

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791382

研究課題名（和文） 前駆破骨細胞のL-セリン感知・応答機構と骨髄微小環境における生理的重要性の検証

研究課題名（英文） L-serine starvation response in osteoclast precursors and its physiological significance in the bone marrow microenvironment

研究代表者

小川 拓哉（OGAWA TAKUYA）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号：30457147

研究成果の概要（和文）：破骨細胞は骨量維持の主役であり、その RANKL 刺激による *in vitro* での分化誘導には培地中のセリンが必須である。破骨細胞分化におけるセリンの作用機構とこの現象の生理的意義の理解を目的に解析を進めた結果、セリンのみの欠乏でアミノ酸飢餓ストレスが引き起こされていること、前駆破骨細胞ではセリン合成系酵素の発現が低いこと、生体内では骨芽細胞が前駆破骨細胞へのセリンの供給に寄与していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Osteoclasts play central roles in the development and remodeling of bone. In addition to the stimulation by RANKL, serine in the culture medium is necessary for the *in vitro* differentiation of osteoclasts from their precursors. We conducted a series of experiments to understand the regulatory mechanism of osteoclast differentiation by serine as well as its physiological significance, and found the activation of amino acid starvation response in the precursors by serine deprivation alone, low expression of serine biosynthetic enzymes, and importance of serine supplied by osteoblasts to osteoclasts in the bone marrow microenvironment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：アミノ酸、セリン、細胞・組織、発生・分化、発現制御、シグナル伝達、骨・軟骨代謝学、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨代謝は、破骨細胞による古い骨基質の吸収反応と骨芽細胞による新しい骨基質の形成反応の相互応答的な機構（骨リモデリング）により制御され、健常時は一定の回転速度に維持されている。骨粗鬆症などの主要な骨関連疾患は破骨細胞の形成・活性の異常亢進が

主たる要因であることから、破骨細胞の形成や骨吸収活性の制御機構に関する研究が盛んに行われている。破骨細胞分化機構の研究は、分化因子 RANKL や分化の鍵となる転写因子 NFATc1/NFAT2 の同定を契機として、RANKL 受容体である RANK 下流のシグナル伝達経路、NFAT2 活性化機構や標的遺伝子などについて

多くの知見が集められ、飛躍的に理解が進んだ。研究代表者は *in vitro* における前駆破骨細胞の分化には培地中のセリンが重要であることを見出したが、その詳細な作用機構や生理的意義については未解明であった。

2. 研究の目的

(1) 破骨細胞分化制御におけるセリンの作用機構を分子レベルで明らかにする。

(2) 前駆破骨細胞である骨髄マクロファージのセリン要求性という現象について、個体レベルでの生理的意義について理解する。

3. 研究の方法

(1) 前駆破骨細胞におけるセリン合成系酵素の発現の解析 (RT-PCR、免疫組織染色等)、セリンの輸送に関わる中性アミノ酸トランスポーターの同定、セリン合成系酵素の過剰発現による破骨細胞分化への影響、マウス骨髄マクロファージにおけるセリン合成系構成酵素およびアミノ酸トランスポーターの発現量の検討。

(2) セリン不含培地におけるマウス骨髄マクロファージのアミノ酸応答シグナル経路 (mTORC1 経路、GCN2-eIF2 α 経路) の活性化状態の検討。

(3) 骨芽細胞・前駆破骨細胞特異的 *de novo* セリン合成能欠損マウスの作成。

4. 研究成果

(1) 前駆破骨細胞・骨芽細胞におけるセリン合成系・輸送系の評価

骨芽細胞は前駆破骨細胞に比べてセリン合成系の各酵素 (PHGDH, PSAT-1, PSPH) を強く発現していることが分かった。また、前駆破骨細胞特異的に *Phgdh* を欠損する *Tnfrsf11a-Cre; Phgdh^{flox/flox}* マウスより骨髄マクロファージを調製したが、*in vitro* での増殖・分化には培地中に存在するセリンのみで十分であった *Phgdh* を前駆破骨細胞に過剰発現したところ、セリン非存在下においても破骨細胞の形成が見られた (以前に行った過剰発現実験とは異なる結果が得られた)。セリン輸送系については、前駆破骨細胞では中性アミノ酸輸送系の ASCT2、LAT2 の発現が認められたのに対し、骨芽細胞では ASCT1、LAT1 の発現が優位であった。さらに輸送系 ASC の阻害剤を作用させたところ、前駆破骨細胞へのセリンの取り込みおよび破骨細胞への分化が抑制されることが分かった。

(2) セリン飢餓によるアミノ酸感知・応答経路への影響

前駆破骨細胞ではセリン飢餓により mTORC1 経路、GCN2-eIF2 α 経路の両アミノ酸応答シグナル経路の活性に変化が見られ、セリンのみの欠乏でアミノ酸飢餓ストレスが引き起こされていることが分かった。また、これ

まで注目していた RANK 以外の破骨細胞分化関連因子についても、セリン飢餓条件下での発現低下を見出した。

(3) 骨芽細胞・前駆破骨細胞特異的 *de novo* セリン合成能欠損マウスの作成と骨形態計測

骨芽細胞が、前駆破骨細胞に対する骨髄局所でのセリンの供給源である可能性について検証するため、骨芽細胞または前駆破骨細胞特異的に *de novo* セリン合成系酵素 *phgdh* 遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウスについて、それぞれ必要となる Cre マウス (*Coll1a1-Cre*, *Tnfrsf11a-Cre*)、floxed マウスを入手し、交配・作成を行った。いずれのマウスにおいても通常通り出生、妊娠可能であり、また体重に基づく成長曲線などからも、外見上特に目立った異常は見られなかった。骨芽細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスについて骨密度測定を行ったところ、調べた週齢の時点では野生型との差は見られなかった。しかしながら組織学的解析の結果、細胞レベルでは破骨細胞の数や形態の異常が見られたため、引き続き週齢による骨密度変化を観察し、その経過について検討を加える必要性が示唆された。

以上、本研究結果より以下の可能性が見出された。

・前駆破骨細胞ではセリン合成系酵素の発現が低いため、セリン飢餓に脆弱であり、セリン合成系酵素の発現レベルがセリン感受性を規定している。

・*in vivo* において、骨芽細胞は前駆破骨細胞に対するセリン供給細胞としても重要である。

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 12 件)

- ① Ishida-Kitagawa N, 他 11 名 (10 番目). Siglec-15 regulates the formation of functional osteoclasts in concert with DNAX-activating protein of 12 KDa (DAP12). *J Biol Chem*. 287(21): 17493-17502. (2012), 査読有.
DOI: 10.1074/jbc.M111.324194
- ② Ikeda A, 他 9 名 (9 番目). Advantages and Potential of Lipid-Membrane-Incorporating Fullerenes Prepared by the Fullerene-Exchange Method. *Chem Asian J*. 7(3): 605-613. (2012), 査読有.
DOI:10.1002/asia.201100792
- ③ Maruoka M, 他 8 名 (5 番目) .

- Abi-1-bridged tyrosine phosphorylation of VASP by Abelson kinase impairs association of VASP to focal adhesions and regulates leukemic cell adhesion. *Biochem J.* 441(3): 889-899. (2012), 査読有.
DOI: 10.1042/BJ20110951
- ④ Yogo K, 他 7 名 (4 番目). Identification of SAMT family proteins as substrates of MARCH11 in mouse spermatids. *Histochem Cell Biol.* 137(1): 53-65. (2012), 査読有.
DOI: 10.1007/s00418-011-0887-y
- ⑤ Bahtiar A, 他 7 名 (7 番目). The L-Ser analog #290 promotes bone recovery in OP and RA mice. *Pharmacol Res.* 64(3): 203-209. (2011), 査読有.
DOI: 10.1016/j.phrs.2011.05.004
- ⑥ Morita Y, 他 6 名 (7 番目). Purification and identification of lactoperoxidase (LPO) in milk basic proteins (MBP) as an inhibitor of osteoclastogenesis. *J Dairy Sci.* 94(5): 2270-2279. (2011). 査読有.
DOI: 10.3168/jds.2010-4039
- ⑦ Sato M, 他 8 名 (7 番目). Identification and functional analysis of a new phosphorylation site (Y398) in the SH3 domain of Abi-1. *FEBS Lett.* 585(6): 834-840. (2011). 査読有.
DOI: 10.1016/j.febslet.2011.02.012
- ⑧ Bao X, Ogawa T, 他 5 名 (2 番目). Acid sphingomyelinase regulates osteoclastogenesis by modulating sphingosine kinases downstream of RANKL signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 405(4): 533-537. (2011). 査読有.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.01.061
- ⑨ 小川拓哉, 他 7 名 (1 番目). 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. アミノ酸研究. 4(2): 167-169. (2010). 査読無.
- ⑩ Nitta M, 他 9 名 (6 番目). Identification and expression analysis of connexin-45 and connexin-60 as major connexins in porcine oocytes. *J Anim Sci.* 88(10): 3269-3279. (2010). 査読有.
DOI: 10.2527/jas.2009-2781
- ⑪ Ikeda A, 他 3 名 (3 番目). Photodynamic Activity of Liposomal Photosensitizers via Energy Transfer from Antenna Molecules to [60]Fullerene. *ACS Med Chem Lett.* 1(3): 115-119. (2010). 査読有.
DOI: 10.1021/ml100021x
- ⑫ Nakamura T, 他 7 名 (6 番目). Potential involvement of Twist2 and Erk in the regulation of osteoblastogenesis by HB-EGF-EGFR signaling. *Cell Struct Funct.* 35(1): 53-61. (2010). 査読有.
DOI: 10.1247/csf.10001
- [学会発表] (計 18 件)
- ① 北川(石田)教弘, 破骨細胞における新規 DAP12 会合膜タンパク質 Siglec-15 の機能解析. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011/12/14(ポスター), 15(口頭), パシフィコ横浜 (横浜).
- ② 佐矢野智子, セリン欠乏による遺伝子発現応答に Atf4 は関与するか? 日本アミノ酸学会第 5 回学術大会, 2011/11/4 (ポスター), 名古屋大学シンポジオン (名古屋)
- ③ 川野裕輝, セリン欠乏により惹起される細胞内情報伝達系解析. 日本アミノ酸学会第 5 回学術大会, 2011/11/4(ポスター). 名古屋大学シンポジオン (名古屋).
- ④ 濱野桃子, セリン合成酵素 Phgdh 欠損線維芽細胞に惹起される炎症反応の分子機序. 日本アミノ酸学会第 5 回学術大会, 2011/11/4 (ポスター), 名古屋大学シンポジオン (名古屋).
- ⑤ 月野真理子, 細胞内セリン充足度と脂質代謝関連遺伝子発現の連動. 日本アミノ酸学会第 5 回学術大会, 2011/11/4 (ポスター), 名古屋大学シンポジオン (名古屋).
- ⑥ 小川拓哉, 破骨細胞分化におけるセリン要求性とセリン供給細胞としての骨芽細胞の検討. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011/7/30 (ポスター), 大阪国際会議場 (大阪).
- ⑦ 北川(石田)教弘, 破骨細胞における新規 DAP12 会合膜タンパク質の機能解析. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011/7/29 (ポスター), 大阪国際会議場 (大阪).
- ⑧ 佐矢野智子, セリン欠乏に応答する遺伝子の発現誘導機序. 第 65 回日本栄養・食料学会大会, 2011/5/15 (口頭), お茶の水女子大学 (東京).
- ⑨ 小川拓哉, 細胞外セリンを介した新たな破骨細胞分化制御機構. 第 65 回日本栄養・食料学会大会, 2011/5/14 (シンポジウム、口頭), お茶の水女子大学 (東京).
- ⑩ 岸田耕一, マウス前駆破骨細胞のセリン取り込みに関与するアミノ酸トランスポーターの解析. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会) 2010/12/9(ポスター), 神戸国際展示場 (神戸).

- ⑪ 藤井直樹, 細胞外セリンによるマウス前駆破骨細胞のアミノ酸シグナル応答経路の制御. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 2010/12/9 (ポスター), 神戸国際展示場 (神戸) .
- ⑫ 桂準平, 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 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 2010/12/9 (ポスター), 神戸国際展示場 (神戸) .
- ⑬ Ishida-Kitagawa N, Identification and Functional Analysis of a Novel Regulator of Actin-ring Formation in Osteoclast. 32nd Annual Meeting of The American Society for Bone and Mineral Research, 2010/10/18(ポスター), Metro Toronto Convention Centre (Toronto).
- ⑭ Ogawa T, Extracellular L-Serine Regulates Intracellular Amino Acid Levels and mTORC1 Activation in Mouse Osteoclast Precursors. 32nd Annual Meeting of The American Society for Bone and Mineral Research, 2010/10/17 (ポスター), Metro Toronto Convention Centre (Toronto).
- ⑮ 小川拓哉, 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. 日本アミノ酸学会第 4 回学術大会, 2010/9/17 (ポスター), ホテルサンシャイン鬼怒川 (日光) .
- ⑯ 小川拓哉, 細胞外L-セリンはアミノ酸栄養シグナルを介して破骨細胞分化を制御する. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会, 2010/7/22(口頭), 京王プラザホテル(東京) .
- ⑰ 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 28 回日本骨代謝学会学術集会, 2010/7/21 (ポスター), 京王プラザホテル (東京) .
- ⑱ Takeya T, Isolation of L-Serine analogs as novel inhibitors of osteoclastogenesis and bone turnover with distinct functional mechanism. IOF World Congress on Osteoporosis & 10th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis, 2010/5/7 (ポスター), Fortezza da Basso (Florence).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 拓哉 (OGAWA TAKUYA)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号 : 30457147