Osaka University Knowledge Archive

Title	RANKLによる破骨細胞分化におけるCalcineurin結合タンパク質PICK１の関与
Author(s)	飯田, 務
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49249
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【10】

氏　　名	飯　田　　務（いい だ つとむ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２１９１２　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年３月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学　位　論　文　名	**RANKL による破骨細胞分化における Calcineurin 結合タンパク質 PICK1 の関与**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　矢谷　博文 （副査） 教　授　上﨑　善規　　准教授　島袋　善夫　　准教授　西村　理行

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

骨は吸収と形成を繰り返し、骨代謝およびカルシウム代謝を調節しながらダイナミックにリモデリングを行っている。骨リモデリングは骨吸収を司る破骨細胞と、骨形成を担う骨芽細胞の細胞数および機能のバランスの上に成り立っている。しかし、炎症、加齢、閉経、ストレスなど様々な要因により破骨細胞による骨吸収が亢進すると、このバランスが崩れ、骨密度が低下して歯周病や骨粗鬆症などの代謝性骨疾患が発症する。高齢化に伴って増加しているこれらの骨吸収が亢進する疾患に対応するためには、破骨細胞分化の分子メカニズムを明らかにし、破骨細胞形成を選択的に阻害する有効な手段の確立が望まれる。

近年、腫瘍壊死因子（TNF）ファミリーに属する Receptor Activator of NF-κB Ligand（RANKL）が、破骨細胞表面に発現する受容体 Receptor Activator of NF-κB（RANK）と結合することにより、細胞内へそのシグナルを伝達し、最終的にその経路を統合するマスター転写因子 Nuclear Factor of Activated T cells 1（NFATc1）を誘導、活性化して破骨細胞を分化誘導することが明らかにされた。

NFATc1 は脱リン酸化することにより核内へ移行して転写を活性化するため、脱リン酸化酵素である Protein Phosphatase 2B（Calcineurin）の関与が示唆されているが、未だ不明な点が多く残っている。そこで、本研究においては、RANKL による破骨細胞の分化制御メカニズムを明らかにするため、破骨細胞分化における Calcineurin シグナル経路の役割を検討し、さらに、Calcineurin の新たな制御機構を見出すために、Calcineurin と結合するタンパク質を探索した。

【方法】

マウス骨髄細胞およびマウス単球系細胞株 RAW264.7 細胞より破骨細胞、破骨細胞様細胞を分化誘導した。soluble RANKL（sRANKL）により NFATc1 が活性化されるか否かをリアルタイム PCR を用いて NFATc1 mRNA の発現量の変化を調べることにより検討した。Calcineurin 阻害剤である Tacrolimus を用いて TRAP 染色後の破骨細胞形成数および NFATc1 mRNA の発現量の変化を検討した。

Yeast Two Hybrid を用いて Calcineurin の機能サブユニットである Calcineurin B と結合するタンパク質をスクリ

ーニングした。スクリーニングにより同定された Protein interacting with C kinase 1（PICK1）と Calcineurin B の酵母における結合特異性を確認するとともに、結合部位を検討した。PICK1 は PDZ ドメインと呼ばれる特徴的な分子構造をもっており、他のタンパク質と結合する際に、C 末端に規則性をもつ３アミノ酸配列を認識し結合することが知られている。Calcineurin B はこのアミノ酸配列をもつことから、PCR を用いて Calcineurin B の C 末端３アミノ酸欠失変異体を作製し、Yeast Two Hybrid を行うことで Calcineurin B と PICK1 の結合について検討した。さらに、Calcineurin B の GFP 付加発現ベクターおよび PICK1 の V5 タグ付加発現ベクターを作製し、ヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞に遺伝子導入し、免疫沈降を行った。また、破骨細胞での Calcineurin B と PICK1 の結合を確認する目的で免疫沈降を行った。

【結果および考察】

NFATc1 mRNA の発現量は、マウス骨髄細胞および RAW264.7 細胞から破骨細胞への分化過程において sRANKL 処置後１日目より増加したが、この増加は Calcineurin 阻害剤の Tacrolimus により抑制された。また、マウス骨髄細胞および RAW264.7 細胞を分化誘導すると、破骨細胞の形成が認められたが、Tacrolimus を作用させると破骨細胞の形成は濃度依存的に抑制された。

Yeast Two Hybrid を用いて Calcineurin B と結合するタンパク質の一つとして PICK1 を同定した。酵母において、Calcineurin B と PICK1 は結合し、Calcineurin B の C 末端３アミノ酸欠失変異体と PICK1 は結合しなかった。HEK293 細胞においても同様に結合し、Calcineurin B の C 末端３アミノ酸欠失変異体と PICK1 は結合しなかった。破骨細胞において、PICK1 の発現が認められ、Calcineurin B と PICK1 の結合も確認された。

以上の結果より、破骨細胞分化機構において Calcineurin が重要な役割を果たすことが確認された。また、PICK1 は Calcineurin B の C 末端３アミノ酸を認識して結合することが明らかとなった。PICK1 は、これまで神経系での発現が確認されており、シナプスで重要な役割を果たすことが知られている。破骨細胞分化とともに PICK1 の増加が認められたことより、分化に関与している可能性が示唆された。今後、破骨細胞分化機構における PICK1 分子の役割を明らかにすることで PICK1 分子あるいはこれに関与する分子をターゲットとした骨吸収抑制薬剤の開発につながる可能性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、RANKL による破骨細胞分化における Calcineurin シグナル経路の役割を検討するために、Calcineurin と結合するタンパク質を探索したものである。

RANKL による破骨細胞分化において、Calcineurin の阻害剤である Tacrolimus 処置により分化が抑制された。Calcineurin 活性を調節している Calcineurin B サブユニットは、その C 末端領域で PDZ ドメインをもつ PICK1 に結合して、破骨細胞分化を促進する情報伝達を行うことを明らかにした。

以上の結果は、破骨細胞分化機構における新たなシグナル伝達経路を解明したものであり、博士（歯学）の学位取得に値するものと認める。