

## 論文の内容の要旨

論文題目 網羅的解析手法を用いた RANKL 誘導性破骨細胞分化メカニズムの解明

氏名 伊澤 直広

骨代謝の恒常性は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の調和のとれたバランスにより維持される。破骨細胞は骨髄マクロファージから分化し、生理的あるいは病的な骨吸収に重要な役割を果たす。破骨細胞の分化には receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) と macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) の 2 つのサイトカインが必須である。RANKL は tumor necrosis factor (TNF) スーパーファミリーの 2 型膜貫通タンパク質であり、骨芽細胞や T リンパ球を含む様々な細胞により生成される。そして安定した 3 量体を形成し、その特異的受容体である TNF 受容体スーパーファミリーに属する受容体 RANK に結合する。RANKL が結合すると、RANK は接着分子 TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) を誘導し、それにより nuclear factor (NF)- $\kappa$ B や mitogen-activated protein kinase、immunoreceptor tyrosine-based activation motif-containing co-activator pathway などの様々なシグナル伝達経路を活性化する。c-Fos や NF- $\kappa$ B、nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1 (NFATc1) などの転写因子はこの RANKL 刺激により誘導され、破骨細胞分化に重要な役割を果たす。

組織あるいは細胞特異的な遺伝子の発現メカニズムに関する知見のほとんどは、各々の遺伝子に対する遺伝子学的、生化学的な研究によりもたらされている。破骨細胞においては、acid phosphatase 5 (Acp5)、cathepsin K (Ctsk)、dendrocyte expressed seven transmembrane protein (Dc-stamp)、integrin  $\beta$  3 (Itgb3)、osteoclast-associated receptor (Oscar) などの破骨細胞特異的な遺伝子について、近傍における制御領域が同定されており、様々な転写因子の関与が示されてきた。しかしながら、破骨細胞に関与する遺伝子発現制御領域のゲノムワイドな網羅的解析はいまだおこなわれておらず、破骨細胞特異的な遺伝子制御の全貌はほとんど解明されていない。

### 破骨細胞分化過程における活性化制御領域

骨髄マクロファージと破骨細胞の活性化制御領域を同定するために、H3K27ac に対する ChIP-seq を行った。H3K27ac は polycomb-repressive complex 2 (PRC2) を形成して、転写を抑制する H3K27me3 に拮抗し、転写の活性化に関与する。骨髄マクロファージ固有のピークは 14897 箇所、破骨細胞固有のピークは 11403 箇所、共通のピークは 10729 箇所が同定された。さらに

FAIRE-seq を行ってヌクレオソームの結合していない領域(nucleosome-free regions; NFRs)を特定し、H3K27ac と NFRs の共通領域における新規結合モチーフ解析を行って、骨髄マクロファージと破骨細胞で遺伝子発現制御に関わる転写因子の候補を探索した。骨髄マクロファージ固有領域、破骨細胞固有領域、共通領域のいずれにおいても PU.1 と bZIP の結合モチーフが濃縮していた。一方、PU.1-IRF 複合体や C/EBP $\epsilon$ 、MADS の結合モチーフは骨髄マクロファージ固有領域で、NFATc1-AP1 や Sp1、GFY の結合モチーフは破骨細胞固有領域に濃縮していた。PU.1、PU.1-IRF8、NFATc1 の既知の結合モチーフについて、H3K27ac ピークの骨髄マクロファージ、破骨細胞それぞれの固有領域および共通領域について探索した。PU.1 モチーフは全ての領域で、PU.1-IRF8 モチーフは共通領域と骨髄マクロファージ固有領域で、NFATc1 モチーフは破骨細胞固有領域で濃縮を認めた。

#### 骨髄マクロファージと破骨細胞における PU.1 結合領域

骨髄マクロファージ固有、破骨細胞固有、共通のいずれの H3K27ac を伴う NFRs にも PU.1 モチーフを認めたため、破骨細胞における PU.1 の役割をより詳細に検証する目的で PU.1 の ChIP-seq を行った。骨髄マクロファージ固有に 21625 箇所、破骨細胞固有に 20821 箇所、共通には 35780 箇所の結合領域を同定した。PU.1 結合領域のうち、骨髄マクロファージに固有のもの、破骨細胞に固有のもの、いずれにも存在する共通のものにつきそれぞれ新規モチーフ解析を行った。PU.1 の ChIP-seq の結果として想定される通り、いずれにも既知の PU.1 の結合配列が強く濃縮していた。それに加え、骨髄マクロファージ固有の PU.1 結合領域では PU.1-IRF8、BORIS、C/EBP $\epsilon$  の結合モチーフが、共通の PU.1 結合領域では bZIP、ETS、IRF、C/EBP $\beta$  の結合モチーフが、破骨細胞固有の PU.1 結合領域では bZIP、NFAT、NF $\kappa$ B、STAT3 の結合モチーフが濃縮していた。この結果から、RANKL 誘導性破骨細胞分化の過程において、PU.1 が細胞種ごとに協調する転写因子のパートナーを切り替えることにより、それぞれの細胞特異的な遺伝子発現を制御している可能性が想起された。また、bZIP の既知の結合モチーフである TGANTCA について解析したところ、破骨細胞固有の PU.1 結合領域では 17.7%に含まれるのに対し、骨髄マクロファージ固有の PU.1 結合領域でこれを含むものは 9.1%にとどまった。

#### NFATc1 と IRF8 の結合領域

NFATc1 は破骨細胞分化におけるマスター転写因子であり、一方 IRF8 は RANKL 誘導性破骨細胞分化を抑制的に制御する。これら破骨細胞に対して対照的な役割をもつ 2 つの転写因子について、RNA-seq、histone 修飾に対する ChIP-seq、およびそれぞれの転写因子に対する ChIP-seq を行い、解析を行った。RNA-seq の結果から RANKL 誘導性破骨細胞分化の過程では Irf8 の発現は減少し、Nfatc1 の発現は増加する。また、転写を抑制的に制御するヒストン修飾であ

る H3K27me3 に対する ChIP-seq では、骨髄マクロファージでは Nfatc1 遺伝子領域にある H3K27me3 修飾が、破骨細胞では減少していた。これに対して、Irf8 遺伝子領域では骨髄マクロファージの段階と比較して破骨細胞で H3K27me3 修飾が大幅に増大した。加えて、Irf8 のプロモータ領域では、転写を亢進する H3K4me3 修飾が骨髄マクロファージと比較して破骨細胞で大幅に減少していた。NFATc1 の結合は Nfatc1 自身の遺伝子領域に広く分布しており、その多くで PU.1 が共局在していた。興味深いことに、NFATc1 の結合は破骨細胞での Irf8 のプロモータ領域にも認められたが、その周囲に PU.1 の結合は認めなかった。

NFATc1 結合領域と IRF8 結合領域の近傍の遺伝子群に対して Gene Ontology 解析を行った。IRF8 制御遺伝子群は骨髄マクロファージにおいて免疫反応や自然免疫応答に関連しており、一方 NFATc1 関連遺伝子群は破骨細胞において、骨髄白血球の分化制御や蛋白質の折り込み、ミトコンドリア輸送、そして破骨細胞分化制御に関連していた。

#### NFATc1 により制御される遺伝子のプロモータ領域でのヒストン修飾

NFATc1 が転写開始点から 2kb 以内に結合するものを NFATc1 制御遺伝子群とし、RNA-seq でこれらの遺伝子群の発現変化を解析した。予想される通り、RANKL 刺激により発現上昇する遺伝子群が存在するが、興味深いことに RANKL 刺激により発現が減少する遺伝子群のプロモータ領域でも NFATc1 の結合が認められた。骨髄マクロファージあるいは破骨細胞において、標準化した mRNA 転写を表す read per kilobases per million (RPKM) が 10 以上である 4976 遺伝子について、NFATc1 が転写開始点から 2kb 以内に結合し、かつ骨髄マクロファージと破骨細胞での発現が 2 倍以上(n=1379)、あるいは 0.5 倍以下(n=689)になる遺伝子群について、そのプロモータ領域でのヒストン修飾を解析した。H3K4me3 修飾についてはどちらの遺伝子群においても骨髄マクロファージと破骨細胞で大きな差は認めなかったが、H3K27me3 修飾については、発現が減少する遺伝子群では破骨細胞において大きく修飾が増加していた。一方、発現が増加する遺伝子群では細胞間で明らかな違いを認めなかった。

#### PU.1 は骨髄マクロファージにおいては IRF8 と、破骨細胞においては NFATc1 と協調して遺伝子発現を制御する

骨髄マクロファージと破骨細胞において、ChIP-seq を用いて PU.1、IRF8、NFATc1 の結合領域を同定し、これらを比較解析した。図 5A に示したヒートマップ解析の結果、骨髄マクロファージ固有の PU.1 結合領域では骨髄マクロファージでの IRF8 結合領域との重なりを認めたが、破骨細胞固有の PU.1 結合領域ではこれを認めなかった。逆に、破骨細胞固有の PU.1 結合領域では破骨細胞での NFATc1 結合領域との重なりを認めたが、骨髄マクロファージ固有の PU.1 結合領域ではこれを認めなかった。また、骨髄マクロファージあるいは破骨細胞の PU.1 結合領

域を bZIP モチーフ(TAGNTCA)の有無で分け、IRF8 と NFATc1 の結合を解析したところ、IRF8 については bZIP の有無による差異は認めなかったが、NFATc1 については、bZIP モチーフを含む PU.1 結合領域において有意に tag density が高い傾向があった。

#### 結論

本研究により、RANKL 刺激が骨髄マクロファージのエピジェネティックな環境を変化させ、Irf8 の発現を抑制し、Nfatc1 の発現を促進することを示した。さらに、PU.1 はパートナー転写因子を IRF8 から NFATc1 へ切り替えることにより結合部位を変化し、骨髄マクロファージ特異的遺伝子の発現を抑制するとともに破骨細胞特異的遺伝子の発現を促進した。