

機関番号：14603
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791394
 研究課題名（和文） NFAT2/NFATc1に制御される破骨細胞骨吸収機構およびその調節機構の解析
 研究課題名（英文） Functional analysis of membrane proteins whose expression were controlled by NFAT2/NFATc1 in mature osteoclasts
 研究代表者
 北川 教弘 (Kitagawa Norihiro)
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
 研究者番号：30294284

研究成果の概要（和文）：

転写因子NFAT2/NFATc1が破骨細胞分化における鍵因子であることから、NFATc1は骨吸収活性に関連する遺伝子の発現を制御すると考えられた。そこでNFATc1制御下で発現するHB-EGFおよび新規DAP12会合膜タンパク質RADIOに着目した。本研究から1) HB-EGFはMEKを介した経路で転写因子Twist2の発現誘導およびSmad1の核内移行阻害を介して骨芽細胞分化を抑制すること、2) RADIOがDAP12と協調的に働き、破骨細胞におけるアクチン細胞骨格形成および骨吸収活性を制御すること、が示された。

研究成果の概要（英文）：

Since NFATc1/NFAT2 is essential for inducing the entire processes of multinucleated cell formation, it seems to be reasonable to speculate that NFATc1 may regulate the expression of membrane proteins which control cell fusion and bone resorption. In this research, we found that 1) HB-EGF suppress osteoblast differentiation through the induction of Twist2 and suppression of nuclear translocation of Smad1, and 2) RADIO acts as a DAP12-associated receptor and is essential for the formation of functional osteoclasts through the regulation of actin-ring formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：破骨細胞、骨吸収、NFATc1、ITAM

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は骨吸収の主細胞であり、骨粗しょう症をはじめとする骨疾患と密接に関与することから、その分化過程や骨吸収機構、活性調節機構の理解は治療薬開発の基

盤研究として期待されるが未だ不明な点が多い。応募者は転写因子NFATc1/NFAT2が細胞融合以降の破骨細胞分化過程に必須なキーレギュレーターであることを報告し、この知見からNFATc1が細胞融合や骨吸収活性に関連する標的遺伝子の発現を制御すると考

えた。そこでNFATc1の制御下で発現調節を受ける膜タンパク質を探索し未だ骨代謝との関連が報告されていない、増殖因子HB-EGF(Heparin-Binding Epidermal Growth Factor)およびDAPI2との会合が報告されているタンパク質RADIO(Receptor Associated DAPI2 In Osteoclast: 解析中のため仮称を用いる)に着目した。本研究開始までに応募者は、破骨細胞で発現するHB-EGFが骨芽細胞および破骨細胞の分化抑制を介し骨代謝を負に制御する因子であること、RADIOが破骨細胞の細胞骨格制御に必要であることを見出していた。

2. 研究の目的

破骨細胞の骨吸収機構、活性調節機構の理解を目指し、本申請では1) HB-EGFの骨代謝制御機序、2) RADIOの破骨細胞骨格制御機構、および3)骨代謝におけるRADIOの生理的意義、の3点を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

① HB-EGFの骨芽細胞分化抑制機構の解析
MC-3T3E1細胞をBMP2にて刺激する骨芽細胞分化誘導系を用いて、組み換えHA-EGFの分化抑制活性をアルカリフォスファターゼ活性やマーカー遺伝子の発現に基づき検討する。この際1)骨芽細胞分化を調節・制御する転写因子の関与をmRNA発現から検討する。さらに2)BMP2下流で機能することが明らかとなっているSmadの核局在を免疫染色法や細胞分画法にて検討する。3)BMP2-BMPレセプターシグナル系とHB-EGF-EGFレセプターシグナル系のクロストークを阻害剤を用いたアプローチにより検討する。

② 抗RADIO抗体の作成

RADIO細胞外領域とマウスIgG2aFc領域の融合タンパク質(RADIO-Fc)をCHO細胞を組換えタンパク質産生細胞として利用する「ポリペプチド発現システム」(特開2006-230252)により作成する。RADIO-Fcを抗原としてポリクローナル抗体を作成する。

③ *in vitro*破骨細胞分化誘導系におけるRADIOの作用機序の解析

RADIOをノックダウンした破骨細胞はアクチンリング形成不全とともに骨吸収活性の低下が観察されている。本細胞にレトロウィルスを用いてRADIO野生型もしくは各種変異体を遺伝子導入し、RADIOの機能に必須な領域を検討する。特にDAPI2との会合を失った変異体を用いることでRADIOが

DAPI2-Associated Receptorとして機能するの
かについて検討する。

④RADIO遺伝子欠損マウスの作成

RADIO遺伝子欠損マウスを作成し、その骨形態計測や骨代謝マーカーを測定することにより、RADIOの生理的意義を検討する。

4. 研究成果

HB-EGF遺伝子欠損マウスが骨吸収・骨形成ともに低下していることを踏まえ、本年度は骨芽細胞分化におけるHB-EGFの働きを検討した。*in vitro*骨芽細胞分化誘導系を用いた解析から、HB-EGFが1)骨芽細胞分化を抑制すること、2)MEKを介した経路で転写因子Twist2の発現誘導およびSmad1の核内移行阻害を介して分化を抑制すること、が明らかとなった(発表論文⑥)。

RADIOの破骨細胞骨格制御機構の解明と骨代謝における意義を明らかにすることを目的とし、研究を行った。まずRADIO細胞外領域とマウスIgG2aFc領域の融合タンパク質(RADIO-Fc)を作成し、これを抗原として抗体を作成した。作成した抗体をもちいてウェスタンブロッティングを行い、破骨細胞分化に伴い内在性RADIOタンパク質発現が上昇すること、シクロスポリンA処理によりその発現誘導が抑制されること、を確認した。また本抗体を用いた免疫染色実験からRADIOタンパク質が単核および多核破骨細胞形質膜上に発現することが示唆された。

RADIOノックダウン細胞はアクチンリング形成異常および骨吸収活性の低下を示す。RADIOノックダウン細胞に野生型もしくは変異型RADIOを強制発現させた結果、野生型RADIOの導入により回復するのに対し、DAPI2との会合能を欠質した変異体や細胞外領域の欠質変異体では回復しえないことが明らかとなった。単核破骨細胞をビトロネクチン刺激すると、c-SrcファミリーチロシンキナーゼによりDAPI2のITAM中チロシン残基がリン酸化され、リン酸化ITAMを介してSykキナーゼがDAPI2と会合し、活性化することが明らかになっている。単核破骨細胞をビトロネクチンで刺激し細胞抽出液を回収した。本抽出液から抗RADIO抗体で免疫沈降したサンプルを抗Syk抗体でウェスタンブロットした結果、ビトロネクチン刺激によりSykのシグナルが増強された。以上の結果から、RADIOが破骨細胞における重要なDAPI2 associated receptorとして機能し、DAPI2とともにアクチンリング形成を介して破骨細胞の骨吸収活性獲得に関与することが強く示唆された。

生体内におけるRADIOの骨代謝における意義を検討するため、RADIO遺伝子欠損マウスの作成を試みた。RADIO遺伝子の転写開始点を5'-RACE法により決定し、プロモーター領域を推定するとともに、RADIO遺伝子のエクソン・イントロン構造を決定した。この情報に基づき、RADIO遺伝子ターゲットングベクターを構築した。得られたベクターを用いて相同組み換えを起こしたESクローンを複数株樹立し、常法に従いRADIO遺伝子ヘテロ欠損マウスの樹立に成功した。今後本マウスの骨組織および代謝を検討することにより、*in vitro*実験系で示された破骨細胞骨吸収活性能におけるRADIOの機能を*in vivo*において検証することが重要な課題であると考えられる。

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8件)

① Bahtiar, A., Nakamura, T., Kishida, K., Katsura, J., Nitta, M., Ishida-Kitagawa, N., Ogawa, T., and Takeya, T. (2011). The l-Ser analog #290 promotes bone recovery in OP and RA mice. *Pharmacol. Res. in press.* (査読有)

② Morita, Y., Ono, A., Serizawa, A., Yogo, K., Ishida-Kitagawa, N., Takeya, T., and Ogawa, T. (2011). Purification and identification of lactoperoxidase in milk basic proteins as an inhibitor of osteoclastogenesis. *J. Dairy Sci.* 94, 2270-9. (査読有)

③ Bao, X., Ogawa, T., Se, S., Akiyama, M., Bahtiar, A., Takeya, T., and Ishida-Kitagawa, N. (2011). Acid sphingomyelinase regulates osteoclastogenesis by modulating sphingosine kinases downstream of RANKL signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 533-7. (査読有)

④ Sato, M., Maruoka, M., Yokota, N., Kuwano, M., Matsui, A., Inada, M., Ogawa, T., Ishida-Kitagawa, N., and Takeya, T. (2011). Identification and functional analysis of a new phosphorylation site (Y398) in the SH3 domain of Abi-1. *FEBS Lett.* 585, 834-40. (査読有)

⑤ 細胞外L-セリンは破骨細胞前駆細胞のアミノ酸栄養シグナル活性化に必須である。(2010)小川拓哉, 西田織衣, 的場祐衣, 岸田耕一, 藤井直樹, Anton Bahtiar, 北川(石田)教弘, 竹家達夫 *アミノ酸研究.* 4, 167-9. (査読無)

⑥ Nakamura, T., Toita, H., Yoshimoto, A., Nishimura, D., Takagi, T., Ogawa, T., Takeya, T., and Ishida-Kitagawa, N. (2010). Potential involvement of Twist2 and Erk in the regulation of osteoblastogenesis by HB-EGF-EGFR signaling. *Cell Struct. Funct.* 35, 53-61. (査読有)

⑦ 細胞外L-セリンは破骨細胞分化におけるRANKL-RANKシグナル伝達系活性化に必須である。(2009) 小川拓哉, 酒井俊樹, 古賀慎太郎, 西田織衣, 的場祐衣, アントン バーティアル, 北川(石田)教弘, 竹家達夫 *アミノ酸研究* 3, 63-5. (査読無)

⑧ Bahtiar, A., Matsumoto, T., Nakamura, T., Akiyama, M., Yogo, K., Ishida-Kitagawa, N., Ogawa, T., and Takeya, T. (2009). Identification of a novel L-serine analog that suppresses osteoclastogenesis *in vitro* and bone turnover *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 284, 34157-66. (査読有)

[学会発表] (計5件)

① 桂隼平、Anton Bahtiar、新田麻衣、北川(石田)教弘、小川拓哉、竹家達夫 骨吸収の異常亢進による骨代謝疾患に対するセリンアナログ #290 の投与効果の検討 BMB2010, 2010.12.10, 神戸

② 木村貴徳、三浦格、錫林其其格、田中國太郎、北岡良基、北川(石田)教弘 破骨細胞における新規アクチン細胞骨格制御因子 RADIO の同定と機能解析, BMB2010, 2010.12.9, 神戸

③ Norihiro Ishida-Kitagawa, Bao Xilinqiqige, Kunitaro Tanaka, Takanori Kimura, Tadashi Miura, Yoshiki Kitaoka, Takuya Ogawa, and Tatsuo Takeya, Identification and Functional Analysis of a Novel Regulator of Actin-ring Formation in Osteoclast. 32nd Annual Meeting of The ASBMR, 2010.10.18, Toronto

④ 北川(石田)教弘、小川拓哉、竹家達夫、破骨細胞における膜タンパク質の網羅的解析と新規アクチン細胞骨格制御因子の同定、第 28 回日本骨代謝学会学術集会 2010.7.21, 東京

⑤ 田中國太郎、北岡良基、木村貴徳、三浦格、北川(石田)教弘 破骨細胞における膜タンパク質の網羅的解析と新規アクチン細胞骨格制御因子の同定 第 32 回日本分子生物学会年会 2009.12.11. 横浜

[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
無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 教弘 (Kitagawa Norihiro)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号 : 30294284

(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 :