

細胞外L-セリンは破骨細胞分化における
RANKL-RANKシグナル伝達系活性化に必須である

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

小川拓哉, 酒井俊樹, 古賀慎太郎, 西田織衣, 的場祐衣, アントン・バーティアル, 北川(石田)教弘, 竹家達夫

An essential role of extracellular L-serine for RANKL-induced osteoclastogenesis *in vitro*

Takuya Ogawa, Toshiki Sakai, Shintaro Koga, Oriie Nishida, Yoshie Matoba,
Anton Bahtiar, Norihiro Ishida-Kitagawa, and Tatsuo Takeya

Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology

細胞外L-セリンは破骨細胞分化における RANKL-RANKシグナル伝達系活性化に必須である

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

小川拓哉, 酒井俊樹, 古賀慎太郎, 西田織衣, 的場祐衣, アントン・バーティアル, 北川(石田)教弘, 竹家達夫

An essential role of extracellular L-serine for RANKL-induced osteoclastogenesis *in vitro*

Takuya Ogawa, Toshiki Sakai, Shintaro Koga, Ori Nishida, Yoshie Matoba,
Anton Bahtiar, Norihiro Ishida-Kitagawa, and Tatsuo Takeya

Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology

【背景・目的】

破骨細胞は骨吸収活性を有し、骨を形成する骨芽細胞とともに骨代謝における主役を司る。細胞の分化系列としては血球系、特に単球/マクロファージ系に属し、その分化過程において細胞融合により多核化するという特徴を有する¹⁾。破骨細胞分化には、骨芽細胞などの間葉系支持細胞より産生される二種類のサイトカイン、M-CSFおよびRANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) が重要である。このうちM-CSFは生存因子としての作用が主であり、RANKLから受容体RANKを介して伝えられるシグナルこそ、破骨細胞分化における中心的役割を担っている。RANK下流ではNF- κ B, p38など複数の経路が活性化されるが、これらの様々なシグナルは下流で破骨細胞分化に必須の転写因子NFAT2/NFATc1の誘導・活性化へと統合される。*in vitro*では、初代骨髄細胞やマウスマクロファージ細胞株RAW264などをRANKLおよびM-CSF存在下で培養することで、破骨細胞へと誘導可能である。我々は過去に*in vitro*での破骨細胞分化は前駆細胞の密度と逆相関し、高細胞密度条件下ではRANKL刺激によるNFAT2の誘導が抑制され、分化が強く阻害されることを報告した²⁾。しかしながら、前駆細胞が細胞密度を感知する機構やその生理的意義については依然として不明である。今回は破骨細胞分化の細胞密度依存性に関する我々の研究から、培地中のL-Ser (以下Ser) の分化における重要性とその分子機構について報告する³⁾。

【方法】

前駆破骨細胞には、C57B/6 マウス (オス, 6~9 週齢) より調製したマウス骨髄マクロファージ (BMM), またはRAW264を用いた。培地は10% FBS/ α -MEM (BMM) または10% FBS/1% MEM Non-essential Amino Acid Solution (NEAA, Sigma)/E-MEM (RAW264) を用いた。なおSer・Gly除去の際は、血清として透析FBSを用いた。破骨細胞の誘導は、まず前駆

細胞を 1.2×10^4 細胞/ cm^2 で播種し、翌日100ng/mL M-CSF (RAW264では不要), 500ng/mL GST-RANKL (以下RANKL) 含有培地に交換し、3日後に再度培地を交換して計4日間RANKL存在下に培養することで行った。破骨細胞の形成は、分化マーカーである酒石酸耐性酸性フォスファターゼの活性を指標に確認した。アミノ酸の定量分析には全自動アミノ酸分析装置JLC-500/V (日本電子) を用いた。また遺伝子導入にはレトロウイルスベクターを用いた。

【結果】

通常よりも16倍高密度の 2×10^5 細胞/ cm^2 で播種したRAW264の培養上清を回収し、通常の分化条件で播種した細胞に対してRANKL刺激を行ったところ、高密度条件下と同様に分化が抑制され、刺激後12~24時間におけるNFAT2の誘導も著しく低下していた。この培養上清に1%NEAAを新たに添加したところ、破骨細胞形成の回復が見られた。そこでNEAAに含まれるGln以外の非必須アミノ酸7種類 (Ala, Asn, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser) をそれぞれ除去した場合のNFAT2の誘導を調べたところ、Ser除去でのみ、発現の低下が認められた。さらに、上記7種のアミノ酸それぞれ一種類のみを添加したところ、Ser添加培地でのみNFAT2が強く誘導された。一方、Gly添加培地にも弱いNFAT2の誘導を認めたが、他のアミノ酸では誘導が見られず、RANKLによるNFAT2の誘導には培地中のSerが不可欠であることが示唆された。また同様の現象を初代細胞であるBMMでも確認した。

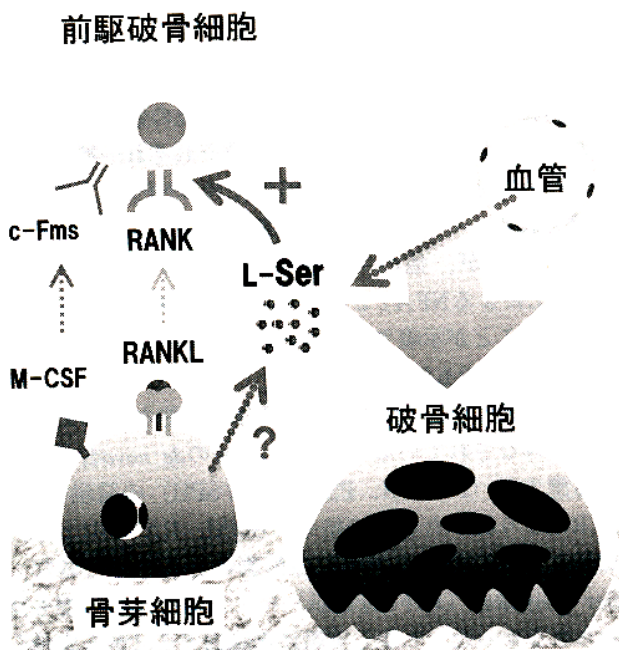
一般にSer・Glyは細胞自身で合成可能なアミノ酸であるとみなされていることから、Serの*de novo*合成に関わる酵素群 (PHGDH, PSAT1, PSPH) の発現をRT-PCRにより調べた。その結果、BMM, RAW264とも、比較した他の細胞と同様に各酵素の発現が確認され、Ser・Gly除去 (以下Ser飢餓) による発現への影響も認められなかった。しかし実際に細胞内アミノ酸を定量し

たところ、前駆細胞ではSer飢餓や高密度条件下では、Ser、Glyとも速やかに減少・枯渇することが分かった。また上記Ser合成酵素群を強制発現させても、細胞内Ser・Glyの枯渇や分化阻害に回復が見られなかった。

次に、破骨細胞分化におけるSerの作用を分子レベルでより詳しく理解するため、RANKよりNFAT 2誘導に到るシグナル伝達経路の活性化状態等について調べた結果、最上流に位置するRANKの発現自体がSer飢餓により顕著に低下していた。翻訳阻害剤シクロヘキシミド存在下にRANKの減少速度を調べたところ、RANKのタンパク質安定性に関してSer飢餓による差は認められなかった。一方、rank mRNAに関しては、BMMではSer飢餓による減少が認められたのに対し、RAW264では変化は認められず一定であった。さらに、RANKの強制発現により、Ser飢餓条件下におけるRANKの発現低下および破骨細胞分化に回復が見られた。

【考察・結論】

本研究により、1) SerはRANKの発現に必須であり、その作用はBMMとRAW264で異なる、2) Ser飢餓や細胞密度の増加は、前駆破骨細胞の細胞内Serの欠乏を招く、3) RANK強制発現細胞での結果から、RANKの発現低下はSer飢餓における分化阻害の主たる要因の一つであり、その制御はタンパク質安定性以外の段階であること、などが示唆された。このことは、前駆破骨細胞はRANKL刺激による分化に際し、細胞外Serのbioavailabilityから細胞密度を感知してRANKL応答性を規定しているという、破骨細胞分化制御の新たな一面を示唆している可能性があり、今後証明すべき課題である。脳における神経細胞の生存や突起形成では、周囲のグリ



ア細胞より供給されるSerが不可欠であることが知られているが¹⁾、破骨細胞分化の場合である骨髄微小環境においても、血中に含まれるSerに加え、骨芽細胞よりRANKLやM-CSFとともにSerも分化シグナルとして供給され、破骨細胞の分化制御に寄与している可能性がある(図1)。今後はSerによるRANK発現制御についてより詳細な解析を行うとともに、前駆破骨細胞がSerの供給を外部環境に依存する原因や生理的意義を解明し、破骨細胞やRANKが関与する骨代謝関連疾患や癌骨転移などに対する、新たなコンセプトに基づいた治療薬や予防法開発の基盤としたい。

【謝辞】

アミノ酸の定量分析にあたりご協力頂きました、本学細胞機能学講座の高木博史教授、大津巖生助教、西田郁久氏に対し、この場を借りてお礼申し上げます。

【文献】

- 1) Suda T, Takahashi N (2008) Contributions to osteoclast biology from Japan. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, **84**: 419-438.
- 2) Ishida N, Hayashi K, Hoshijima M, Ogawa T, Koga S, Miyatake Y, Kumegawa M, Kimura T, Takeya T (2002) Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis *in vitro* and elucidation of NFAT 2 as a key regulator. *J Biol Chem*, **277**: 41147-41156.
- 3) Ogawa T, Ishida-Kitagawa N, Tanaka A, Matsumoto T, Hirouchi T, Akimaru M, Tanihara M, Yogo K, Takeya T (2006) A novel role of L-Ser for the expression of NFAT 2 in RANKL-induced osteoclastogenesis *in vitro*. *J Bone Miner Metab*, **24**: 373-379.
- 4) Furuya S (2008) An essential role for *de novo* biosynthesis of L-serine in CNS development. *Asia Pac J Clin Nutr*, **17**: 312-315.

【議論】

杉原富人 分化効率や関連分子の発現のSer濃度依存性に関し、具体的なプロファイルについてはどこまで調べたのか。

小川拓哉 分化刺激後のNFAT 2の発現に関しては、0-100 μ Mの間でSer濃度を変え、濃度依存的な誘導を確認している。分化やRANKの発現に関してはSerの有無(0, 100 μ M)による影響は見ているが、Serの濃度を細かく振って調べたことはなく、今後検討したい。

杉原富人 骨芽細胞と破骨細胞との共存培養系において培地中のSer濃度を下げた場合、RANKやNFAT 2の発現低下、あるいは分化の抑制は解除されるか。