

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592823

研究課題名(和文)ファルネシル2リン酸合成酵素による破骨細胞Cl分泌輸送体CIC7調節機序の解明

研究課題名(英文)A novel regulation of farnesyl diphosphate synthase (FDPS) on the activity of Cl⁻ extrusion in osteoclasts

研究代表者

鍛冶屋 浩(Kajiya, Hiroshi)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80177378

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)：ビスホスホネート製剤の阻害分子のファルネシル2リン酸合成酵素(Fdps)の破骨細胞の発現及びその調節機序に関し検討した。さらに、FDPSを過剰発現する(FDPS^{tg})マウスを作成し、脛骨の骨形態解析を行った。破骨細胞前駆細胞にFDPSは発現し、成熟破骨細胞のCIC-7と会合し共同在した。細胞外液酸性によりCIC-7由来のCl⁻電流が活性化され、同時に細胞内Cl⁻濃度が減少した。FDPS阻害剤のゾレドロン酸はこのCl⁻電流と細胞内Cl⁻濃度の減少を抑制した。FDPS^{tg}マウスでは、野生型に比較し、脛骨骨密度が減少し、FDPS^{tg}マウスの破骨細胞は酸活性化Cl⁻電流の増大が認められた。

研究成果の概要(英文)：Farnesyl diphosphate synthase (FDPS) have well known to be inhibited by nitrogen-containing bisphosphonates, leading to suppression of bone resorption in mature osteoclasts. However, little is known whether FDPS regulate directly the extrusion activity of CIC-7 Cl⁻ transporters (CIC7) in mature osteoclasts. FDPS was associated and colocalized with CIC7 in mouse osteoclasts and HEK cells coexpressing FDPS and CIC7. Extracellular acidification induced outwardly rectifying Cl⁻ currents (acid-induced Cl⁻ currents) and decreased intracellular Cl⁻ concentration ([Cl⁻]_i) associated with CIC7 in osteoclasts. Zoledronic acid, FDPS inhibitors suppressed the acid-induced Cl⁻ currents and [Cl⁻]_i reduction. In transgenic mice overexpressing with FDPS (FDPS Tg-mice), bone mineral density significantly decreased with elevation of the bone resorption parameters. The results suggest that FDPS may contribute to regulate the bone resorption activity, especially the CIC7 activity in mature osteoclasts.

研究分野：歯学・機能系基礎歯学

キーワード：骨代謝 破骨細胞 酸分泌輸送体 ビスホスホネート製剤

1. 研究開始当初の背景

窒素含有ビスホスホネート製剤(NBPs)は、破骨細胞の骨吸収能を直接的に抑制する優れた骨粗鬆症治療薬である。この抑制機序についてはメバロン酸・コレステロール代謝経路におけるファルネシル2リン酸合成酵素(FDPS)の阻害が主なる作用点であることが報告されている。FDPSはメバロン酸代謝系においてゲラニル2リン酸やファルネシル2リン酸を生成し、RhoやRasなどの低分子GTP結合タンパク質をプレニル化する翻訳後修飾酵素の1つである。このプレニル化修飾されたタンパク質が細胞膜へ局在し、破骨細胞の骨吸収時の細胞骨格が形成され、NBPsはこの形態の形成を抑制し骨吸収が最終的に抑制されると考えられている。しかしながら、FDPSと骨ミネラルの溶解を担う酸分泌輸送体の関係については明らかでない。我々はイーストツーハイブリッド法解析によりFDPSが破骨細胞の酸分泌輸送体を構成するCIC7型Cl輸送体(CIC-7)の細胞質ドメインに結合することを明らかにした。

2. 研究の目的

窒素含有ビスホスホネート製剤(NBPs)は、メバロン酸経路のファルネシル2リン酸合成酵素(FDPS)の阻害により破骨細胞の骨吸収能を抑制する骨粗鬆症治療薬である。このFDPSは低分子GTP結合タンパク質をプレニル化する酵素で、この修飾タンパク質により骨吸収時の細胞骨格が形成され、NBPsはこの吸収形態を抑制すると考えられている。しかしながら、FDPSと骨ミネラルの溶解を担う酸分泌輸送体の関係については明らかでない。そこで、破骨細胞におけるFDPSの発現、局在及びCl分泌の調節機序について、野生型

(WT)及び破骨細胞特異的なトランスジェニックマウス(FDPS^{tg})作製して検討した。

3. 研究の方法

(1)ファルネシル2リン酸合成酵素(FDPS)の破骨細胞の形成時の発現と局在についてPCR法、Western blot法、免疫沈降法及び免疫染色法により検討した。

(2)パッチクランプ法と蛍光測光法によりFDPSによるCl分泌能調節能を評価した。

(3)破骨細胞特異的にFDPSが発現するトランスジェニックマウス(Tg-FDPS)を作成し、野生型(WT)とTg-FDPSマウスの脛骨を用い、micro-CT法と骨形態解析法を行った。

4. 研究の成果

まず、イーストツーハイブリッド法によりCIC7型Cl輸送体(Clc7)の細胞内N末端をベイトとして会合する分子を網羅的に解析したところメバロン酸系分子の1つであるFarnesyl diphosphate synthetase (FDPS)が会合することが明らかになった。次に野生型(WT)マウス由来の骨髄マクロファージとRAW264.7細胞の破骨細胞前駆細胞における発現を半定量性及びリアルタイムRT-PCR法、ウェスタンブロッティング法、及び免疫染色法で検討したところ、破骨細胞前駆細胞においてmRNAとタンパク質共にFDPSは発現し、分化に伴いわずかに発現が増加した(図1)。

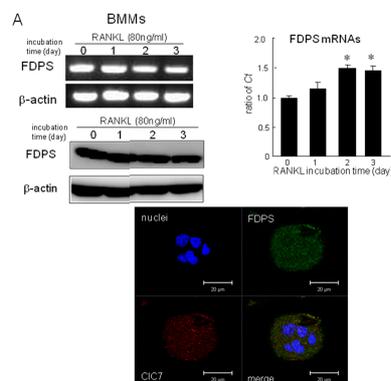


図1 破骨細胞分化・形成におけるファルネシル2リン酸合成酵素(FDPS)の発現と局在

さらに、FDPS と Cln7 を HEK293 細胞に過剰共発現させた場合に会合し、さらに骨髄由来の破骨細胞自身でも会合し、共同在していた(図2)。

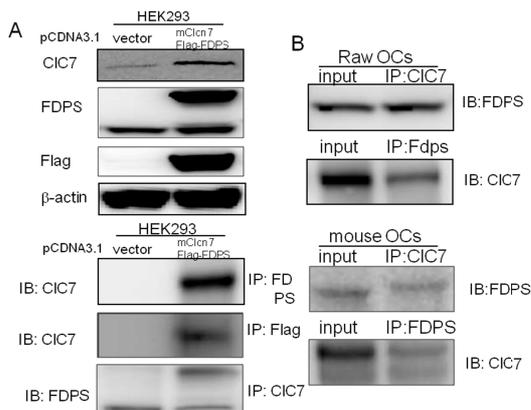


図2 過剰発現細胞と破骨細胞におけるFDPSとCIC7の会合作用

パッチクランプ法を用い破骨細胞の細胞外液を酸性にすると、CIC-7 に由来する外向き整流性 Cl⁻電流が活性化された。さらに、蛍光測光法により細胞内 Cl⁻イオン濃度を検討したところ細胞外酸性化は細胞内 Cl⁻濃度を同時に減少させ、酸性環境下は細胞外への Cl⁻分泌が増加すると考えられた。一方、FDPS 阻害剤であるビスホスホネート製剤ゾレドロン酸とアレンドロン酸はこの酸活性化 Cl⁻電流と細胞内 Cl⁻濃度の減少を濃度依存性に抑制した(図3)。

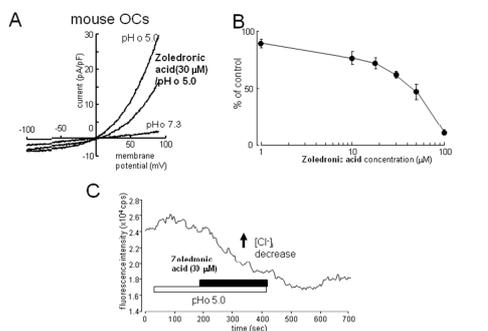


図3 外液酸性化により誘発される Cl⁻電流及び細胞内 Cl⁻イオン濃度減少と FDPS阻害剤ゾレドロン酸による抑制

これらのゾレドロン酸による Cl⁻分泌能の抑制は

メパロン酸代謝物のゲラニルゲラニル酸により部分的に回復した。

Micro-CT 法及び骨形態計測法を用いて WT と破骨細胞特異的 FDPS を過剰発現した(Tg-FDPS)マウスの脛骨形態を検討したところ、WT マウスと比較して、Tg-FDPS マウスの脛骨骨密度が有意に減少した(図4)。

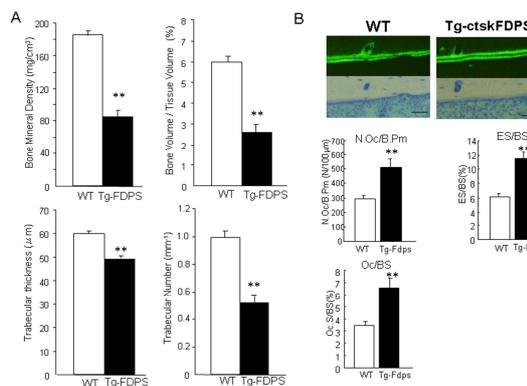


図4 破骨細胞特異的なFDPS過剰発現(Tg-FDPS)マウスの脛骨の形態的特徴

この場合、破骨細胞数の増加を含めた骨吸収パラメーターは増加したが、骨形成パラメーターに変化はなかった。さらに、Tg-FDPS マウス由来の破骨細胞は酸活性化 Cl⁻電流の増大が認められた(図5)。

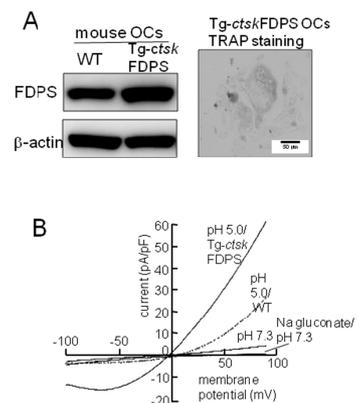


図5 Tg-FDPSマウス由来の破骨細胞の Cl⁻電流の増強作用

以上の結果より、ファルネシル 2 リン酸合成酵素(FDPS)は破骨細胞の CIC-7 型輸送体に結合して

Cl⁻分泌能を活性化していると考えられた。さらに、窒素含有ビスホスホネート製剤(NBPs)による骨吸収抑制作用にこの Cl⁻分泌能の活性化抑制も関与すると考えられた。

5 . 主な発表論文等

雑誌論文

1. Mevalonates Restore Zoledronic Acid-induced Osteoclastogenesis Inhibition. Nagaoka Y, Kajiya H*, Ozeki S, Ikebe T, Okabe K. *J Dent Res.* 2015; 94:594-601. doi: 10.1177/0022034514564187.
2. Reactive oxygen species promotes cellular senescence in normal human epidermal keratinocytes through epigenetic regulation of p16(INK4a.). Sasaki M, Kajiya H*, Ozeki S, Okabe K., Ikebe T. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;452:622-628. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.123.
3. The potential role of transient receptor potential type A1 as a mechanoreceptor in human periodontal ligament cells. Tsutsumi T, Kajiya H*, Fukawa T, Sasaki M, Nemoto T, Tsuzuki T, Takahashi Y, Fujii S, Maeda H, Okabe K. *Eur J Oral Sci.* 2013;121:538-544. doi: 10.1111/eos.12083.
4. A novel inhibitory mechanism of nitrogen-containing bisphosphonate on the activity of Cl⁻ extrusion in osteoclasts. Ohgi K, Kajiya H*, Okamoto F., Nagaoka Y, Onitsuka T, Nagai A, Sakagami R, Okabe K.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.

2013;386:589-598. doi:

10.1007/s00210-013-0857-0.

5. Hyperocclusion up-regulates CCL3 expression in CCL2- and CCR2-deficient mice.

Tsutsumi T, Kajiya H*, Goto KT, Takahashi Y,

Okabe K. *J Dent Res.* 2013;92:65-70. doi:

10.1177/0022034512467803.

1. 破骨細胞イオン輸送体を介した分化・吸収過程の調節. 鍛冶屋 浩 第3回口腔神経科学研究会(招待講演) 2015年2月14日(東京)
2. ビスホスホネート製剤による破骨細胞酸分泌輸送体の新しい調節機序. 鍛冶屋 浩 生体制御・創薬研究ワークショップ(招待講演) 2014年3月15日(鹿児島)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鍛冶屋 浩(KAJIYA HIROSHI)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：80177373

(2)研究分担者

岡本富士雄(OKAMOTO FUJIO)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：60153938

岡部幸司(OKABE KOJI)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：80224026