

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792059

研究課題名(和文) 骨芽細胞のメカノセンサーを介した JNK・p38 グナルによる骨免疫制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the role of mechanosensor-mediated JNK/p38 signaling in osteoimmunological regulation of osteoblasts

研究代表者

松井 裕之 (Matsui, Hiroyuki)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：10547277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メカニカルストレスにより活性化される骨芽細胞の JNK および p38 シグナル伝達経路の機能解析を行った。細胞伸展に伴い誘発される細胞外カルシウムの流入に伴い活性化される ASK1 は JNK および p38 を活性化した。ASK1-JNK 経路は TNF 受容体ファミリーのひとつ Fn14 の発現を誘導していた。一方、ASK1-p38 経路はケモカインのひとつ MCP-3 の発現を誘導した。Fn14 は骨芽細胞のアポトーシスに寄与する一方、MCP-3 は前駆破骨細胞の局所遊走を促進した。これらのことから、ASK1-JNK/p38 経路は過剰力による骨吸収の機構に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we report that large-magnitude (12%) cyclic stretch induced Ca²⁺ influx in MC3T3-E1 osteoblasts, which subsequently activated ASK1 MAP3K. The activated ASK1-JNK lead to transiently enhanced expression of FGF-inducible 14 (Fn14, a member of the TNF receptor superfamily) gene. Cells with enhanced expression of Fn14 subsequently acquired sensitivity to the ligand of Fn14, TNF-related weak inducer of apoptosis, and underwent apoptosis. On the other hand, ASK1-p38 pathway induced expression of monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3) gene, which promoted chemotaxis of pre-osteoclasts. These results suggest that ASK1-JNK/p38 pathways contribute to the mechanism of mechanical overloading-induced bone resorption via cytokine-related gene expression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：メカノバイオロジー 骨代謝 JNK p38

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、骨芽細胞に対する反復伸展刺激により、TGF-beta-activated protein kinase 1 (TAK1) MAP3K が活性化され、この下流において JNK, p38, NF-kB を介して interleukin-6 (IL-6) が産生されることを示した。一方、TAK1 の他に apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) が活性化されることを見出していたが、その機能については未解明のままであった。これらストレス応答 MAP キナーゼ経路は病原関連分子パターンやサイトカインのみならず、熱性ショックや浸透圧などの物理化学的な刺激によっても活性化される。その下流においては炎症反応やアポトーシスなどの生物学的反応に関わることが知られているが、骨メカノバイオロジーにおける役割は不明であった。

2. 研究の目的

骨芽細胞伸展刺激の系を用いて、以下の項目の解明を目的とした。

(1) JNK/p38 の下流における遺伝子発現の網羅的解析

(2) 前項にて同定した分子の機能解析および細胞生物学的アウトプットの解析

3. 研究の方法

MC3T3-E1 骨芽細胞は理研より入手し、通常に則り培養を行った。メカニカルストレスを負荷する系は Strex 社製 ST-140 を使用した。シリコンゴム製伸展チャンパーにブタ由来タイプ I 型コラーゲンを処理したのち、骨芽細胞の培養を行った。

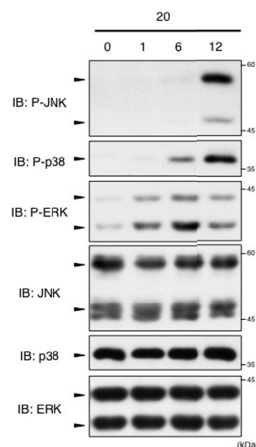
(1) タンパクの検出は主にウエスタンブロット法により行った。細胞は Lysis buffer (20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 250 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 2 mM EGTA, 12.5 mM β -glycerophosphate, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 10 μ g/ml leupeptin) により可溶化し、遠心にてデブリスを除去した後 SDS-PAGE に供した。検出に使用した抗体は以下の通りである。phospho-JNK, phospho-p38, phospho-ERK, JNK2, p38, ERK, phospho-MKK3/6, phospho-MKK4, MKK6, phospho-TAK1 (P-Thr187), Fn14, active caspase-3, actin および FLAG は Cell Signaling Technology より購入した。Phospho-ASK1 antibody は東京大学薬学研究科・一條秀憲教授より供与された。MKK4 (554105) および caspase-3 (611048) は BD Bioscience より購入した。TAK1 (N579) and TWEAK (S-20) は Santa Cruz Biotechnology より購入した。JNK (06-749) および ASK1 (C2) antibodies は Upstate Biotechnology および Anaspec よりそれぞれ購入した。MCP-3 (AF-456-NA) は R&D systems より購入した。

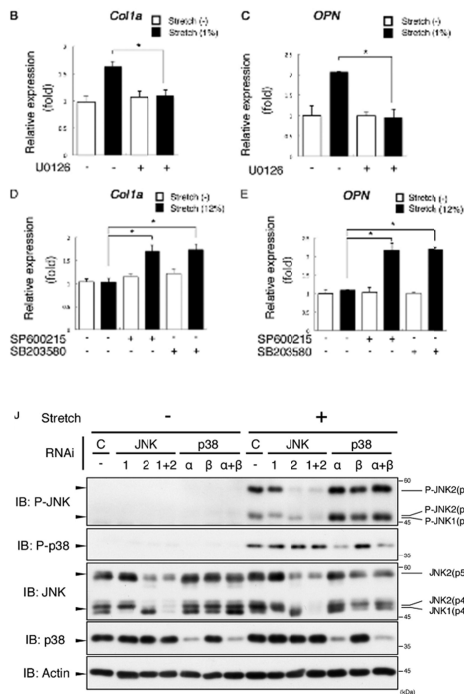
SP600215, SB203580 および U126 は Calbiochem より購入した。CHX および MG132 はシグマより購入した。RNA 干渉実験に用いた siRNA (mouse JNK1 : MSS218561, JNK2 : MSS218565, p38 α : MSS240943, p38 β : MSS207968, ASK1 #1; MSS218536 and #2; MSS218535, TWEAK #1; NM_011614_stealth_501 and #2; NM_011614_stealth_722, and Stealth RNAi Negative Control は Invitrogen より購入した。siRNA の導入には Lipofectamine RNAiMAX (1 μ l/ chamber) を用いてトランスフェクションし、7 2 時間後に反復伸展刺激を行った。

下流での遺伝子発現解析はマイクロアレイを行い、リアルタイム PCR により解析を行った。検出に用いたプライマーは以下の通りである。mouse Col1a (5'-CACCCTCAAGAGCCTGAGTC -3' および 5'-GCTTCTTTTCCTTGGGGTTC -3'), mouse Fn14 (5'-CGACAAGTGCATGGACTGCG -3' および 5'-CCAGGACCAGACTAAGAGCGC -3'), mouse GAPDH (5'-GCACAGTCAAGGCCGAGAATGG -3' および 5'-GGTGAAGACACCAGTAGAC -3'), mouse MCP-3 (5'-CATCCACATGCTGCTGCTATGTC -3' および 5'-CCACTTCTGATGGGCTTCAG -3'), mouse OPN (5'-TACGACCATGAGATTGGCAGTGA -3' および 5'-TATAGGATCTGGGTGCAGGCTGTAA -3')

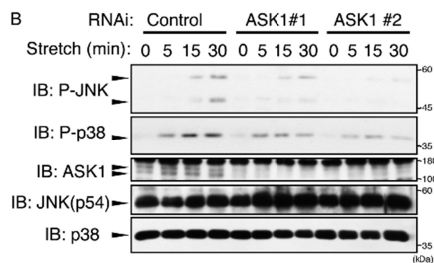
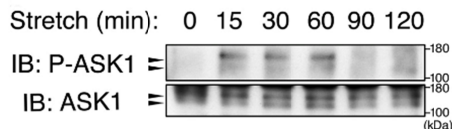
4. 研究成果

JNK, p38 および ERK の活性化に必要な伸展強度の検討を行ったところ、ERK は 1% で十分であったのに対し、p38 は 6% 以上、JNK は 12% の伸展を要した。1% 伸展における ERK の活性は Col1a および OPN の発現上昇に寄与していたが、12% 伸展時における JNK および p38 の活性化はこれを抑制していた。また、このとき活性化されている JNK および p38 のメインアイソフォームは JNK1 (p46), JNK2 (p46, p54), p38 であることが分かった。

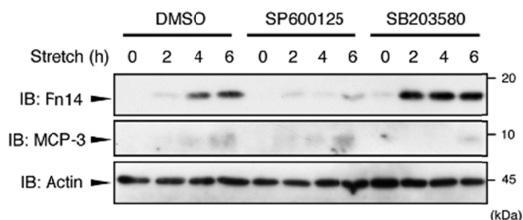




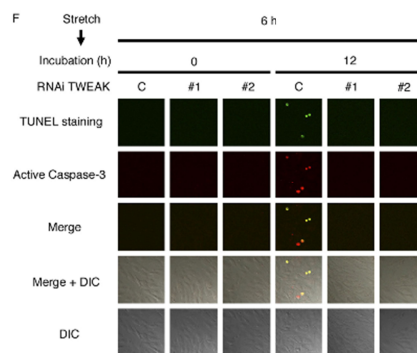
また，上流の MAP3K として ASK1 の活性化を見出した。ASK1 は JNK および p38 両者を活性化していることが明らかになった。



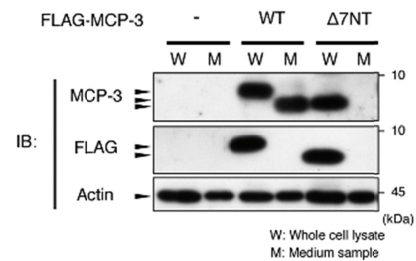
JNK および p38 の活性化の下流で制御される遺伝子発現の解析を行ったところ，TNF 受容体ファミリーの一員である Fn14 および MCP-3 を同定した。Fn14 は JNK 依存的に，MCP-3 は p38 依存的な発現制御を受けていた。



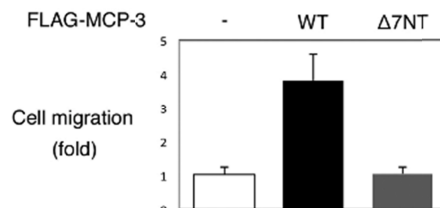
Fn14 はそのリガンドであり TNFsf12 にコードされる TWEAK 依存的に骨芽細胞にアポトーシスを誘導していた。



一方，MCP-3 は N 末端のシグナルペプチドに含まれる最初の 7 文字に依存して分泌されることが分かった。さらに，全長のタンパクが細胞外からのみ，かつ切断型のタンパクが細胞外にのみ検出されることから，このときの切断様式は C 末端側を細胞膜上で細胞外に切り出すシェディングであることが明らかになった。



また，野生型を発現した際の培養上清のみが前駆破骨細胞の遊走を促進したことから，MCP-3 の機能発現には N 末端の 7 ペプチドが必要であることが明らかになった。



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 4 件)

Matsui H., Fukuno N., Kanda Y., Kantoh Y., Chida T., Nagaura Y., Suzuki O., Nishitoh H., Takeda K., Ichijo H., Sawada Y., Sasaki K., Kobayashi T., and Tamura S. The expression of Fn14 via mechanical stress-activated JNK contributes to apoptosis induction in osteoblasts. *J.Biol.Chem.* 2014, 289:6438-6450 査読有

Shinoda Y, Fujita K, Saito S, Matsui H, Kanto Y, Nagaura Y, Fukunaga K, Tamura S, Kobayashi T. Acyl-CoA binding domain

containing 3 (ACBD3) recruits the protein phosphatase PPM1L to ER-Golgi membrane contact sites. FEBS Letters 2012, 586(19):3024-9 査読有

Matsui H, Harada I and Sawada Y. Src, p130Cas, and Mechanotransduction in Cancer Cells. Genes and Cancer 2012, 3(5-6), 394-401 査読有

「松井裕之、原田伊知郎、石島旨章、澤田泰宏 メカニカルストレスと変形性関節症 CLINICAL CALCIUM 2012, Vol.22 No.12 1855-1862 査読有 doi: CliCa121218551862

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

編集 山本 雅、仙波憲太郎、山梨裕司 著者 松井裕之 他イラストで徹底理解するシグナル伝達キーワード事典 羊土社, 2012

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 裕之 (Matsui Hiroyuki)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：10547277