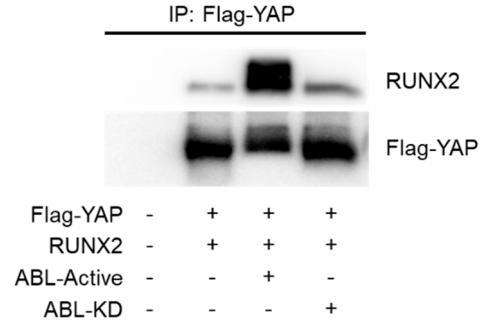
206　骨粗鬆症克服を目指した骨芽細胞ネットワークの解明	松本　佳則

【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。我々はチロシンキナーゼ 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。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。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、細胞増殖に関与する転写共役因子 YAP に着目し、ABL が YAP を介して骨芽細胞分化を促進する機序を明らかにした。

【方法】1. RUNX2／YAP／ABL の関係について : 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. 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。

【結果】ABL は骨芽細胞必須転写因子 RUNX2 と YAP との結合を促進し、RUNX2 の転写活性を高め、骨芽細胞分化を促進する可能性が示された。この作用は ABL キナーゼ活性依存的であった。また ABL は YAP、RUNX2 に結合し、ABL が RUNX2 と YAP の結合を仲介する蛋白である可能性が示された。また本研究で我々は、活性型 ABL が YAP の細胞内発現量を増加させる可能性があることに気がついた。これは posttranscriptional modification であった。更にその機序として、ABL が YAP のセリン残基の脱リン酸化を促進していることを見出した。

RUNX2 と YAP の結合は活性型 ABL によりコントロールされる



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、細胞増殖に関与する転写共役因子 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ィ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ィルスを用いて Saos-2 細胞（ヒト骨肉腫細胞株）に、ウィルスを介して *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。

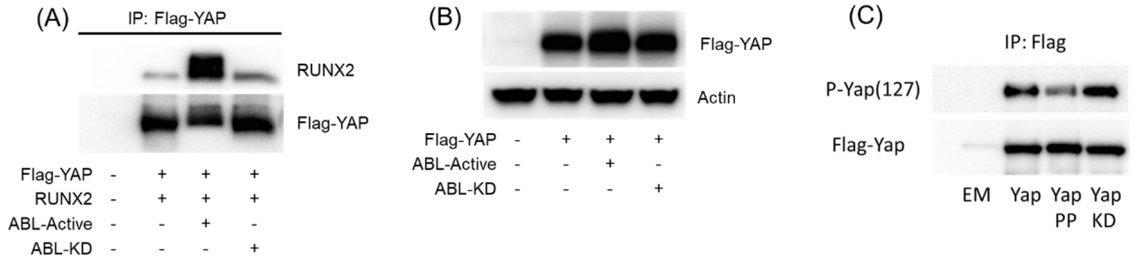


図 1. RUNX2 と YAP の結合は活性型 ABL によりコントロールされる

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, Grynpas 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 β1-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.