Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

ATP-induced osteoclast function; the formation of sealing-zone like structure and the secretion of lytic granules via microtubule-deacetylation under the control of Syk

陌間, 亮一

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2009-09-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲4730
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004730

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏　　名	陌間　亮一
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4730 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

ATP-induced osteoclast function; the formation of sealing-zone like structure and the secretion of lytic granules via microtubule-deacetylation under the control of Syk(破骨細胞において ATP/ P2X7 受容体シグナルにより誘導される微小管のアセチル化制御を介した骨吸収の分子機構の解析)

審 査 委 員

主 査　教 授　片岡　徹
　　教 授　堀田　博
　　教 授　南　　康博

学位論文の内容要旨

ATP-induced osteoclast function; the formation of sealing-zone like structure and the secretion of lytic granules via microtubule-deacetylation under the control of Syk

破骨細胞において ATP/ $P2X_7$ 受容体シグナルにより誘導される微小管のアセチル化制御を介した骨吸収の分子機構の解析

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
生　化　学
(指導教員：中村俊一教授)

陌間　亮一

【緒言】

破骨細胞は、血液細胞である単球・マクロファージが分化成熟し、骨溶解能を獲得した多核細胞である。成熟破骨細胞への分化因子や、骨吸収の分子機構などで注目を集めている破骨細胞だが、いまだそれらの詳細な分子メカニズムは解明に至ってはいない。

単球から破骨細胞への分化には M-CSF と RANKL が主要な分化因子であり、分化・成熟するにつれ、様々なマーカーを発現する。多核化、TRAP(酒石酸耐性酸性フォスファターゼ)、カテプシン K の産生など多数が確認されているが、骨溶解能を有することが最も重要な成熟の指標である。

破骨細胞は、骨髄内にて CD44 やインテグリンなどを介し骨基質に接着する。骨溶解時には、細胞直下に（骨基質の間に）環状の細胞接着面(sealing-zone)を形成して周囲とは独立した閉鎖空間を形成し、酸やカテプシン K などの破骨細胞特異的な蛋白分解酵素を腔内に分泌する事で石灰化基質を破壊する。

マウスを用いた *in-vivo* の実験系で分化因子への注目が多い中にあって、本研究ではヒト末梢血由来の単球より破骨細胞へ分化・成熟させた、*in-vitro* の実験系で成熟破骨細胞の骨溶解能に注目した。具体的には、骨溶解開始シグナルの探索・細胞骨格の再構成のプロセス、細胞内輸送について検討をすすめた。その結果、(1)核酸である ATP(アデノシン三リン酸)が $P2X_7$ レセプターを介した骨吸収の開始シグナルであること、ATP 刺激により、(2) 破骨細胞の細胞骨格が再構築され、sealing-zone 様の輪状構造を形成する事、さらに(3) （細胞辺縁から細胞中心へ向かい、）最終的に（閉鎖空間、または骨基質に向けて）へ放出される lysosome の細胞内輸送が誘導される事を見いだした。また、(4)これら一連の細胞骨格の再構築およびリソソームの輸送には、微小管の脱アセチル化が必須であり、(5)そのスイッチングの制御にチロシンキナーゼ Syk が関わっている事を示した。

【方法と結果】

ヒト末梢血をフィコールで遠心分離し、単核球層を回収、鉄ビーズの結合した抗 CD14 抗体を用いて 95%以上の精度で単球を分離した。

この単球を Vitronectin を塗布したガラスディッシュ上にて、MCSF 及び RANKL 存在下で 21 日間培養した。多核化、TRAP 陽性化、カテプシン K の産生を解析し、成熟破骨細胞である事を確認した。

マクロファージの酸性顆粒放出に ATP がリガンドとして関わっているとの報告があり、マクロファージを由来とする破骨細胞においても ATP が骨吸収シグナルの開始リガンドとして作用することを検討した。骨(象牙質)切片上で分化した破骨細胞を 0.5mM ATP で刺激し、20 時間後に象牙質切片を回収、骨吸収窩(dentin pit)の形成を確認したところ、コントロールに比べて pit 形成の有意な増加が確認された。

ATP をリガンドとする受容体にはイオンチャネル型の P2X 受容体と、G 蛋白質結合型の P2Y 受容体が既に知られている。P2X 受容体サブタイプのうち、P2X7 の強力な agonist である 0.3mM BzATP においても同様に dentin pit の形成が有意に増加した。しかし BzATP は他のサブタイプにも作用することより、

受容体同定の実験を行った。その結果、P2X4、P2Y2 受容体に作用する低濃度の ATP、P2Y1 受容体に作用する ADP や、P2Y2 受容体に作用する UTP 刺激では dentin pit の形成に増加を認めなかったが、P2X7 受容体に特異的な高濃度の ATP 刺激では、増加した。また、P2X7 受容体をアロステリックに阻害する BBG で前処理した破骨細胞では、BzATP 刺激による pit の増加は認められなかった。更に、レンチウイルスを用いて P2X7-shRNA を破骨細胞に導入した場合、ATP 刺激依存性の sealing-zone/シーリングゾーンの形成が抑制される事を確認した。以上から、破骨細胞の骨吸収に ATP-P2X7 受容体を介したシグナルが関与する事を示した。

次に、この ***in-vitro*** での破骨細胞の骨溶解の実験系を用いて、破骨細胞がどのようにして sealing zone を形成するのかを免疫染色により追跡した。その結果、接着面において、アクチンを中心とした接着斑である podosome の集積に、規則的な変化があることを見いだし、5 段階 stage に分類した。

ATP 刺激前、破骨細胞の接着面に分布する既存の podosome は、ATP-P2X7 受容体刺激により、数分以内に完全に崩壊(Stage1)し、リモデリングを開始した。刺激後 30 分程で接着面全域を覆う podosome が出現(Stage2)し、刺激後 1 時間で接着面の中央より podosome のターンオーバーによる podosome の消失(Stage3:消失面の直径は接着面の直径の半分以下)がみられた。刺激後 2 時間迄に、podosome が消失した領域が拡大し、podpsome によるアクチンリングが形成され sealing zone 様構造が出現した(Stage4:消失の直径は、接着面の直径の 1/2~4/5)。そのアクチンリングは、刺激後 4 時間で更に薄くなり (Stage5:消失面の直径は、接着面の 4/5 を超えて拡大)、リング構造は崩壊した。

また、リソソームの動きにも規則性を認め、ATP 刺激に伴い、刺激後 1 時間から 2 時間にかけて細胞の中心方向へ顆粒を集約する動きが観察された。

これら細胞骨格のリモデリングやリソソームの細胞内輸送を制御する ATP-P2X7 受容体の下流にある分子を同定する為、骨格や輸送に関わる α-tubulin に着目した。輸送方向に影響を与える事が知られている α-tubulin の転写後修飾のアセチル化を調べた。その結果、ATP 刺激 30 分前後の、podosome が接着面の全面を覆う stage2 では、α-tubulin のアセチル化の修飾が増強した。さらに ATP 刺激 2 時間前後では、細胞中央での podosome の消失面積が拡大しアクチンリングが形成され (Stage4)、α-tubulin のアセチル化が弱まる(脱アセチル化の)傾向が確認された。

Podosome の形成と α-tubulin のアセチル化(外向き輸送を促進)、podosome のターンオーバーと α-tubulin の脱アセチル化(内向き輸送を促進)が、破骨細胞の機能に重要であると仮説を立てた。細胞質内の脱アセチル化酵素で知られる HDAC6 をターゲットとして、その阻害剤の一つである TSA を用いて、破骨細胞の骨溶解能への影響を調べた。

TSA(10μM)で前処理した破骨細胞は、脱アセチル化酵素が阻害される事により、α-tubulin の過剰なアセチル化を起こし、アセチル化—脱アセチル化のスイッチングが阻害される。TSA 前処理により、ATP 刺激による dentin pit の形成が有意に減少した。また、ATP 刺激に伴う CathepsinK の放出も、TSA 前処理により有意に減少する事が判明した。さらに、アクチンリングの形成においても、TSA 前処理により stage2 から 3 への移行が抑制され、stage2 で停止した。細胞骨格にひきつづき、細胞内の酸性顆粒の輸送についても、TSA 前処理を行った細胞では、ATP 刺激に伴う内向きの輸送が減少した。これらの結果より、α-tubulin のアセチル化ー脱アセチル化のスイッチングが破骨細胞の骨溶解能に重要である事が示された。

では、このスイッチングを制御する分子は何であるのか検討した。破骨細胞においては、RhoA が HDAC6 を制御している事がすでに報告されており、マクロファージにおいては、Syk が Vav-RhoA の上流で機能することを、我々が既に報告していることから、Syk と α-tubulin のアセチル化/脱アセチル化の関連性について検討した。

ヒト単球・マクロファージ系の HL60 細胞株を用い、活性型 vitaminD3、TPA、RANKL で分化し、7 日目で多核、TRAP 陽性の破骨細胞様の細胞を得ることが出来た。Dentin slice 上で分化した HL60 においても、ATP 刺激依存性の pit 形が確認された。

レンチウイルスを用いて Syk を過剰発現させた細胞株で Syk のチロシンリン酸化の変化を W.B.にて調べたところ、ATP 刺激 1 時間後での有意な上昇が確認され、更に、ATP 依存性に Syk と HDAC6 が共沈することを確認した。さらに Syk の役割を解析する為、Syk の発現を抑制した shRNA-Syk/HL 株とその抑制を解除した rescue-Syk/shRNA-Syk/HL 株を作製した。これらの変異 HL60 細胞株は、親株である HL60 同様に、多核で TRAP 陽性を示す破骨細胞様細胞に分化することを確認した。ATP 刺激依存性の骨溶解能を象牙質切片上で比較したところ、親株に比し shRNA-Syk 株で dentin pit の形成が著明に抑制され、rescue-Syk 株では pit 形成の抑制が回復した。Syk が破骨細胞の骨溶解能に必要である事が確認できた。そこで、Syk が、α-tubulin のアセチル化に影響を与えるかを調べた。

破骨細胞様に分化させた上述の細胞株を、可逆的な脱アセチル化酵素阻害剤である TSA で前処理し、アセチル化を過剰にした。その後 TSA を取り除いて、脱アセチル化の速度を比較した。結果、shRNA-Syk 株では、脱アセチル化の速度が親株に比べて遅く、rescue-Syk 株ではその遅れが回復、Syk が HDAC6 など脱アセチル化酵素の活性を調節していることが示唆された。

【考察】

今回、我々は ***in vitro*** で骨溶解能を解析する為の実験系を構築し、ATP が P2X7 受容体を介して破骨細胞の骨溶解能を開始させる事を新たに示した。骨溶解の過程で段階的な podosome の再構築と lysosome の輸送を見いだした。 更に、α-tubulin の脱アセチル化が破骨細胞の骨溶解能に重要である事を示し、チロシンキナーゼ Syk が脱アセチル化を上流で調節している事を示唆した。

破骨細胞においては、骨溶解能に微小管の脱アセチル化が重要であり、今後の新たな薬剤ターゲットとなる可能性を示唆した。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2048号	氏　名	陌間 亮一
論文題目 Title of Dissertation	ATP-induced osteoclast function; the formation of sealing-zone like structure and the secretion of lytic granules via microtubule-deacetylation under the control of Syk （破骨細胞において ATP/P2X$_7$受容体シグナルにより誘導される微小管のアセチル化制御を介した骨吸収の分子機構の解析）		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 片岡 徹 副　査 Vice-examiner 南 康博 副　査 Vice-examiner 堀田 博		
審査終了日	平成２１年　7月 21 日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

破骨細胞は、生体における骨の再構築（骨リモデリング）に必須の役割を果たしている。すなわち、骨内部において、酸性の骨分解顆粒を放出して骨を分解し（骨吸収）、それを補うべく骨芽細胞が再形成をおこなっている。正常な骨はこのバランスにより維持されており、その破綻は重篤な疾患や病態をもたらす。しかし、破骨細胞による骨吸収の分子機構は未だ十分には明らかにされていない。

本研究者は、破骨細胞による骨吸収のメカニズムについて研究し、ATP を介する破骨細胞の活性化にチロシンキナーゼ Syk が関与することをシーリングゾーンの形成とαチューブリンのアセチル化を指標に検討した。

破骨細胞は、血液・免疫細胞の一つであるマクロファージが細胞融合して生じる多核の細胞である。申請者はまず、*in vitro* でヒト末梢血由来単球、およびヒト白血病細胞株を破骨細胞に分化するシステムを確立した。さらに、破骨細胞に骨吸収を開始させる細胞外リガンドを探索し、ATP 刺激により、破骨細胞が活性化され、象牙質切片上において骨成分の分解を亢進する事を見いだした。引き続いて、ATP が認識する受容体を同定するために、特異的リガンドおよび阻害剤による検討を行い、複数の核酸受容体（P2X, P2Y）の中でも、P2X$_7$が、ATP 刺激依存性に骨溶解を開始させる主な受容体であることを見いだした。

次に、本研究者は、ATP/P2X$_7$ 受容体から骨吸収に至るプロセスを細胞骨格の再構築とリソソーム様顆粒の動きに焦点を当てて解析を行った。その結果、(1) 破骨細胞では、ATP 刺激により、速やかに既存のアクチン細胞骨格が崩壊し、その後、F-アクチンの集積構造である podosome の斑点状の形成、段階的な変化を経て、環状の接着帯シーリングゾーンの形成に至ること、(2) このアクチンの変化に呼応するように、骨分解酵素を含んだリソソーム様顆粒の輸送が亢進し、シーリングゾーンの環の内側領域に向かって移動した後、破骨細胞直下に放出されることを示した。

さらに、本研究者は、ATP 刺激により、微小管の構成成分であるαチューブリンのアセチル化（K44）の亢進とその後の脱アセチル化が認められることに注目し、αチューブリンのアセチル化の変動が、骨吸収のプロセスに影響を与えるかどうか

検討した。脱アセチル化阻害剤による過剰なアセチル化は、シーリングゾーンの形成と骨分解顆粒の輸送を可逆的に停止させた。この結果より、αチューブリンのアセチル化のダイナミックな制御、すなわち ATP 刺激後のアセチル化の亢進とその後の脱アセチル化が、骨吸収のプロセスであるシーリングゾーンの形成と骨分解顆粒の放出に必須の反応であると結論づけた。

最後に、本研究者は、すでに骨リモデリングへの関与が報告されているチロシンキナーゼ Syk と上記αチューブリンのアセチル化制御の関わりについて、Syk-shRNA を安定的に発現する HL60 細胞株（Syk-shRNA/HL）、および、Syk を再導入した HL60 細胞株を作成して検討した。Syk-shRNA/HL では、脱アセチル化阻害剤を除去した後の脱アセチル化回復の反応速度が、HL60 親株に比して低下していたが、Syk の再導入によりこの低下が解除され、Syk がαチューブリン-脱アセチル化反応の上流で機能していることが示唆された。

本研究は、破骨細胞による骨吸収について、その $P2X_7$ 受容体を介した ATP シグナルによる制御機構を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったαチューブリンのアセチル化制御を介したシーリングゾーン形成と骨分解顆粒の輸送の誘導、ならびに、αチューブリンのアセチル化調節におけるチロシンキナーゼ Syk の関与について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。