

博士論文

TGF- $\beta$ による破骨細胞分化に関わる遺伝子

Nedd9 の同定

小 山 卓 摩

「目次」

1.要旨	.....3
2.序文	.....8
3.方法	.....22
4.結果	.....32
5.考察	.....61
6.謝辞	.....69
7.参考文献	.....70

# TGF- $\beta$ による破骨細胞分化に関わる遺伝子

## Nedd9 の同定

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻

指導教員 田中 栄 教授

氏名 小山 卓摩

### 1. 要旨

本研究では、TGF- $\beta$ 刺激による破骨細胞分化におけるヒストン修飾の変化について網羅的なクロマチン免疫沈降(ChIP)シーケンスを行い、エピジェネティックに制御される Smad 標的遺伝子として Nedd9 を同定した。

Nedd9 の強制発現は、TGF- $\beta$ 阻害剤による破骨細胞分化の抑制を部分的に回復させ、遺伝子サイレンシングは RANKL による破骨細胞形成を抑制した。Nedd9 ノックアウトマウスの細胞では、破骨細胞形成が抑制され、TGF- $\beta$  による破骨細胞形成促進効果も一部失われた。

これらの結果から、Nedd9 は RANKL による破骨細胞形成に関与する TGF- $\beta$ 経路標的遺伝子であることが示唆された。

## 略語一覽

BMM	bone marrow-derived monocyte/macrophage precursor cells
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
c-Fms	M-CSF の受容体
RANK	receptor activator of NF- $\kappa$ B
RANKL	RANK ligand
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
BMP	bone morphogenic protein
IGF	insulin like growth factor
TNF	tumor necrosis factor
OPG	osteoprotegerin
ATF4	activating transcription factor 4
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B



PI3K	Phosphatidyl inositol 3 kinase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
TAK1	TGF- $\beta$ activated kinase 1
AP-1	Activator protein-1
NFATc1	Nuclear factor of activated T cells c1
ITAM	Immunoreceptor tyrosine based activation motif
OSCAR	Osteoclast associated receptor
FcR $\gamma$	Fc receptor common $\gamma$ subunit
DAP12	DNAX activation protein of 12kDa
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
CaMKIV	Calcium calmodulin dependent protein kinase type IV
DC-STAMP	Dendritic cell specific transmembrane protein
OC-STAMP	Osteoclast stimulatory transmembrane protein
Atp6v0dw	V type proton ATPase subunit d2

TRAP	Tartrate resistant acid phosphatase
Irf8	Interferon regulatory factor 8
Mafb	Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B
Blimp-1	B lymphocyte induced maturation protein 1
MMP	Matrix metalloprotease
R-Smad	Receptor regulated Smad
Co-Smad	Common partner Smad
I-Smad	Inhibitory Smad
SBR	Smad binding region
PBS	Phosphate buffered saline
MEM	Minimum essential medium
FBS	Fetal bovine serum
SB431542	TGF- $\beta$ 受容体阻害薬の一つ
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis

Nedd9	Neural precursor cell expressed developmentally down regulated protein 9
Cas	Crk associated substrate
Crk	CT10 regulator of kinase

## 2. 序文

### 骨の恒常性と破骨細胞について

骨を形成する細胞は主に、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞から成り立っている。骨芽細胞は、間葉系由来の細胞で、繊維性タンパク質の1型コラーゲン、骨基質を形成するオステオカルシンなどのタンパク質を産生し、類骨を形成する。類骨にリン酸カルシウムが沈着し、石灰化骨器質を形成する。骨芽細胞の周囲に骨気質が形成されていくことで、周囲を骨に囲まれた骨芽細胞の一部は骨細胞へ分化する。骨細胞は骨内の細胞の90%以上を占めており、骨器質内部に張り巡らされた骨細管の中に樹状突起を伸ばしており、骨内の物質輸送や情報伝達を行っている。また、骨溶解による一過性の急激な骨吸収反応を行っていることも知られている。

骨の恒常性・骨代謝は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスにより保たれている。破骨細胞が骨吸収して形成された吸収窩には、骨芽細胞が骨形成を行って骨器質を再生し、骨のリモデリング現象として知られている。ヒトの破骨細胞による吸収期が3週間程度継続したのち、数週の転換期を経て3-4ヶ月の骨形成期に入る。破骨細胞が活性化すると、骨芽細胞も共役的に活性化するという関係が知られており、カップリング機構と言われている。カップリングには、破骨細胞が骨器質を溶解することで骨器質内に潜在的に含まれているTGF- $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ )やBMP(bone morphogenic protein)、IGF(insulin like growth factor)

等の因子が骨芽細胞に形成的に作用する他、破骨細胞と骨芽細胞の細胞間相互作用、破骨細胞から分泌された種々のサイトカインも骨芽細胞形成的に作用していることが報告されている<sup>1,2</sup>。

関節リウマチ(Rheumatoid arthritis; RA)や骨粗鬆症、がんの骨転移などの疾病では、骨吸収が優位となって骨の恒常性バランスが崩れ、骨量の低下、骨脆弱性・骨破壊、易骨折性をきたす。また、大理石病など、骨吸収がなされずに骨形成優位になり、強い骨硬化をきたす疾患もある。マウスモデルでは、破骨細胞分化に必要な因子である、RANK (receptor activator of NF- $\kappa$ B)、RANKL(RANK ligand)、c-Fos などの遺伝子欠損マウス(ノックアウトマウス)は大理石病様の骨硬化の形態を示すことが知られている<sup>3,4</sup>。

破骨細胞は、マクロファージと近縁の細胞で骨吸収の役割を担う細胞である。破骨細胞は、骨吸収を担う多核の巨大な細胞であり、造血幹細胞から単球・マクロファージ系の前駆細胞、破骨前駆細胞を経て分化する。破骨細胞の分化には、破骨前駆細胞が骨芽細胞や骨細胞、滑膜線維芽細胞などの間葉系支持細胞と接触し分化誘導シグナルを受け取ることが必要である。破骨細胞の分化には破骨前駆細胞への分化、多核化、活性化、および最終的にはアポトーシスの段階をへる。

破骨細胞が骨基質に接着すると高度に極性化し、骨と密着した細胞膜面では波状縁(ruffled border)というひだ状の多数の突起を形成して酸を分泌し、活発な骨吸収を

行う。破骨細胞膜上にはプロトンポンプが発現し、酸を分泌して骨基質を溶解する。

また、酸性条件下で働くカテプシン K の様なタンパク分解酵素も分泌し、骨コラーゲンなどのタンパク分解も行う。破骨細胞の寿命は2週間程度と短く、アポトーシスを起こした後にマクロファージに貪食される<sup>1</sup>。

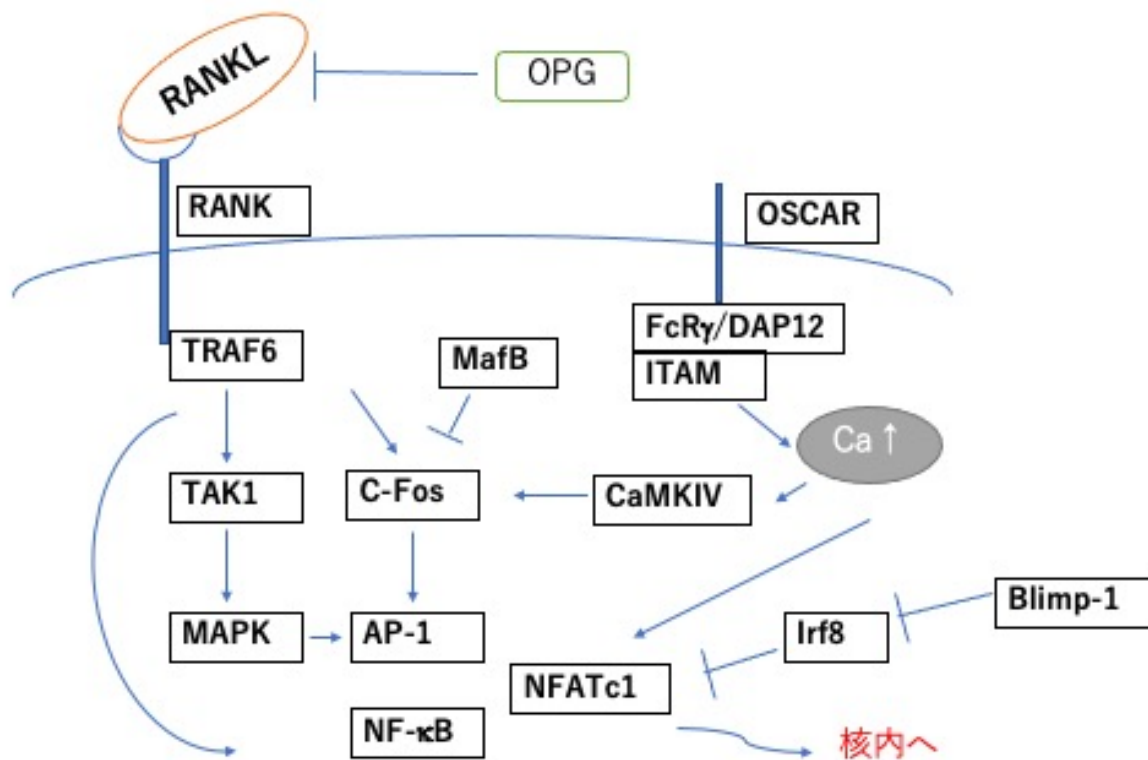
## 破骨細胞分化に関連するサイトカイン

造血幹細胞は M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) 刺激により単球・マクロファージ系破骨前駆細胞へと分化する。さらに M-CSF 刺激により破骨前駆細胞の増殖、生存が促進される。破骨前駆細胞において、M-CSF は受容体の c-Fms と結合し、PI3K/Akt(Phosphoinositide 3 kinase/Akt)系や MAPK(Mitogen activated protein kinase)系のシグナル伝達を経て、activating transcription factor 4 (ATF4)等の転写因子を介して、RANK (receptor activator of NF- $\kappa$ B)の発現が誘導される<sup>5</sup>。

RANK は TNF (tumor necrosis factor) 受容体ファミリーに属する膜タンパク質であり、破骨前駆細胞、破骨細胞に発現する。RANKL (RANK ligand) は RANK のリガンドであり、TNF ファミリーに属する膜結合型サイトカインである。骨芽細胞や骨髄間質細胞などにおいて、副甲状腺ホルモン、性ホルモン、活性型ビタミン D3、プロスタグランジン E2 などのホルモン、サイトカインの刺激により、RANKL は発現される。RANKL は主に膜結合型と可溶型が存在し、破骨前駆細胞の RANK に結

合することで成熟破骨細胞へ分化させる。RANK、RANKL を欠損したマウスやヒト変異患者では破骨細胞が存在せず、重度の大理石骨病を呈することが知られており、RANKL は破骨細胞分化に必須の因子である<sup>3</sup>。モデリング期においては、RANKL は骨芽細胞や軟骨細胞、リモデリング期には、骨細胞を中心とした間葉系細胞が発現し、破骨前駆細胞の分化を促進する<sup>6</sup>。一方、RA などの炎症性疾患では、関節周囲の滑膜線維芽細胞や T 細胞の一部が、RANKL を発現し、破骨細胞分化を促進し骨関節破壊を進行させる<sup>7</sup>。また、骨芽細胞や骨細胞は、可溶性受容体であるオステオプロテジエリン OPG (osteoprotegerin) を産生し、OPG は RANK に対して競合的に RANKL に結合して、破骨細胞分化を強く抑制している。

## RANK/RANKL 経路下流のシグナル伝達概略図



図は文献 1 を元に作成

### 破骨細胞分化に関連する細胞内シグナル伝達

RANKL が破骨前駆細胞の RANK に結合すると、RANK の adaptor タンパクである TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) を介して TGF- $\beta$  activated kinase 1 (TAK1) , Nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、mitogen-activated protein kinase (MAPK)、activator protein-1 (AP-1)、c-Fos などのシグナル伝達因子が活性化される。これらのシグナル伝達経路を経て、破骨細胞分化のマスター転写因子である Nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) が発現される<sup>2</sup>。NFATc1 のプロモーター領域にはこれ



らの転写因子の結合配列の他に NFATc1 自身の結合配列もあり、自己増幅が誘導されることが知られている。NFATc1 は、破骨細胞分化において中心的で支配的な機能を果たす転写因子であり、破骨細胞の分化や融合、機能、生存にかかわる遺伝子を発現調節する。

また、RANKL/RANK 系とは異なる共刺激系分子 ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) によりカルシウム濃度が細胞内で上昇することが NFATc1 タンパク質の核内移行に必要であることも明らかになってきた。

Osteoclast-associated receptor (OSCAR) 等の受容体から、ITAM 配列を持つアダプター蛋白質の Fc receptor common  $\gamma$  subunit (FcR $\gamma$ ) と DAP12 にシグナルが伝達され、phospholipase C $\gamma$ (PLC $\gamma$ )を介して、RANK シグナルと協働してカルシウムシグナル、カルシニューリンを活性化させ、NFATc1 の核内移行、活性化を誘導する。カルシウム濃度上昇に伴いカルシウム/カルモジュリン依存性タンパクキナーゼ (CaMKIV:calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV)が活性化され、これらは c-Fos、AP-1 の活性化を介して NFATc1 を誘導する<sup>89</sup>。

破骨細胞は、破骨前駆細胞同士が融合することにより多核巨細胞となる。NFATc1 は、細胞接着と細胞融合に関連する Dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP), Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP) や V-type proton ATPase subunit d2 (Atp6v0d2) 等を活性化させ、細胞融合を促進させる。

これらの因子を欠損したマウスを使用した実験では TRAP(tartrate resistant acid phosphatase)陽性細胞は認めるものの、多角細胞の欠損、細胞融合障害をきたすことが知られている<sup>10 11 12</sup>。

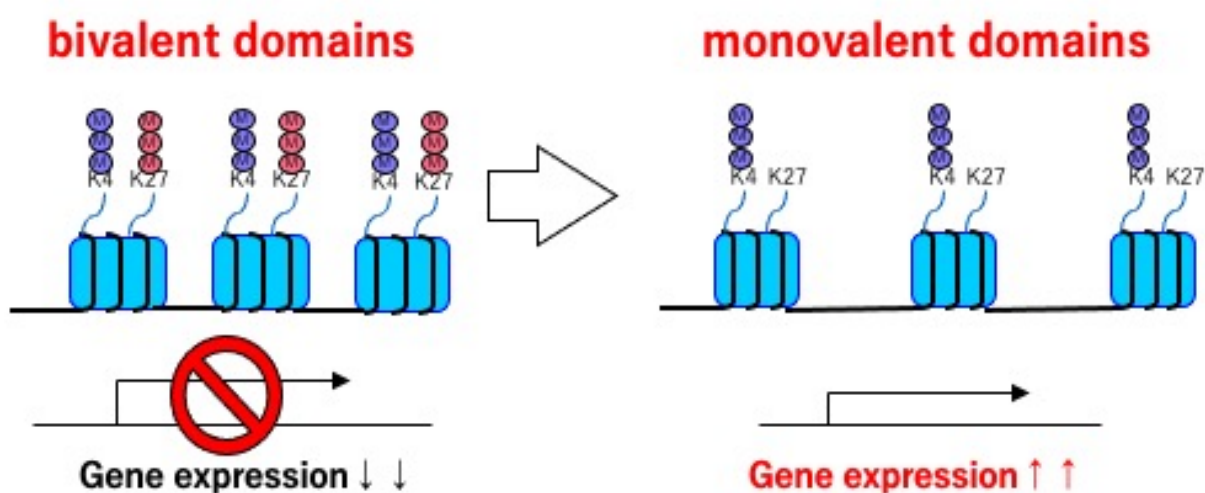
成熟した破骨細胞は、骨表面に接着し、酸や蛋白質分解酵素を分泌し始め、骨吸収を開始する。NFATc1により誘導され、破骨細胞は $\alpha_v\beta_3$ インテグリンによって骨表面に接着し、c-Src依存性シグナルによって、アクチンリング、波状縁を形成し、酸(H<sup>+</sup>イオン)分泌が生じ、骨のミネラル分を溶解する<sup>12 13</sup>。また、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) やカテプシン K などの蛋白質分解酵素発現も促進する。

## 破骨細胞分化におけるエピジェネティックな制御機構

遺伝子の発現はそのゲノム配列だけではなく、エピジェネティックな要素によっても制御されている。エピジェネティックな修飾として、DNA のメチル化、ヒストンのアセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化、ADP リボシル化など、数多くの共有結合による修飾が行われていることは知られており、クロマチン構造の形成や遺伝子発現の制御に様々なレベルで関与している。さらに、特定のリジン残基のアセチル化は遺伝子発現を活性化する一方で、メチル化はその部位により遺伝子発現の活性化や抑制化をすることが分かっている。ヒストン H3 とヒストン H4 のメチル化部位は、主にヒストンの尾部 (H3K4, H3K9, H3K36, H4K20) とヌクレオソームの中心部 (H3K79) に存在する<sup>14</sup>。H1、H2A、H2B、H3、H4 と呼ばれる 5 つのヒストンのうち<sup>15</sup>、Stahl らは、ヒストン H3 のリジン 4 でのメチル化が真核生物では酵母や繊毛虫の一種である *Tetrahymena* から高度の保存されており、ヒストン H3 リジン 4 でメチル化されている部位の核は転写活性がある部位に対応していることを報告した<sup>16</sup>。ヒストン H3 のリジン 4 のトリメチル化 (H3K4me3) はヌクレオソームリモディングを行う酵素を誘導し、ヒストンのアセチル化を生じることで遺伝子発現を活性化させ、ヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化 (H3K27me3) はクロマチンをコンパクトに折りたたむことで遺伝子発現を抑制する。Bernstein らは、胚性幹細胞で、重要な発生遺伝子が H3K27me3(転写抑制)と H3K4me3(転写活性化)が共存する bivalent

domain [H3K4me3(+)/H3K27me3(+)]から H3K4me3 のみが存在する monovalent domain [H3K4me3(+)/H3K27me3(-)]に変化することを明らかにした<sup>17</sup>。同様のヒストンメチル化変化は、他の多くの細胞種でも観察されている。我々の研究室では、RANKL による破骨細胞形成誘導時にマスター転写因子である活性化 T 細胞核因子 1 (NFATc1) 遺伝子がヒストン修飾変化による制御を受けていることを報告した<sup>18</sup>。破骨細胞分化に伴い NFATc1 のプロモーター領域は、H3K4me3(+)/H3K27me3(+)  
 二バレントから H3K4me3(+)/H3K27me3(-)モノバレントへヒストン修飾パターンを変化させており、この変化に伴う H3K27 の脱メチル化は Jmjd3 の制御下にある。このことから、破骨細胞分化においてもヒストンのメチル化をはじめとするエピジェネティックな制御が重要な役割を果たしていることが示唆される。

### ヒストンメチル化のパターン変化と遺伝子発現の変化



図は文献 17 を元に作成

## TGF- $\beta$ と破骨細胞分化

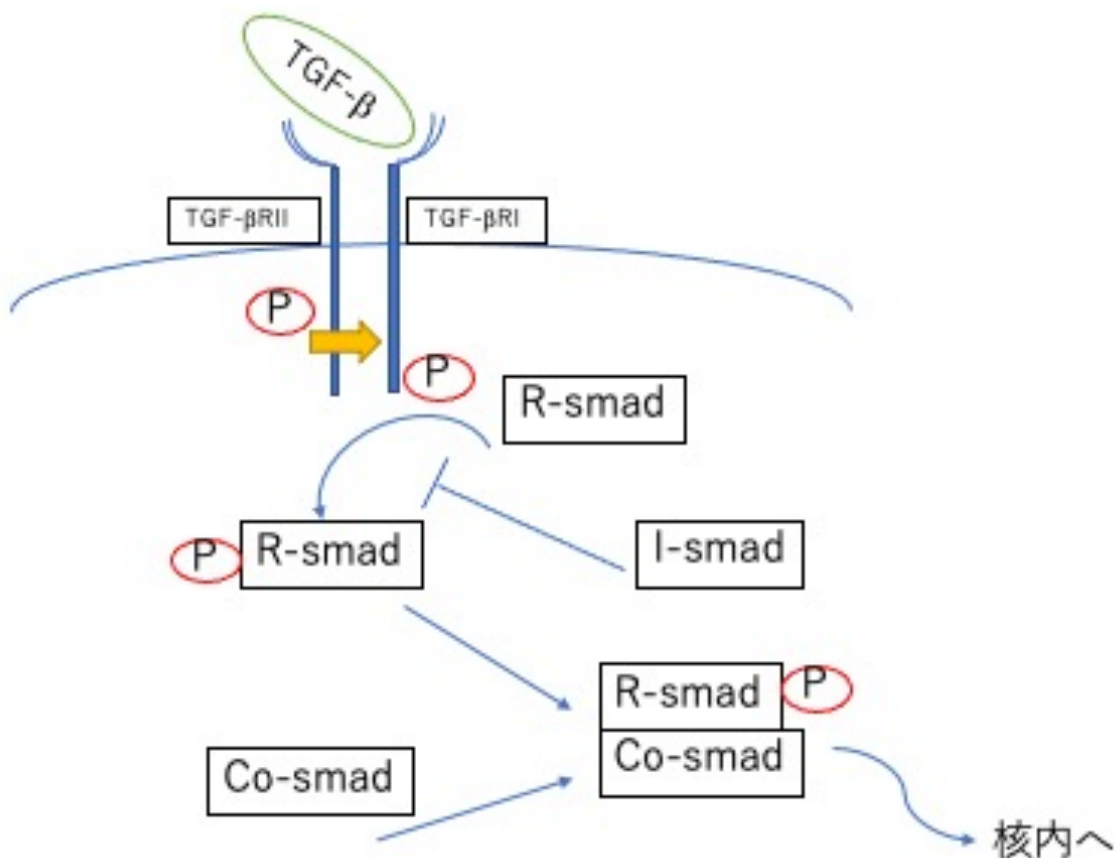
TGF- $\beta$ (transforming growth factor)は、多数の細胞で、細胞の増殖、分化、遊走化、アポトーシス、血管新生などに関係しているサイトカインである。TGF- $\beta$ スーパーファミリーを構成するサイトカインは、哺乳類においては 30 種類以上知られており、TGF- $\beta$ ファミリー、アクチビンファミリー、BMP(bone morphogenetic protein)ファミリーの大きく分けて 3 つのファミリーに分類される。TGF- $\beta$ ファミリーには哺乳類では、TGF- $\beta$ 1~3 までの 3 つのサブタイプが存在する(TGF $\beta$ 4 はニワトリ、TGF $\beta$ 5 はタコにしか発現していない)。TGF- $\beta$ も BMP と同様に骨内に豊富に存在している<sup>19</sup>。TGF- $\beta$ は細胞外マトリックスでは、LTBP(latent TGF- $\beta$ -binding protein)と結合することで複合体を形成し潜在型として不活性化された状態(latent TGF- $\beta$ )で存在しており、プロテアーゼ、インテグリン、pH、活性酸素等の刺激により活性化する<sup>20</sup>。

活性化された TGF- $\beta$ が細胞膜上にある II 型受容体に結合し、さらに I 型受容体と結合することで複合体が形成される。TGF- $\beta$  受容体は受容体型セリン/スレオニンキナーゼであり、II 型受容体が I 型受容体をリン酸化し、活性化された I 型受容体が、下流のシグナル伝達カスケードを活性化させる。TGF- $\beta$  下流シグナル伝達経路には、古典的経路(Smad 経路)と非 Smad 経路が知られている<sup>21</sup>。

Smad は TGF- $\beta$ 下流に位置する細胞内シグナル伝達物質で、R-Smad(receptor regulated Smad)、Co-Smad(common partner Smad)、I-Smad(inhibitory Smad)の 3 種

類のサブグループに分類される。R-Smad は TGF- $\beta$ 受容体から直接活性化され、シグナル伝達を行う。Co-Smad は、R-Smad と複合体を形成する。I-Smad は、R-Smad の活性を抑制する。Smad には 1~9 までのサブタイプがあり、それぞれ Smad 1, 2, 3, 5, 8, 9 が R-Smad(Smad 2,3 は TGF- $\beta$ とアクチビンのシグナル伝達を、Smad 1, 5, 8, 9 は BMP のシグナル伝達を行う)、Smad 4 が Co-Smad、Smad 6, 7 が I-Smad として働いていることが知られている。

### TGF- $\beta$ -Smad 経路のシグナル伝達概略図



図は文献 21 を元に作成

TGF- $\beta$ 下流の Smad 経路では、TGF- $\beta$ 受容体にリン酸化された Smad2 と Smad3 が Smad4 と結合することで複合体を形成する。この分子複合体は核内に移行して Smad 結合領域 (Smad binding region : SBR) に結合し、他の転写因子や転写共役因子とともに特定の遺伝子発現を制御する転写因子として働く。また、TGF- $\beta$ 刺激は Smad7 の発現を促進することで Smad-induced Smad inhibition というネガティブフィードバック機構が存在する。非 Smad 経路は、p38MAPK 経路や JNK 経路など、いくつかの Smad 非依存性経路で構成されている<sup>22 23 24</sup>。

TGF- $\beta$ は様々な細胞に受容体が存在し、複数のシグナル伝達経路を持つことから、破骨細胞に対しても複合的な作用を示すことが予想される。これまでの報告では、TGF- $\beta$ の破骨細胞に対する影響は、促進的なものと抑制的なものの両方が知られている。破骨細胞分化に対する TGF- $\beta$ の促進作用には、いくつかの分子が関与していることが報告されている。Fox らは、TGF- $\beta$ による JAK/STAT 系を抑制するサイトカインシグナル抑制因子の発現が、破骨細胞分化を促進すること、TGF- $\beta$ が破骨細胞形成の重要な制御因子である NFATc1 の発現を直接誘導することを報告した<sup>25</sup>。Yan らは、TGF- $\beta$ による RANK の発現上昇が、RANKL による破骨細胞形成を促進すること報告した<sup>26</sup>。一方で、TGF- $\beta$ は他の細胞に働きかけることで破骨細胞に抑制的に作用していることが報告されている。Takai らは、TGF- $\beta$ が骨髄の間質細胞に作用して、間接的に破骨細胞形成を抑制すると報告した<sup>27</sup>。Quiin らは、骨芽細胞と破骨細胞の共

培養において TGF- $\beta$  が骨芽細胞の RANKL 発現を抑制することで破骨細胞形成に抑制的に働くと報告した<sup>28</sup>。さらに、多因子サイトカインアッセイによると、RANKL 存在下で TGF- $\beta$  と TNF- $\alpha$  を併用すると、他のサイトカインの組み合わせと比較して最もよく破骨細胞の形成がなされると報告されている<sup>29</sup>。この様に、破骨細胞分化に対する TGF- $\beta$  の働きはまだ一定の見解が得られていない。

我々の研究室ではこれまでに、BMM が RANKL や M-CSF に応答して破骨細胞が分化するためには、RANK に関連するアダプター因子である TRAF (tumor necrosis factor receptor-associated factor) 6 と TGF- $\beta$  下流の Smad2/3 との分子間相互作用が必要であることを報告した<sup>30</sup>。また、破骨細胞形成に関わる遺伝子のオープンクロマチン領域に Smad2/3 結合部位を同定し、Smad2/3 と c-Fos が協調して核内に移行することを明らかにした<sup>31</sup>。この様に、TGF- $\beta$  下流から Smad2/3 標的遺伝子までの分子制御機構は解明されてきた。しかし、TGF- $\beta$ -Smad2/3 経路の下流で破骨細胞の分化を制御する直接的な Smad 標的遺伝子はまだ特定されていない。

## 本研究の目的

これまでの序論に述べたように、破骨細胞分化に関連する TGF- $\beta$ -Smad2/3 経路の標的遺伝子についてはまだ判明しておらず、本研究ではこれを同定することを目的とした。さらに、破骨細胞分化においてもエピジェネティックなヒストン修飾変化によ

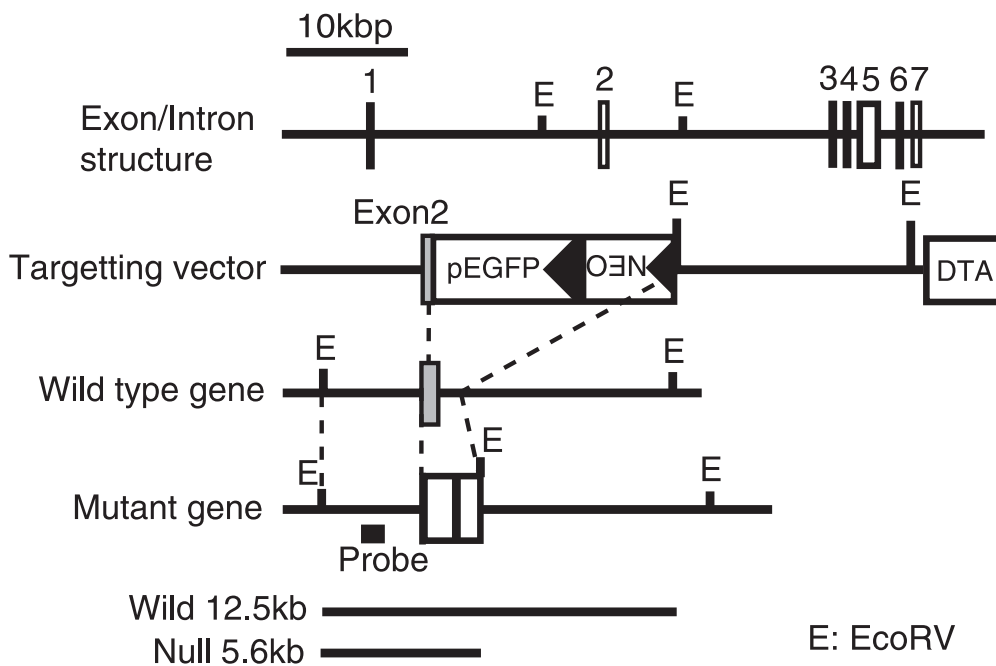


る遺伝子制御が重要であることが判明してきており、Smad 標的遺伝子の中でこうした制御がなされている遺伝子を絞り込んだ。そのために、抗 Smad2/3 抗体、抗 H3K4me3 抗体、抗 H3K27me3 抗体を用いた ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation with sequencing) 解析、RNA-seq 解析によって、破骨細胞の分化に強く関与する Smad2/3 制御遺伝子を調べた。さらに Smad2/3 制御遺伝子として同定した Nedd9 について、in vivo、in vitro の実験を行い、破骨細胞分化における Nedd9 の働きを調べた。

### 3. 方法

#### 実験動物

Nedd9 ノックアウトマウス(Nedd9<sup>-/-</sup>マウス)は C57BL/6J(B6)を遺伝的背景とし、作製手順は、以下の通りである<sup>32</sup>。Nedd9 タンパク質の N-末端 SH3 ドメインをコードするエクソン 2 を EGFP(Clontech 社)とネオマイシン耐性遺伝子で置換した。胚性幹 (ES) 細胞にターゲティングベクターを挿入し、相同組換えとなった ES クローンを選択した。8 細胞期のマウス胚に挿入し、オスのキメラを B6 メスと交配させて変異マウスを作製した。作製した Nedd9<sup>-/-</sup>マウスは東京大学血液腫瘍内科・瀬尾幸子氏より供与頂いた。すべての動物実験は、東京大学の動物実験委員会の承認を得た。



図は文献 32 より引用

## 破骨細胞分化実験

4-5 週齢の雄性 DDY マウスの長管骨(大腿骨及び脛骨)を PBS (Phosphate buffered saline) でフラッシュして骨髓細胞を採取した。100 ng/ml の M-CSF を加えた  $\alpha$ MEM (Minimum essential medium) + 10 % FBS (Fetal bovine serum) 培地で 2 日培養し、骨髓由来単球マクロファージ前駆細胞 (BMM ; bone marrow-derived monocyte/macrophage precursor cells) を作成した。これらの細胞あるいはこれらの細胞にレトロウイルスを感染させた細胞 (後述) を、10 ng/ml M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) と 100 ng/mL RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B) を加えた培地で 4 日培養し、破骨細胞に分化させた。破骨細胞分化に関わる TGF- $\beta$ /Smad 経路の作用を調べるために、1 ng/ml TGF- $\beta$  または 10  $\mu$ M SB431542 (TGF- $\beta$  受容体阻害薬) を RANKL とともに添加した。SB431542 は、TGF- $\beta$  タイプ I 受容体の強力かつ特異的なリン酸化阻害剤であり、RANKL による破骨細胞の形成を強く抑制する<sup>30</sup>。

RANKL 刺激後の検体は PBS で洗浄後、4 % パラホルムアルデヒド溶液下に 15 分間室温で静置し固定した。アセトン (50 %) / エタノール (50 %) 溶液を加え、30 秒静置した。TRAP 染色液 (Naphthol AS-MX phosphate 0.1 mg/ml, N, N-Dimethylformamide 10  $\mu$ l/ml, Fast red violet LB salt 0.6 mg/ml, TRAP Buffer [酢酸 Na 5.44 g/l, 酒石酸 Na 10.5 g/l]) で 5 分間室温静置、TRAP 染色を行った。破骨細胞分化は特記なき場合は TRAP 陽性の 3 核以上の細胞を成熟破骨細胞として計数し

評価した。

## クロマチン免疫沈降 (ChIP ; Chromatin immunoprecipitation) シーク エンス解析

ChIP シークエンス解析とマイクロアレイによる発現アレイ解析は、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野の油谷浩幸先生のご協力のもとで共同研究者の安井哲郎先生が行った。細胞を 15 cm 培養皿で約 80 %被覆されるまで培養した。TGF- $\beta$  2 ng/ml または TGF- $\beta$  阻害剤 SB431542 5  $\mu$ M を 1.5 時間添加培養したのち、細胞を 1 %ホルムアルデヒドで室温固定した後、グリシンで中和した。培養した BMM または破骨細胞を採取し、遠心して上清を除去したのち SDS (sodium dodecyl sulfate) 溶解液 (50 mM Tris-HCl [PH 8.0]、1 % SDS、10 mM EDTA、Complete Protease Inhibitor Cocktail) に懸濁した。1 分ごとに 30 秒の超音波処理 (output level 2、50 % duty) を 6 サイクル行った。8 °C、15000 回転で 10 分遠心して上清を ChIP 希釈液 (20 mM Tris-HCl [PH 8.0]、150 mM NaCl、2 mM EDTA、1 % Triton X-100) で 10 倍希釈した。サンプルを 4-10  $\mu$ g の抗体とプロテイン A/G セファローズビーズを 0.05 mg/ml BSA (bovine serum albumin) を加えた ChIP 希釈液内で結合させ、4°Cで 6 時間培養した。免疫沈降物を洗浄後、elution buffer (50 mM Tris-HCl [PH 8.0]、10 mM EDTA、1 % SDS) 内に 65°Cで培養し、pronase 1.5  $\mu$ g を

加え 4 °C で 2 時間、42 °C で 6 時間処理し、脱架橋 DNA を得た。得られた DNA を PCR purification kit (Qiagen、 Germantown、 MD、 USA) で精製した。

精製した DNA は、Genome Analyzer IIx system (Illumina; San Diego、 CA、 USA) を用いて、配列決定を行った。得られた配列は、マウスのゲノムにマッピングした。

Model-based analysis of ChIP-Seq を用いてピークの検出を行った。

#### ChIP-seq に使用したプライマー配列

遺伝子名	Forward配列	Reverse配列
Nedd9	AGAAGGCAGAGGCAGCATA A	CCTGTGGCATCATCTCTAAGG
Pdgfb	TTTCAAGGCGATGAGGTCAC	GGAGAGTGCCCCAGACCT
Smad6	CATGCAGGGTGTCTCTAGCA	GGCTACATGGATCACGATGG
Tmepai	AAACCTACTGCGACGACAGG	ATGAGAGG CACTTTGCAACC
Ski	TGGAGGCTCTGCTCTAGG	CCTGCAGCTGGTTTGTGTAA
Cdkn1a	TCTGT GTACGTGCGTGTG	TAAATTCCCGCCTATGTTGG
Serpine1	AGCCCAATAGAGAACTTCAAGTCC	CAGTACACCTCAAACCCAGCC
Smad7	TGCGAAACACAATCGCTTT	CTCTGCTCGG CTGGTTCC
Ppib	ATGTGGTACGGAAGGTGGAGA	AGCTGCTTAGAGGGATGAGG
Hoxa13	TGGCATGTTTTAGGGACCTC	CACATCCCTTGGAGGGTCTA

#### マイクロアレイによる発現アレイ解析

培養した BMM に TGF- $\beta$  2 ng/ml を 24 時間、もしくは RANKL 5 ng/ml を 72 時間添加培養した検体から RNA を TRIzol で抽出し、Gene Chip (Affymetrix ; Santa Clara, CA, USA) による発現解析を行った。検体採取のタイムポイントは東京大学先端科学技術研究センター・油谷浩幸先生らの TGF- $\beta$  添加による発現アレイ実験に準じて実施した<sup>33</sup>。また、*in vitro* での破骨細胞培養においては BMM へ M-SCF を 2 日間、M-SCF と RANKL を 3-5 日添加培養して成熟破骨細胞をえる事実も考慮した。全 RNA から合成したビオチン標識 RNA を、Gene Chip Mouse Genome MOE430 2.0 オリゴヌクレオチドアレイ (Affymetrix 社 ; Santa Clara, CA, USA) に配合した。アレイを streptavidin-phycoerythrin で染色し、Affymetrix 社製スキャナーで画像データを収集した。Microarray Suite ソフトウェア 5.0 を用いて、各遺伝子プローブセットの平均差分 (AD) を算出し、遺伝子発現強度値として示した。AD 値は、すべての AD 値の平均が 100 になるようにアレイごとに正規化した。各サンプルについて、1 つのアレイデータを取得した。得られたデータは、様々な転写産物について qPCR で検証し、アレイデータと qPCR データの間に矛盾する結果はなかった。Affymetrix 社のプローブ ID を遺伝子記号に変換した。

## 定量的逆転写 PCR

培養した細胞に 6 cm 培養皿 1 枚あたり 350  $\mu$ l の ISOGEN(和光純薬工業株式会社)

を加え細胞を懸濁し、室温にて5分間静置した。100  $\mu$ l のクロロホルムを加え混和し、2-3分室温で静置した。4 $^{\circ}$ C 12000 g で15分遠心し、水相を採取し、200  $\mu$ l のイソプロパノールを加えた。5-10分室温で静置し、4 $^{\circ}$ C 12000 g で10分遠心し、上清を除去した。沈殿に70%エタノールを1 ml 加え、4 $^{\circ}$ C 12000 g で5分遠心し、上清を除去、DEPC処理水30  $\mu$ l に溶解し、RNAを得た。

定量的逆転写PCRは、上記で得られたRNAの濃度を測定し、QuantiTect Reverse Transcription kit (QIAGEN)を用いて逆転写して得られた1本鎖cDNAを使用し、ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems社製)を用いて行った。

1  $\mu$ g のRNAをDEPC処理水で8  $\mu$ l になるよう溶解し、RT Reaction Mixを10  $\mu$ l、RT Enzyme Mixを2  $\mu$ l 加え、25 $^{\circ}$ Cで10分、50 $^{\circ}$ Cで30分、85 $^{\circ}$ Cで5分処理した。*E.coli* RNase Hを2単位加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間温置し、cDNAを作成した。cDNA検体にSYBR Green Realtime PCR Master Mixとプライマーを加え、定量的逆転写PCRを行った。データ収集後、PCRアンプリコン配列を含むプラスミドを連続的に希釈して作成した標準曲線を用いて特定の遺伝子のmRNAコピー数を算出した。内部コントロールとしてマウスの $\beta$ -アクチンを使用した。

定量的逆転写PCRに使用したプライマー配列

遺伝子名	Forward配列	Reverse配列
Nedd9	CCACCCTCCTACCAGAATCA	ATACCCCTTGAGTGCTGTGG
CathepsinK	ACGGAGGCATTGACTCTGAAGATG	GGAAGCACCAACGAGAGGAGAAAT

## レトロウイルスベクターを使用した遺伝子導入

レトロウイルス構築のために、完全長 cDNA を KOD plus(タカラバイオ株式会社)を用いて PCR で増幅し、Zero Blunt TOPO II ベクター (Invitrogen) にサブクローニングして、pMX-puro ベクターに挿入した。FuGENE 6 (Roche 社) を用いて、合計  $2 \times 10^6$  個の BOSC23 パッケージング細胞に  $6 \mu\text{g}$  のベクターを導入した。24 時間後、培地を新鮮な  $\alpha$ -MEM/10 %FBS に交換し、さらに 24 時間培養した。その後、2,400 rpm で 3 分間遠心分離した後、上清をレトロウイルスストックとして回収した。合計  $5 \times 10^6$  個の BMM を、 $6 \text{ mg/ml}$  のポリブレン (Sigma-Aldrich; St Louis、 MO、 USA) および  $30 \text{ ng/ml}$  の組換えマウス M-CSF の存在下で、8 ml のレトロウイルスストックで 5 時間培養した。5 時間のレトロウイルス感染後、培地を  $\alpha$ -MEM/10 % FBS と  $100 \text{ ng/ml}$  M-CSF に変更し、さらに 24 時間培養した。トリプシンで BMM を回収し、 $2 \mu\text{g/ml}$  のピューロマイシンを含む  $\alpha$ -MEM/10 % FBS で 2 日間培養することでピューロマイシン耐性細胞を選別し採取した。



## RNA 干渉 (RNAi)

RNAi 発現ベクターは、piGENEmU6 ベクター (iGENE Therapeutics; Tokyo, Japan) を用いて構築し、U6 プロモーターと挿入物を pMx-GFP ベクターにクローニングした。BOSC パッケージング細胞にレトロウイルスベクターを導入し、2 日後に上清を回収することで、特定の遺伝子を持つレトロウイルスを調製した。レトロウイルス感染については、最初の 2 日間の培養後、BMM を 30 ng/ml M-CSF および 4 ng/ml ポリブレン (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA) の存在下でレトロウイルスと 6 時間培養し、10 ng/ml M-CSF の存在下で一晩培養した。導入した BMM を選択するために、Trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA) で細胞を剥離し、10 ng/ml M-CSF および 2 µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich) で 2 日間培養した。

RNAi に用いた標的配列

遺伝子名	sense	anti sense
shNedd9_1	gttGCATTAGATCTTTGGTCGACAggtgtgct gtccTGTTGGCCAAAGGTCTGATGCtttt	atgcaaaaaGCATCAGACCTTTGGCCAACA gacagcacTGTCGACCAAAGATCTAATGC
shNedd9_2	gtttGCAGTGCTAGTGACATGTgtgctgtccA CATGTTACTCCTGGTACTGCttt	atgcaaaaaGCAGTACCAGGAGTAACATGTg gacagcacACATGTCACTCCTAGCACTGC

## タンパク質の抽出と Western blotting

細胞を氷冷した PBS で洗浄し、48 °C でタンパク抽出用 buffer [1 %NP-40、10 mM Tris-HCl (pH7.8)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、10 mM NaF、10 mg/mL aprotinin] を用いてタンパク質を抽出した。

ウェスタンブロット解析のために、抽出液を 7.5 % から 15 % のトリス-グリシン勾配ゲルを用いた SDS-PAGE にかき、ポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF 膜) に転写した。6 % milk-TBS-T でブロッキングした後、PVDF 膜をカテプシン K またはアクチンに対する一次抗体と反応させた。続いてヤギ抗マウス IgG またはヤギ抗ウサギ IgG を加えた。免疫反応したバンドは、ECL Plus 化学発光試薬を用いて可視化した。

## 骨形態計測

12 週齢の雄の野生型および Nedd9<sup>-/-</sup> マウスの後肢および第 5 腰椎を摘出し、70 % エタノールで固定した。DCS-600R システム (アロカ株式会社) を用いて、単純 X 線撮影およびデュアルエネルギー X 線吸収測定スキャン分析を行い、BMD (mg/cm<sup>2</sup>) を測定した。マイクロ CT (シマズ製作所) を用いて腰椎の海面骨骨梁の 3D 画像を作

成した。

## 統計解析

結果は平均±SD(標準偏差)で表した。統計解析は、正規性の検定には Kolmogorov-Smirnov 検定を、等分散性の検定には F 検定を使用した。連続変数については両側対応のない Student's T 検定を、カテゴリー変数についてはカイ二乗検定を用いて行った。 $p$  値が 0.05 未満の場合は、統計的に有意であると判断した。

## 4. 結果

### TGF- $\beta$ -Smad2/3 によって制御される遺伝子の同定

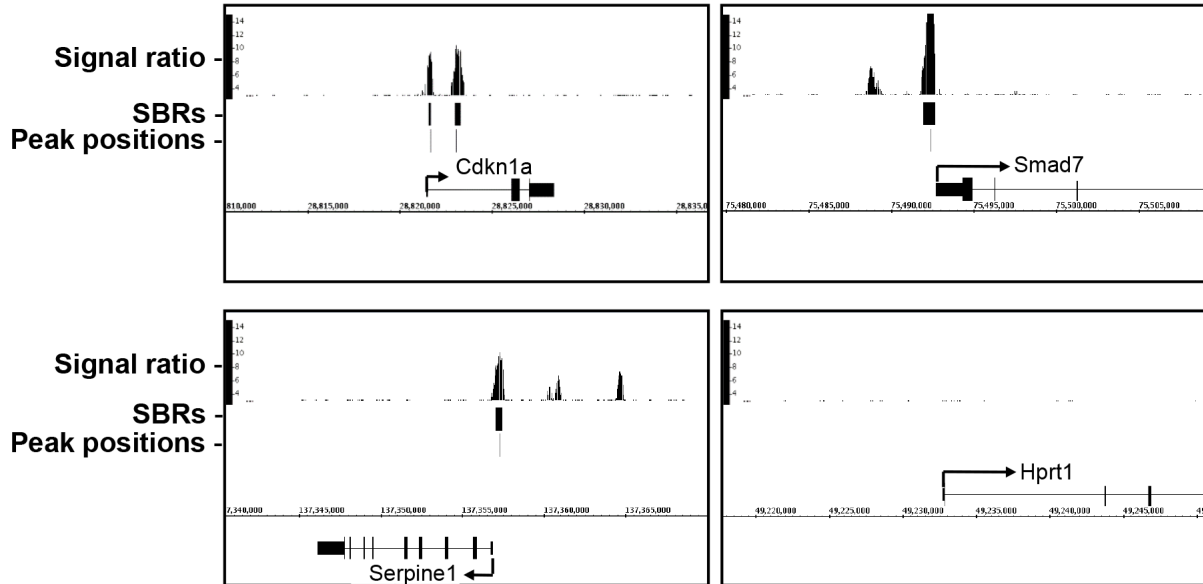
TGF- $\beta$ -Smad2/3 によって制御される遺伝子を同定するため、2 ng/ml の TGF- $\beta$  を 1.5 時間添加培養した BMM を用いて、抗 Smad2/3 抗体を用いた ChIP-seq 解析を行った。総リード数は 15,108,905 で、10,837,516 リード (71.7 %) がマウスゲノムにマッピングされた。

合計 2,786 個の Smad2/3 結合領域 (SBR) が同定された (ピークシグナル比 $\geq$ 8)。転写開始点 (TSS) から 10 kb 上流と第 1 イントロンの間に SBR のピーク位置がある遺伝子を Smad2/3 標的遺伝子と定義し、903 個の遺伝子を Smad2/3 標的遺伝子として選択した。

図 1A に示すように、Cdkn1a、Smad7、Serpine1 などの既知の TGF- $\beta$  調節遺伝子のプロモーター領域に Smad2/3 が結合していることを確認した。これらの遺伝子のうち 7 つ (Serpine1、Cdkn1a、Smad7、Smad6、Ski、Tmepai、Pdgfb) の Smad2/3 結合領域を選択し、ChIP-q PCR により TGF- $\beta$  依存的な Smad2/3 結合の増加を確認した (図 1B)。SBR は、遠く離れた上流領域からイントロン領域まで広く分布しており、レファレンス遺伝子の TSS 付近で顕著な濃縮が見られた (図 1C)。

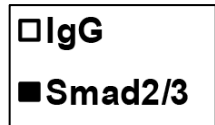
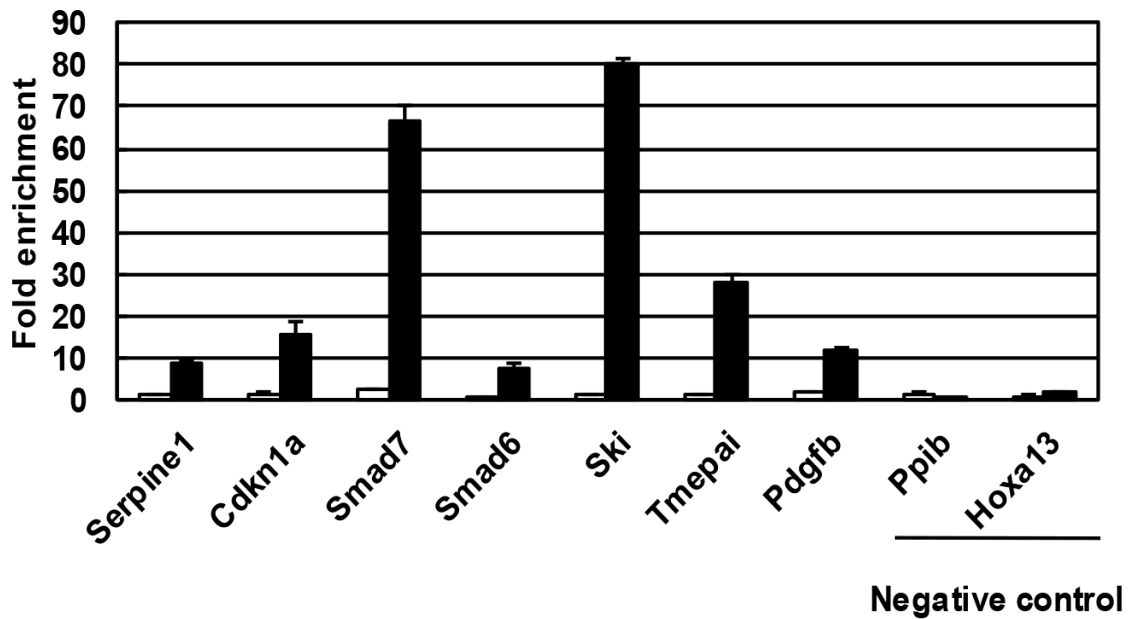
図 1. Smad2/3 結合部位の同定(ChIP-seq)

A



(A) BMM に 2 ng/ml の TGF- $\beta$  を 1.5 時間添加培養した後、抗 Smad2/3 抗体を用いて ChIP-seq 解析を行った。3 つの既知の Smad 標的遺伝子 (Cdkn1a、Serpine1、Smad7) と、ネガティブコントロールとして 1 つの遺伝子 (Hprt1) を解析した。ピークシグナル比(signal ratio)  $\geq 8$  として定義した Smad2/3 結合領域 (Smad Binding Region;SBR) と各 SBR のピーク位置(peak positions)を黒棒で示した。各 TGF- $\beta$  標的遺伝子のプロモーター領域に SBR が位置していることを確認できた。

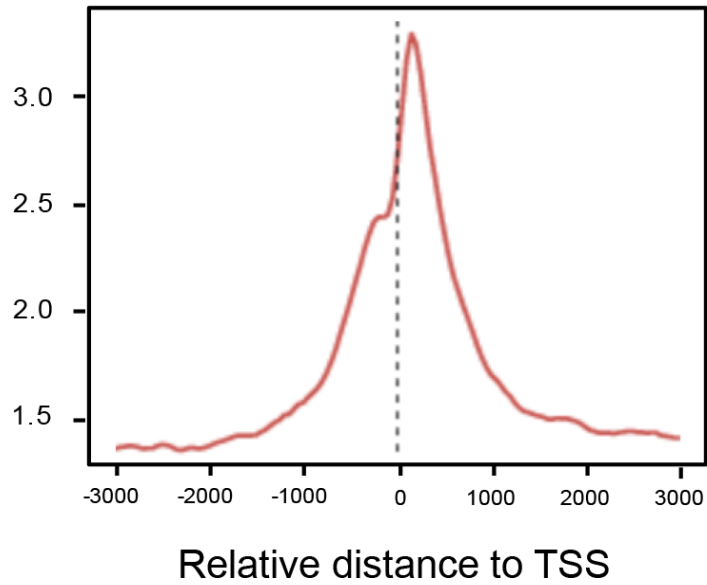
B



(B) ChIP-q PCR の結果。転写開始点 (TSS) から 10 kb 上流と第 1 イントロンの間に SBR のピーク位置がある遺伝子を Smad2/3 標的遺伝子と定義した。7 つの Smad2/3 標的遺伝子と 2 つのネガティブコントロール遺伝子を選択し、ChIP-qPCR(リアルタイム PCR)で検証した。各検体に対するコントロールとしてマウス IgG を用いた。Hprt1 に対して発現量が何倍かをそれぞれの遺伝子で計算し、fold enrichment として示した。

C

### Average Smad2/3 signal profile near TSS



(C) ChIP-seq 解析における転写開始点(TSS)周辺の Smad2/3 シグナルの平均プロファイル。Smad2/3 の結合は TSS 周辺に集積していた。

## TGF- $\beta$ によるヒストンの修飾

TGF- $\beta$ によるヒストン修飾を解析するために、1 ng/ml の TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ (+)BMM とする) または 5  $\mu$ M の TGF  $\beta$ 阻害剤 SB431542 (TGF- $\beta$ (-)BMM とする) で処理した BMM を、抗 H3K4me3 または抗 H3K27me3 抗体を用いた ChIP-seq 解析に使用した。TSS から  $\pm$ 1kb 以内に H3K4me3 のピークがある遺伝子を K4(+)遺伝子 (ピークシグナル比 $\geq$ 8)、TSS から  $\pm$ 1kb 以内に H3K27me3 のピークがある遺伝子を K27(+)遺伝子 (ピークシグナル比 $\geq$ 5) と定義した。TGF- $\beta$  (-)と TGF- $\beta$  (+)の BMM では、それぞれ 9,962 個と 9,505 個の K4(+)遺伝子、2,600 個と 2,827 個の K27(+)遺伝子が同定された。Smad2/3 標的遺伝子は、TGF- $\beta$  (-)の BMM では K4(+)K27(+)マーク、TGF- $\beta$ (+)では K4(+)K27(-)マークを持つ遺伝子が有意に集結していた (7.8 倍、 $p < 10^{-5}$  カイ二乗検定) (図 2A)。TSS 周辺の H3K4me3 の平均シグナル強度は、TGF- $\beta$ (+)BMM の方が TGF- $\beta$ (-)BMM よりも高く、H3K27me3 のシグナル強度は低かった (図 2B)。



図 2. TGF- $\beta$ によるヒストン修飾の解析(ChIP-seq)

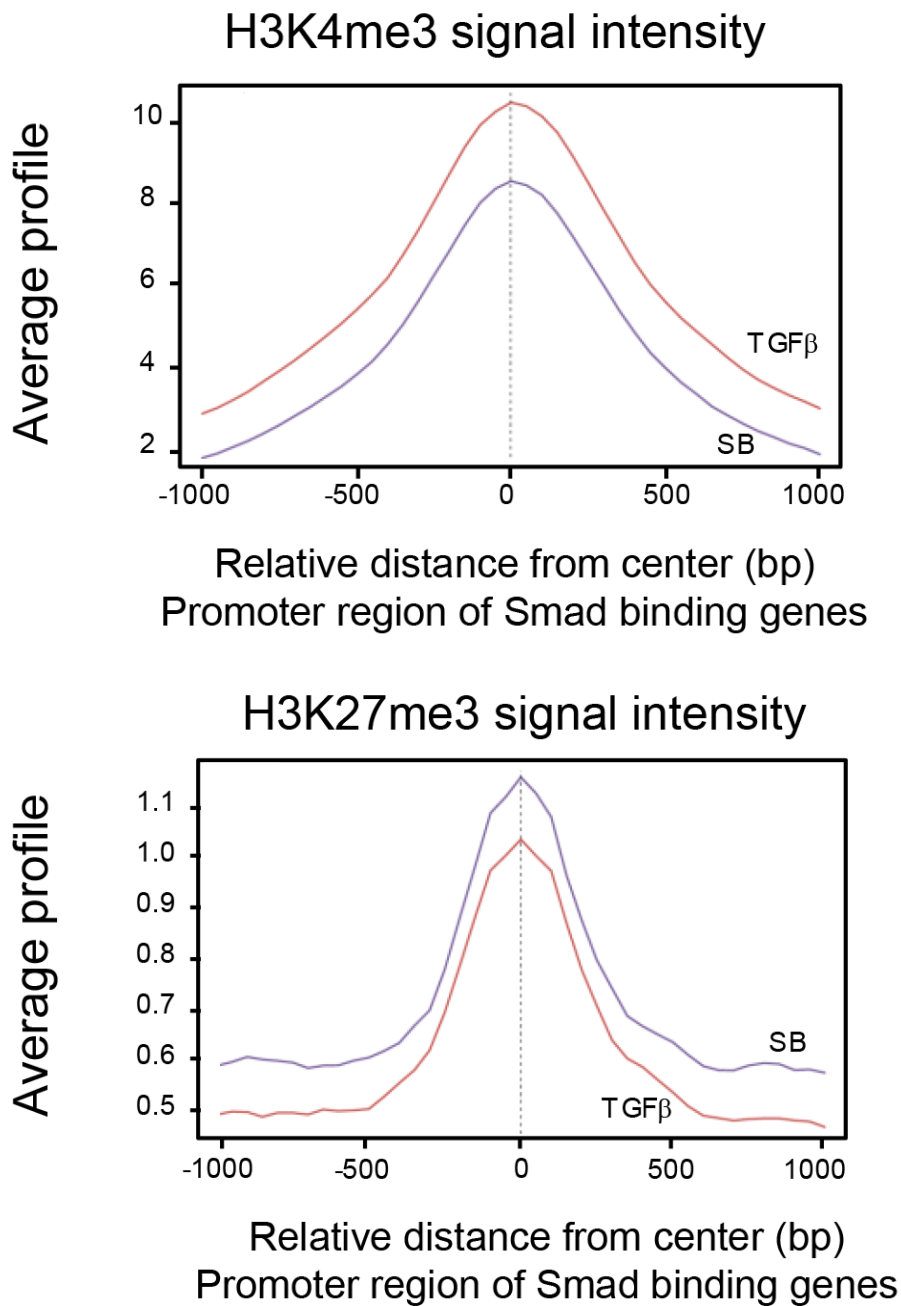
A

TGF- $\beta$ (-)		TGF- $\beta$ (+)		Genes		SBRs		b/a	Enrichment	##
K4	K27	K4	K27	a	% total genes	b	% total SBRs	%		
any	any	any	any	21,194	100	903	100	4.3		
+	+	+	+	541	2.6	17	1.9	3.1	0.7	
+	+	+	-	21	0.1	7	0.8	33.3	7.8	##
+	+	-	+	56	0.3	0	0.0	0.0	0.0	
+	+	-	-	0	0.0	0	0.0	N/A	N/A	
+	-	+	+	27	0.1	4	0.4	14.8	3.5	
+	-	+	-	8013	37.8	550	60.9	6.9	1.6	##
+	-	-	+	0	0.0	0	0.0	N/A	N/A	
+	-	-	-	22	0.1	1	0.1	4.5	1.1	
-	+	+	+	2	0.0	0	0.0	0.0	0.0	
-	+	+	-	4	0.0	1	0.1	25.0	5.9	
-	+	-	+	964	4.5	16	1.8	1.7	0.4	##
-	+	-	-	14	0.1	2	0.2	14.3	3.4	
-	-	+	+	0	0.0	0	0.0	N/A	N/A	
-	-	+	-	15	0.1	2	0.2	13.3	3.1	
-	-	-	+	7	0.0	0	0.0	0.0	0.0	
-	-	-	-	4212	19.9	82	9.1	1.9	0.5	##

(## :  $p < 0.0001$ )

(A) 1 ng/ml の TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ (+)とする) または 5  $\mu$ M の TGF- $\beta$ 阻害剤 SB431542 (TGF- $\beta$ (-)とする) で処理した BMM を、抗 H3K4me3 抗体または抗 H3K27me3 抗体で処理した ChIP-seq 解析の結果。TSS から +/-1kb の範囲で H3K4me3 ピークを持つ遺伝子を K4(+)遺伝子、H3K27me3 ピークを持つ遺伝子を K27(+)遺伝子とした。TGF- $\beta$ , K4, K27 それぞれの(+)/(-)で遺伝子を分類し、Smad2/3 標的遺伝子の集積度 (enrichment score) を算出した。TGF- $\beta$ (-)で K4(+)K27(+)かつ TGF- $\beta$ (+)で K4(+)K27(-)であった遺伝子で最も高いエンリッチメントが観察された。

B



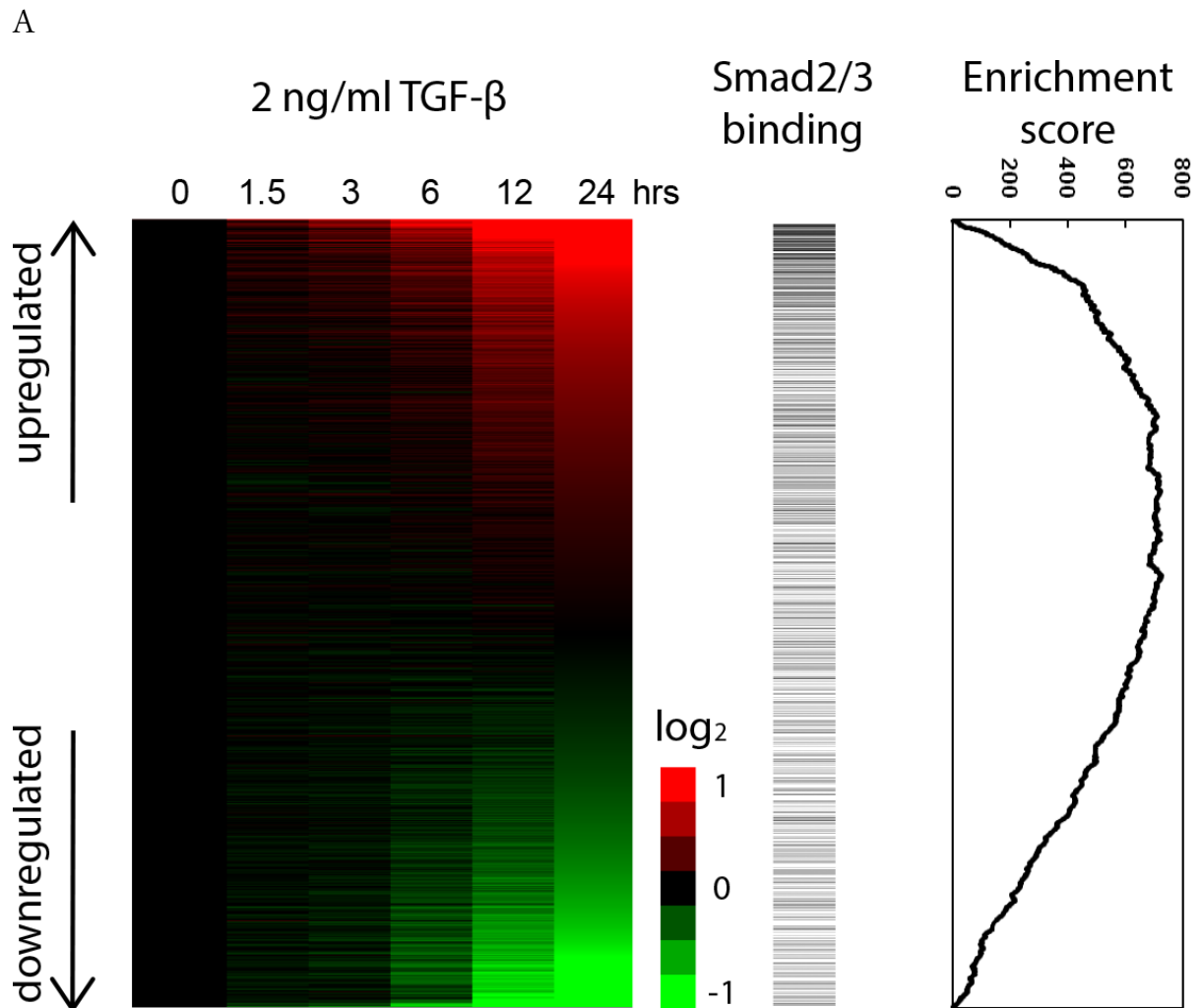
(B) Smad2/3 標的遺伝子の TSS 周辺でのヒストン修飾因子のシグナル強度を示す。H3K4me3 のシグナル強度は TGF-β(+) で TGF-β(-) よりも高かった。H3K4me27 のシグナル強度は TGF-β (-) の方が TGF-β (+) より高かった。

## TGF- $\beta$ は Smad2/3 標的遺伝子を誘導し、RANKL は抑制的に制御する

14,177 プローブ(8,839 遺伝子)のうち、少なくとも 1 つの時点で Gene Chip Mouse Genome MOE430 2.0 オリゴヌクレオチドアレイによる遺伝子発現量が 70 以上であったものを調べたところ、TGF- $\beta$ によって発現が 2 倍以上上昇した遺伝子には Smad2/3 標的遺伝子が有意に集積していたが、発現が 0.5 倍以下に低下した遺伝子には集積していなかった(図 3、上段および下段)。(  $p < 10^{-5}$  カイ二乗検定) また、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) <sup>34</sup> によって算出されたエンリッチメントスコアは、統計的に有意な集積を示した (  $p < 10^{-6}$  ) (図 3 下段)。

次に、RANKL 刺激による Smad2/3 標的遺伝子の発現の変化を解析した。少なくとも 1 つの時点で 70 以上の発現値を示した 16,631 個のプローブ(10,004 個の遺伝子)を用いて、さらなる解析を行った。Smad2/3 標的遺伝子は、RANKL 刺激の 24 時間後、48 時間後、72 時間後に、発現が 0.5 倍以下に低下した遺伝子には有意に集積されていたが、2 倍以上に上昇した遺伝子には含まれていなかった(図 4、上段および下段;  $p < 10^{-5}$  カイ二乗検定)。さらに、TGF- $\beta$ 刺激によってヒストン修飾が K4(+)/K27(+)ビバレントな状態から K4(+)/K27(-)モノバレントな状態に変化した遺伝子は、RANKL によって抑制される遺伝子に集積していた(図 4、上段)。統計的解析では、GSEA のエンリッチメントスコアで  $p < 10^{-6}$  を有意水準とした(図 4、下段)。

図3. 破骨細胞形成における TGF- $\beta$ 下流のエフェクター因子の同定(RNA マイクロアレイ解析)



(A) TGF- $\beta$ 刺激後、各遺伝子発現の変化をヒートマップで示した。赤色は遺伝子発現の増加、緑色は減少を示す。中央に、Smad2/3 標的遺伝子の集積を横棒として示した。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) エンリッチメントスコアを右パネルにグラフ化した。Smad2/3 標的遺伝子は、TGF- $\beta$ によって発現上昇する遺伝子に有意に集積していた。

B

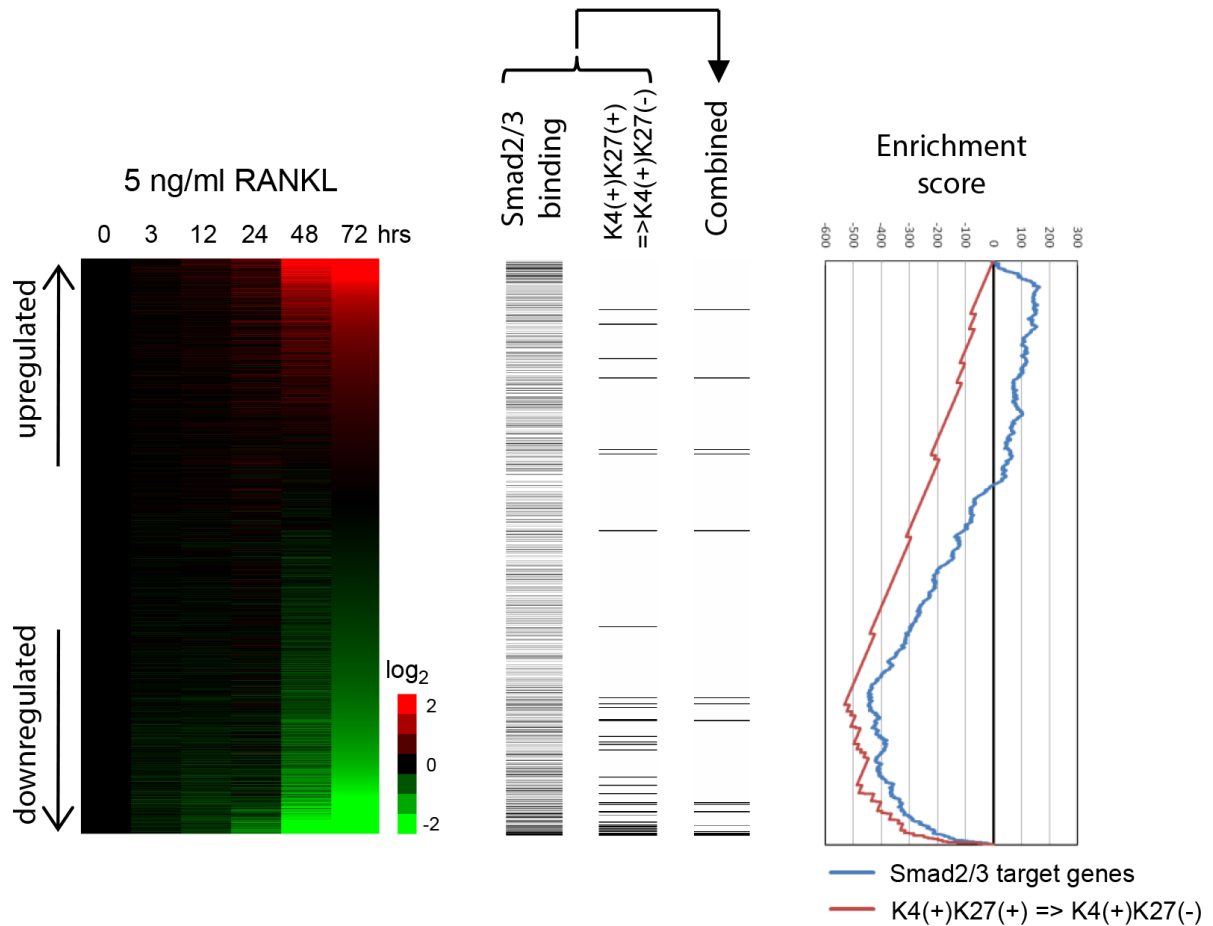
		All genes		Smad2/3 target genes		#b/#a
		Genes (#a)	% total genes	Genes (#b)	% total genes	%
Total		8839	100.0	592	100.0	6.7
≥ 2-fold increase	1.5 hrs	80	0.9	34	5.7	42.5*
	6 hrs	279	3.2	64	10.8	22.9*
	24 hrs	616	7.0	83	14.0	13.5*
≤ 0.5-fold decrease	1.5 hrs	47	0.5	4	0.7	8.5
	6 hrs	206	2.3	13	2.2	6.3
	24 hrs	684	7.7	29	4.9	4.2

\* $p < 10^{-5}$

(B) TGF- $\beta$ 刺激に対して発現が2倍以上上昇した遺伝子、または0.5倍以下に低下した遺伝子を抽出した。Smad2/3 標的遺伝子の発現上昇または発現低下遺伝子のエンリッチメントを評価した。

図 4. 破骨細胞形成における RANKL および Smad2/3、ヒストン修飾に関わる因子の同定(RNA マイクロアレイ解析)

A



(A) TGF- $\beta$ を添加培養した BMM に対して 5 ng/ml の RANKL を投与した。RANKL 投与後の Smad2/3 標的遺伝子の相対的発現レベルを RANKL 投与前と比較して左側にヒートマップで示した。中央の横棒は、Smad2/3 標的遺伝子、TGF- $\beta$ (-)で K4(+)/K27(+) ビバレントなヒストン修飾パターンを示しつつ TGF- $\beta$ (+)では K4(+)/K27(-)モノバレントパターンを示す遺伝子、および両者どちらにも当てはまる遺伝子を示した。GSEA のエンリッチメントスコアを右側にグラフで示した。

B

		All genes		Smad2/3 target genes		#b/#a
		Genes (#a)	% total genes	Genes (#b)	% total genes	%
Total		10,004	100.0	636	100.0	6.4
≥ 2-fold increase	3 hrs	145	1.4	19	3.0	13.1
	12 hrs	231	2.3	20	3.1	8.7
	24 hrs	1,450	14.5	67	10.5	4.6
	48 hrs	1,375	13.7	80	12.6	5.8
	72 hrs	1,291	12.9	103	16.2	8.0
≤ 0.5-fold decrease	3 hrs	282	2.8	15	2.4	5.3
	12 hrs	455	4.5	24	3.8	5.3
	24 hrs	1,286	12.9	139	21.9	10.8*
	48 hrs	1,963	19.6	238	37.4	12.1*
	72 hrs	2,279	22.8	211	33.2	9.3*

\* $p < 10^{-5}$

(B)RANKL によって相対的な発現量が 2 倍以上、または 0.5 倍以下に増加した遺伝子群における Smad2/3 標的遺伝子を評価した。Smad2/3 標的遺伝子は、RANKL によって抑制された遺伝子に有意に集積していた。

## BMM における Smad2/3 標的 Nedd9 の同定

抗ヒストン抗体を用いた ChIP シークエンスの結果、TSS から±1kb 以内に H3K4me3 のピークがある K4(+)遺伝子、および TSS から±1kb 以内に H3K27me3 のピークがある K27(+)遺伝子は、TGF-β阻害薬を添加培養した BMM から採取した TGF-β(-)サンプルでは、それぞれ 9,962 個と 2,600 個同定された。TGF-βを添加培養した TGF-β(+)サンプルでは、K(+)遺伝子は 9,055 個同定され、転写開始点付近に K27 ピークのない K27(-)遺伝子は、3,777 個同定された。TGF-β(-)で K4(+)かつ K27(+)である遺伝子は 790 個、TGF-β(+)で K4(+)かつ K27(-)である遺伝子は 605 個であった。さらに TGF-β(-)で K4(+)K27(+)かつ TGF-β(+)で K4(+)K27(-)を満たす遺伝子は 35 個であった。これら 35 個のうち、Smad2/3 がプロモーター領域に結合する Smad2/3 結合遺伝子を抽出した結果、14 個の Smad2/3 標的遺伝子を同定した (図 5 A,B)。

これら 14 個の、TGF-β(-)では K4(+)K27(+)かつ、TGF-β(+)では K4(+)K27(-)の Smad 標的遺伝子の mRNA 発現を realtime PCR で調べた。mRNA の発現量は、TGF-β刺激後に上昇していた (図 5 C)。

同定した 14 個の遺伝子から細胞分化に関連する遺伝子として Nedd9 を抽出した。



図 5 A. TGF-β刺激によりヒストン修飾変化をきたす遺伝子の同定

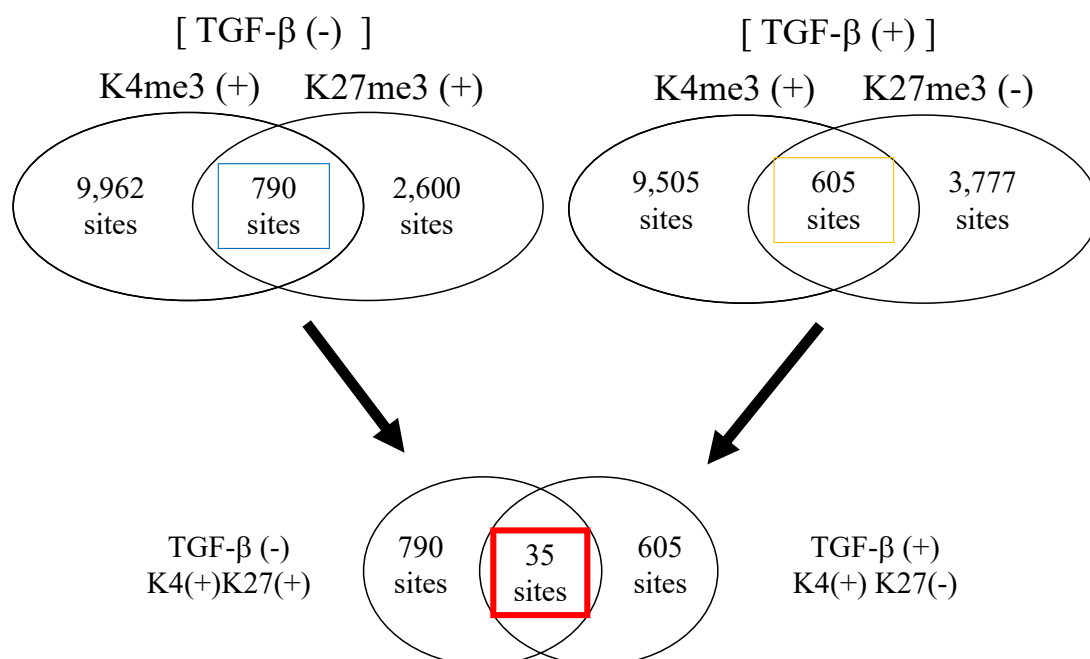
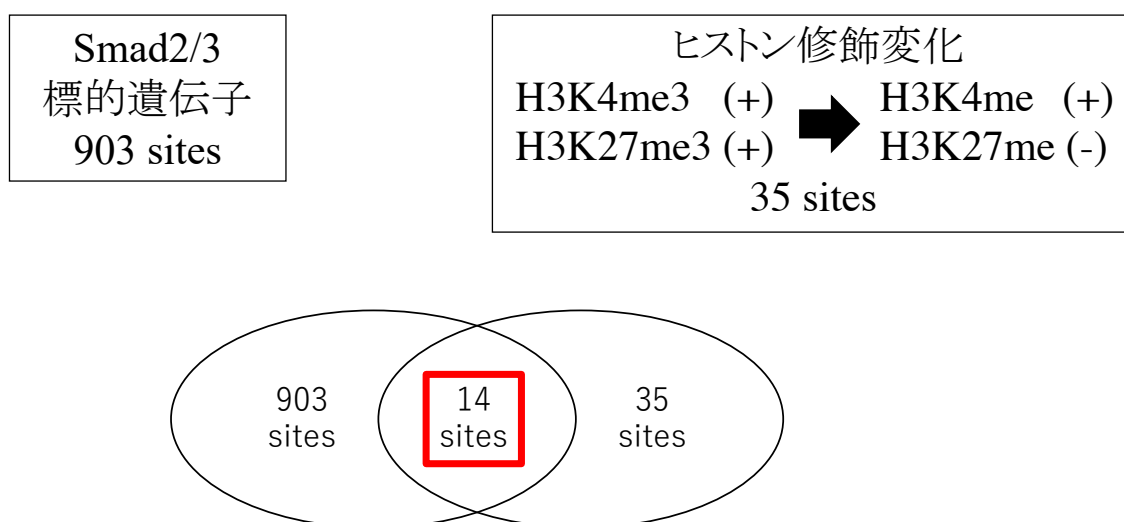
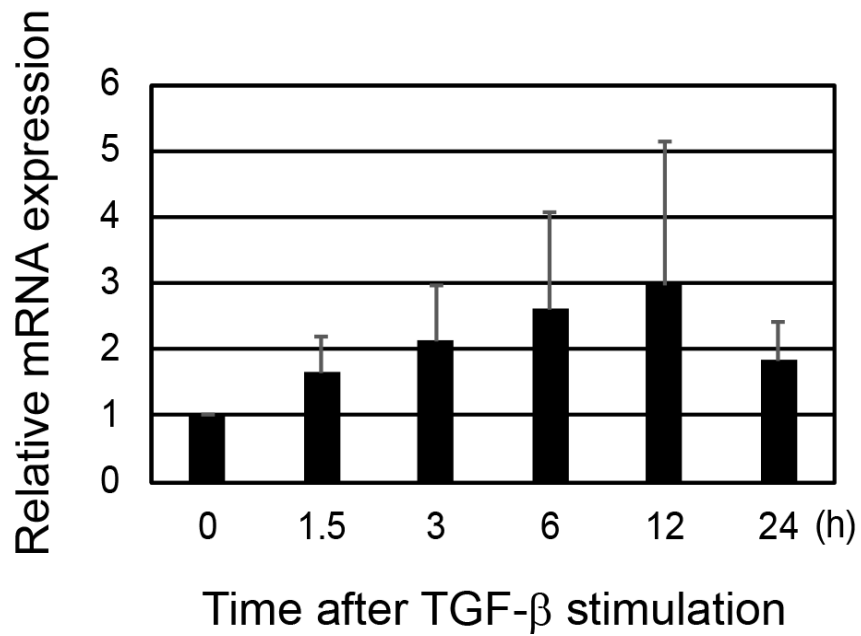


図 5 B. Smad2/3 標的遺伝子で TGF-β刺激によりヒストン修飾変化する遺伝子の同定



プロモーター領域にSmad2/3が結合  
H3K4me3, H3K27me3→H3K4me3に変化  
遺伝子14個

図 5 C



(C) TGF- $\beta$ (-)で K4(+)K27(+)かつ TGF- $\beta$ (+)で K4(+)K27(-)であった Smad 標的遺伝子の TGF- $\beta$ 刺激後の mRNA 発現。TGF- $\beta$ 刺激前の発現量を基準として 14 個の遺伝子の発現量の平均  $\pm$  標準偏差を示した。TGF- $\beta$ 刺激に反応して mRNA 発現量の増加を認めた。

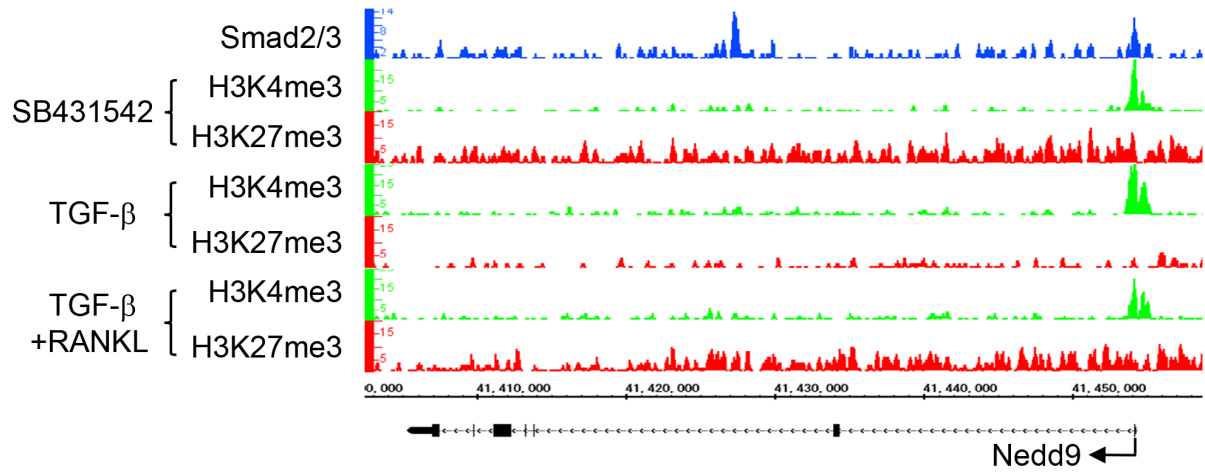
## Nedd9 は TGF- $\beta$ 刺激でヒストン修飾が変化して発現が増加し、RANKL 刺激で発現が低下する

Nedd9 は、Cas-L や HEF-1 (human enhancer of filamentation 1) と呼ばれ、CAS (crk-associated substrate) ファミリータンパク質の一つである<sup>35 36 37</sup>。Nedd9 は、focal adhesion(細胞膜上の細胞外器質が結合する接着点)局在する足場タンパク質であり、癌細胞の発生と進行に関与している<sup>32,38 39</sup>。

図 6A に示すように、Smad2/3 の結合は、Nedd9 遺伝子の TSS 付近に集中していた。ヒストンの修飾状態は、TGF- $\beta$ 刺激によって、K4(+)<sup>+</sup>K27(+)<sup>+</sup>ビバレントから K4(+)<sup>+</sup>K27(-)<sup>-</sup>モノバレントに変化し、RANKL 刺激に反応して K4(+)<sup>+</sup>K27(+)<sup>+</sup>ビバレントに戻った。Nedd9 遺伝子の発現は、BMM の TGF- $\beta$ によって増加し、RANKL 刺激によって減少した (図 6B)。

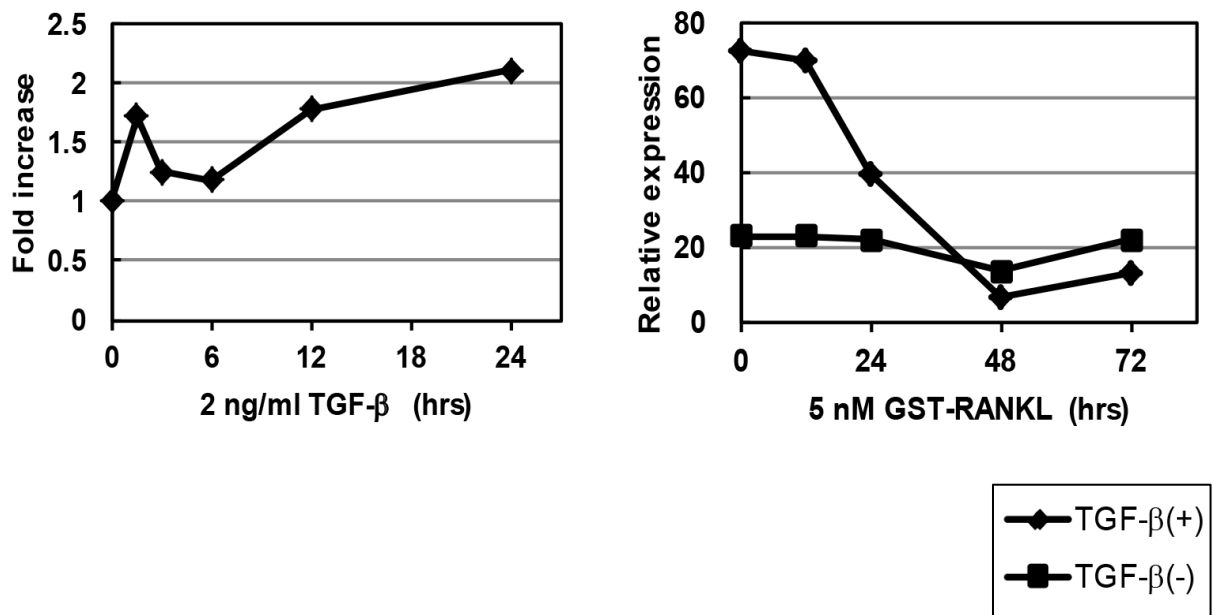
図 6. 破骨細胞形成における Nedd9 遺伝子のエピジェネティックな制御機構

A



(A)破骨細胞形成過程における Nedd9 遺伝子の Smad2/3 結合とヒストン修飾の変化。Nedd9 遺伝子のプロモーター上には、Smad2/3 が集積していた。BMM におけるヒストン修飾パターンは、TGF-βによって K4(+)/K27(+)ビバレントから K4(+)/K27(-)モノバレントに変化し、RANKL 刺激後に K4(+)/K27(+)ビバレントに戻った。

B



(B)TGF-βまたは RANKL 刺激後の Nedd9 mRNA の発現量の変化を示す。TGF-β刺激で発現が増加し、RANKL 刺激で減少した。SB431542(TGF-β阻害剤)の存在下では、発現は低レベルにとどまった。

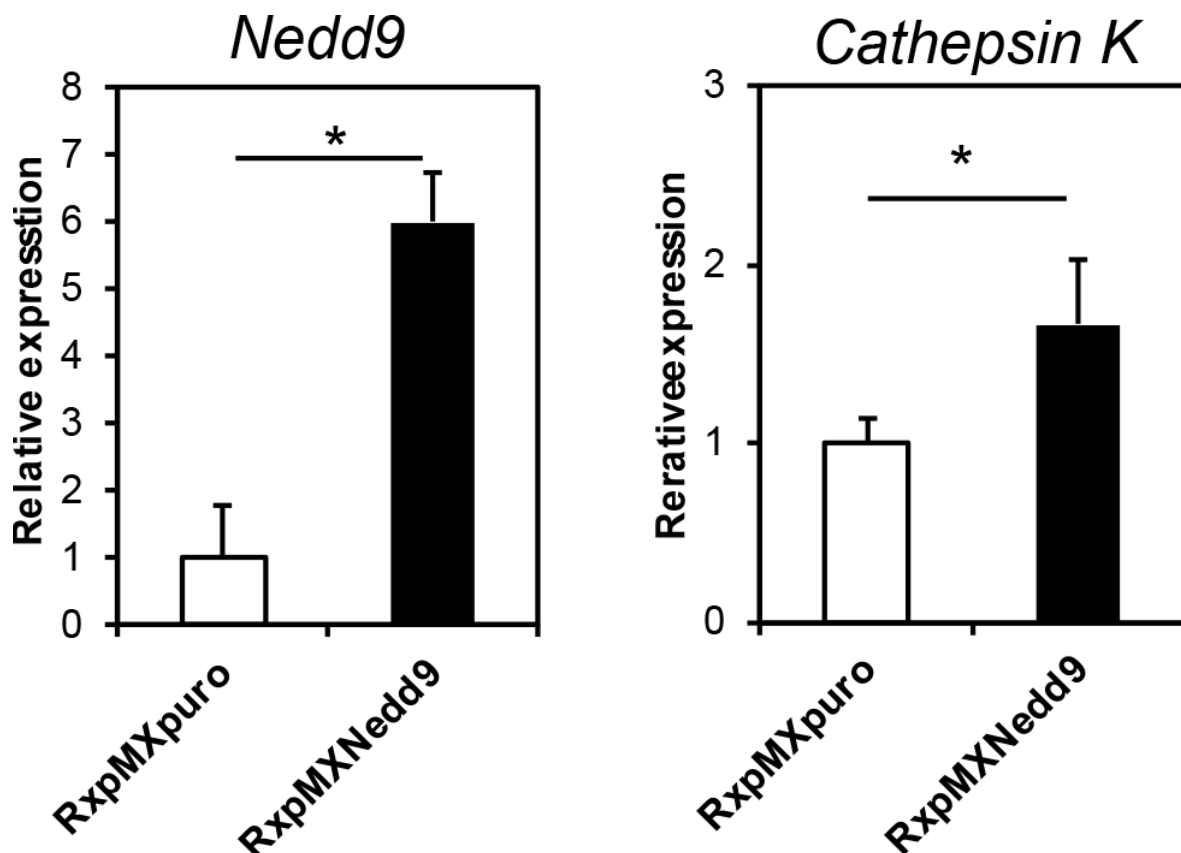
## Nedd9 遺伝子の強制発現

破骨細胞形成における Nedd9 の機能を評価した。Nedd9 をレトロウイルスベクターでトランスフェクションして過剰発現させると、破骨細胞のマーカー遺伝子であるカテプシン K の発現が有意に増加した (図 7A)。

さらに、Nedd9 の過剰発現は、コントロールと比較して破骨細胞形成の増加を認めた。SB431542 により TGF- $\beta$  を阻害すると破骨細胞形成は抑制されたが、同条件下でも Nedd9 の過剰発現は骨細胞形成の部分的な増加を認めた。 ( $p < 0.05$ 、図 7B-D)。

図 7. 破骨細胞形成における Nedd9 過剰発現の結果

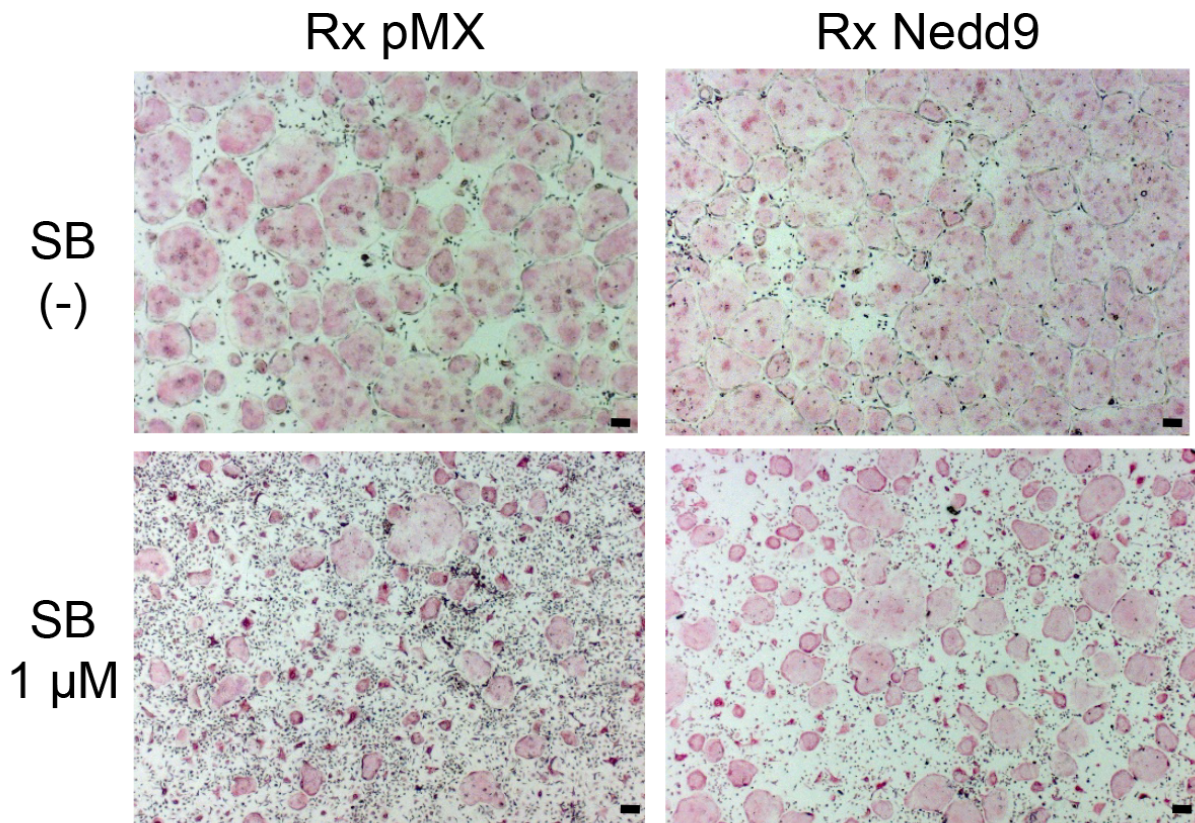
A



(A) Nedd9 およびカテプシン K のリアルタイム PCR の解析結果 (\*  $p < 0.05$ ;  $n=3$ )。Nedd9 遺伝子を導入したレトロウイルスベクターによる過剰発現が RANKL

誘導による破骨細胞形成に及ぼす影響を、Nedd9 およびカテプシン K の mRNA 発現で示した。

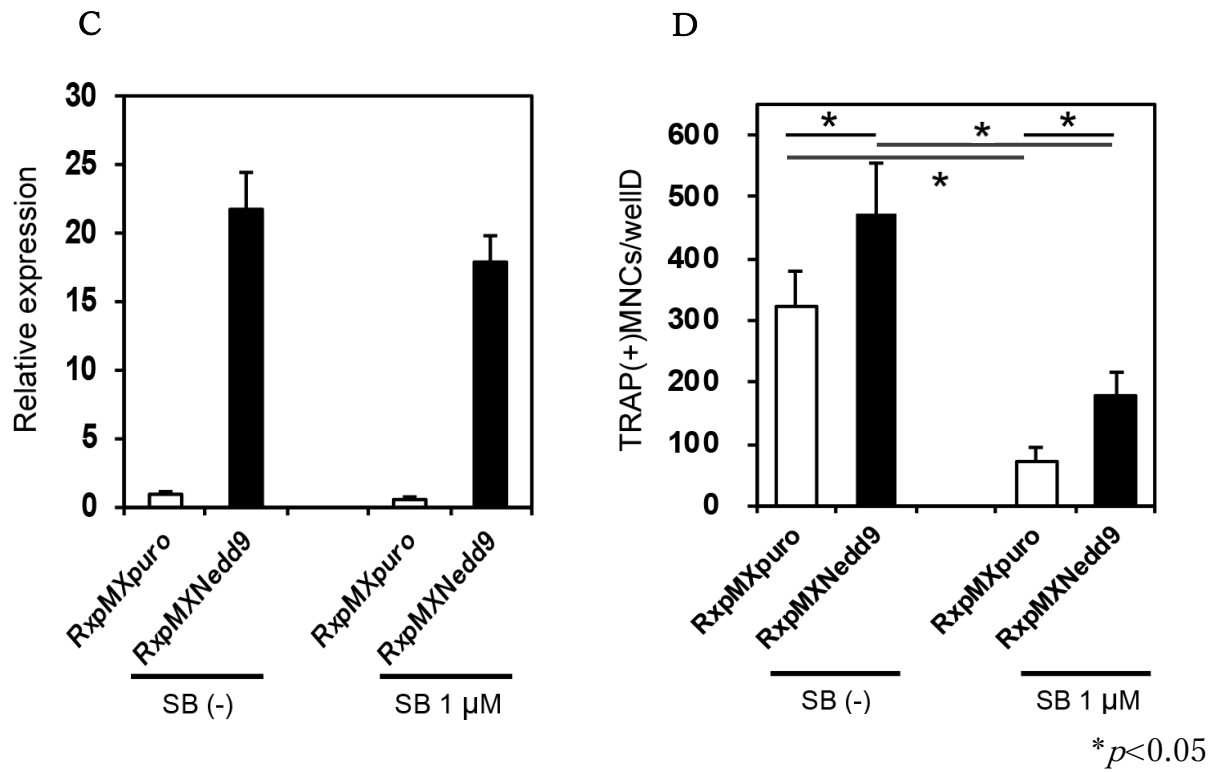
B



(B) Nedd9 過剰発現における破骨細胞形成。

Nedd9 遺伝子過剰発現を行い、RANKL 刺激による破骨細胞形成に対する TGF- $\beta$ 阻害剤(SB431542)の効果を TRAP 染色で評価した。Nedd9 の過剰発現は、RANKL による破骨細胞形成を増加させた。TGF- $\beta$ 阻害剤は破骨細胞形成を抑制したが、その効果は Nedd9 の過剰発現によって一部回復した。培養液を TRAP で染色した。スケールバーは 100  $\mu$ m を示す。

C, D



(C) リアルタイム PCR 法による Nedd9 遺伝子の発現量。

(D) Nedd9 過剰発現における破骨細胞数 (\* *p* < 0.05 ; n=3)。

Nedd9 の過剰発現により、TRAP 陽性の破骨細胞の数が有意に増加し、TGF-β阻害剤(SB431542)による破骨細胞形成の抑制は、Nedd9 の過剰発現により一部回復した。

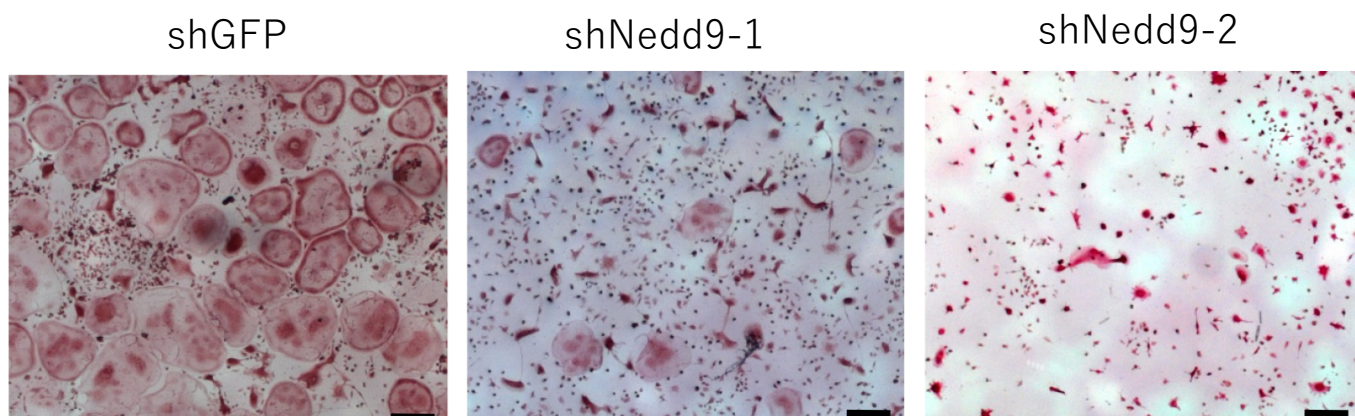


## RNAiによる遺伝子干渉(ノックダウン)

レトロウイルスを用いた shNedd9 による Nedd9 のノックダウンは、RANKL による破骨細胞形成を著しく抑制した (図 8A-C)。これらの結果は、RANKL による破骨細胞形成に Nedd9 が重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

図 8. 破骨細胞形成における Nedd9 遺伝子ノックダウンの結果

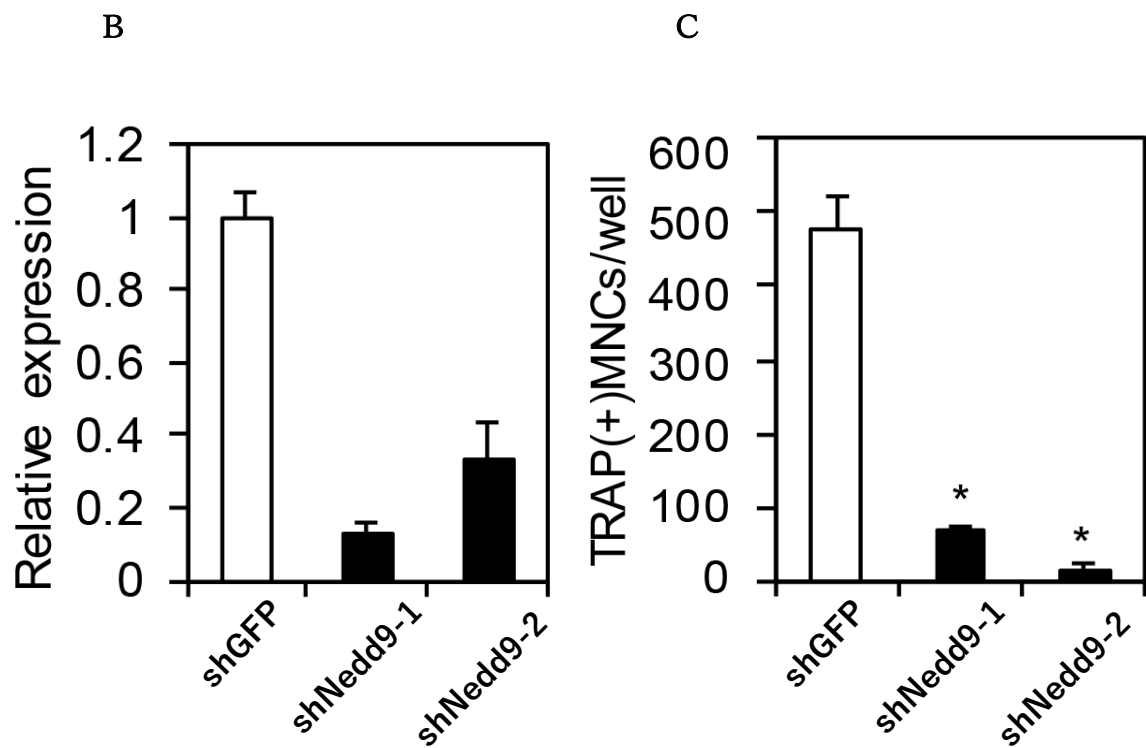
A



(A) Nedd9 ノックダウンにおける破骨細胞形成。

shNedd9 を導入したレトロウイルスベクターを感染させた BMM を 5 nM の RANKL で 3 日間処理し、TRAP で染色した。コントロールとしては、shRNA をコードするレトロウイルスベクター (shGFP) を使用した。Nedd9 のノックダウンにより破骨細胞形成の抑制がみられた。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

B、C



\* $p < 0.05$

(B) リアルタイム PCR による Nedd9 遺伝子の発現。

(C) Nedd9 ノックダウンにおける破骨細胞数 (\*  $p < 0.05$ ;  $n=3$ )。

TRAP 陽性の破骨細胞の数は、shNedd9 のレトロウイルス導入により有意に減少した。

## Nedd9<sup>-/-</sup>マウスにおける破骨細胞の評価

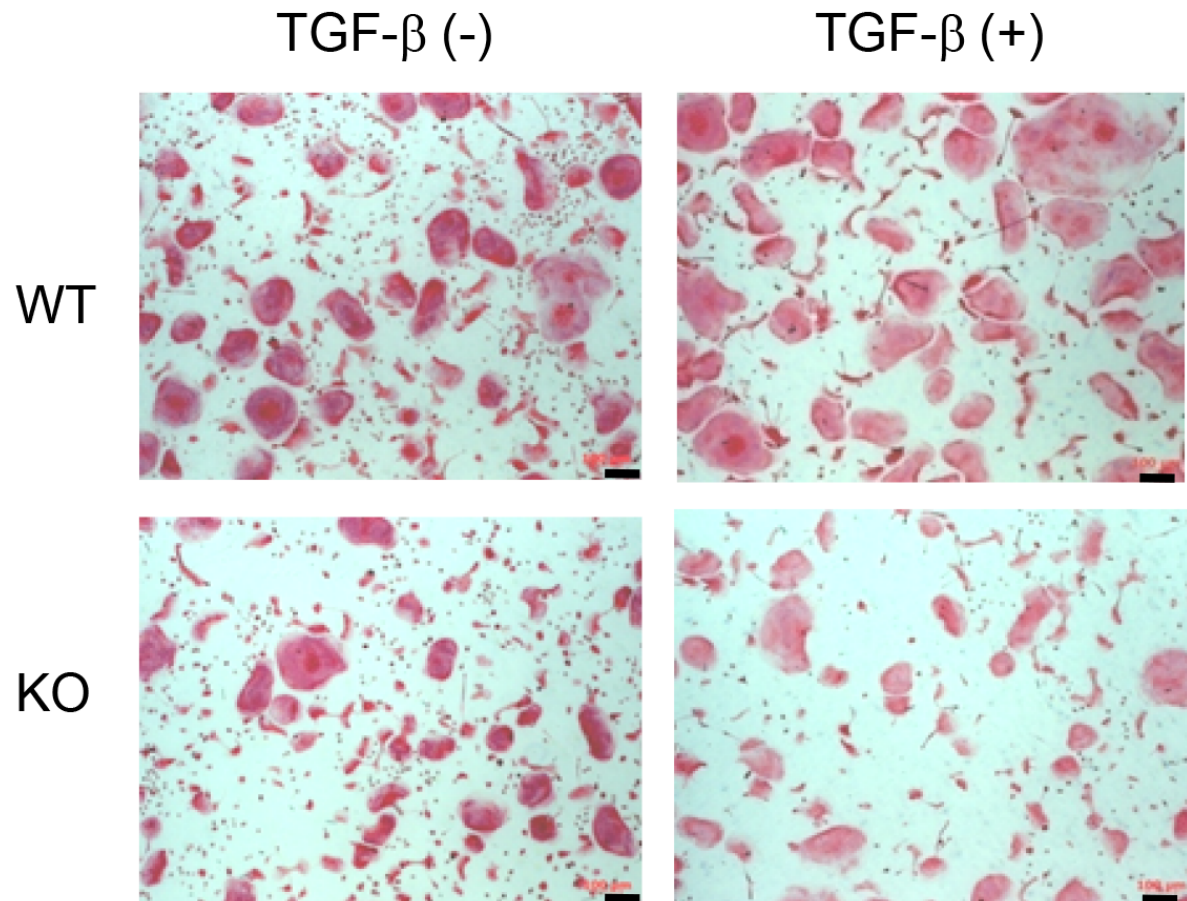
Nedd9<sup>-/-</sup>マウスを用いて、破骨細胞形成における Nedd9 の機能を評価した。Nedd9<sup>-/-</sup>マウスの BMM は、shNedd9 を投与した細胞と同様に破骨細胞形成が減少した (図 9A および 9B)。TGF- $\beta$  による破骨細胞形成促進作用は、Nedd9 欠損 BMM を用いた破骨細胞誘導では低下していた (図 9B)。ウェスタンブロット法によるカテプシン K の発現は、Nedd9 欠損の破骨細胞では低下していた (図 9C)。

Nedd9<sup>-/-</sup>マウスにおいて、RANKL 下流のシグナル伝達経路における発現の変化をウェスタンブロット法により評価した。MAPK 経路では野生型と比較して違いがなかったが、ITAM 共刺激系において PLC $\gamma$ 1 の発現が低下していた (図 9D)。

下肢の X 線、腰椎のマイクロ CT、二重エネルギー X 線吸収法で評価した骨格、骨密度の表現型については、Nedd9<sup>-/-</sup>マウスでは骨量が増加傾向であったが、有意な差はなかった (図 10A-C)。

図 9. Nedd9<sup>-/-</sup>-マウスから採取した BMM における破骨細胞形成

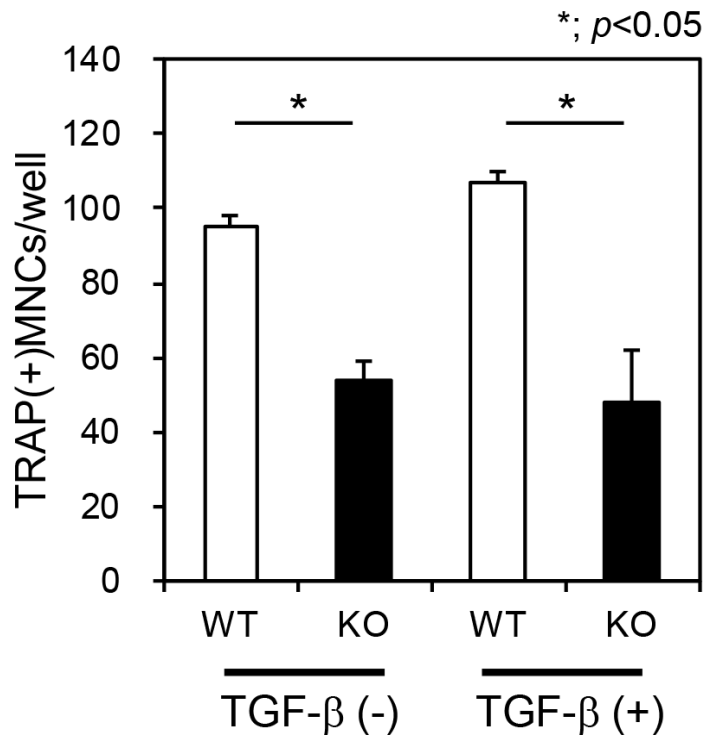
A



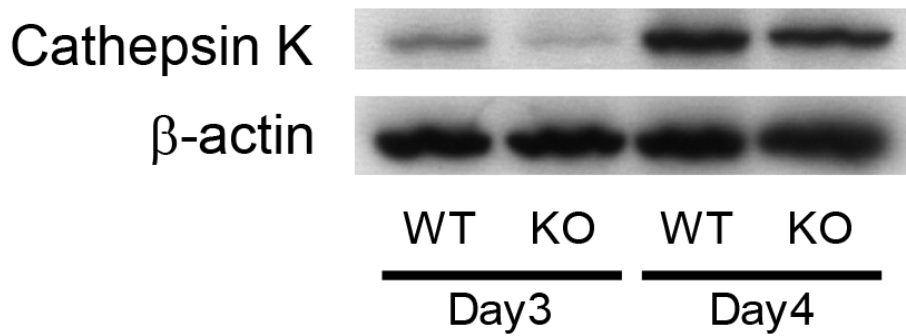
(A) Nedd9<sup>-/-</sup>-マウスにおける破骨細胞形成。

Nedd9<sup>-/-</sup>-マウスと野生型 (WT) マウスから BMM を採取し、RANKL の存在下、TGF- $\beta$  添加の有無の条件下で培養した。破骨細胞形成は、TRAP 染色で確認した。

B



C



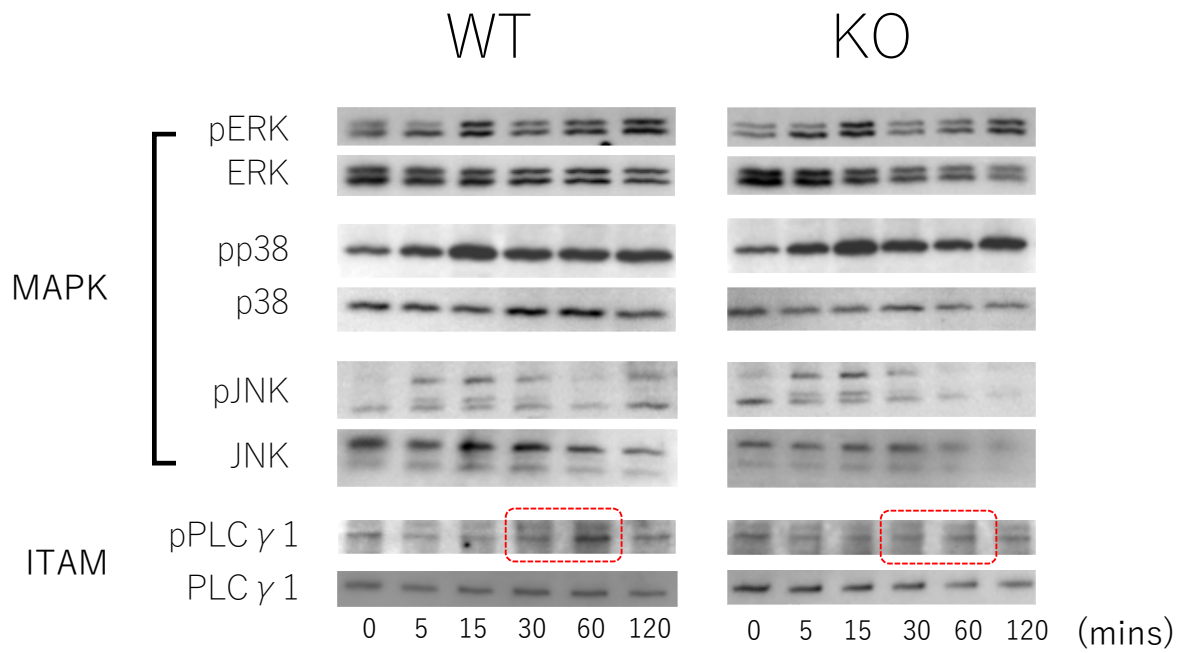
(B) Nedd9<sup>-/-</sup>マウスにおける破骨細胞数 (\*  $p < 0.05$ ;  $n=3$ )。

TRAP(+) MNCs は TRAP 染色陽性の多角細胞(multinuclear nuclear cells)数を表す。Nedd9<sup>-/-</sup>マウスでは破骨細胞数が減少し、TGF-β追加しても細胞数減少は変わらなかった。

(C)カテプシン K タンパク質の発現を western blotting で評価。

Nedd9<sup>-/-</sup>マウスでカテプシン K 発現の低下を認めた。

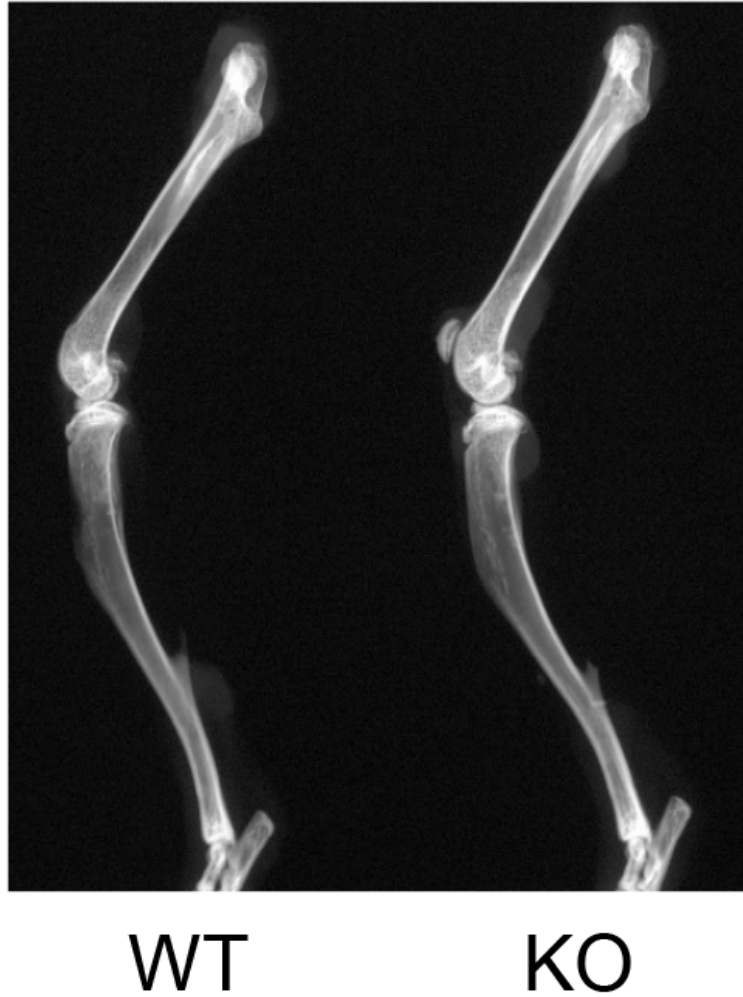
D



(D)RANKL 下流および ITAM 経路の因子の発現を western blotting で評価。  
MAPK 経路では差がなかったが、ITAM 下流の PLC $\gamma$ 1 タンパク質発現が Nedd9<sup>-/-</sup>で低下していた。

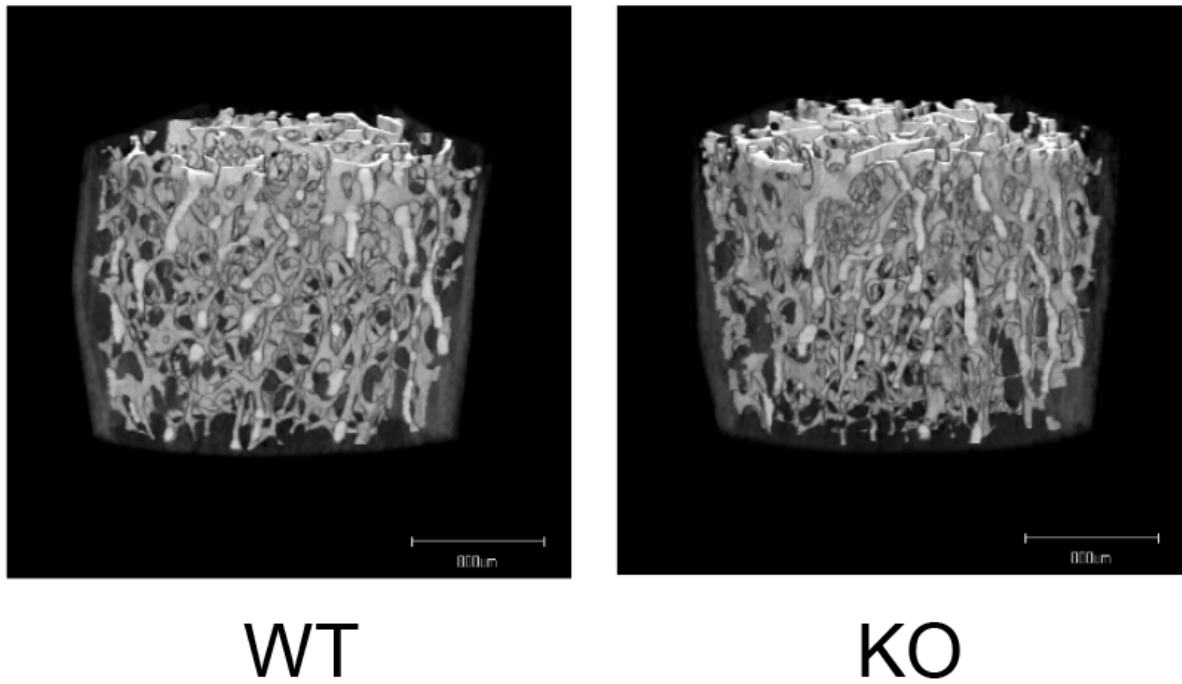
図 10. Nedd9<sup>-/-</sup> マウスの骨の表現型

A



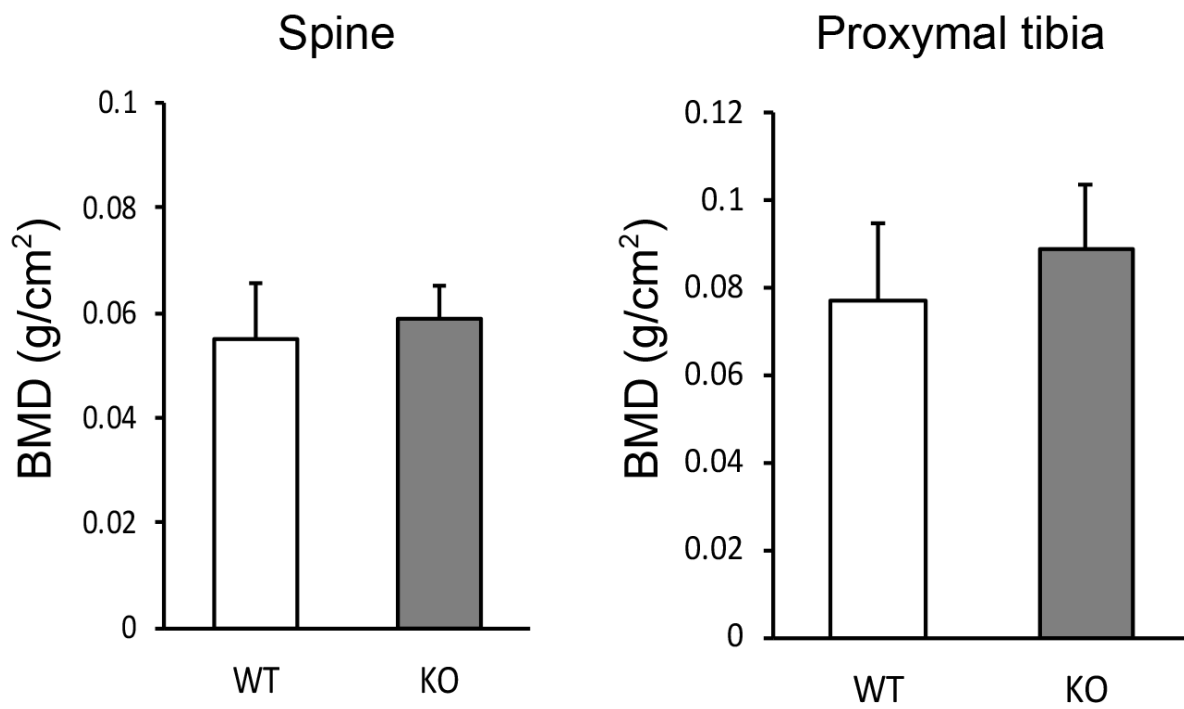
(A) 下肢骨の X 線 (12 週齢のオス Nedd9<sup>-/-</sup> マウスと野生型マウス)。

B



(B) 腰椎椎体のマイクロ CT(12 週齢のオス Nedd9<sup>-/-</sup>マウスと野生型マウス)。

C



(C) 腰椎椎体と近位脛骨の骨密度 (n=3)。



## 5. 考察

本研究では、ChIP-seq 解析と RNA-seq 解析により、BMM における Smad2/3 結合領域を網羅的に解析し、同部への標的遺伝子を同定した。Smad2/3 標的遺伝子は、予想通り TGF- $\beta$  の発現量が多い遺伝子に集中していた。さらに、これらの遺伝子は、RANKL 処理によって発現が低下する遺伝子群にも集中していた。TGF- $\beta$  は、造血幹細胞から破骨細胞方向への分化を誘導すること、造血幹細胞を bone marrow niche へ誘導すること、単球・マクロファージ系骨髄細胞に作用して RNAK の発現を上昇させることがこれまで報告されており、TGF- $\beta$  は破骨細胞分化の早い段階に作用していると考えられた<sup>25,26</sup>。Smad2/3 標的遺伝子群の多くが RANKL により発現が低下していたことはこれらの報告を裏付ける結果であると考えられた。

細胞の分化には、ヒストンの修飾が重要な役割を果たしている。ヒストンのメチル化 H3K4me3 は活性化されたプロモーター領域に集中しており<sup>40,41</sup>、H3K27me3 はポリコーム群タンパク質を介した遺伝子抑制に関与している<sup>42</sup>。本研究でもヒストン修飾についての ChIP-seq の結果により、Smad2/3 標的遺伝子の転写開始点付近で H3K4me3 シグナルのピークは TGF- $\beta$  刺激群で上昇し、H3K27me3 のピークは TGF- $\beta$  阻害群で上昇していた。近年の研究によって、様々な種類の細胞の主要な発生遺伝

子の発現においてヒストン修飾パターンが H3K4me3(+)H3K27me3(+)ビバレントから H3K4me3(+)H3K27me3(-)モノバレントへと変化させる傾向があることが明らかになっている。本研究では、ヒストン修飾パターンが K4(+)K27(+)ビバレントから K4(+)K27(-)モノバレントに変化する遺伝子群に、Smad2/3 標的遺伝子が有意に集積していることを示した。さらに、Smad2/3 標的遺伝子かつヒストン修飾変化が K4(+)K27(+)ビバレントから K4(+)K27(-)モノバレントに変化する遺伝子を 14 個抽出した。その中で、Nedd9 は細胞分化に関連する遺伝子であることが知られており<sup>43</sup>、破骨細胞分化に関連する Smad2/3 標的遺伝子の候補として抽出した。

本研究ではさらに、ChIP-seq の結果により、Smad2/3 が Nedd9 遺伝子のプロモーター領域に結合し、TGF- $\beta$  刺激によりヒストン修飾パターンが H3K4me3(+)H3K27me3(+)ビバレントから H3K4me3(+)H3K27me3(-)モノバレントへ変化すること、さらに RANKL 刺激を加えることで H3K4me3(+)H3K27me3(+)ビバレントへもどることを明らかにした。この結果に対応するように、Nedd9 の mRNA 発現量は TGF- $\beta$  刺激後には増加し、RANKL 刺激後には低下していた。RANKL 刺激後に遺伝子発現が低下することから、多くの Smad 標的遺伝子と同様に Nedd9 は破骨細胞分化の早期に作用すると考えられる。予備的に行ったマウス成熟破骨細胞のシングルセル解析では、Nedd9 の発現は低い結果を示し、前駆細胞段階で作用している分子であることが推察された。

Nedd9 (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 9 : 神経前駆細胞発現発達抑制タンパク質 9) は、Cas-L(Crk-associated substrate lymphocyte type-related protein : Crk 基質関連タンパク質)や Cass2(Cas scaffolding protein family member 2 : Cas 足場タンパク質ファミリーメンバー2)、HEF-1 (human enhancer of filamentation 1 : ヒトフィラメントエンハンサー1) と呼ばれ、Cas (Crk-associated substrate) ファミリータンパク質の一つである。Crk はチロシンキナーゼ機能のあるアダプタータンパク質として知られており、細胞の分裂、移動、接着など様々な機能への関与が知られている<sup>44</sup>。

Nedd9 は、末梢 T 細胞で $\beta$ 1 インテグリンに連結することによってチロシンリン酸化される 105 kDa のタンパク質として同定された<sup>44</sup>。インテグリン以外にも、T 細胞受容体、B 細胞受容体、TGF- $\beta$ 受容体など様々な受容体刺激によって活性化され、細胞内シグナル伝達に関わって活動していることが知られている。他には、Aurora A (有糸分裂キナーゼ)と直接結合・活性化させ、有糸分裂の開始に関連することも知られている。Nedd9 は、細胞周期の間期/静止期には、focal adhesion(細胞膜上の細胞外器質が結合する接着点)に大部分が局在しており、細胞分裂時の細胞接着のセンサーになっていると考えられている<sup>43</sup>。

また、これまでの研究では、がん関連遺伝子として、複数の悪性腫瘍の分化、移動、および転移に関与していることが知られている<sup>45</sup>。MCF-7 細胞(ヒト乳癌細胞株)を使

用した研究では、Nedd9 は E カドヘリン(カルシウム依存性細胞接着タンパク質)の形成に抑制的に関与し細胞接着能を失うことで、上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT)を介して、細胞の遊走・転移に関係すると報告されている<sup>46</sup>。E カドヘリンは、破骨細胞においても接着機能を通して破骨細胞分化における細胞融合に関与することが知られている<sup>47</sup>。その他にも、中枢神経系で、TGF- $\beta$ を介した脳神経系の発生や、アルツハイマー病や脳損傷後の神経再生への関与が知られている<sup>48</sup>。

Nedd9 の細胞内シグナル伝達における役割の一つとして、TGF- $\beta$ によって誘導され、様々な種類の細胞で Smad タンパク群と直接相互作用することが知られている<sup>49</sup><sup>50</sup>。Huh-7 細胞(高分化型ヒト肝癌由来細胞株)を使用した以前の研究では、Nedd9 は阻害性 Smad である Smad6/7 と結合することでその働きを抑制し、TGF- $\beta$ /Smad2/3 経路に対して促進的に働くとの報告がなされている<sup>51</sup>。本研究の ChIP-seq 解析では、Smad2/3 が Smad6/7 のプロモーター領域に結合していることが示された。BMM においても、Nedd9 が阻害性 Smad に作用することで、TGF- $\beta$ シグナルを制御している可能性がある。また、Nedd9<sup>-/-</sup>マウスでは、破骨細胞形成が抑制されており、TGF- $\beta$ 刺激によっても破骨細胞形成の抑制は変わらなかった。このことから、TGF- $\beta$ が Nedd9 の作用を介して破骨細胞分化の制御に作用していることがうかがえる。

生体内での骨の恒常性における Nedd9 の役割は明らかではない。瀬尾らは、Nedd9-

/-マウスを作製し、リンパ球の輸送が変化することを報告した<sup>32</sup>。また、片寄らは、Nedd9-/-マウスは野生型マウスと比較してコラーゲン誘発関節炎の発症が減少し、関節破壊が減少することを報告した<sup>52</sup>。

本研究では、Nedd9 の過剰発現は破骨細胞形成を促進し、Nedd9 のノックダウンまたはノックアウトは破骨細胞形成を抑制した。RANKL 添加後のカテプシン K 発現は、Nedd9 の強制発現で増加し、そのノックアウトで低下していた。このことから Nedd9 は破骨細胞分化において促進的に作用していることがわかる。また、RANKL 下流の MAPK 経路ではタンパク発現に差がなかったが、共刺激系の ITAM 経路では PLC $\gamma$  の発現がノックアウトで低下していた。破骨細胞分化においては、PLC $\gamma$  は ITAM 配列を持つアダプター蛋白質の下流に位置し、カルシニューリン活性を通じて Nfatc1 の発現を誘導する。T 細胞や B 細胞の受容体下流で Nedd9 や Cas ファミリータンパク質がアダプター因子として働き ITAM 系に作用することがこれまで報告されており<sup>53</sup>、破骨細胞分化において ITAM 系を介して分化を促進させることが Nedd9 の機能の一つと推察される。

骨表現型については、Nedd9-/-マウスでは骨密度が高い傾向が示されたが、有意差はなかった。その理由の一つとして、TGF- $\beta$  は破骨細胞形成に対して促進的に作用する一方で、骨芽細胞に対しても作用しており、骨の恒常性を保つように調節していることがあげられる。つまり、骨吸収が亢進して、酸の刺激で骨内の不活化型 TGF- $\beta$  が

活性化型に変化すると、骨芽細胞の OPG 産生が亢進することで RANKL/OPG バランスの調節がなされ、破骨細胞形成に抑制的に作用しネガティブフィードバックとして働く。こうした骨恒常性を保とうとする機構が働き、Nedd9<sup>-/-</sup>マウスで骨量の増加傾向は認めながらも有意差を形成するに至らなかったと考える。

Nedd9 の属する Cas ファミリータンパク質に共役する Src の一種である c-Src は、破骨細胞において骨吸収窩を形成する上で必要なアクチンリング形成に重要な働きをしている。また、Cas ファミリータンパク質の一つである p130Cas も破骨細胞機能に関与している。Nagai らは、p130Cas の conditional knockout マウスは、野生型に比べて骨量の増加を認め、破骨細胞においてアクチンリング形成を欠いたと報告した。この様に破骨細胞機能に関連するファミリー因子が他にもあるため、in vivo の実験系では Nedd9 欠損の影響を相補的に減弱した可能性があると考え<sup>54</sup>。

今後の課題としては、破骨細胞分化における TGF- $\beta$ /Smad 系における Nedd9 の詳細な制御メカニズムの解明、骨細胞もしくは骨芽細胞骨における Nedd9 の働きの解明などが挙げられる。shRNA によるノックダウン実験での TGF- $\beta$ 添加実験や、ノックアウトマウスモデルにおいて、共存培養や破骨細胞機能に関する実験、加齢マウスモデル、卵巣摘出モデルによる実験、ChIP-seq や RNA-seq におけるノックアウトと野生型の比較などの実験、さらにシングルセル解析によるクラスターリング解析などが

これらの解明に繋がると考えられる。骨の恒常性における Smad2/3 標的分子 Nedd9 の役割を完全に理解するには、骨関連細胞の包括的な解析や研究が必要であると考えられる。

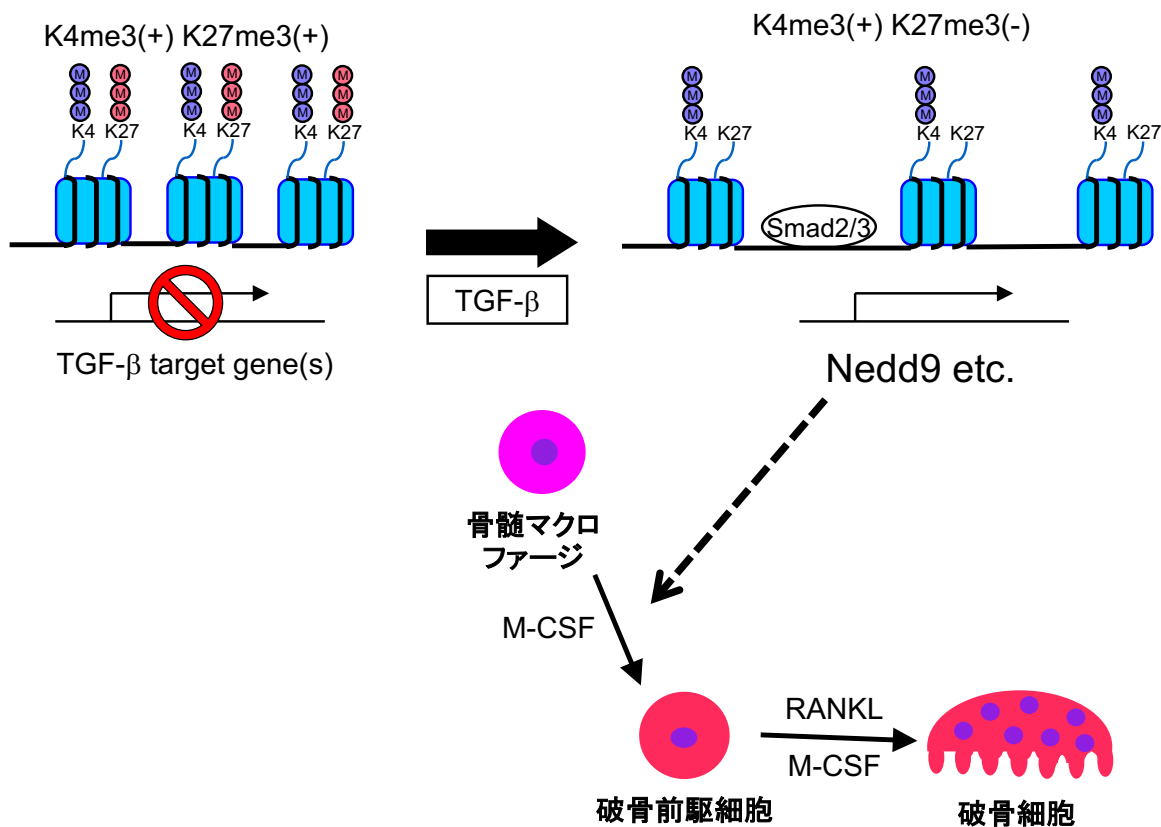
本邦では平均寿命の伸長により急速に高齢社会が到来しており、高齢者の健康寿命の維持が社会的な課題となっている。高齢者人口の増加とともに骨粗鬆症患者も増加してきている。骨粗鬆症では、骨量の低下、骨脆弱性をきたし、軽微な外傷や外傷がなくとも容易に骨折を起こすようになる。一旦骨折を起こしてしまうと ADL が著明に低下し、それを改善するために行う手術や環境整備にかかる医療資源・介護資源は膨大である。そのため、骨粗鬆症をはじめとした骨量の低下する疾患に対して予防的治療ができるようになることが重要であると考えられる。

骨粗鬆症や関節リウマチ、がんの骨転移などでは、骨吸収と骨形成のバランスが崩れ、骨吸収が優位となる病態をきたしている。骨吸収において主要な役割を演じる破骨細胞の研究はそのための知見を提供するものとして重要であると考えられる。これまでの骨代謝に対する研究に基づき、副甲状腺ホルモン製剤、ビスホスホネート製剤、抗 RANKL 抗体製剤、抗スクレロスチン製剤など様々な薬剤が開発されてきた。しかし、

これらの薬剤を使用しても骨量の維持に難渋する症例や薬剤に特異的な副作用も明らかになってきており、より良い治療法の開発が望まれる。そのためにも、さらなる破骨細胞を中心とした骨代謝の研究が必要とされている。

本研究で明らかになった破骨細胞分化における TGF- $\beta$ 経路の役割、ヒストン修飾の重要性、Nedd9 の役割についての知見が、今後の治療法開発の一助となれば幸いである。

図 11. 破骨細胞分化における Nedd9 の作用





## 6.謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なご指導を頂いた整形外科学教室の田中栄教授、熊本大学整形外科教室の宮本健史教授に心より感謝致します。加えて、ご指導をいただきました整形外科学教室の門野夕峰先生(現所属：埼玉医科大学病院、教授)、廣瀬旬先生(現所属：地域医療推進機構東京新宿メディカルセンター)、安井哲郎先生(現所属：帝京大学医学部附属溝口病院、教授)、松本卓巳先生、小俣康德先生、伊沢直広先生(現所属：埼玉医科大学病院)、中村伸哉先生(現所属：東京都健康長寿医療センター)にも感謝の意を表します。また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた整形外科学教室の先生方、ありがとうございました。

## 7. 引用文献

- 1 Tanaka, S. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the RANKL/RANK/OPG system. *Am J Nephrol* **27**, 466-478, doi:10.1159/000106484 (2007).
- 2 Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* **7**, 292-304, doi:10.1038/nri2062 (2007).
- 3 Kong, Y. Y. *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**, 315-323, doi:10.1038/16852 (1999).
- 4 Grigoriadis, A. E. *et al.* c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* **266**, 443-448, doi:10.1126/science.7939685 (1994).
- 5 Cao, H. *et al.* Activating transcription factor 4 regulates osteoclast differentiation in mice. *J Clin Invest* **120**, 2755-2766, doi:10.1172/jci42106 (2010).
- 6 Nakashima, T. *et al.* Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* **17**, 1231-1234, doi:10.1038/nm.2452 (2011).
- 7 Komatsu, N. *et al.* Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* **20**, 62-68, doi:10.1038/nm.3432 (2014).
- 8 Koga, T. *et al.* Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* **428**, 758-763, doi:10.1038/nature02444 (2004).
- 9 Sato, K. *et al.* Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway. *Nat Med* **12**, 1410-1416, doi:10.1038/nm1515 (2006).
- 10 Yagi, M. *et al.* DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med* **202**, 345-351, doi:10.1084/jem.20050645 (2005).
- 11 Miyamoto, H. *et al.* Osteoclast stimulatory transmembrane protein and dendritic cell-specific transmembrane protein cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells. *J Bone Miner Res* **27**, 1289-1297, doi:10.1002/jbmr.1575 (2012).
- 12 Lee, S. H. *et al.* v-ATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nat Med* **12**, 1403-1409, doi:10.1038/nm1514 (2006).
- 13 Weinert, S. *et al.* Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H<sup>+</sup>-driven lysosomal Cl<sup>-</sup> accumulation. *Science* **328**, 1401-1403, doi:10.1126/science.1188072 (2010).
- 14 Zhang, Y. & Reinberg, D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**, 2343-2360, doi:10.1101/gad.927301 (2001).
- 15 Margueron, R., Trojer, P. & Reinberg, D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* **15**, 163-176, doi:10.1016/j.gde.2005.01.005 (2005).
- 16 Strahl, B. D., Ohba, R., Cook, R. G. & Allis, C. D. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci*

- USA* **96**, 14967-14972, doi:10.1073/pnas.96.26.14967 (1999).
- 17 Bernstein, B. E. *et al.* A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315-326, doi:10.1016/j.cell.2006.02.041 (2006).
- 18 Yasui, T. *et al.* Epigenetic regulation of osteoclast differentiation: possible involvement of Jmjd3 in the histone demethylation of Nfatc1. *J Bone Miner Res* **26**, 2665-2671, doi:10.1002/jbmr.464 (2011).
- 19 Janssens, K., ten Dijke, P., Janssens, S. & Van Hul, W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev* **26**, 743-774, doi:10.1210/er.2004-0001 (2005).
- 20 Tang, S. Y. & Alliston, T. Regulation of postnatal bone homeostasis by TGF  $\beta$ . *Bonekey Rep* **2**, 255, doi:10.1038/bonekey.2012.255 (2013).
- 21 Ikushima, H. & Miyazono, K. TGF- $\beta$  signal transduction spreading to a wider field: a broad variety of mechanisms for context-dependent effects of TGF- $\beta$ . *Cell Tissue Res* **347**, 37-49, doi:10.1007/s00441-011-1179-5 (2012).
- 22 Massagué, J., Attisano, L. & Wrana, J. L. The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* **4**, 172-178, doi:10.1016/0962-8924(94)90202-x (1994).
- 23 Li, M. O. & Flavell, R. A. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* **134**, 392-404, doi:10.1016/j.cell.2008.07.025 (2008).
- 24 Graff, J. M., Bansal, A. & Melton, D. A. Xenopus Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF beta superfamily. *Cell* **85**, 479-487, doi:10.1016/s0092-8674(00)81249-0 (1996).
- 25 Fox, S. W., Haque, S. J., Lovibond, A. C. & Chambers, T. J. The possible role of TGF-beta-induced suppressors of cytokine signaling expression in osteoclast/macrophage lineage commitment in vitro. *J Immunol* **170**, 3679-3687, doi:10.4049/jimmunol.170.7.3679 (2003).
- 26 Yan, T., Riggs, B. L., Boyle, W. J. & Khosla, S. Regulation of osteoclastogenesis and RANK expression by TGF-beta1. *J Cell Biochem* **83**, 320-325, doi:10.1002/jcb.1200 (2001).
- 27 Takai, H. *et al.* Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* **273**, 27091-27096, doi:10.1074/jbc.273.42.27091 (1998).
- 28 Quinn, J. M. *et al.* Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J Bone Miner Res* **16**, 1787-1794, doi:10.1359/jbmr.2001.16.10.1787 (2001).
- 29 Huang, W., Drissi, M. H., O'Keefe, R. J. & Schwarz, E. M. A rapid multiparameter approach to study factors that regulate osteoclastogenesis: demonstration of the combinatorial dominant effects of TNF-alpha and TGF-beta in RANKL-mediated osteoclastogenesis. *Calcif Tissue Int* **73**, 584-593, doi:10.1007/s00223-003-0059-8 (2003).
- 30 Yasui, T. *et al.* Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF- $\beta$  through molecular interaction between Smad3 and Traf6. *J Bone Miner Res* **26**, 1447-1456, doi:10.1002/jbmr.357

- (2011).
- 31 Omata, Y. *et al.* Genomewide comprehensive analysis reveals critical cooperation between Smad and c-Fos in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* **30**, 869-877, doi:10.1002/jbmr.2418 (2015).
- 32 Seo, S. *et al.* Crk-associated substrate lymphocyte type is required for lymphocyte trafficking and marginal zone B cell maintenance. *J Immunol* **175**, 3492-3501, doi:10.4049/jimmunol.175.6.3492 (2005).
- 33 Koinuma, D. *et al.* Chromatin immunoprecipitation on microarray analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in transforming growth factor beta signaling. *Mol Cell Biol* **29**, 172-186, doi:10.1128/mcb.01038-08 (2009).
- 34 Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545-15550, doi:10.1073/pnas.0506580102 (2005).
- 35 Minegishi, M. *et al.* Structure and function of Cas-L, a 105-kD Crk-associated substrate-related protein that is involved in beta 1 integrin-mediated signaling in lymphocytes. *J Exp Med* **184**, 1365-1375, doi:10.1084/jem.184.4.1365 (1996).
- 36 Tikhmyanova, N., Little, J. L. & Golemis, E. A. CAS proteins in normal and pathological cell growth control. *Cell Mol Life Sci* **67**, 1025-1048, doi:10.1007/s00018-009-0213-1 (2010).
- 37 Tornillo, G., Defilippi, P. & Cabodi, S. Cas proteins: dodgy scaffolding in breast cancer. *Breast Cancer Res* **16**, 443, doi:10.1186/s13058-014-0443-5 (2014).
- 38 Law, S. F., Zhang, Y. Z., Klein-Szanto, A. J. & Golemis, E. A. Cell cycle-regulated processing of HEF1 to multiple protein forms differentially targeted to multiple subcellular compartments. *Mol Cell Biol* **18**, 3540-3551, doi:10.1128/mcb.18.6.3540 (1998).
- 39 Shagisultanova, E., Gaponova, A. V., Gabbasov, R., Nicolas, E. & Golemis, E. A. Preclinical and clinical studies of the NEDD9 scaffold protein in cancer and other diseases. *Gene* **567**, 1-11, doi:10.1016/j.gene.2015.04.086 (2015).
- 40 Barski, A. *et al.* High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823-837, doi:10.1016/j.cell.2007.05.009 (2007).
- 41 Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R. & Young, R. A. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* **130**, 77-88, doi:10.1016/j.cell.2007.05.042 (2007).
- 42 Schwartz, Y. B. & Pirrotta, V. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet* **8**, 9-22, doi:10.1038/nrg1981 (2007).
- 43 Pugacheva, E. N. & Golemis, E. A. The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat Cell Biol* **7**, 937-946, doi:10.1038/ncb1309 (2005).
- 44 Miyagishi, M. & Taira, K. Strategies for generation of an siRNA expression library directed

- against the human genome. *Oligonucleotides* **13**, 325-333, doi:10.1089/154545703322617005 (2003).
- 45 Morimoto, K. *et al.* NEDD9 crucially regulates TGF- $\beta$ -triggered epithelial-mesenchymal transition and cell invasion in prostate cancer cells: involvement in cancer progressiveness. *Prostate* **74**, 901-910, doi:10.1002/pros.22809 (2014).
- 46 Tikhmyanova, N. & Golemis, E. A. NEDD9 and BCAR1 negatively regulate E-cadherin membrane localization, and promote E-cadherin degradation. *PLoS One* **6**, e22102, doi:10.1371/journal.pone.0022102 (2011).
- 47 Fiorino, C. & Harrison, R. E. E-cadherin is important for cell differentiation during osteoclastogenesis. *Bone* **86**, 106-118, doi:10.1016/j.bone.2016.03.004 (2016).
- 48 Vogel, T., Ahrens, S., Büttner, N. & Kriegstein, K. Transforming growth factor beta promotes neuronal cell fate of mouse cortical and hippocampal progenitors in vitro and in vivo: identification of Nedd9 as an essential signaling component. *Cereb Cortex* **20**, 661-671, doi:10.1093/cercor/bhp134 (2010).
- 49 Liu, X. *et al.* A novel ability of Smad3 to regulate proteasomal degradation of a Cas family member HEF1. *Embo j* **19**, 6759-6769, doi:10.1093/emboj/19.24.6759 (2000).
- 50 Zheng, M. & McKeown-Longo, P. J. Regulation of HEF1 expression and phosphorylation by TGF-beta 1 and cell adhesion. *J Biol Chem* **277**, 39599-39608, doi:10.1074/jbc.M202263200 (2002).
- 51 Inamoto, S. *et al.* Crk-associated substrate lymphocyte type regulates transforming growth factor-beta signaling by inhibiting Smad6 and Smad7. *Oncogene* **26**, 893-904, doi:10.1038/sj.onc.1209848 (2007).
- 52 Katayose, T. *et al.* The role of Cas-L/NEDD9 as a regulator of collagen-induced arthritis in a murine model. *Biochem Biophys Res Commun* **460**, 1069-1075, doi:10.1016/j.bbrc.2015.03.156 (2015).
- 53 Kyono, W. T. *et al.* Differential interaction of Crkl with Cbl or C3G, Hef-1, and gamma subunit immunoreceptor tyrosine-based activation motif in signaling of myeloid high affinity Fc receptor for IgG (Fc gamma RI). *J Immunol* **161**, 5555-5563 (1998).
- 54 Nagai, Y. *et al.* p130Cas, Crk-associated substrate, plays important roles in osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Res* **28**, 2449-2462, doi:10.1002/jbmr.1936 (2013).