

206. 骨粗鬆症克服を目指した骨芽細胞ネットワークの解明

松本 佳則

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

Key words : ABL, RUNX2, 骨芽細胞

緒言

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。我々はこれまで、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、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 [1]。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 ABL が骨芽細胞内で YAP (yes-associated protein) に結合することを見出した。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 [2]。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ことが明らかとなった [3]。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、細胞増殖に関する転写共役因子 YAP に着目し、ABL が YAP と RUNX2 を介して骨芽細胞分化を促進する機序を明らかにした。

方法および結果

1. ABL は 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

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 の役割を明らかにした。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。驚くべきことに、ABL-Active (恒常的キナーゼ活性型 ABL) を YAP、RUNX2 と共発現させた HEK293T 細胞を用いた免疫沈降 (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 1A)。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 1A)。

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。

2. ABL は YAP/RUNX2 に結合する

加えて強制発現モデルの IP にて ABL が YAP、RUNX2 に結合することも分かった。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によるRUNX2のチロシンリン酸化がYAPとの結合に重要である

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1B)。これはposttranscriptional modificationであった。更にその機序として、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1C)。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。

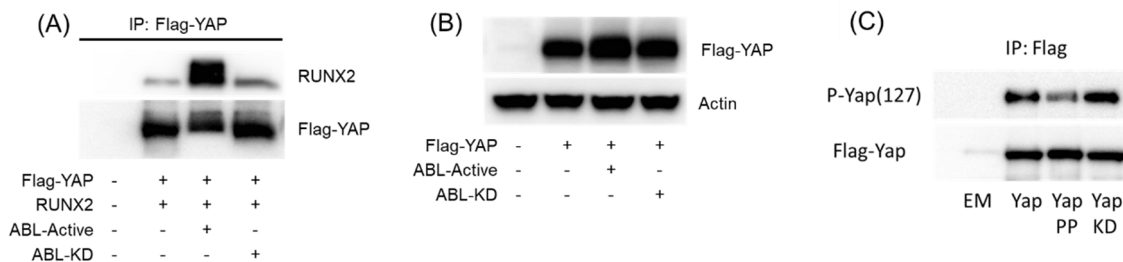


図1. RUNX2とYAPの結合は活性型ABLによりコントロールされる

図中に記載の遺伝子をHEK293T細胞に強制発現させ、免疫沈降(A、C)、ウェスタンブロット(B)にて解析した。ABL-PP: 恒常活性型ABL、ABL-KD: 不活性型ABL。

考 察

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ことで、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。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、University of Toronto の Prof. Robert Rottapel である。

文 献

- 1) Matsumoto Y, La Rose J, Kent OA, Wagner MJ, Narimatsu M, Levy AD, Omar MH, Tong J, Krieger JR, Riggs E, Storozhuk Y, Pasquale J, Ventura M, Yeganeh B, Post M, Moran MF, Grynepas MD, Wrana JL, Superti-Furga G, Koleske AJ, Pendergast AM, Rottapel R. Reciprocal stabilization of ABL and TAZ regulates osteoblastogenesis through transcription factor RUNX2. *The Journal of Clinical Investigation*. 2016 Dec 1;126(12):4482-4496. doi: 10.1172/JCI87802.
- 2) Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & Development*. 2016 Jan 1;30(1):1-17. doi: 10.1101/gad.274027.115.
- 3) Tang Y, Rowe RG, Botvinick EL, Kurup A, Putnam AJ, Seiki M, Weaver VM, Keller ET, Goldstein S, Dai J, Begun D, Saunders T, Weiss SJ. MT1-MMP-dependent control of skeletal stem cell commitment via a β 1-integrin/YAP/TAZ signaling axis. *Developmental Cell*. 2013 May 28;25(4):402-16. doi: 10.1016/j.devcel.2013.04.011. Epub 2013 May 16.