

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462859

研究課題名(和文) 骨芽細胞の分化と破骨細胞形成におけるPKRの機能解明

研究課題名(英文) The role of PKR on the differentiation of osteoblasts and formation of osteoclasts

研究代表者

羽地 達次 (HANEJI, Tatsuji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：50156379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Double-stranded RNA dependent protein kinase (PKR) が骨芽細胞の分化と破骨細胞の形成に必須であるという我々のこれまでの成果を発展させ、骨形成と骨吸収におけるPKRの役割を細胞生物学的に解明し、動物実験で確認した。また、PKRはOsterix, STAT1, I B, NF- B等の因子を調節するという観点から骨芽細胞の分化機構を明らかにした。さらに、破骨細胞形成の観点からPKRを標的にした骨破壊制御が可能かどうかを骨粗鬆症マウスやコラーゲン誘導関節炎マウスを用いて動物レベルで検討した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roles of PKR in osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. LPS induced high levels of PKR in osteoclast precursor cells. The LPS-induced osteoclast differentiation was markedly suppressed in the cells pre-treated with PKR inhibitor, C16 and in the cells in which gene silencing of PKR were done. Inhibition of PKR activity in the cells was suppressed the expression of osteoclast differentiation markers including c-fos and NFATc. Bone resorption activity of the LPS-induced osteoclasts was also suppressed by the C16 treatment. Inhibition of PKR activity suppressed the LPS-induced activation of NF- B and MAPK in osteoclasts. Treatment of C16 effectively prevented the LPS-induced destruction of alveolar bone in the artificial periodontitis in rat. Thus, the present results suggest that PKR plays a pivotal role in the LPS-induced bone loss in periodontitis and PKR inhibition may become an important therapeutic target for periodontitis.

研究分野：細胞生物学, 組織学

キーワード：骨芽細胞 破骨細胞 骨形成 骨吸収 人工的歯周炎 PKR LPS

## 1. 研究開始当初の背景

Double-stranded RNA dependent protein kinase (PKR) はウイルス感染時の免疫応答に關与する蛋白質リン酸化酵素として同定され、細胞の防御機構やアポトーシスに關与する。我々は PKR 変異骨芽細胞と破骨細胞を作製し、PKR が骨芽細胞と破骨細胞の分化に關与するかどうか調べてきた。PKR 変異骨芽細胞では ALP 等骨関連蛋白質の発現が減少し、石灰化能も欠如していた。PKR 変異マウス破骨前駆細胞 (RAW264.7) は RANKL の刺激による破骨細胞形成が阻害されていた。PKR 変異骨芽細胞では Osterix の発現が低下しているため PKR は Osterix を介して骨形成を制御すると考えられる。

## 2. 研究の目的

PKR が骨芽細胞の分化と破骨細胞の形成に必須であるという我々のこれまでの成果を発展させ、骨形成と骨吸収における PKR の役割を細胞生物学的に解明し、動物実験で確証する。さらに軟骨細胞の分化に PKR が關与するかどうかを検討する。PKR は Osterix, STAT1, IκB, NF-κB 等の因子を調節するという観点から骨芽細胞の分化機構を明らかにする。さらに、破骨細胞形成の観点から PKR を標的にした骨破壊制御が可能かどうかを遺伝子変異マウスや人工的歯周炎ラットを用いて個体レベルで検討する。

## 3. 研究の方法

本研究は PKR と骨芽細胞、PKR と破骨細胞の2つの分野にわたるので、研究代表者とそれぞれを専門とする研究分担者が並行して研究を進めた。骨芽細胞に関しては、PKR 変異骨芽細胞を用いて、骨形成における PKR の役割を STAT1 と Osterix に焦点を当て、それぞれの発現、相互関係、リン酸化・脱リン酸化の有無を調べた。破骨細胞に関しては、破骨前駆細胞膜融合分子の発現を調べ、破骨細胞形成と前破骨細胞の融合における PKR の関わりを明らかにし、動物レベルで調べた。

(1) PKR 変異細胞における Osterix と STAT1 の発現を Real-time PCR とウエスタンブロット法で調べ、野生型細胞と比較した。両細胞株で Osterix と STAT1 のゲルシフト解析とルシフェラーゼ解析を行い、PKR が Osterix

と STAT1 の転写活性を制御しているか否か、骨形成促進因子 (活性型ビタミン D3, PTH, オカダ酸) 処理によりこれらの転写活性が調節されるか否かを調べた。PKR 変異細胞より電気泳動用試料を調製後、IκB, NF-κB およびその上流の IKK の抗体およびそれらのリン酸化抗体を用いてそれぞれの蛋白質の発現とリン酸化を調べ、リン酸化されるアミノ酸部位を決定した。

(2) RANKL と TNF-α で刺激すると破骨前駆細胞は TRAP 陽性多核細胞に分化する。よって、野生型および PKR 変異細胞を RANKL で刺激して、破骨細胞膜融合関連分子 (MFR, CD9, CD44, DC-STAMP, ADAM8, Atp6v0d2, E-cadherin) の発現を解析した。また、マウス骨髄からマクロファージを採取し、この細胞を PKR 活性阻害剤 2-aminopurine (2-AP) や C16 で前処理した後、それぞれの細胞を RANKL で刺激し、破骨細胞膜融合関連分子と成熟破骨細胞マーカー (カテプシン K, カルシトニン受容体, TRAP) の発現を調べた。マウス骨髄細胞を RANKL で処理した後、2-AP を添加し象牙質切片上で培養後、象牙質切片上の吸収窩を走査型電子顕微鏡で観察し、吸収窩の数および面積を測定し、機能した破骨細胞に分化するか否かを調べた。

(3) 炎症性骨破壊モデルマウスと人工的歯周病ラットに PKR 活性化阻害剤の治療効果と予防効果について、エックス線学的・病理組織学的解析を行った後、骨形態計測による詳細な解析を行った。また、PKR に対する siRNA 細胞を骨破壊部位に導入し、炎症性骨破壊部位における PKR の役割について解析した。

(4) PKR はタンパク質リン酸化酵素であるので、それに対してタンパク質脱リン酸化酵素が骨芽細胞と破骨細胞の分化に關与するか、關与するならどのような因子に關与するか、細胞と動物個体を用いて詳細に調べた。本項目ではタンパク質脱リン酸化酵素 PP2A に焦点を当て研究した。

## 4. 研究成果

PKR が骨芽細胞の分化と破骨細胞の形成に必須であるという我々のこれまでの成果を

発展させ、本研究で、骨形成と骨吸収における PKR の役割を細胞生物学的に解明し、動物実験で確認した。また、PKR は Osterix, STAT1, IκB, NF-κB 等の因子を調節するという観点から骨芽細胞の分化機構を解明した。骨芽細胞の分化における蛋白質のリン酸化と脱リン酸化について解析し、オカダ酸とカリクリン A が PKR の活性と Osterix, STAT1, NF-κB の発現とリン酸化を介して骨芽細胞の分化を誘導すること (Haneji et al, 2013)、軟骨芽細胞の分化に関与していること (Morimoto et al, 2013) を証明した。また、PP2A が Osteocalcin と Osterix の発現を介して骨芽細胞の分化に関与すること (Okamura et al, 2013)、骨芽細胞における RANKL と OPG の発現を介して破骨細胞形成に関与すること (Okamura et al, 2013) を公表した。

Histone demethylase Jmjd3 (Yang et al, 2013) と Utx (Yang et al, 2015) は Runx2 と Osterix を介して骨芽細胞の分化を制御すること、Bcl-2 と Bim のアポトーシス関連分子を介して骨芽細胞の分化を促進すること (Yang et al, 2016) を見出した。

PKR 活性を阻害すると TNF-α 誘導破骨細胞形成が抑制された。この結果は siRNA を導入により、PKR 特異的であることが分かった (Shinohara et al, 2016)。また、PKR 活性阻害は In vitro で骨吸収活性を抑制し、マウス頭蓋骨における TNF-α 誘導破骨細胞形成と骨吸収を抑制した (Shinohara et al, 2016)。これらの作用は TNF-α による NF-κB と MAP キナーゼ経路、NFATc1 と c-fos の発現、NFATc1 の核移行とカルシウムシグナル等の細胞内情報伝達を PKR が制御することによる (Shinohara et al, 2016; Teramachi et al, submitted)。

歯周病モデルラットの破骨細胞や組織に PKR が過剰に発現していること、LPS および TNF-α による破骨細胞分化に伴ってその発現が増強されること、LPS 誘導歯周炎モデルラットと TNF-α 局所投与頭蓋冠の破骨細胞形成と骨破壊は PKR 阻害剤により抑制された。(Teramachi et al, submitted)。

今回の実験は病的骨破壊モデルを用いており、他の実験結果においても炎症局所の PKR 発現が有意に上昇していることから、歯周病、関節リウマチなど炎症性骨破壊を伴う疾患において、PKR が新規治療標的となりうる可能性が考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 25 件)

1. Yang D, Okamura H, Teramachi J, Haneji T Histone demethylase Jmjd3 regulates osteoblast differentiation through targeting anti-apoptotic protein Bcl-2 and pro-apoptotic protein Bim, *BBA Molecular Cell Research*, 1863, 650-659, 2016 (査読あり) doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.01.006
2. Yang D, Okamura H, Teramachi J, Haneji T Histone demethylase Utx regulates osteoblast differentiation and mineralization, *Journal of Cellular Biochemistry* 116, 2628-2636, 2015 (査読あり) doi: 10.1002/jcb.25210
3. Shinohara H, Teramachi J, Okamura H, Yang D, Nagata T, Haneji T Double stranded RNA-dependent protein kinase is necessary for TNF-α-induced osteoclast formation *in vitro* and *in vivo*, *Journal of Cellular Biochemistry* 116, 1957-1967, 2015 (査読あり) doi: 10.1002/jcb.25151
4. Okamura H, Yang D, Teramachi J, Yoshida K, Haneji T Reduction of PP2A Cα stimulates adipogenesis by regulating the Wnt/GSK-3β/β-catenin pathway and PPARγ expression, *BBA-Molecular Cell Research*, 1843, 2376-2384, 2014 (査読あり) doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.06.008
5. Yang D, Okamura H, Nakashima Y, Haneji T Histone demethylase Jmjd3 regulates osteoblast differentiation via transcription factors Runx2 and Osterix, *Journal of Biological Chemistry*, 288, 33530-33541, 2013 (査読あり) doi: 10.1074/jbc.M113.497040
6. Haneji T, Hirashima K, Teramachi J, Morimoto H Okadaic acid activates PKR pathway and induces apoptosis through PKR-stimulation in osteoblastic MG63 cells, *International Journal of Oncology*, 42, 1904-1910, 2013 (査読あり) doi: 10.3892/ijo.2013.1911
7. Morimoto H, Baba R, Haneji T, Doi Y Double-stranded RNA-dependent protein kinase regulates insulin-stimulated chondrogenesis in mouse clonal chondrogenic cells, *ATDC-5*, *Cell Tissue Res*, 351, 41-47, 2013 (査読あり) doi: 10.1007/s00441-012-1521-6
8. Okamura H, Yang D, Yoshida K, Haneji T Protein phosphatase 2A Cα is involved in osteoclastogenesis by regulating RANKL and OPG expression in osteoblasts, *FEBS Letters*, 587, 48-53, 2013 (査読あり) doi: 10.1016/j.febslet.2012.10.041

9. Okamura H, Yang D, Yoshida K, Haneji T  
Protein phosphatase 2A  $\alpha$  regulates osteoblast  
differentiation and the expressions of Bone  
sialoprotein and Osteocalcin via Osterix transcription  
factor, Journal of Cellular Physiology, 228, 1031-1037,  
2013 (査読あり)  
doi: 10.1002/jcp.24250

〔学会発表〕(計 43 件)

1. 岡村裕彦, 羽地達次  
PP2A $\alpha$  は Wnt/ $\beta$ -catenin 経路と PPAR $\gamma$  の発現を介  
して脂肪細胞の分化を調節する,日本解剖学会 第  
121 回学術集会, 2016 年 3 月 28 日, ビックパレ  
ットふくしま(福島県郡山市)
2. 寺町順平, 岡村裕彦, 羽地達次  
Pim 阻害による骨髄腫骨吸収亢進の抑制, 第 57 回  
歯科基礎医学会学術大会・総会, 2015 年 9 月 12  
日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)
3. Teramachi J, Morimoto H, Okamura H, Haneji T  
Critical role of PKR in TNF- $\alpha$ -induced  
osteoclastogenesis, 日本解剖学会第 120 回学術集会,  
2015 年 3 月 22 日, 神戸国際会議場・展示場(兵  
庫県神戸市)
4. 寺町順平, 稲垣裕司, 岡村裕彦, 永田俊彦,  
羽地達次  
PKR は歯周病変における破骨細胞形成及び骨吸収  
を制御する, 第 32 回日本骨代謝学会学術集会,  
2014 年 7 月 25 日, 大阪国際会議場(大阪府大阪  
市)
5. 寺町順平, 篠原宏貴, 稲垣裕司, 森本景之, 永  
田俊彦, 羽地達次  
歯周病微小環境での破骨細胞形成における PKR  
の役割, 第 119 回日本解剖学会総会, 2014 年 3 月  
29 日, 自治医科大学キャンパス(栃木県下野市)
6. 寺町順平, 森本景之, 羽地達次  
第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, ワ  
ークショップ 3 「硬組織形成の組織細胞化学」  
炎症性骨破壊における PKR の役割, 2013 年 9 月  
28 日, 航空会館(東京都港区)
7. 森本景之, 寺町順平, 羽地達次  
サテライトシンポジウム 2, 「多様化する骨形成・  
骨吸収細胞研究」, 破骨細胞の分化を調節する免疫  
関連分子とその検出法  
第 55 回歯科基礎医学会総会, 2013 年 9 月 22 日,  
岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)
8. 寺町順平, 森本景之, 羽地達次  
PKR は炎症性骨破壊において重要な役割を果た  
している, 第 55 回歯科基礎医学会総会, 2013 年 9  
月 21 日, 岡山コンベンションセンター(岡山県岡  
山市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

羽地 達次 (HANEJI, Tatsuji)  
徳島大学・大学院医歯薬研究部・教授  
研究者番号: 50156379

### (2) 研究分担者

森本 景之 (MORIMOTO, Hiroyuki)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 30335806

寺町 順平 (TERAMACHI, Jyumpei)  
徳島大学・大学院医歯薬研究部・助教  
研究者番号: 20515986

### (3) 連携研究者

岡村 裕彦 (OKAMURA, Hirohiko)  
徳島大学・大学院医歯薬研究部・准教授  
研究者番号: 20380024