

機関番号：32409

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890214

研究課題名(和文) Src-p130Cas axisによる破骨細胞の機能発現機構の解明

研究課題名(英文) The role of Src-p130Cas axis in osteoclastic bone resorption

研究代表者

大澤 賢次 (Osawa, Kenji)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：70638238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞特異的p130Cas遺伝子欠損マウスでは破骨細胞は増加するが骨量は顕著に増加し、大理石骨病様の表現型を呈していた。同マウス由来破骨細胞はアクチンリングを持つTRAP陽性の破骨細胞の割合が著明に減少し、吸収窩の形成が抑制されていた。また、アクチン重合に関わるRac1活性の減少や、関連分子の細胞内局在の変化、Rac1の活性調節因子Dock5のc-Src、Pyk2との会合の喪失が生じていることが確認された。

以上の結果からp130Casはc-Src、Pyk2さらにDock5と複合体を形成し、Rac1-Arp3シグナルを活性化させることにより破骨細胞の骨吸収能を制御していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Osteoclast-specific p130Cas conditional knockout mice (p130Cas cKO) exhibit a high bone mass phenotype caused by defect in multinucleation and cytoskeleton organization causing bone resorption deficiency. Bone marrow cells from p130Cas cKO were able to differentiate into osteoclasts and wild-type cells in vitro. However, osteoclasts from p130Cas cKO failed to form actin rings and resorb pits on dentine slices. Although the initial events of osteoclast attachment were intact, the Rac1 activity that organizes the actin cytoskeleton was reduced, and its distribution was disrupted in p130Cas cKO osteoclasts. Dedicator of cytokinesis 5 (Dock5), a Rho family guanine nucleotide exchanger, failed to associate with Src or Pyk2 in osteoclasts in the absence of p130Cas. These results strongly indicate that p130Cas plays pivotal roles in osteoclastic bone resorption.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨代謝 骨吸収 破骨細胞 細胞内情報伝達 p130Cas c-Src Integrin

## 1. 研究開始当初の背景

平成 17 年度厚生労働省歯科疾患実態調査によると、我が国では 45 歳以上の 40%以上が進行した歯周病に罹患している。歯周病は破骨細胞による骨吸収の亢進が原因であることから、歯周病治療を成功させるには骨吸収を制御することが重要であり、破骨細胞は治療の重要なターゲットである。

破骨細胞による骨吸収を制御するためには破骨細胞の分化を抑制し、破骨細胞の数を減らす方法と破骨細胞の骨吸収能を抑制する方法の 2 つのアプローチが考えられる。破骨細胞の分化はマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)と Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL)によって制御されることが知られている。これまで報告されている大理石骨病の表現型を呈する遺伝子欠損マウスのほとんどが、破骨細胞分化障害に起因するものであった。これに対して、破骨細胞の骨吸収能を制御する分子には未だ不明な点が多い。

c-Src 遺伝子欠損マウスは、破骨細胞が存在するにもかかわらず、骨吸収が出来ないことによる大理石骨病を呈する(Soriano et al. Cell 1991)。このことは破骨細胞が骨吸収を行う際に c-Src が重要な役割を担っていることを示唆する。

p130Cas は細胞接着時の細胞骨格形成に重要であり(Sawada et al. Cell 2006)、インテグリンシグナルによって活性化された c-Src の基質となる分子で、破骨細胞による骨吸収に重要であることが報告されている(Nakamura et al. J Biol Chem 1998)が、p130Cas 遺伝子欠損マウスは胎生致死のため、個体レベルでの骨における p130Cas の役割は明らかにならなかった。

## 2. 研究の目的

細胞接着時の細胞骨格形成に重要な因子である p130Cas は、破骨細胞の骨吸収に必須の分子 c-Src の下流で働くことによって破骨細胞の骨吸収能を制御すると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは不明である。そこで本研究では破骨細胞の骨吸収における Src-p130Cas axis の役割について個体レベルで検証し、分子レベルで解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) p130Cas flox マウスと破骨細胞の分化マーカーであるカテプシン K プロモーター誘導性に組み換え酵素 Cre を発現するマウスとを交配することにより、破骨細胞特異的 p130Cas 遺伝子欠損マウス(p130Cas cKO)を作製し、軟 X 線撮影、 $\mu$ CT 撮影、骨形態計測、組織学的解析による表現型の解析を行った。また電子顕微鏡を用いて破骨細胞が骨吸収を行う際に重要な波状縁の形成を観察した。

(2) p130Cas cKO マウス骨髄細胞から M-CSF

および RANKL 刺激、もしくは活性型ビタミン D3 存在化での骨芽細胞との共培養により破骨細胞を分化誘導し、骨吸収能について、TRAP 染色、ファロイジン染色を行い検討した。さらに、c-Src-p130Cas のシグナル伝達についてウエスタンブロッティング法を用いて検討を行った。

(3) p130Cas cKO 由来破骨細胞を用いて、アクチン重合に関わる Rac1, Dock5, Arp3 等の蛍光免疫染色を行い、各分子の細胞内局在について野生型との比較・検討を行った。また、各分子のタンパク相互作用について免疫沈降ウエスタンブロッティング法を用いて検討した。

(4) p130Cas cKO 由来破骨細胞に対して、野生型 Cas、およびドミナントネガティブ型 Cas の遺伝子導入を行い、骨吸収能におよぼす変化について TRAP 染色、ファロイジン染色を行い検討した。また、細胞骨格関連分子のタンパク相互作用の変化について免疫沈降ウエスタンブロッティング法を用いて検討した。

## 4. 研究成果

まず p130Cas cKO および同腹の野生型マウスの顎骨及び大腿骨を摘出し、軟 X 線撮影および  $\mu$ CT 撮影を行った。p130Cas cKO では野生型と比較して骨幹端部で著明な X 線不透過像を認め、骨密度も有意な高値を示した。組織標本作製し、ヘマトキシリンエオジン染色および TRAP 染色にて検討したところ、p130Cas cKO マウスでは破骨細胞数はむしろ増加していた。また電子顕微鏡像では、p130Cas cKO での破骨細胞における波状縁の形成は認められなかった。以上の結果が性差や週令にかかわらず認められたことから、p130Cas cKO マウスは骨吸収機能の障害による大理石骨病様の表現型を呈していると考えられた。

次に p130Cas cKO 由来骨髄細胞から破骨細胞を誘導し p130Cas 抗体を用いて p130Cas の発現を確認したところ、p130Cas の発現は殆ど認められなかった。p130Cas cKO 由来破骨細胞は野生型マウス由来の破骨細胞と比較して核数の少ない小さな破骨細胞が誘導された。さらにアクチンリングを持つ破骨細胞の割合が著明に減少し、象牙片上に播種すると吸収窩の形成が抑制された。

続いて、誘導した破骨細胞をプレート上に播種し、3 インテグリンのリン酸化、およびインテグリン下流のシグナル因子として重要な c-Src および Pyk2 のリン酸化について検討したが p130Cas cKO と野生型での変化は認められなかった。しかしながら、p130Cas cKO ではアクチン重合に関わる Rac1 活性が減少していることが明らかになり、Rac1 とその下流分子 Arp3 の細胞内局在が変化していた。さらに Rac1 の活性調節因子 Dock5 は、

野生型では c-*Src*, *Pyk2* と会合しているのに対して、p130Cas cKO では会合が失われ、c-*Src* と *Pyk2* との会合も失われていることが確認された。

さらに p130Cas cKO 由来の破骨細胞に野生型 Cas を発現させると、c-*Src* と *Pyk2* の会合と骨吸収能が回復した。一方 *Pyk2* との会合ができない SH3 ドメイン欠失型 Cas を発現させても Dock5 は Cas と会合せず、骨吸収能も回復しなかった。

以上の結果から p130Cas は c-*Src*, *Pyk2* さらに Dock5 と複合体を形成し、*Rac1-Arp3* シグナルを活性化させることによって破骨細胞の骨吸収能を制御していると考えられた。

#### 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 3 件)

1. Taniguchi R, Fukushima H, Osawa K, Maruyama T, Yasuda H, Weih F, Doi T, Maki K, Jimi E.

RelB-induced expression of Cot, an MAP3K family member, rescues RANKL-induced osteoclastogenesis in alymphoplasia mice by promoting NF- $\kappa$ B2 processing by IKK $\alpha$ .

J Biol Chem. 査読有 2014;289(11):7349-61. doi:10.1074/jbc.M113.538314.

2. Nagai Y, Osawa K, Fukushima H, Tamura Y, Aoki K, Ohya K, Yasuda H, Hikiji H, Takahashi M, Seta Y, Seo S, Kurokawa M, Kato S, Honda H, Nakamura I, Maki K, Jimi E.

p130Cas, Crk-associated substrate, plays important roles in osteoclastic bone resorption.

J Bone Miner Res. 査読有 2013;28(12):2449-62. doi:10.1002/jbmr.1936.

3. Nakamura H, Aoki K, Masuda W, Alles N, Nagano K, Fukushima H, Osawa K, Yasuda H, Nakamura I, Mikuni-Takagaki Y, Ohya K, Maki K, Jimi E.

Disruption of NF- $\kappa$ B1 prevents bone loss caused by mechanical unloading.

J Bone Miner Res. 査読有 2013;28(6):1457-67. doi: 0.1002/jbmr.1866.

[学会発表](計 10 件)

#### 1. 大澤賢次

p130Cas による破骨細胞の骨吸収制御機構  
第 16 回骨代謝研究会

2013 年 11 月 30 日

慶應大学(東京都新宿区)

2. 大澤賢次、宮本阿礼、塚本翔、水田誉人、片桐岳信

FOP の変異 ALK2 は異所性骨化を誘導する  
第 11 回 RCGM フロンティアシンポジウム

2013 年 11 月 22 日～2013 年 11 月 23 日

埼玉医科大学(埼玉県日高市)

3. 大澤賢次、福島秀文、田村幸彦、青木和広、大谷啓一、牧憲司、自見英治郎

p130Cas の破骨細胞における骨吸収能発現のメカニズム

第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2013 年 9 月 22 日

岡山国際会議場(岡山県岡山市)

4. 藤本舞、大澤賢次、古株彰一郎、須田直人、片桐岳信

進行性骨化性線維異形成症から同定された 2 種類の ALK2 変異体は 型受容体に対する感受性が異なる

第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2013 年 9 月 22 日

岡山国際会議場(岡山県岡山市)

5. 多田幸代、福島秀文、大澤賢次、自見英治郎

新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤は口腔癌による顎骨浸潤を抑制する

第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2013 年 9 月 22 日

岡山国際会議場(岡山県岡山市)

#### 6. 大澤賢次

転写因子 NF- $\kappa$ B による骨形成調節機構について

第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2013 年 9 月 20 日

岡山国際会議場(岡山県岡山市)

7. 大澤賢次、福島秀文、牧憲司、保田尚孝、田村幸彦、青木和広、大谷啓一、加藤茂明、仲村一郎、自見英治郎

p130Cas は *Src/Pyk2/Dock5* と会合し、*Rac1* の活性を制御することで破骨細胞の骨吸収を制御する

第 31 回日本骨代謝学会学術集会

2013 年 5 月 30 日

神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

8. Yoshie Nagai, Kenji Osawa, Hidefummi Fukushima, Kenshi Maki, Eijiro Jimi.

p130Cas plays important roles in osteoclastic bone resorption.

The Fifth Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology Future Technology in Medical & Dental Areas

2012 年 10 月 26 日

九州工業大学(福岡県北九州市)

9. 永井香絵、福島秀文、大澤賢次、田村幸彦、青木和広、大谷啓一、中村仁美、牧憲司、自見英治郎

p130Cas は破骨細胞の機能発現に重要な役割をもつ

第 54 回歯科基礎医学会学術大会

2012 年 9 月 15 日

奥羽大学(福島県上郡市)

10. 大澤賢次、福島秀文、Alles Neil、青木和広、張 皿、大谷啓一、自見英治郎

NF- $\kappa$ B の p100 のプロセッシングは骨代謝において重要である

第 54 回歯科基礎医学会学術大会

2012 年 9 月 15 日

奥羽大学(福島県上郡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大澤 賢次 (Osawa Kenji)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 70638238

### (2) 研究分担者

(なし)

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

(なし)

研究者番号 :