

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861619

研究課題名(和文)低強度・高周波振動骨造成法を制御するメカノトランスダクション機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanotransduction mechanism of low magnitude and high frequency loading-induced gain of bone mass.

研究代表者

松井 裕之 (MATSUI, Hiroyuki)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：10547277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨は適正なメカニカルストレスにより骨量を維持し、局所的な過剰力と脱力学的負荷に対し骨吸収を起こす。研究代表者はこれまでに、JNK、p38が活性化されるメカニカルストレス条件では骨吸収に關与する遺伝子の発現を制御すること、およびERKが優先的に活性化する微弱なメカニカルストレス条件では、ERKの活性化は骨芽細胞分化に寄与することを見出したが、その上流のMAP3Kは不明である。本研究ではこれを同定するために、RNAiによりERK経路の上流に位置する可能性を持つ遺伝子を検出するスクリーニング系を構築し、現存する23種類のMAP3K全てに対し検討を行った。

研究成果の概要(英文)：It is well known that proper mechanical stress induces gain of bone mass while local overloading and unloading results in bone loss. Previously we observed that JNK and p38-activating mechanical stress in osteoblast induced expression of bone resorption-related genes, and low magnitude mechanical stress that preferentially activated ERK pathway induced osteoblast differentiation. However, MAP3K(s) that activate ERK pathway in response to low magnitude mechanical stress remains to be elucidated. In this study, we constructed RNAi screening system that detects potential genes located upstream of ERK pathway, then tested all existing 23 MAP3Ks for screening.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：メカノトランスダクション ERK

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに、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 および apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) が活性化されることを見出し、さらにその下流における遺伝子発現について解析を行った。TAK1 の下流においては IL-6 が、ASK1 の下流においては JNK を介して Fn14 が、p38 を介して MCP-3 が発現制御されていたが、これらの遺伝子はいずれも骨芽細胞分化に関与せず、さらに JNK および p38 の阻害剤を使った検討でもメカニカルストレス誘導性の骨芽細胞分化に関与する兆候は得られなかった。一方、ERK を優先的に活性化し JNK および p38 を活性化しないごく微弱な反復進展刺激 (Low magnitude mechanical stress; LMMS) は骨芽細胞分化を誘導したことから、骨芽細胞分化メカニカル優位となるストレスは ERK を活性化し JNK および p38 を活性化しない範囲にあることが示された。しかしながら、この ERK の活性化に責任性を有する上流 MAP3K は不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、LMMS により活性化され ERK へのシグナル伝達を行う MAP3K を同定するとともに、その機能解析を行うことにより MAP3K レベルでの骨芽細胞分化制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

MC3T3-E1 骨芽細胞は理研より入手し、通法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以前より離床している 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 (新田ゼラチン) を処理したのち、骨芽細胞の培養を行った。

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。

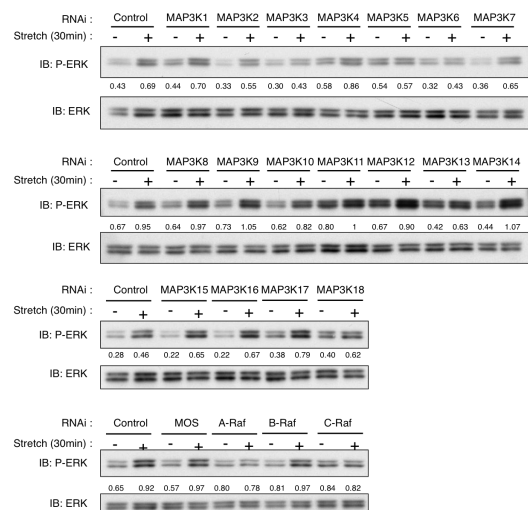
phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) antibody (Thr202/Tyr204, 1:1000, #4370), p44/43 MAPK (Erk1/2) antibody (1:1000, #4695), phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182, 1:1000, #4511) antibody, p38 antibody (D13E1, 1:1000, #8690), phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) antibody (1:1000, #4668), SAPK/JNK antibody (1:1000, #9252), phospho-A-Raf (Ser292) antibody (1:1000, #4431), A-Raf

antibody (1:1000, #4432), phospho-C-Raf (Ser338) antibody (1:1000, #9427), C-Raf (D5X6R) antibody (1:1000, #12552), Active Caspase-3 antibody (Asp175, 1:1000, #9664)

4. 研究成果

本研究では、LMMS により活性化される MAP3K の同定に向け、骨芽細胞において ERK を活性化する報告を持つ MAP3K8 に着目して検討を行った。しかし、内性分子の検出に関する抗体を入手するに至らず、明確な関与を裏付けるデータは得られなかった。そこで、現存する 22 種類の MAP3K 全てに対し RNAi によるスクリーニングを行った。その結果、A-Raf, C-Raf および MAP3K5 (ASK1) を一次候補として検出した (Figure 1)。ASK1 は先の研究で LMMS により活性

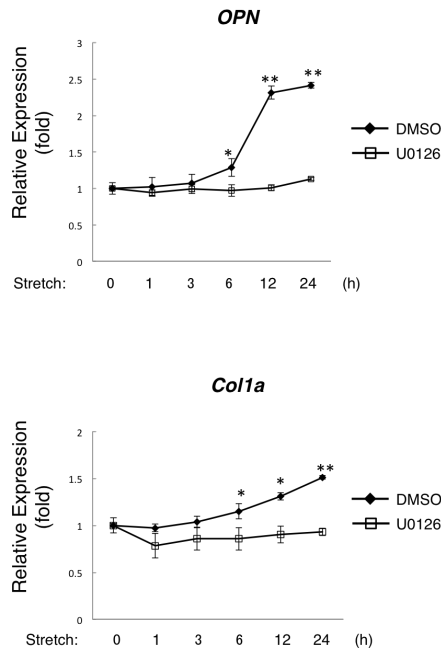
FIGURE 1



化されなかったことから候補から除外した。先の研究で、LMMS により活性化される ERK は骨芽細胞分化マーカーである Osteopontin (OPN) および Collagen 1A (Col1a) の発現を制御しており、本研究において再現性よく確認された (Figure 2)。A-Raf のノックダウンはこの反応を完全に抑制する一方、C-Raf のノックダウンでは有意差は認めないものの部分的な抑制を呈した (Figure 3)。このことから、A-Raf と C-Raf のシグナル伝達路は ERK を共通に活性化しながらも別の機構で骨芽細胞分化を制御していることが示唆された。

Raf ファミリー分子は細胞の生存に関与することが古くから知られている。さらに、骨芽細胞は末端分化に際し、多くがアポトーシスにより淘汰されごく一部が骨細胞として生存する。このように、骨芽細胞系列においてアポトーシスは骨芽細胞機能において重要な役割を果たしていることが示唆される。そこで、A-Raf および C-Raf のアポトーシスへの関与を検討した。その結果、C-Raf のノックダウンはアポトーシスの実行役である Caspase-3 の活性化を誘導したが、A-Raf のノックダウンは影響を及ぼさなかった

FIGURE 2



(Figure 4). これらの結果から , A-Raf および C-Raf は骨芽細胞の LMMS 応答において明確に役割を分けていることが分かった . C-Raf のノックダウンは Caspase-3 の活性化を非刺激時で誘導し , LMMS 負荷時にさらに強く誘導したことから , 細胞死に対する脆弱性を示していた . このことから , C-Raf は安静時および LMMS 負荷時の骨芽細胞の生存を担保していることが明らかとなった . これに対し A-Raf のノックダウンは細胞死に対する影響は与えなかったが骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を明確に抑制したことから , A-Raf は骨芽細胞分化の執行役であることが示唆される . ERK という共通の分子を活性化しながらもその波及効果が A-Raf と C-Raf の間で異なるという結果は大変興味深い . 同様に , 細胞生理に関するアウトプットが MAPK でなく MAP3K のレベルで決定さ

FIGURE 3

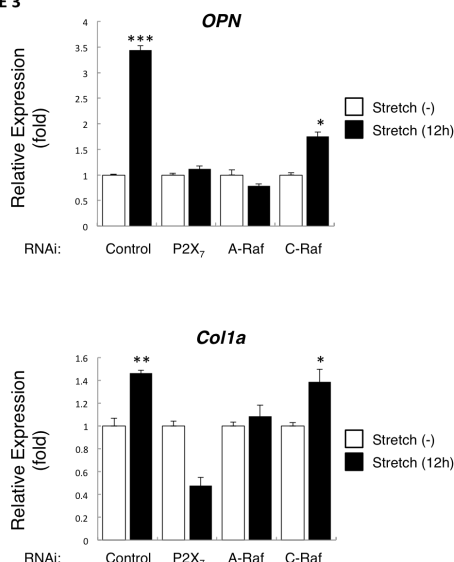
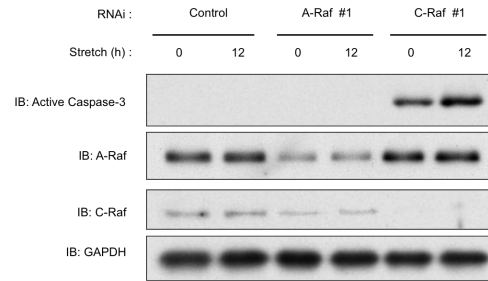


FIGURE 4



れている例では , マクロファージにおいて菌体内毒素 LPS は TAK1 および ASK1 を活性化させるが , ASK1 の活性化はサイトカインの産生を介した敗血症性ショックに寄与することが報告されている . また , B 細胞の成熟分化に必須である CD40 刺激においては , MEKK1 および TAK1 が活性化され , いずれも JNK と p38 の活性化を制御しているが , その活性化に必要な Scaffold とその集合体である Signalsome は両者の間で異なっており , これが MAP3K のレベルで生物学的アウトプットが異なる理由として考えられている . A-Raf と C-Raf は構造的に類似しているファミリーメンバーであるが , その N 末端に 40 アミノ酸の挿入配列がある . Raf の N 末端はもともと , 3 次構造の変化による自己阻害部位であることが古くから知られている . これらのことから , Raf ファミリーの N 末端における構造の差による Signalsome の差異が A-Raf と C-Raf の生理機能を分けている原因であることが示唆される .

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 1 件)

Han JM., Hong G., Matsui H., Shimizu Y., Zheng G., Lin H. and Sasaki K. :The surface characterization and bioactivity of NANOZR in vitro. Dent. Mater J. 33(2):210-219, 2014 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

Hiroyuki Matsui, Qi Zhang and Keiichi Sasaki. MAP3Ks determine cell fate of osteoblast in mechanobiology. Chulalongkorn-Tohoku Joint Symposium in Dental Science 2015, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 9 Dec., 2015

Qi Zhang, Hiroyuki Matsui, Xing Liang, Keiichi Sasaki. P2X₇ RECEPTOR MEDIATES LOW-MAGNITUDE OF MECHANICAL STRESS-INDUCED ERK ACTIVATION IN OSTEOBLASTS. EAO congress STOCKHOLM 2015, Stockholm, Sweden, 24-26 Sep., 2015

Hiroyuki Matsui, Qi Zhang, Xing Liang,
Keiichi Sasaki. Analysis of mechanical
stress signaling that gives “good” or “bad”
reaction for bone. JSPS 二国間交流事業共同
セミナー・四川・東北デンタルシンポジウム
四川大学，成都市，中国，7月3日 2015

6．研究組織

(1)研究代表者

松井 裕之 (MATSUI, Hiroyuki)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機
構・助教

研究者番号：10547277