果、*Src*のTyr416およびTyr527のリン酸化状態に差がなかった。以上より、アルクチゲニンによる細胞骨格系への影響はないことが示唆された。

以上の研究成果から、核移行の阻害によるNFATc1の機能抑制とは異なる、NFATc1の転写活性の制御機構が存在することを明らかにした。NFATc1の核移行促進やNFATc1のリン酸化状態の違いから、ドミナントネガティブ型のNFATc1の生成がアルクチゲニン処理による抑制作用の原因であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Yamashita T, Uehara S, Udagawa N, Li F, Kadota S, Esumi H, Kobayashi Y and Takahashi N, Arctigenin Inhibits Osteoclast Differentiation and Function by Suppressing Both Calcineurin-Dependent and Osteoblastic Cell-Dependent NFATc1 Pathways. PLoS ONE 2014, Vol. 9, pp. e85878, DOI: 10.1371/journal.pone.0085878, 査読有

Okamoto M, Udagawa N, Uehara S, Maeda K, Yamashita T, Nakamichi Y, Kato H, Saito N, Minami Y, Takahashi N, and Kobayashi Y, Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/-catenin signaling during osteoblastogenesis. Scientific Reports 2014, Vol. 4, pp. 4493, DOI: 10.1038/srep04493, 査読有

Yamashita T, Takahashi N, and Udagawa N, World Journal of Orthopedics 2012, Vol. 3, pp. 175-181, DOI: 10.5312/wjo.v3.i11.175, 査読有

[学会発表](計4件)

山下照仁, 小林泰浩, 上原俊介, 宇田川信之, 李峰, 門田重利, 江角浩安, 高橋直之, アルクチゲニンの破骨細胞分化抑制メカニズム, 第56回歯科基礎医学会学術大会総会 2014年9月26日 福岡国際会議場(福岡市)

Yamashita T, Uehara S, Udagawa N, Li F, Kadota S, Esumi H, Kobayashi Y, and Takahashi N, Arctigenin Inhibits Osteoclastogenesis by Suppressing Both Calcineurin-Dependent and Osteoblastic Cell-Dependent NFATc1 Pathways, ASBMR 2014 Annual Meeting 2014年09月13日 George R. Brown Convention Center (Houston, USA)

山下照仁, 小林泰浩, 上原俊介, 宇田川信之, 李峰, 門田重利, 江角浩安, 高橋直之, 抗炎症作用を持つアルクチゲニンの破骨細胞抑制メカニズム, 第1回日本骨免疫会議 2014年7月4日 万国津梁館(名護市)

Yamashita T, Uehara S, Udagawa N, Kobayashi Y, and Takahashi N, Arctigenin Inhibits Transcriptional Activity of NFATc1 by Its Nuclear Translocation-Independent Mechanism, 国際骨代謝学会および日本骨代謝学会 2013年5月29日 ポートピアホテル(神戸市)

[その他]

松本歯科大学総合歯科医学研究所ホームページ
http://www.mdu.ac.jp/laboratory/research_contents/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 照仁 (YAMASHITA, Teruhito)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授
研究者番号: 90302893

(2)研究分担者

二宮 禎 (NINOMIYA, Tadashi)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号: 00360222

高橋 直之 (TAKAHASHI, Naoyuki)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号: 90119222

(3)研究協力者

門田 重利 (KADOTA, Shigetoshi)
菊池 孝信 (KIKUCHI, Takanobu)