

<研究課題> 骨粗鬆症の克服を目指した骨芽細胞制御ネットワークの解明

代表研究者 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
腎・免疫・内分泌代謝内科学 助教 松本 佳則
共同研究者 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
大学院生 浅野 洋介

【まとめ】

YAPはHippo経路の下流で細胞増殖を促進する転写共役因子である。近年YAPが骨芽細胞分化を促進し、脂肪細胞分化を抑制することが報告され、我々は、ABLがYAPとの相互作用を介してこの働きを制御しているのではないかと考えた。本研究ではABLとYAPの相互作用に骨芽細胞必須転写因子のRUNX2が関与することを明らかにし、その分子生物学的メカニズムの一端を解明した。

1. 研究の目的

健康で豊かな長寿社会を実現させる為には、骨粗鬆症の予防、改善が急務である。50歳以上の日本人女性の3割が骨折や寝たきりの原因となる骨粗鬆症を発症する為、骨形成、骨吸収を担う骨芽細胞及び破骨細胞を制御する機序の解明は骨粗鬆症の克服に必須の研究テーマであるが、未だその詳細は不明である。申請者はこれまで、チロシンキナーゼを活性化するアダプター蛋白、3BP2に着目し、多くの報告をしてきた。留学したトロント大学のProf. Robert Rottapel研究室では、3BP2がチロシンキナーゼABLを活性化させ、ABLが下流の骨芽細胞必須転写因子RUNX2やその転写共役因子TAZをチロシンリン酸化させることで、骨芽細胞分化を促進させることを明らかにした。骨芽細胞の骨形成促進に着目したこれまでの研究成果は、骨粗鬆症を改善させる新たな治療薬開発への寄与が期待される。我々は最近の研究（未発表）から、ABLが骨芽細胞内でYAP (yes-associated protein)に結合する事を見出した。YAPはHippo経路の下流で細胞増殖を促進するtranscription co-activatorであり、細胞同士が接触するとHippo経路が活性化してYAPが抑制され、細胞増殖能が低下する。ところが、近年YAPが骨芽細胞分化を促進し、脂肪細胞分化を抑制することが報告され、YAPは骨芽細胞や脂肪細胞の起源となる間葉系幹細胞の運命決定因子である事が明らかとなった。我々は、ABLがYAPとの相互作用を介してこの働きを制御しているのではないかと考えた。本

研究の目的として、細胞増殖に関する転写共役因子YAPに着目し、ABLがYAPを介して骨芽細胞分化を促進し、脂肪細胞分化を抑制する機序を明らかにする。

2. 研究方法と経過

本研究は、下記4点について検討する。

① RUNX2/YAP/ABLの関係について：

我々は最近の研究から、ABLがYAPに結合する事を見出した。YAPはHippo経路の下流で細胞増殖を促進するtranscription co-activatorであり、細胞同士が接触すると、Hippo経路が活性化してYAPが抑制され、細胞増殖能が低下する。これまでYAPが骨芽細胞必須転写因子RUNX2に結合することは報告されているが、骨芽細胞分化における機能は明らかになっていない。そこでまず我々は、293T細胞を使用した強制発現モデルを用いて、RUNX2/YAPの結合におけるABLの役割を明らかにする。

② RUNX2の骨芽細胞における転写活性の検討：

RUNX2は転写因子であり、ターゲット遺伝子のオステオカルシンのプロモーター領域に結合し、遺伝子発現促進を介して、骨芽細胞分化及び石灰化を増強させる。RUNX2の転写活性におけるYAP、ABPの役割を検討するため、ルシフェラーゼベクターを用いて、プロモーターアッセイを行う。

③ 骨芽細胞内におけるABL、YAP発現量と骨芽細胞分化について：

長期の骨芽細胞培養で安定的にABLを発現させる為、レトロウイルスベクター(pMx-ABL-FKBP)を作成し、パッケージング細胞から産生されたレトロウイルスを用いて骨芽細胞への遺伝子導入を行う。FKBPはFK506結合タンパクの略で、通常は単体で存在するが、FKBPリガンド(AP20187, ARIAD)を培地内に添加すると二量体を形成し、FKBPと共に二量体化したwild-type ABLは自己リン酸化を介し

て活性型 ABL となる。このシステムにより、繊細な骨芽細胞に対する活性型 ABL の作用を必要時のみとする事ができる。3-4 日齢マウス (pups) の頭蓋骨より抽出した骨芽細胞または SaOS-2 細胞 (ヒト骨肉腫細胞) に、ウィルスを介してコントロールベクターまたは ABL-FKBP 遺伝子を導入し、AP20187 を 50 nM 添加した骨芽細胞分化培地で 2-4 週間培養の後、アリザリンレッド染色にて石灰化の有無を比較する。更にこれらの細胞を用いて、ABL の作用により YAP と RUNX2 の相互作用が促進し、その結果オステオカルシンの発現が増強している事を、定量 PCR やウェスタンブロット法にて確認する。

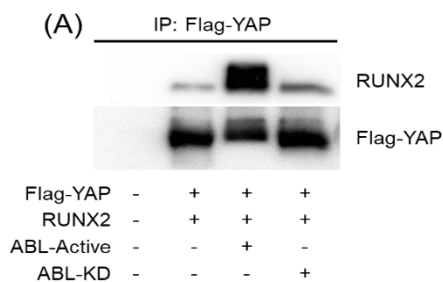
④ RUNX2 の転写活性におけるチロシンリン酸化の意義：

ABL による YAP と RUNX2 の結合制御メカニズム解明の為、活性型 ABL、RUNX2 を共発現させた細胞を用いて、RUNX2 のチロシンリン酸化部位を詳細に検討する。

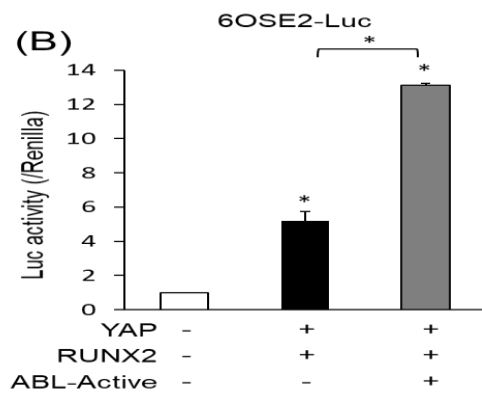
3. 研究の成果

1. ABL は YAP と RUNX2 のチロシンリン酸化を通して骨芽細胞分化を促進する。

骨芽細胞必須転写因子の RUNX2 は骨芽細胞分化の過程でターゲット遺伝子であるオステオカルシンのプロモーターに結合し、その発現を促進する。驚くべき事に、ABL-Active (恒常的キナーゼ活性型 ABL) を YAP、RUNX2 と共発現させた HEK293T 細胞を用いて免疫沈降 (IP) にて検討すると、YAP と RUNX2 の結合が ABL 共発現により著明に増強した (図 A)。一方 ABL-KD (キナーゼ欠損型 ABL) では YAP と RUNX2 の結合増加は見られなかった (図 A)。



また YAP と RUNX2 の結合促進に伴う骨芽細胞分化マーカーの変化を調べる為、オステオカルシンプロモーターのルシフェラーゼ活性 (6OSE2-Luc) を 293T 細胞にて検討した。RUNX2 に YAP を共発現させるとプロモーター活性を強く促進したが、そこに ABL-Active を共発現させると、更に活性が増強した (図 B)。ABL-KD では増強効果は見られなかった。



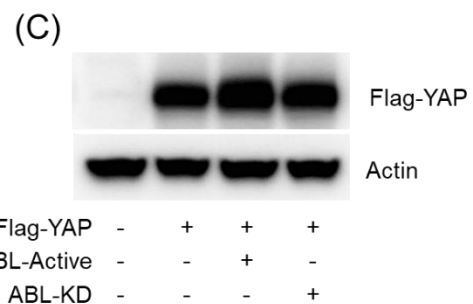
2. ABL は YAP/RUNX2 にキナーゼ依存的に結合する。

加えて ABL が YAP、RUNX2 に結合し、チロシンリン酸化する事も分かった。ABL の YAP/RUNX2 に対する結合は、ABL キナーゼ依存的であることも明らかになった。そこで我々は、「ABL がチロシンリン酸化を通して両者の結合を促進させ、RUNX2 の転写活性を促進している」との仮説を立てた。

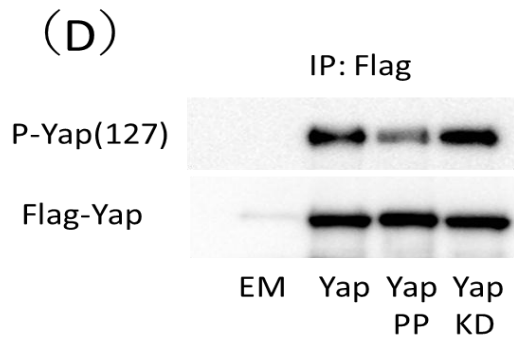
3. ABL 誘導性の RUNX2 のチロシンリン酸化は RUNX2 の転写活性に重要である。

我々は RUNX2 の全てのチロシンをフェニルアラニンに置換したベクターを作製し、RUNX2 の転写活性及び ABL により増強される YAP との結合について検討した。その結果、RUNX2 のチロシン置換型は ABL 存在下でも YAP との結合が阻害され、転写活性も極めて低いことが明らかとなった。

4. ABL は YAP を安定化する。



本研究の中で我々は、活性型 ABL は YAP の細胞内発現量を増加させることに気がついた (図 C)。これは posttranscriptional modification であった。更に機序の解明として我々は、ABL と Hippo 経路の関係に注目した。YAP は自らの WW ドメインを介して LATS1/2 の PPXY モチーフと結合する。LATS1/2 により S127 がリン酸化された YAP は 14-3-3 タンパクと結合し、核内移行が阻害され分解される。興味深いことに ABL が YAP (S127) を脱リン酸化することを見出した (図 D)。



核内移行した YAP は、細胞増殖促進転写因子 “TEAD” と結合の後、下流の Cyr61 (Cysteine-rich protein 61)、CTGF (Connective tissue growth factor) 等、細胞増殖を促進する因子を発現させて、細胞増殖能を高めている。今後我々は、HEK293T 細胞において、YAP/TEAD 誘導性の Cyr61、CTGF の mRNA 量を検討し、ABL、YAP の細胞増殖能に関わる機能を検討する。更にこれらの研究を通して、骨芽細胞分化や増殖における YAP、RUNX2 を介した ABL の機能を明らかにする。

5. ABL は骨芽細胞分化を促進する。

我々は前述のレトロウイルスベクターを作製し、パッケージング細胞から産生されたレトロウイルスを用いて Saos-2 細胞(ヒト骨肉腫細胞株)に、ウイルスを介して ABL 遺伝子を導入した。その結果、ABL 導入の骨芽細胞は分化が促進し、石灰化能が亢進することが明らかとなった。今後この細胞を用いて、YAP/RUNX2 ノックダウンにおける、骨芽細胞分化・石灰化能及び増殖能について検討する。

4. 今後の課題

骨芽細胞分化に関わるメカニズムの解明は、これまで破骨細胞のみをターゲットとした治療薬が中心であった骨粗鬆症の治療戦略に、大きなインパクトを与える。本研究の推進は、“ABL、YAP を介して骨芽細胞分化を促進させる事で、破壊された関節や低下した骨量を回復させる”という、画期的な治療法の開発に繋がる為、大変重要である。また本研究は、慢性骨髄性白血病において現在主要な治療薬となっている“イマチニブ”などの ABL 阻害薬で起こりうる副作用の機序の解明という観点からも、臨床的に大きな意義があると考えている。更に YAP は Hippo 経路で細胞増殖を制御する重要な因子

であり、YAP の異常増加が悪性腫瘍の発症に関連することが報告されている。Bone Biology を基礎とした YAP 発現の制御メカニズムの解明が、Cancer Biology にも応用できると考えている。まだ本研究は道半ばで、in vitro での検討を重ねる中で、今後 YAP ノックアウトマウスを用いて in vivo での検討を行いたい。また脂肪細胞分化における ABL/YAP/RUNX2 相互作用の関わりも明らかにしたい。更に骨研究から他領域研究への応用という観点からも本研究の成果を普遍化していきたい。

5. 研究成果の公表方法

本研究は、in vivo での検討が終わった段階で学術論文としてまとめ、国際雑誌に投稿予定である。またその成果を日本リウマチ学会、日本骨代謝学会、アメリカリウマチ学会などに発表する予定である。本研究の成果をより広く広報できるよう全力を尽くす。本研究をご支援頂きました三井住友海上福祉財団の皆様方に感謝申し上げます。