

審査の結果の要旨

氏名小山 卓摩

本研究は、ChIP(クロマチン免疫沈降)シーケンスによる網羅的な遺伝子解析手法を用いて、エピジェネティックに制御される TGF- $\beta$  下流の Smad 標的遺伝子 Nedd9 を同定し、その破骨細胞分化における役割を評価した。

結果を以下に記す。

1. 骨髄マクロファージ(BMM)に TGF- $\beta$  を添加培養した後、TGF- $\beta$  シグナルの下流因子である Smad2/3 に対する抗体を用いた ChIP シーケンス解析を行った。転写開始点から 10kb 以内に Smad2/3 結合領域がある Smad 標的遺伝子は 903 個同定された。
2. エピジェネティックなヒストン修飾の変化が遺伝子制御に関わるという先行研究に着目し、Smad 標的遺伝子群のヒストン修飾変化を調べた。TGF- $\beta$  を添加培養した TGF- $\beta$ (+)BMM と TGF- $\beta$  受容体阻害剤(SB431542)を添加培養した TGF- $\beta$ (-)BMM を使用し、抗ヒストンメチル化抗体(抗 H3K4me3 抗体および抗 H3K27me3 抗体)を用いた ChIP シーケンス解析を行った。Smad 標的遺伝子の転写開始点付近での H3K4me3 シグナル強度は TGF- $\beta$ (+)BMM で TGF- $\beta$ (-)よりも強く、H3K27me3 シグナル強度は TGF- $\beta$ (-)で TGF- $\beta$ (+)よりも強い結果であり、TGF- $\beta$  刺激下でのヒストン修飾変化の結果、転写が促進される方向に作用していることが示された。
3. BMM に TGF- $\beta$  もしくは RANKL を添加培養した後、RNA マイクロアレイによる発現アレイ解析を行った。Smad 標的遺伝子は、TGF- $\beta$  刺激により発現が亢進していた。一方で、RANKL 刺激では、Smad 標的遺伝子の多くで発現が低下していた。
4. 抗ヒストンメチル化抗体を用いた ChIP シーケンスで、転写開始点から 1kb 以内に H3K4me3 のピークがある遺伝子を K4(+)遺伝子、H3K27me3 のピークがあるものを K27(+)遺伝子とした。TGF- $\beta$ (-)において K4(+)で K27(+)でもある遺伝子は 790 個同定され、TGF- $\beta$ (+)において K4(+)かつ K27(-)である遺伝子は 605 個同定された。双方の条件を満たす遺伝子は 35 個同定された。35 個のうち、Smad 標的遺伝子は 14 個であった。その中から細胞分化に関連する遺伝子として Nedd9 を抽出した。
5. ChIP シーケンスの結果では、Nedd9 の転写開始点付近に Smad2/3 のピークを認めた。また、ヒストン修飾変化は、TGF- $\beta$ (-)で K4(+)K27(+)bivalent、TGF- $\beta$ (+)で K4(+)K27(-)monovalent に変化し、さらに RANKL を加えると K4(+)K27(+)bivalent へ戻った。Nedd9 の mRNA 発現は、TGF- $\beta$  刺激で増加し、RANKL 刺激で減少した。
6. レトロウイルスベクターを使用した遺伝子導入による Nedd9 遺伝子の強制発現実験を

行った。Nedd9 の強制発現では、コントロールと比較して破骨細胞形成の増加がみられた。TGF- $\beta$ 阻害剤使用下では破骨細胞分化は抑制されたが、同条件下でも Nedd9 の強制発現を行うと破骨細胞形成の部分的な増加がみられた。

7. レトロウイルスを使用した shRNA による遺伝子ノックダウン実験を行った。Nedd9 のノックダウンによって、破骨細胞形成は著しく抑制された。
8. ノックアウトマウス(Nedd9<sup>-/-</sup>マウス)より採取した BMM を使用して破骨細胞形成実験を行った。野生型より採取した検体と比較して、Nedd9<sup>-/-</sup>では破骨細胞形成が低下していた。TGF- $\beta$ を添加培養しても、Nedd9<sup>-/-</sup>では破骨細胞形成が低下したままであった。カテプシン K のタンパク質発現は Nedd9<sup>-/-</sup>で低下していた。また、MAPK 経路では発現に差がなかったが、ITAM 経路の PLC $\gamma$ 1 のタンパク質発現は Nedd9<sup>-/-</sup>で低下していた。
9. 骨の表現型について、下肢骨の X 線写真、腰椎のマイクロ CT を撮影し、骨密度を計測した。Nedd9<sup>-/-</sup>では骨量の増加傾向は認められたが、野生型と比較して有意差はなかった。

以上、本研究は、破骨細胞分化における TGF- $\beta$ -Smad2/3 経路の標的遺伝子群について、エピジェネティックなヒストン修飾変化による転写調節を受けており、TGF- $\beta$ 刺激で遺伝子発現が亢進し、RANKL 刺激で発現が低下する傾向にあることを示した。また、Smad 標的遺伝子でヒストン修飾変化による調節を受けている遺伝子の中から Nedd9 を同定し、Nedd9 は破骨細胞分化に促進的に作用する遺伝子であることを示した。

本研究はこれまで知られていなかった破骨細胞分化に関連する Smad 標的遺伝子について解明するものであり、学位授与に値するものと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。