

博士論文

破骨細胞分化におけるホメオドメイン蛋白 **Hhex**
の作用メカニズムに関する研究

渡邊 寿人

博士論文

破骨細胞分化におけるホメオドメイン蛋白 **Hhex**
の作用メカニズムに関する研究

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 渡邊 寿人

目次

| | |
|---------------------------------------|------|
| 第 1 章 要旨 | 8 頁 |
| 第 2 章 序文 | 9 頁 |
| 第 3 章 方法 | 16 頁 |
| 3-1. 実験試薬 | |
| 3-2. 実験動物 | |
| 3-3. 破骨細胞培養および染色による評価 | |
| 3-4. リアルタイム PCR | |
| 3-5. 免疫染色 | |
| 3-6. Western blotting | |
| 3-7. plasmid 構築およびレトロウイルスベクターによる遺伝子導入 | |
| 3-8. μ CT による骨構造解析 | |
| 3-9. 骨形態計測 | |
| 3-10. RNA-seq | |
| 3-11. ChIP-seq | |
| 3-12. 骨吸収活性評価 | |
| 3-13. 細胞増殖アッセイおよび細胞周期解析 | |

3-14. ShRNA による遺伝子サイレンシング

3-15. データ解析

第 4 章 結果 26 頁

4-1. 破骨細胞分化においてエピジェネティックな制御を受ける *Hhex* の同定

4-2. 破骨細胞分化における *Hhex* の mRNA およびタンパク質の発現変化とその局在

4-3. *Hhex* 遺伝子の発現を制御する上流因子の解析

4-4. *Hhex* 過剰発現および発現抑制した骨髄由来マクロファージの解析

4-5. *Hhex* コンディショナルノックアウトマウスの解析

4-6. *Hhex* 欠失による細胞周期関連遺伝子への影響

4-7. *Cdkn2a* 発現抑制による破骨細胞分化への影響

第 5 章 考察 53 頁

第 6 章 結論 65 頁

第 7 章 謝辞 66 頁

第 8 章 参考文献 67 頁

略語

ACP5; ACid Phosphatase 5

Actin β ; beta-actin

α -MEM; alpha-Minimum Essential Medium

BCL-xL; B-Cell Lymphoma-extra Large

BCL-2; B-Cell Lymphoma-2

BCL2L11; B-Cell Lymphoma 2 Like 11

BCL6; B-Cell Lymphoma 6

BMM; Bone Marrow Macrophage

CALCR; CALCitonin Receptor

CDK; Cyclin-Dependent Kinase

CDKI; Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor

CDKN2A; Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A

CDK6; Cyclin Dependent Kinase 6

ChIP; Chromatin ImmunoPrecipitation

ChIP-seq; Chromatin ImmunoPrecipitation-sequencing

CLC-7; ChLoride Channel protein-7

CTSK; CaThepSin K

DHEAS; DeHydroEpiAndrosterone Sulphate

DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO; DiMethyl SulfOxide

DNA; DeoxyriboNucleic Acid

ENL; Eleven-Nineteen-Leukemia

FBS; Fetal Bovine Serum

Fucci; Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator

GMA; GlycolMethAcrylate

GWAS; Genome Wide Association Study

HHEX; Hematopoietically Expressed homeoboX

HRP; HorseRadish Peroxidase

H3K4me3; trimethylation of lysine 4 on histone H3 protein

H3K27ac; acetylation of lysine 27 on histone H3 protein

H3K27me3; trimethylation of lysine 4 on histone H3 protein

IFN; Interferon

IRF8; Interferon Regulatory Factor 8

ITGB3; InTeGrin subunit Beta 3

JMJD3; JuMonJi Domain containing 3

LPS; LipoPolySaccharide

MAFB; MAF bZIP transcription factor B

MCL-1; Myeloid Cell Leukemia-1

M-CSF; Macrophage-Colony Stimulating Factor

MITF; Melanocyte Inducing Transcription Factor

MLL; Mixed-Lineage Leukemia

MMP; Matrix MetalloProteinase

MNC; MultiNucleated Cell

mRNA; messenger RiboNucleic Acid

NFATc1; Nuclear Factor of Activated T cells 1

NF- κ B; Nuclear Factor kappa B

OC; OsteoClast

OVX; Ovariectomy

PBS; Phosphate-Buffered Saline

PCDH7; ProtoCaDHerin-7

PCR; Polymerase Chain Reaction

Poly(I:C); PolyInosinic-polyCytidylic acid sodium salt

PRC2; Polycomb Repressive Complex 2

P/S; Penicillin / Streptomycin solution

PVDF; PolyVinylidene DiFluoride

qPCR; quantitative polymerase chain reaction

RANK; Receptor Activator for Nuclear factor-kB

RANKL; Receptor Activator for Nuclear factor-kB Ligand

RIPA; RadioImmunoPrecipitAtion

SDS-PAGE; Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SNP; Single Nucleotide Polymorphism

TNF; Tumor Necrosis Factor

TRAP; Tartrate-Resistant Acid Phosphatase

TSS; Transcription Start Site

VEGF; Vascular Endothelial Growth Factor

WST-8; Water Soluble Tetrazolium salts-8

μ CT; micro Computed Tomography

第 1 章 要旨

破骨細胞分化過程において、H3K4me3 と H3K27me3 が bivalent domain から monovalent domain に変化するようなエピジェネティックな制御を受けている遺伝子の中で破骨細胞分化に重要と考える遺伝子を抽出し、その中から造血細胞の分化に関連する遺伝子である *Hhex* に関して、破骨細胞における分化・機能の解析を行った。*Hhex* は破骨細胞のマスター転写因子である NFATc1 により抑制的に制御され、細胞周期制御に関与する *Cdkn2a* を介して破骨細胞の分化に関わっていることが示唆された。

本研究では NFATc1 依存性のエピジェネティックな破骨細胞分化制御の新たな負の制御メカニズムを提起した。

第 2 章 序文

近年、人口の高齢化に伴い骨粗鬆症患者は増加し 1300 万人を超えと言われて
いる¹。骨粗鬆症は骨折の最大の危険因子であり、骨折は生活機能や生活の質を低
下させるだけでなく不動化を引き起こし、長期的には骨折の有無に関わらず死亡リス
クを有意に増加させる²。骨粗鬆症は、骨強度の低下を特徴とし、骨強度は骨密度と骨
質の 2 つの要因によって規定される^{3,4}。この 2 つの要因には骨リモデリングが大きく関
係している。骨リモデリングは主に破骨細胞や骨芽細胞、骨細胞などの細胞群の連携
した活動による骨の新陳代謝機構で、破骨細胞が骨吸収を行うことで開始される。骨
吸収が終わると、それに引き続き、骨芽細胞による骨形成が行われる。そして、骨の恒
常性や骨強度は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスが保た
れることで維持され^{5,6}、このバランスが崩れることにより骨粗鬆症は進行する。

現在、骨粗鬆症の治療には、主にビスホスホネート製剤や抗 RANKL 抗体などの破
骨細胞の機能や分化を抑制する薬剤が使用されている。これらの製剤の骨脆弱性骨
折のリスクを抑える効果は臨床治験でも証明され、多大な恩恵をもたらしている⁷。しか
し、その効果は完全ではなく、薬剤の長期内服により大腿骨非定型骨折や顎骨壊死
などの重篤な副作用も報告されている。そのため、骨粗鬆症の治療標的である破骨細
胞の分化のメカニズムを解明することは、より優れた治療法の開発につながる重要な

研究であると考えられる。

破骨細胞は、生体において骨吸収を担う細胞で生理学的および病理学的な骨吸収の両方に関与している⁸。単球/マクロファージ系前駆細胞から破骨細胞への分化は骨芽細胞などから分泌される M-CSF と RANKL という 2 つのサイトカインによって調節されている⁹⁻¹¹。TNF スーパーファミリーのメンバーである RANKL が、破骨前駆細胞に発現する RANK 受容体に結合することは破骨細胞の分化に不可欠であり¹²、RANKL が欠失すると破骨細胞形成は阻害され、大理石骨病の症状を呈する^{13,14}。

RANKL は、破骨細胞分化を促進する正の modulator として機能する NF- κ B、c-FOS、NFATc1 などの転写因子を調節する^{10,15}。c-FOS の *Nfatc1* promoter 領域への結合は *Nfatc1* 遺伝子発現を誘導する¹⁶。NFATc1 は自身の promoter へ結合することによりその発現を自己増幅することができ、破骨細胞分化中に NFATc1 は著明に増加する¹⁷。NFATc1 は、骨吸収活性の調節に関与する *Acp5* や *Calcr*、*Itgb3* などに加えて、*Dc-stamp* などの細胞融合に関わる遺伝子も誘導し、破骨細胞分化のマスター転写因子として機能している⁶。

破骨細胞の機能に関わるものとして骨吸収能がある。破骨細胞は骨表面に接着し、蛋白分解酵素や酸を分泌し骨吸収を行うが、NFATc1 は MMPs や CTSK などの発現を誘導する¹⁸。また、V 型 ATPase や CLC-7 などの働きにより H⁺イオンと Cl⁻イオンの分泌が促され、骨の強固なミネラルを溶解することもわかっている^{19,20}。

破骨細胞の機能には融合能も関与している。破骨細胞は、前駆細胞が融合することで多核巨細胞となるが、*Dc-stamp* や *Oc-stamp* をノックアウトしたマウスでは TRAP 陽性の単核の破骨細胞は存在するが、多核の破骨細胞は形成されないことが報告されている^{21,22}。また、中村らは NFATc1 によって発現が増加する PCDH7 が、MITF や *Dc-stamp*、*Oc-stamp*、*Atp6v0d2* の制御を通じて細胞融合を促進することを報告している²³。

破骨細胞の寿命は約2週間程度と考えられており、他の骨関連細胞と比較すると短い。このため、破骨細胞の生存能も骨吸収に大きな影響を与える。例えば、BCL-2 ファミリーに属する BCL-xL と MCL-1 が破骨細胞のアポトーシスを抑制することによって生存能を正に制御していることが報告されている^{24,25}。一方、BCL-2 ファミリーに属する BCL2L11 はアポトーシスを誘導し破骨細胞の生存能を負に制御すると考えられている²⁶。

破骨細胞分化においては、破骨細胞分化を促進する正の調節因子に加えて、破骨細胞分化を抑制する負の調節因子もいくつか同定されている。例えば、IRF8 は NFATc1 の発現や自己増幅を阻害することで破骨細胞分化を抑制することが知られており、*Irf8* をノックアウトしたマウスでは破骨細胞の増加を伴う重度の骨粗鬆症が引き起こされる²⁷。また、*Bcl-6* も、ノックアウトマウスで破骨細胞分化が促進することや、BCL-6 が *Nfatc1* や *Dc-stamp* の promoter に結合しそれらの発現を阻害することがわ

かっている^{28,29}。MAFBはBMMsで豊富に発現しており、*in vitro*においてMAFBを過剰発現したBMMsからの破骨細胞形成は抑制される。そして、MAFBはc-FOSと結合することでNFATc1の発現を阻害することが報告されている³⁰。興味深いことに、これらの破骨細胞形成のnegative regulatorは、NFATc1により発現が誘導されるBLIMP-1によって発現が抑制される^{28,29}。NFATc1の発現を抑制する破骨細胞分化の負の調節因子の発現が、NFATc1によって制御されているという機構は、破骨細胞形成にNFATc1活性が必須であるということに矛盾しないものになっている¹⁷ (図1)。

図1

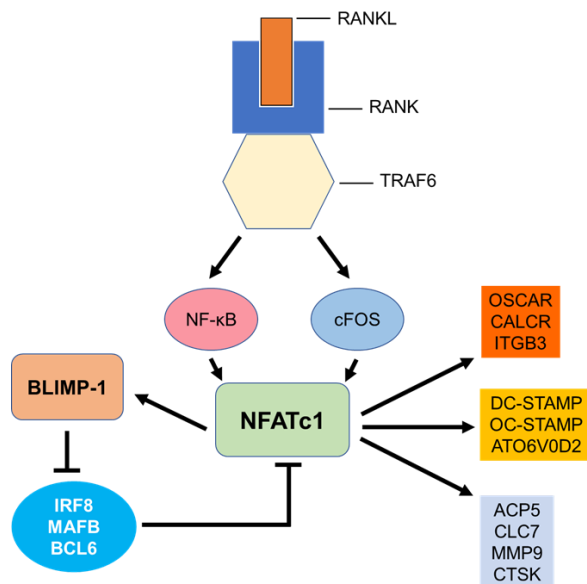


図1. 破骨細胞分化関連因子の概略図

しかしながら、破骨細胞形成中に発現が増加する正の調節因子と比較して、分化に伴い下方制御される負の調節因子の役割とその作用機序は不明な点が多く、これらを研究することは破骨細胞分化のメカニズムを解明するために重要であると考えられた。

そこで我々は、破骨細胞分化において重要な働きをする負の調節因子を特定するために、RANKL が誘導する破骨細胞形成中のエピジェネティックな調節、特にヒストン修飾に注目をした^{31,32}。ヒストン修飾は、遺伝子発現と細胞分化の調節に重要な役割を果たしており、ヒストン H3 のリジン 4 のトリメチル化 (H3K4me3) は、転写活性のある遺伝子または転写の準備が整った **poised state** な遺伝子に関連している³³。また、ヒストン H3 のリジン 27 のアセチル化 (H3K27ac) は、アクティブなシスエレメントを特異的に区別し、ヒストン H3 のリジン 27 のトリメチル化 (H3K27me3) によるポリコム抑制複合体 2 (PRC2) 依存性の転写抑制に拮抗する^{34,35}。遺伝子の **promoter** 領域での H3K4me3 および H3K27me3 のトリメチル化は、遺伝子発現を決定的に調節し、特に主要な遺伝子の発現は、H3K4me3 と H3K27me3 の **bivalent** パターンから H3K4me3 **monovalent** パターンへのヒストン修飾の変化を示す傾向がある。一方、Bernstein らは、胚性幹細胞のヒストン修飾状態が脱メチル化によって H3K4me3 と H3K27me3 の **bivalent** パターンから H3K27me3 の **monovalent** パターンに変化することが、遺伝子発現の抑制につながると報告している³⁶ (図2)。

図2

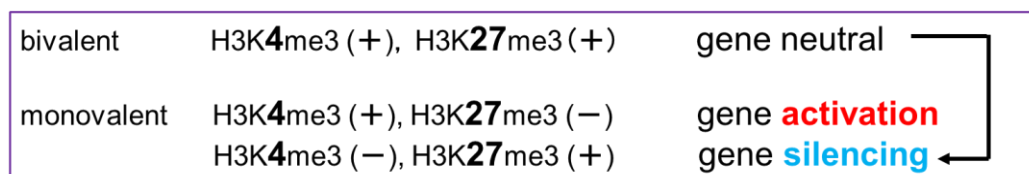


図2. ヒストン修飾の変化と遺伝子発現の関係性の概略図

破骨細胞分化とエピジェネティックの関わりについては、例えば、RANKL 刺激が histone demethylase である JMJD3 を増加させることにより、*Nfatc1* のシスエレメントの H3K27me3 修飾を減少させたことが報告されている³²。また、*Irf8* の発現変化にも関連があり、転写因子 PU.1 が、DNA 結合部位を *Irf8* から *Nfatc1* に切り替えることで、ヒストン修飾を介したエピジェネティックな変化が起こり、破骨細胞形成が促進することが報告されている^{37,38}。しかし、破骨細胞におけるエピジェネティックな分化制御のメカニズムには未だに解明されていないことが多い。

総括すると、破骨細胞による過剰な骨吸収は、骨粗鬆症などの骨量減少に重要な役割を果たしている³⁹。破骨細胞は、前駆細胞から単核破骨細胞に分化し多核破骨細胞へと融合するという、生体の中でも稀な特徴を有し、この分化・成熟の機構は極めて複雑である。骨粗鬆症に影響する破骨細胞の骨吸収能を決定しているものには、細胞融合や多核化などの分化成熟能、骨吸収に関わる酵素の分泌能、破骨細胞の

生存能など多くの因子が関わっている。これらは解明されていないことが多く、破骨細胞の分化や機能、生存に関するさらなる研究は、破骨細胞が引き起こす骨量減少に対する、これまでにない新たなアプローチでの治療法の開発につながることを期待される。

本研究は、未だにあまり解明されていない、破骨細胞分化に伴い負に調節される遺伝子のうち、破骨細胞分化に重要な役割を果たす遺伝子を同定することを目的とした。そこで、破骨細胞分化に伴い、**promoter** 領域上流で **H3K4me3** と **H3K27me3** が **bivalent domain** から **monovalent domain** に変化するような遺伝子のうち、破骨細胞分化とともに、遺伝子発現量が減少する遺伝子を網羅的に解析した。

その結果、破骨細胞分化の負の調節因子の 1 遺伝子として *Hhex* を同定した。そして、破骨細胞分化においてエピジェネティックな制御を受けている *Hhex* 遺伝子の機能を解析し破骨細胞分化において細胞融合と細胞周期調節の新たな役割を発見した。

第 3 章 方法

3-1. 実験試薬

培養に用いた α -MEM、DMEM および protease inhibitor cocktail はナカライテスク (京都府、日本) から購入した。FBS、penicillin-streptomycin および RIPA buffer は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。マウス M-CSF は PeproTech (Cranbury, NJ, USA) から購入した。RANKL は富士フイルム和光純薬 (大阪府、日本) から購入した。TRAP 染色キットは Cosmo Bio (東京都、日本) から購入した。Poly(I:C)、Puromycin および Polybrene は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。Lipofectamine 2000 は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) から購入した。Cell Counting Kit-8 (CCK-8) および Cell Cycle Assay Solution Blue は、同仁化学研究所 (熊本県、日本) から購入した。骨吸収活性評価キットは PG リサーチ (東京都、日本) から購入した。抗 H3K4me3 抗体は、Active Motif (Carlsbad, CA, USA) から購入した。抗 H3K27me3 および抗 H3K27ac 抗体は、Millipore (Billerica, MA, USA) から購入した。免疫染色の rhodamine-conjugated phalloidin (R415) は Invitrogen から、DAPI 含有封入剤はナカライテスクから購入した。抗 HHEX 抗体 (720258) と、Alexa Fluor 488 は Thermo Fisher Scientific から購入した。Western blotting には以下の抗体を用いた。anti-HHEX (ab34222; Abcam, Cambridge, UK)、anti-FLAG (F3165; Sigma-

Aldrich)、anti-GFP (A-11122; Thermo Fisher Scientific)、HRP-conjugated beta actin (HRP-60008; Proteintech, Chicago, IL, USA)、HRP-conjugated secondary antibodies (W4021 or W4011; Proteintech)。ShRNA lentiviral particle (Control, sc-108080 ; *Cdkn2a*, sc-43988-V ; *Blimp-1*, sc-37715-V) は Santa Cruz (Dallas, TX, USA)から購入した。

3-2. 実験動物

C57BL/6 系統の *Hhex*^{flx/flx} (*Hhex*^{fl/fl})マウスは Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA)から購入した。*Ctsk*^{Cre/+}および *Mx-1*^{Cre/+}マウスは、慶応大学宮本健史准教授 (現熊本大学教授)から供与頂き、すべてのマウスは特定病原体除去条件下で生まれ、東京大学臨床リサーチセンター地下整形外科動物実験飼育室にて維持した。水と食料は自由に与えられた。すべての動物実験は、東京大学実験動物倫理委員会 (P17-091)の動物研究委員会の承認を得て実施され、すべての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準 (総理府告示)」、「東京大学医学部動物実験指針」に基づいて行った。

Hhex^{fl/fl} マウスを *CtsK*^{Cre+/-}マウスと交配して、*CtsK*^{Cre+/-}, *Hhex*^{fl/fl} マウス (*Hhex*^{ΔOC/-}) を作製した。*Hhex*^{fl/fl} マウスを *Mx-1*^{Cre+/-}マウスと交配して、*Mx-1*^{Cre+/-}, *Hhex*^{fl/fl} マウス (*Hhex*^{MxCre/-}) を作製した。*Mx-1*^{Cre+/-}マウスの Cre recombinase 発現のため PBS で溶解

した Poly(I:C) (12.5 μ g/g 体重) を、実験で使用する少なくとも 3 週間前に週に 1 回腹腔内注射した。 *Hhex* ^{Δ OC/-} および *Hhex*^{MxCre/-} マウスの対照群としては *Hhex*^{fl/fl} マウスを使用した。

3-3. 破骨細胞培養および染色による評価

7~9 週齢の雄マウスの大腿骨・脛骨から採取したマウス骨髄細胞を、M-CSF 100 ng/mL および 10%FBS および 1%P/S 含有 α -MEM で 5 日間培養し、M-CSF 依存性の接着細胞を BMMs として回収した。³⁷ その BMMs を M-CSF 10 ng/mL と RANKL 100 ng/mL もしくは実験ごとに記載してある量添加した 10%FBS 含有 α -MEM で 3~5 日間培養することで成熟破骨細胞を生成した。破骨細胞を識別するために、細胞を 10%ホルマリン中性緩衝液で 5 分間固定し、TRAP 染色キットで染色し、5 つ以上の核を持つ TRAP 陽性細胞を破骨細胞と判断した。

3-4. リアルタイム PCR

mRNA を Direct-zol RNA Microprep キット (Zymo Research, Irvine, CA, USA) で抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡、大阪府、日本) を使用して逆転写し、一本鎖 cDNA を生成した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を製造元のプロトコルに従って使用し、Thermal Cycler Dice Real Time System III (タカラバイオ株

式会社、滋賀県、日本)を用いてリアルタイム PCR を行った。すべて triplicate で行い、beta-actin 発現で標準化した。primer 配列は以下のとおり設計した。

Hhex-F: 5'- GTTTCAGAATCGCCGAGCTAAAT-3',

R: 5'- CTGCTCACAGGAAGTGTCCAAA-3';

Cdkn2a-F: 5'-CTGAATCTCCGCGAGGAAAGC-3',

R: 5'-GCCCATCATCATCACCTGAATCG-3';

Nfatc1-F: 5'-CAAGTCTCACCACAGGGCTCACTA-3',

R: 5'-GCGTGAGAGGTTTCATTCTCCAAGT-3';

Blimp-1-F: 5'-TTCTTGTGTGGTATTGTCGGGACTT-3',

R: 5'-TTGGGGACACTCTTTGGGTAGAGTT-3';

beta-Actin-F: 5'-CAGCCTTCCTTCTTGGGTATG-3',

R: 5'-AGGTCTTTACGGATGTCAACG-3';

Acp5-F: 5'-GACCACAACCTGCAGTATCTTC-3'

R: 5'-CATAGTGAAACCGCAAGTAGCC-3'

Oscar-F: 5'-ATCAGTTTCGAAGGTTCTGGC-3'

R: 5'-CTGCTGTGCCAATCACAAGTA-3'

De-stamp-F: 5'-TCCTCCATGAACAAACAGTTCCAA-3';

R: 5'-AGACGTGGTTTAGGAATGCAGCTC-3';

3-5. 免疫染色

M-CSF もしくは M-CSF および RANKL 刺激 2 日後に細胞を PBS で洗浄し、4% (w/v) パラホルムアルデヒドで室温下に 15 分間固定し、続いて 0.1% (v/v) TritonX-100 で 5 分間透過処理を行った。次に、細胞を PBS で 2 回洗浄し、10% (v/v) ヤギ正常血清で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、PBS で洗浄し、抗 HHEX 抗体 (1:100) または rhodamine-conjugated phalloidin (1:200) で室温下に 1 時間染色した。抗 HHEX 抗体に対し二次抗体 (1:400) を室温 1 時間で反応させた。PBS で洗浄した後、核染色のために DAPI 含有封入剤を添加した。蛍光画像は、蛍光顕微鏡 (キーエンス、大阪府、日本) を使用して取得した。

3-6. Western blotting

氷冷 PBS で洗浄した後、protease inhibitor cocktail を添加した RIPA buffer を用いてタンパクを回収した。SDS-PAGE で PVDF メンブレン (Millipore) に転写し、ブロッキング後、各一次抗体もしくは HRP-conjugated beta actin で incubate した。二次抗体には HRP-conjugated secondary antibodies を使用し、Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク) を用い化学発光し、iBright CL1000 Imaging System (Invitrogen) によって検出および分析を行った。

3-7. plasmid 構築およびレトロウイルスベクターによる遺伝子導入

Hhex の過剰発現のために、マウス *Hhex* の完全長コード配列 (NM_008245) を、EcoRI および XhoI で消化することにより成熟破骨細胞からクローン化し、レトロウイルスベクター (pMX-IRES-Puro) にサブクローニングし pMX-Hhex-IRES-Puro を作成した。また、HHEX の発光検出のため、EGFP を ligation し pMX-Hhex-EGFP-IRES-Puro を作成した。レトロウイルスベクター pMX-Cre-IRES-Puro は慶応大学宮本健史准教授 (現熊本大学教授) から供与頂いた。レトロウイルス粒子を生成するために、製造元のプロトコルに従って Lipofectamine 2000 を使用し、レトロウイルスベクターをパッケージング細胞株 293GPG に transfection した。transfection の 24 時間後から 4 日間レトロウイルスを含む上清を回収した。上清を $6,000 \times g$ で 16 時間遠心分離してレトロウイルス粒子液を濃縮させ遺伝子導入に用いた。M-CSF で前培養した BMMs を、20 ng/mL の M-CSF および 3 $\mu\text{g/mL}$ の polybrene の存在下でレトロウイルス粒子液と 6 時間 incubate した後、M-CSF 20 ng/mL の存在下で一晩培養した。感染した BMMs を選別するために、20 ng/mL の M-CSF および 3 $\mu\text{g/mL}$ の puromycin の存在下で 2 日間培養した後、各種実験に使用した。

3-8. μCT による骨構造解析

μCT スキャンは inspeXio SMX-100CT システム (島津製作所、京都府、日本) を用い

て行った。走査は 90 kV、40 μ A で行い、1 枚の CT スライス の解像度は 1024 \times 1024 ピクセルに設定した。骨形態の測定では、大腿骨遠位部の骨端線から近位 1 mm の範囲を解析した。三次元微細構造画像データを再構成し、TRI/3D-BON ソフトウェア (ラトックシステム、大阪府、日本) を用いて構造指標を算出した。

3-9. 骨形態計測

脛骨近位部の二次海綿体領域の GMA 樹脂包埋切片を用いて、400 倍の倍率で組織形態分析を行った。骨代謝回転分析のために、マウスを屠殺する 5 日前と 2 日前に、8 mg/kg のカルセインを腹腔内に注射した。侵食面 (ES)、骨石灰面 (MS)、破骨細胞面 (Oc.S)、骨芽細胞面 (Ob.S) を測定し、侵食面/骨面比 (ES/BS)、破骨細胞面/骨面比 (Oc.S/BS)、骨芽細胞面/骨面比 (Ob.S/BS)、骨石灰面/骨面比 (MS/BS)、骨形成速度/骨面比 (BFR/BS) を算出した。

3-10. RNA-seq

ISOGEN (ニッポンジーン、東京都、日本) で RNA 抽出を行い、TruSeq RNA Sample Preparation Kits (Illumina, San Diego, CA, USA) でライブラリを作成し、Genome Analyzer IIx system (Illumina) を用いて sequence を行った。mapping には HISAT2 を、発現量の定量化には RSEM を用いた。

3-11. ChIP-seq

細胞を 1%ホルムアルデヒドで室温固定した後、Glycine で中和した。次に、細胞を回収し、超音波破碎処理を行った後、各抗体および protein A/G beads とともに incubate し免疫沈降を行った。採取された DNA を 65°Cで脱クロスリンクした後、PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)にて精製した。DNA ライブラリは、標準的な Illumina プロトコル (Illumina)を用いて配列決定のために調製した。精製された DNA は cBot Cluster Generation system および Genome Analyzer Iix system (Illumina)を用いて sequence を行った。ChIP-seq リードは、Bowtie (バージョン 1.1.2)を用いて、マウス参照ゲノム配列 (mm9)に mapping した。上記のリアルタイム PCR と同様に THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡)を用い、得られた Ct 値は%Input 法で補正を行った。リアルタイム PCR には下記の primer を用いた。

Cdkn2a Upstream promoter-F: 5'- GGCTGTGGAGCCAGGTCAGG-3',

R: 5'-GCCCAATCGCCCAGTCGTGT-3';

Cdkn2a Exon 1α -F: 5'- TCGCCCAACGCCCCGAAC-3',

R: 5'- TCCTGAACAAAAGTTACCCGACTGC-3'

3-12. 骨吸収活性評価

各 BMMs を骨吸収活性評価キットの蛍光標識リン酸カルシウム固層化プレートに播

種し、上清を回収し測定用緩衝液を添加した後、マイクロプレートリーダー(Varioskan LUX, Thermo Fisher Scientific)を用いて蛍光強度(Ex:485nm, Em:535nm)の測定を行った。また、培養終了後のプレートの培地を除き、5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で細胞を除去し乾燥させた後、pit の画像を撮影した。pit 面積は画像解析ソフト ImageJ (バージョン 1.8.0)により測定した。

3-13. 細胞増殖アッセイおよび細胞周期解析

細胞増殖率は、CCK-8 で定性的に生細胞数を反映させて評価した。各グループの細胞を、M-CSF を含む 100 μ L の培地に 2.5×10^4 個細胞/ウェルの密度で 96 ウェルプレートに播種した。各ウェルを 24, 48, 72, 96 時間培養した後、CCK-8 を添加し、2 時間後にマイクロプレートリーダーを用いて 450nm 吸光度を測定した。

細胞周期分析は、Cell Cycle Assay Solution Blue を用いてプロトコルに沿って行った。各グループの細胞を M-CSF を含む 2 mL の培地に 5×10^5 個細胞/ウェルの密度で 6 ウェルプレートに播種した。24 時間培養した後、細胞を回収し、500 μ L の PBS に懸濁した。5 μ L の Cell Cycle Assay Solution Blue を各細胞懸濁液に添加し、37 $^{\circ}$ C で 15 分間 incubate した。細胞周期の状態は、フローサイトメーター(CytoFLEX, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)を用いて測定し、Kaluzza 解析ソフトウェア(Beckman Coulter)を用いて解析した。

3-14. ShRNA による遺伝子サイレンシング

BMMs における *Blimp-1/Cdkn2a* のノックダウンのため、ShRNA レンチウイルス粒子を用いて遺伝子導入を行った。対照として scrambled ShRNA 粒子を用いた。上記のレトロウイルスベクターと同様、M-CSF で前培養した BMMs を、20 ng/mL の M-CSF および 3 μ g/mL のポリブレンの存在下でウイルス粒子液と 6 時間 incubate した後、M-CSF 20 ng/mL の存在下で一晩培養した。感染した BMMs を選別するために、20 ng/mL の M-CSF および 3 μ g/mL の puromycin の存在下で 2 日間培養した後、各種実験に使用した。

3-15. データ解析

一連の実験は、少なくとも 3 回繰り返した。すべての統計計算は、GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いて行った。統計解析は、unpaired Student's t test を用いて行った。P 値が 0.05 未満の場合、統計的に有意であると判断した。すべての P 値を含む値は図の凡例に記載した。

第 4 章 結果

4-1. 破骨細胞分化においてエピジェネティックな制御を受ける *Hhex* の同定

最初に、破骨細胞の分化中に promoter 領域がエピジェネティックな制御を受ける遺伝子をスクリーニングし、そのうち転写因子としての活性をもつ遺伝子を抽出した。

破骨細胞分化の負の調節因子を同定するために、ChIP-seq の結果から、BMMs の段階ではシスエレメントのヒストン修飾が H3K4me3 および H3K27me3 bivalent な状態で、RANKL 刺激に応じて H3K27me3 monovalent な状態に変化した遺伝子に焦点を当てた。さらに、その中で高い転写活性に関連しているアクティブなエンハンサーマークである H3K27ac 修飾の減少がみられる遺伝子を絞り込んだ。そして、RNA-seq の結果から、破骨細胞分化に伴い実際に発現量が大きく減少するものを抽出し、最終的に過去に破骨細胞関連の報告がなく新規性が期待できる遺伝子として *Hhex* に注目した(図3)。

図3

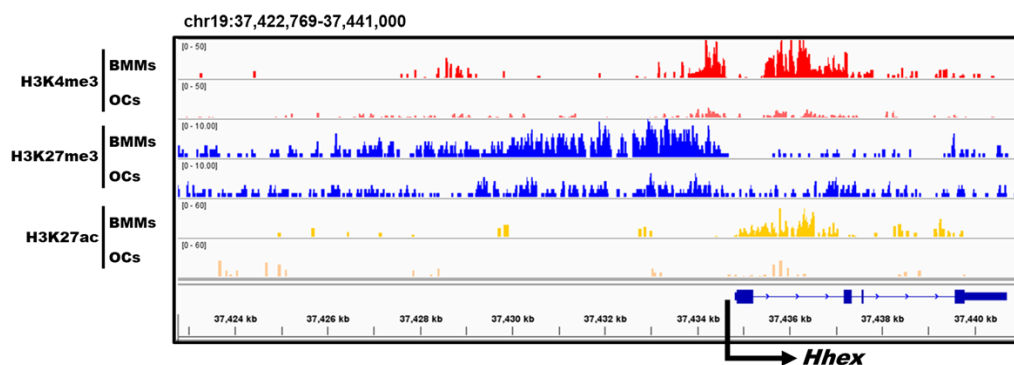


図3. 破骨細胞分化過程における *Hex* 周囲の ChIP-seq 結果

Hex の TSS 周囲での BMMs および OCs における H3K4me3, H3K27me3, H3K27ac 修飾変化。RANKL 刺激による BMMs から OCs への分化に伴い、H3K4me3 および H3K27ac は減少したが、H3K27me3 の発現は保たれていた。

4-2. 破骨細胞分化における *Hhex* の mRNA およびタンパク質の発現変化とその局在

破骨細胞分化に伴う BMMs での *Hhex* の mRNA の発現は、RANKL 刺激によって時間依存的に減少した(図4)。また、HHEX のタンパク質発現も RANKL 刺激の 24 時間後から著明に減少した(図5)。そして、抗 HHEX 抗体を用いた免疫細胞染色では、HHEX が主に核に局在し、その蛍光強度が RANKL 刺激後に減少したことが示された(図6)。これらの結果は、BMM の核内に存在する転写因子 *Hhex* が、RANKL 刺激による破骨細胞分化過程でエピジェネティックな制御機構により下方制御されることを示している。

図4

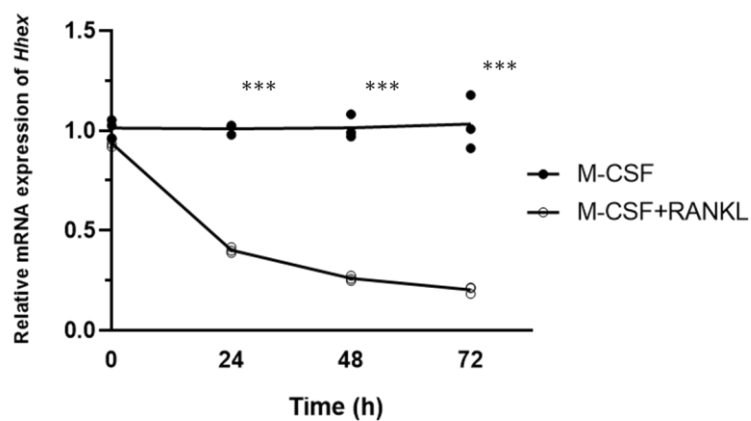


図4. 破骨細胞分化における *Hhex* の mRNA 発現変化

リアルタイム PCR による、マウスの BMMs を M-CSF または M-CSF および RANKL 存在下で培養した各群の *Hhex* の時間経過による mRNA 発現変化。 (***, $P < 0.01$; $n = 3$.)

RANKL 刺激による破骨細胞分化過程で *Hhex* の発現減少がみられた。

図5

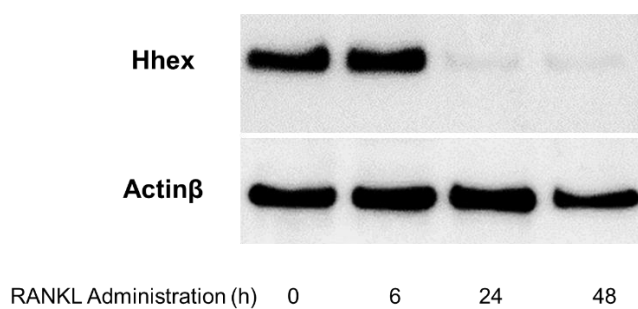


図5. 破骨細胞分化における HHEX のタンパク質発現変化

Western blotting による、マウスの BMMs を M-CSF および RANKL 存在下で培養した際の時間経過による HHEX のタンパク質発現変化。

図6

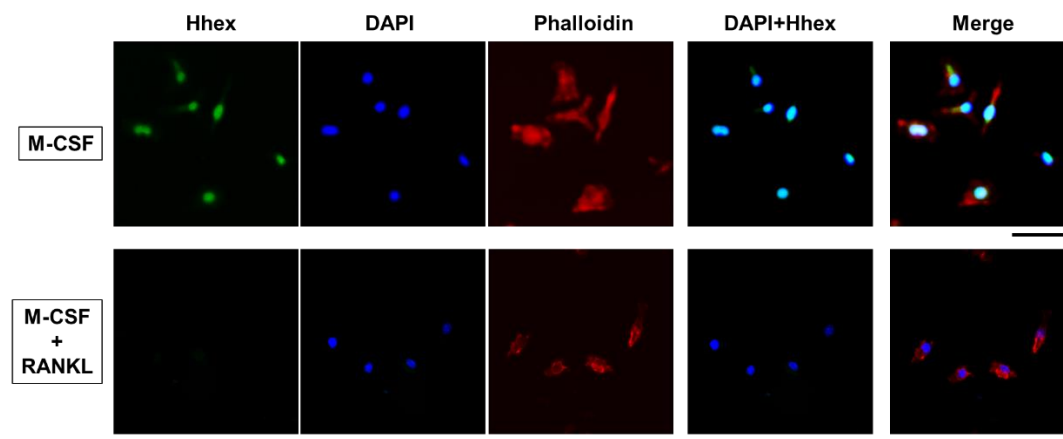


図6. M-CSF または M-CSF / RANKL 存在下に培養された BMMs の免疫細胞染色
(Hhex) 抗 HHEX 抗体と反応させた後、緑色標識二次抗体と反応させた。(DAPI) 細胞核は DAPI
により青く染色された。(Phalloidin) アクチン線維を可視化した。Bars=50 μ m.
HHEX は主に核に局在し、HHEX の蛍光は M-CSF/RANKL 刺激群(下)で減衰した。

4-3. *Hhex* 遺伝子の発現を制御する上流因子の解析

Hhex が RANKL 刺激により下方制御されることがわかったため、この発現減少が破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 に依存しているかどうかを判断するために、カルシニューリン阻害剤である FK506 を添加し *Hhex* 発現への影響を調べた。カルシニューリンを阻害すると NFATc1 の核移行と auto amplification が抑制される¹⁶。

図7に示すように、FK506 は RANKL 刺激による *Hhex* 発現の減少を用量依存的に弱めた。また、NFATc1 によって発現が増加する BLIMP-1 は、IRF8、MAFB、BCL6 などの破骨細胞分化の負の調節因子を下方制御することにより破骨細胞分化を促進するが、*Blimp-1* ノックアウトマウスでは破骨細胞分化において *Hhex* 発現の減少が抑制されることが報告されている^{28,29}。そして、FK506 を添加すると、RANKL 刺激時の *Blimp-1* および *Nfatc1* の発現は用量依存的に減少した。これは、*Hhex* の発現と逆の相関を示していた(図7)。これらの結果は、*Hhex* が NFATc1 依存的に増加する *Blimp-1* によって負に制御されていることを示唆する。そして、このことを裏付けるように、ShRNA により *Blimp-1* をノックダウンすると、RANKL 刺激による *Hhex* 発現の減少は抑制された(図8)。

図7

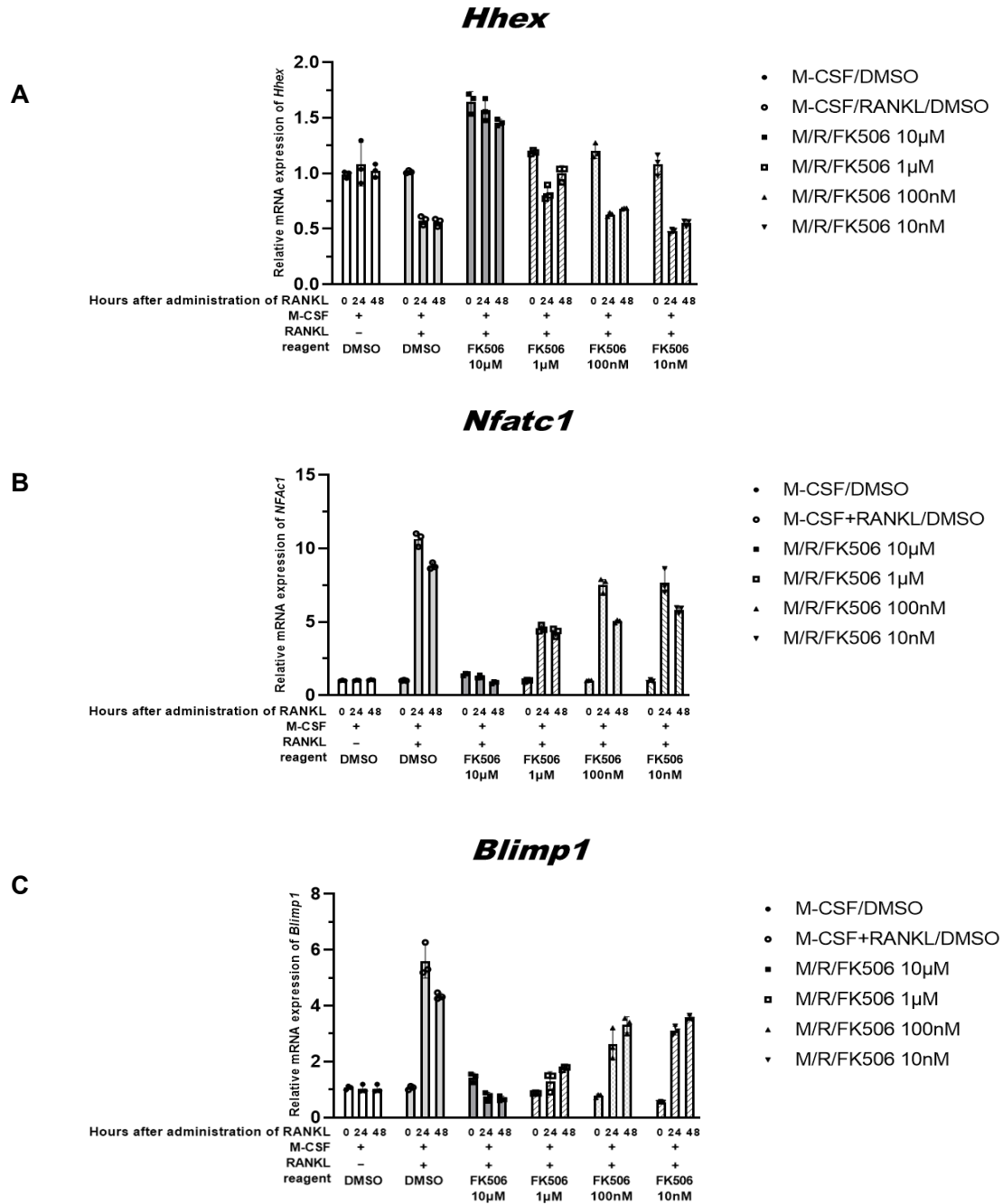


図7. FK506 による *Hhex*・*Nfatc1*・*Blimp-1* 発現への影響

示された濃度の FK506 または DMSO の存在下で M-CSF または M-CSF/RANKL 存在下に培養されたBMMsにおける、(A) *Hhex*、(B) *Nfatc1*、および(C) *Blimp-1* のリアルタイムPCRによる mRNA 発現の時間経過による変化。

十分量の FK506 添加により破骨細胞分化に伴う *Hhex* 発現の減少は抑制された。

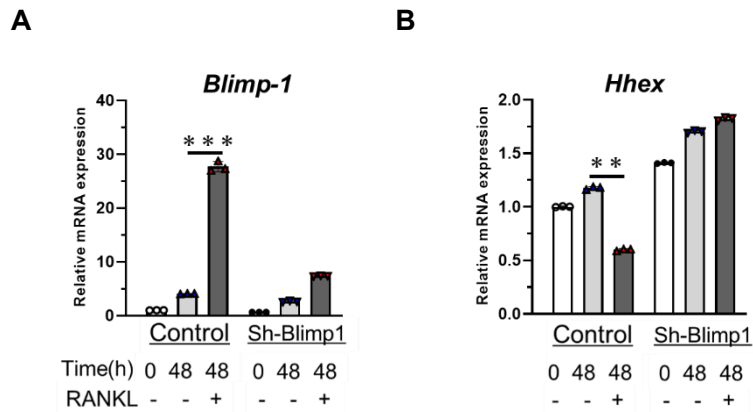


図8. ShRNA により *Blimp-1* をノックダウンした BMMs の *Hhex* 発現の変化

ShRNA により *Blimp-1* をノックダウンした BMMs における (A) *Blimp-1* および (B) *Hhex* のリアルタイム PCR による mRNA の発現変化。 (***, $P < 0.001$; **, $P = 0.002$; $n = 3$.)

Control, Scramble ShRNA ; Sh-Blimp1 , *Blimp-1* ShRNA.

Blimp-1 に対する ShRNA レンチウイルス粒子を感染させた BMMs は RANKL 刺激による *Blimp-1* の発現増加および *Hhex* の発現減少が抑制された。

4-4. *Hhex* 過剰発現および発現抑制した骨髄由来マクロファージの解析

破骨細胞形成における *Hhex* の役割を調べるために、レトロウイルスベクター pMX-Hhex-IRES-Puro を transduction して BMMs で *Hhex* を過剰発現させた。コントロールとしては pMX-IRES-Puro を transduction した BMMs を用いた。pMX-Hhex-IRES-Puro を transduction した BMMs で *Hhex* 発現が増加したことをリアルタイム PCR および western blotting によって確認した (図9)。この *Hhex* を過剰発現させた BMMs では、RANKL 刺激による多核破骨細胞形成が著明に抑制された (図10)。*Hhex* 過剰発現による多核破骨細胞形成の阻害は、pMX-Hhex-EGFP-IRES-Puro を transduction した HHEX-EGFP fusion protein を過剰発現する BMMs でも確認された (図11)。

続いて、*Hhex* 発現を抑制した BMMs を RANKL 刺激し破骨細胞形成を調べた。*Hhex* 遺伝子の 2 番目の exon を囲む loxP 配列を組み込んだ *Hhex*^{fl/fl} マウスから得られた BMMs に、pMx-Cre-IRES-Puro レトロウイルスベクターを transduction すると、*Hhex* の発現が抑制された (図12)。この *Hhex* 発現を抑制した BMMs に RANKL 刺激を行うと、Control 群と比べより多くの多核破骨細胞が形成された (図13)。

これらの結果から、*Hhex* は RANKL 刺激による多核破骨細胞形成を負に調節することが示唆された。

図9

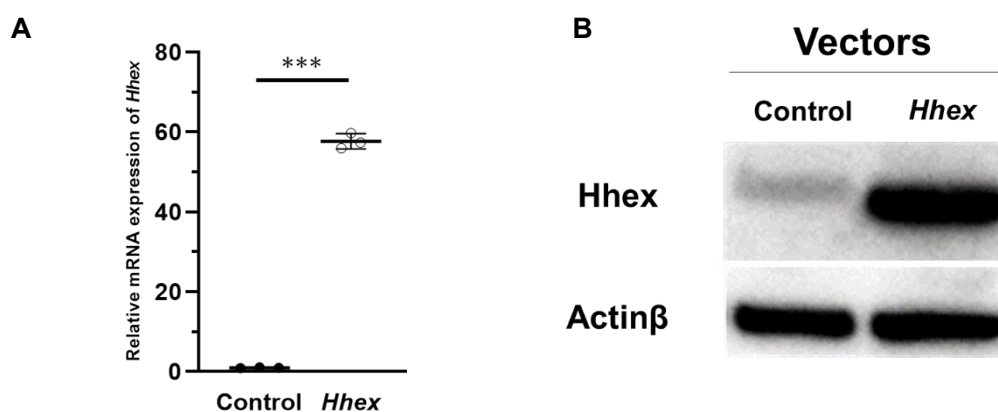


図9. レトロウイルスベクターによる BMMs での *Hhex* の過剰発現

(A) 各レトロウイルスベクターを transduction した BMMs の *Hhex* の mRNA 発現 (***, $P < 0.001$; $n = 3$.) および (B) タンパク質発現。

Control, pMX-IRES-Puro ; *Hhex*, pMX-Hhex-IRES-Puro.

図10

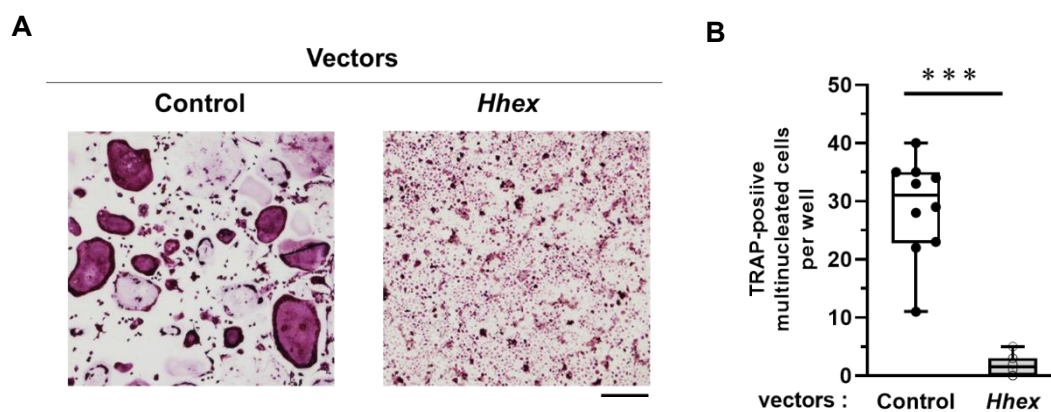


図10. *Hhex* 過剰発現 BMMs の破骨細胞形成

(A) RANKL 刺激開始後 4 日目の TRAP 染色 (Bar=100μm) と (B) 96 ウェルプレート1ウェル内あたりの TRAP 陽性で 5 核以上の多核細胞(MNC)の数。 (***, $P < 0.001$; $n = 10$)

Control, pMX-IRES-Puro ; *Hhex*, pMX-Hhex-IRES-Puro.

Hhex を過剰発現した BMMs は RANKL 刺激による TRAP 陽性多核細胞形成が阻害された。

図11

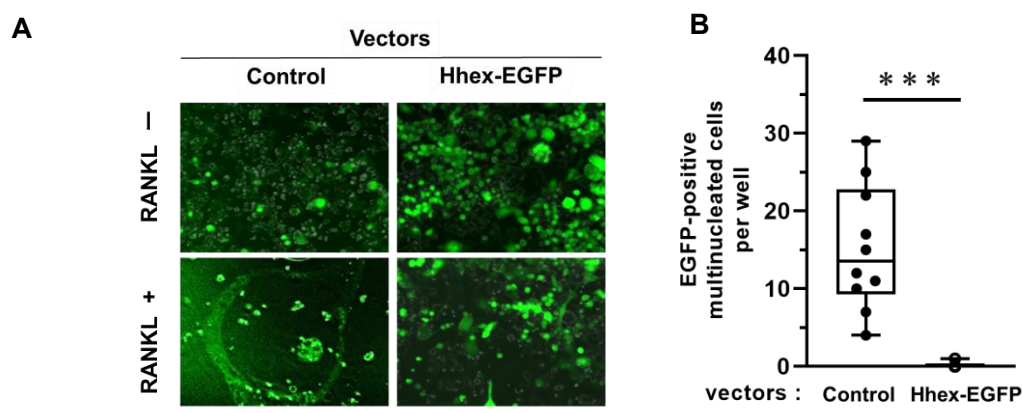


図11. EGFP による *Hhex* 過剰発現 BMMs の多核細胞形成

(A) 蛍光顕微鏡画像 (Bar=100 μ m) と (B) RANKL 刺激開始後 4 日目の 96 ウェルプレート 1 ウェル内あたりの EGFP 陽性 MNC の数。(***, $P < 0.001$; $n = 10$.)

Control, pMX-EGFP-IRES-Puro; Hhex-EGFP, pMX-Hhex-EGFP-IRES-Puro.

Control 群で確認できた EGFP 陽性の多核細胞は、Hhex-EGFP 群ではほとんど見られなかった。

図12

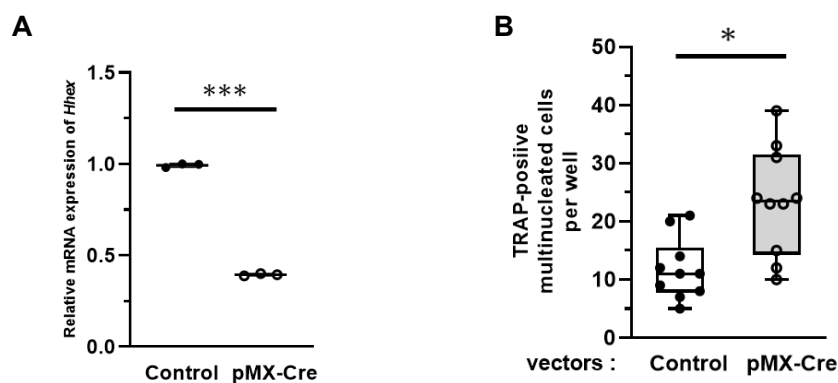


図12. *Hhex* 抑制 BMMs の破骨細胞形成

(A) 各レトロウイルスベクターを transduction した *Hhex*^{fl/fl} マウスの BMMs の *Hhex* の mRNA 発現。(***, $P < 0.001$; $n = 3$.) (B) RANKL 刺激開始後 4 日目の 96 ウェルプレート 1 ウェル内あたりの TRAP 陽性 MNC の数。(*, $P = 0.02$; $n = 10$.)

Control, pMX-IRES-Puro; pMX-Cre, pMX-Cre-IRES-Puro.

Hhex^{fl/fl} マウスの BMMs に pMX-Cre を transduction すると多核破骨細胞形成が促進した。

4-5. *Hhex* コンディショナルノックアウトマウスの解析

次に、破骨細胞分化における *Hhex* 欠失の影響を *in vivo* で解析した。*Hhex* のコンディショナルノックアウトマウスは胎生致死となるため⁴⁰⁻⁴²、Cre-loxP システムを用いてコンディショナルノックアウトマウスを作製した。*Hhex*^{fl/fl} マウスに、I 型 IFN 誘導性 promoter から Cre recombinase を発現するトランスジェニック系統 (Mx-1 Cre) マウスを交配し、Poly(I:C)の処理に応じて Cre recombinase が誘導されるマウスを作成した⁴³。(このマウスを以後 *Hhex*^{MxCre/-}マウスと表記する。)

Hhex^{MxCre/-}マウスの BMMs は HHEX タンパク質の発現が減少していることを確認した(図13)。また、*Hhex*^{MxCre/-}マウスの BMMs は *in vitro* での破骨細胞分化が促進された(図14)。

In vivo での *Hhex* 欠失の影響を調べるために、12 週齢の雄の *Hhex*^{MxCre/-}マウスおよび *Hhex*^{fl/fl} マウスに Poly(I:C)を腹腔内注射し、8 週間後に屠殺して μ CT による骨構造の解析を行った。その結果、*Hhex*^{MxCre/-}マウスは、*Hhex*^{fl/fl} マウスと比較して、BV/TV、Tb.N、Tb.h、N.Nd/TV が著しく減少した(図15)。そして、脛骨近位部の骨形態計測分析を行うと、*Hhex*^{MxCre/-}マウスは *Hhex*^{fl/fl} マウスと比べ、破骨細胞数の増加および骨吸収パラメーターの増加と骨量の減少を示した。骨形成パラメーターは、*Hhex*^{MxCre/-}マウスでわずかに減少したが、有意な差はなかった(図16)。

Poly(I:C)による Mx-1 promoter の誘導は BMMs のみならず、他の細胞にも影響を

与えるため、*Hhex*^{fl/fl} マウスを Cre recombinase 遺伝子が挿入された Ctsk Cre ノックインマウスと交配することにより、破骨細胞系列特異的な *Hhex* コンディショナルノックアウトマウスも生成した。(このマウスを以後 *Hhex*^{ΔOC/-}マウスと表記する。) *Hhex*^{ΔOC/-}マウスのBMMs は *Hhex*^{fl/fl} と比較し HHEX タンパク質の有意な減少が観察され(図17)、M-CSF および RANKL により破骨細胞分化を誘導すると、破骨細胞の分化が増加した(図18)。また、in vivo での解析のため、12 週齢の雌 *Hhex*^{ΔOC/-}および *Hhex*^{fl/fl} マウスに対し μCT による骨構造の解析を行った。その結果、*Hhex*^{ΔOC/-}の骨量がやや低い傾向がみられたが有意な差ではなかった。

そこで、破骨細胞による骨吸収の差を明瞭にすることを目的に、閉経による破骨細胞形成促進のモデルとして知られる卵巣摘出術を施したマウスを用い評価を行う方針とした^{44,45}。12 週齢の雌 *Hhex*^{ΔOC/-}および *Hhex*^{fl/fl} マウスに対し卵巣摘出術 (OVX) を施し、8 週間後に屠殺し、μCT による骨構造の解析を行った。その結果、OVX を施した *Hhex*^{ΔOC/-}マウスは、OVX を施した *Hhex*^{fl/fl} マウスと比較して、BV/TV、Tb.N、Tb.h、N.Nd/TV の有意な減少を示した(図19)。

これらの結果は、in vitro および in vivo の両方で *Hhex* が破骨細胞形成においての負の調節的役割を果たしていることを示している。

図13

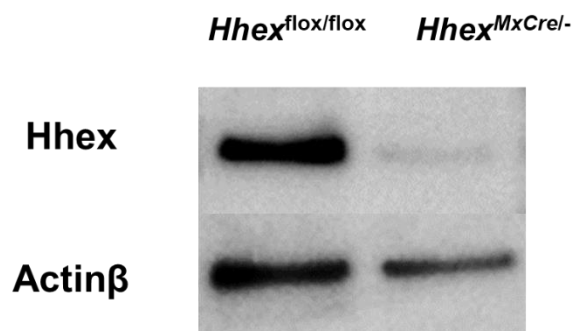


図13. *Hhex*^{flox/flox} および *Hhex*^{MxCre/-}マウスの BMMs の HHEX タンパク質の発現 western blotting により *Hhex*^{MxCre/-}マウスの HHEX 発現が抑制されたことが確認された。

図14

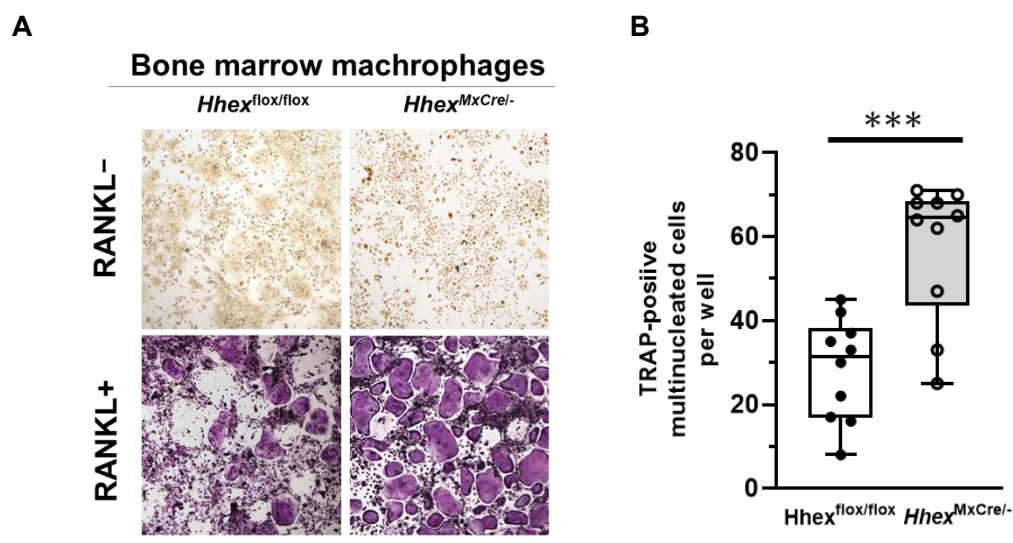


図14. *Hhex*^{MxCre/-}マウスの破骨細胞形成

(A) *Hhex*^{flox/flox} マウスと *Hhex*^{MxCre/-}マウスの BMMs に M-CSF もしくは M-CSF/RANKL を投与して 4 日間培養した後の TRAP 染色 (Bar=500μm) と (B) 1 ウェルあたりの TRAP 陽性 MNC の数。 (***, $P < 0.001$; n = 10.)

Hhex^{flox/flox} マウスと比較した *Hhex*^{MxCre/-}マウスの BMMs において破骨細胞分化が促進した。

図15

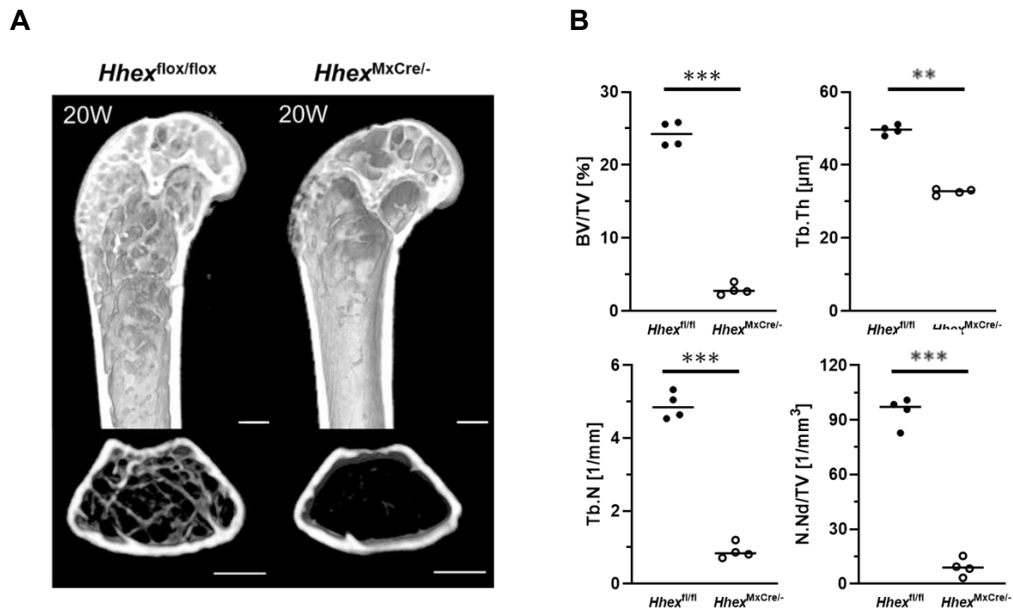


図15. *Hhex*^{flox/flox} および *Hhex*^{MxCre/-}マウスの大腿骨遠位部の μ CT 解析

Poly(I:C)を *Hhex*^{flox/flox} および *Hhex*^{MxCre/-}マウスの 12 週齢の雄に注射し、8 週間後に大腿骨を採取し解析を行った。

(A) 各マウスの大腿骨遠位端の矢状断図(上)と横断面図(下)。(Bars = 500 μ m) (B) 大腿骨骨幹端部の μ CT で測定した各パラメーター。(***, $P < 0.001$; **, $P = 0.003$; $n = 4$.) BV/TV (bone volume per tissue volume), Tb.Th (trabecular bone thickness), Tb.N (trabecular number), N.Nd/TV (number of nodules per tissue volume).

Hhex^{MxCre/-}マウスは、*Hhex*^{flox/flox} マウスと比較して、海綿骨パラメーターの減少がみられた。

図16

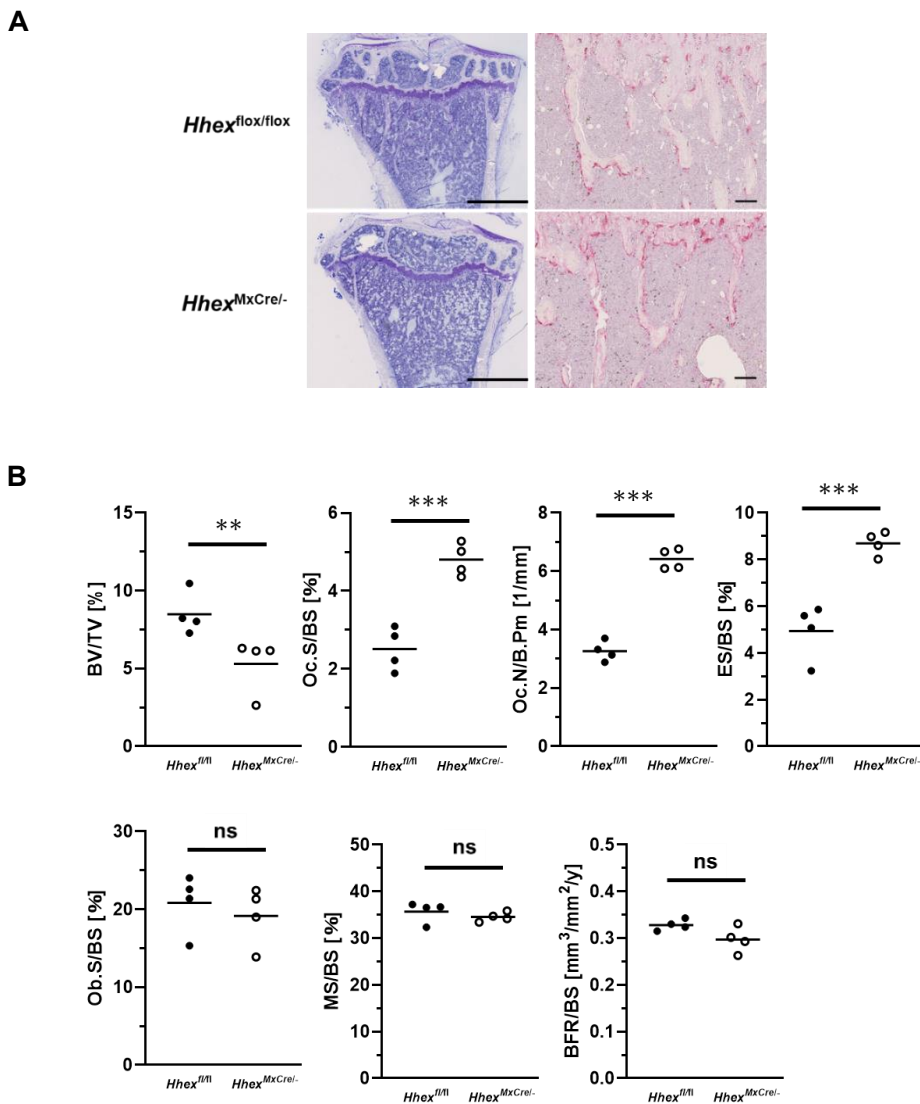


図16. *Hhex*^{flox/flox} および *Hhex*^{MxCre/-}マウスの脛骨近位部の骨組織像および骨形態計測

Poly(I:C)を *Hhex*^{flox/flox} および *Hhex*^{MxCre/-}マウスの 12 週齢の雄に注射し、8 週間後に大腿骨を採取し解析を行った。

(A) 脛骨近位部の骨組織像のトルイジンブルー染色(左, Bars=1mm)と TRAP 染色(右, Bars=100µm)。(B) 脛骨近位部の骨形態計測分析における破骨細胞の骨吸収および骨芽細胞の骨形成のパラメーター。(**, $P = 0.003$; ***, $P < 0.001$; ns, $P > 0.05$; n=4.) BV/TV(bone volume per tissue volume), Oc.S/BS(osteoclast surface per bone surface), Oc.N/B.Pm(osteoclast number per bone perimeter), ES/BS(eroded surface per bone surface), Ob.S/BS(osteoblast surface per bone surface), MS/BS(mineralized surface per bone surface), BFR/BS(bone formation rate per bone surface).

Hhex^{MxCre/-}マウスは海面骨量の減少、破骨細胞数の増加および骨吸収面の増加を示した。

図17

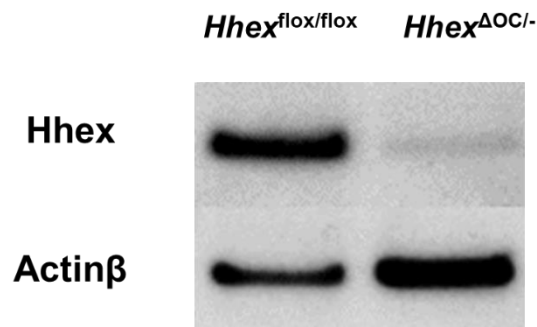


図17. *Hhex*^{flox/flox} および *Hhex*^{ΔOC/-}マウスの BMMs の HHEX タンパク質の発現 western blotting により *Hhex*^{ΔOC/-}マウスの HHEX 発現が抑制されたことが確認された。

図18

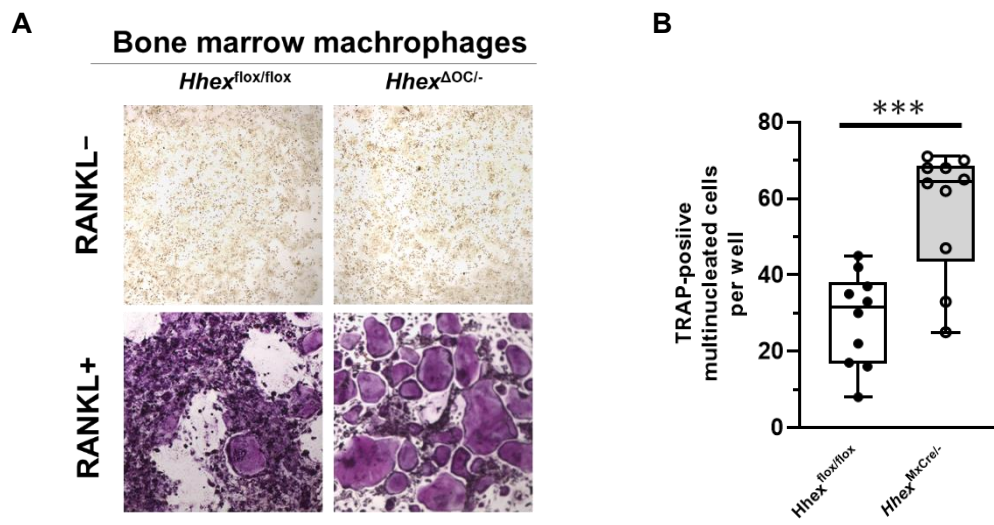


図18. *Hhex*^{ΔOC/-}マウスの破骨細胞分化促進

(A) *Hhex*^{flox/flox} マウスと *Hhex*^{ΔOC/-}マウスの BMMs に M-CSF もしくは M-CSF/RANKL を添加して 4 日間培養した後の TRAP 染色 (Bar=500μm) と (B)1 ウェルあたりの TRAP 陽性 MNC の数。 (***, $P < 0.001$; n = 10.)

Hhex^{flox/flox} マウスと比較した *Hhex*^{ΔOC/-}マウスの BMMs において破骨細胞分化が促進した。

図19

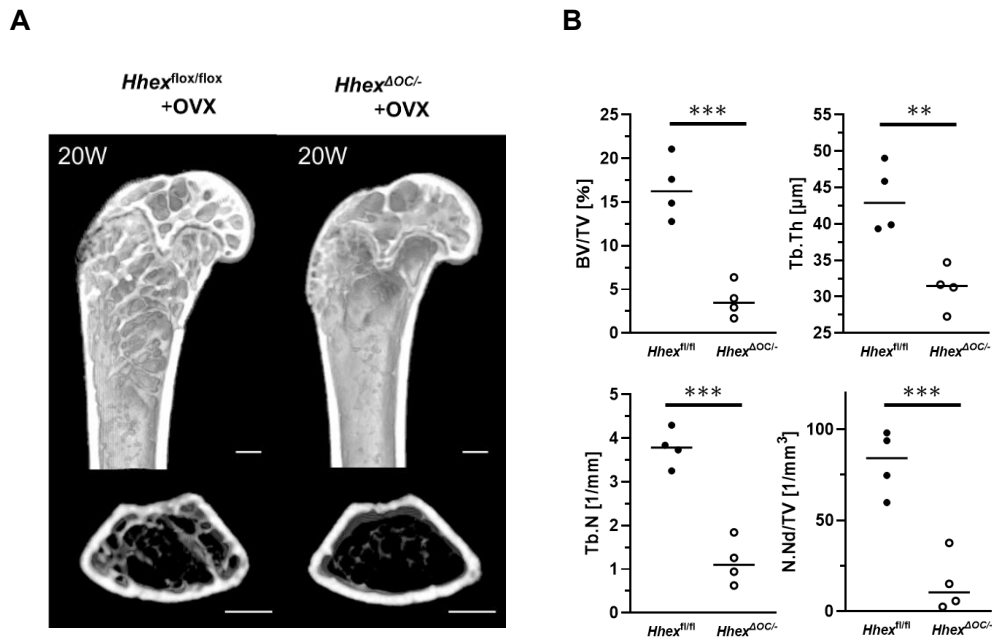


図19. OVX 後の *Hhex*^{flx/flx} および OVX 後の *Hhex*^{ΔOC/-} マウスの大腿骨遠位部の μCT 解析
Hhex^{flx/flx} および *Hhex*^{ΔOC/-} マウスの 12 週齢の雌に卵巣摘出術を行い、8 週後に大腿骨を採取した。

(A) マウスの大腿骨遠位端の矢状断図(上)と横断面図(下)。(Bars = 500μm) (B) 大腿骨骨幹端部の μCT で測定した各パラメーター。(***, $P < 0.001$; **, $P = 0.005$; $n = 4$.)

BV/TV (bone volume per tissue volume), Tb.Th (trabecular bone thickness), Tb.N (trabecular number), N.Nd/TV (number of nodules per tissue volume).

OVX 後の *Hhex*^{ΔOC/-} マウスは、OVX 後の *Hhex*^{flx/flx} マウスと比較して、海綿骨パラメーターの減少がみられた。

4-6. *Hhex* 欠失による細胞周期関連遺伝子への影響

Hhex が RANKL 誘導破骨細胞分化を負に調節するメカニズムについて検討した。興味深いことに、*Hhex* を過剰発現した BMMs を RANKL 刺激した際の、*Nfatc1* や破骨細胞マーカー遺伝子の発現に、破骨細胞形成阻害を説明できるような有意な差はみられなかった(図20)。また、*Hhex* を過剰発現した BMMs からの多核の破骨細胞形成が阻害された(図10)ことから、破骨細胞の多核化が骨吸収能に寄与しているかを確認するために、*Hhex* を過剰発現した BMMs に RANKL を添加し、破骨細胞分化を促して骨吸収活性を評価した。その結果、*Hhex* 過剰発現群では、骨吸収活性が定量的にも定量的にも減少していた(図21)。このことから、非多核破骨細胞は多核破骨細胞よりも骨吸収活性が低いことが示唆された。

破骨細胞の多核化に関わる因子としては、DC-STAMP が知られている²¹が、*Hhex* の変動による発現変化はみられなかった(図20)。破骨細胞の多核化に関わる他の因子として細胞周期がある。細胞周期の調節は破骨細胞の分化に重要であり、細胞周期が停止した静止期破骨細胞前駆細胞 (cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors) が破骨細胞前駆細胞であることが報告されている^{46,47}。

また、HHEX は *Cdkn2a* 遺伝子座に結合し、PRC2 と直接相互作用して、H3K27me3 を介したエピジェネティックな制御により *Cdkn2a* の発現抑制に関わっている⁴⁸。実際に、*Hhex*^{fl/fl} マウスの BMMs、*Hhex*^{fl/fl} マウスの BMMs に RANKL を添加したもの、

Hhex^{MxCre/-}マウスの BMMs、それぞれに対し抗 H3K27me3 抗体で ChIP を行い、前述の既報の *Cdkn2a* 遺伝子座の結合部位の回収率を評価した。その結果、*Hhex* の減少に伴い、H3K27 のトリメチル化が減少する傾向がみられた (図22)。

そこで、BMMs の細胞増殖と細胞周期に対する *Hhex* の影響を分析した。WST-8 を使用し M-CSF 存在下の BMMs の細胞増殖率を定性的に評価すると、*Hhex*^{MxCre/-}マウスの BMMs は *Hhex*^{fl/fl} マウスの BMMs と比較して増殖率が鈍化していた (図23)。

また、フローサイトメトリーにより細胞周期分布を分析すると、*Hhex*^{MxCre/-}の BMMs は *Hhex*^{fl/fl}と比較し、S 期の細胞の割合が減少し、G1 期の細胞の割合が増加していた (図24)。このことから、*Hhex* は *Cdkn2a* 発現の調節を介して細胞周期を調節しており、*Hhex* をノックアウトした BMMs では G1 期での細胞周期の停止が誘発されたと考えられた。

Hhex と細胞増殖・細胞周期に関連が疑われたため、BMMs から破骨細胞への分化過程における *Cdkn2a* の発現を調べた。BMMs と RANKL で誘導した破骨細胞に対する ChIP-seq の解析では、BMMs と比較し破骨細胞において *Cdkn2a* のシスエレメントでの H3K27me3 修飾が減少したのに対し、H3K4me3 修飾は両群で明らかな差がなかった (図25)。また、BMMs に RANKL を添加すると *Cdkn2a* の mRNA 発現の増加が確認された (図26)。

そこで次に、BMMs において *Hhex* の過剰発現もしくは発現抑制を行い、*Cdkn2a* の

発現への影響を調べた。上記のレトロウイルスベクターを使用し、BMMs の *Hhex* を過剰発現すると、*Hhex* 過剰発現群ではコントロールと比較し *Cdkn2a* 発現が抑制された。一方、*Hhex* 発現を抑制した *Hhex*^{MxCre/-}マウスからの BMMs では *Cdkn2a* の発現は増加した(図27)。

図20

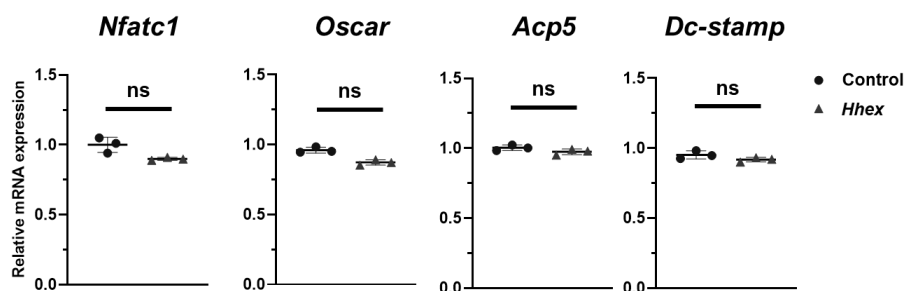


図20. *Hhex* を過剰発現した BMMs に RANKL を添加して 48 時間後の mRNA の発現
各レトロウイルスベクターを transduction した BMMs の *Nfatc1*, *Oscar*, *Acp* および *Dc-stamp* の mRNA
発現。(ns, $P > 0.05$; $n = 3$.) Control, pMX-IRES-Puro; *Hhex*, pMX-Hhex-IRES-Puro.
Hhex を過剰発現した BMMs の RANKL 添加後の破骨細胞関連遺伝子発現に、破骨細胞形成の
阻害を説明できるような有意な差はみられなかった。

図21

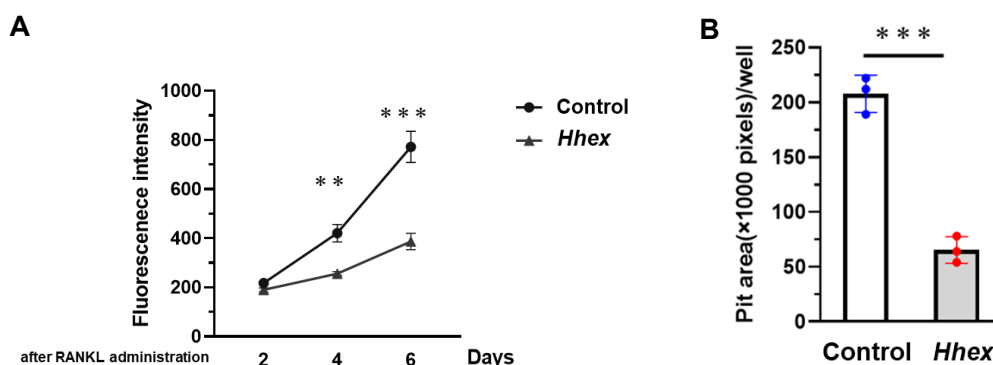


図21. *Hhex* を過剰発現した BMMs に RANKL により破骨細胞分化を誘導した際の骨吸収活性
各レトロウイルスベクターを transduction した BMMs に RANKL 刺激を加え、骨吸収活性を評価し
た。Control, pMX-IRES-Puro; *Hhex*, pMX-Hhex-IRES-Puro.

(A) 蛍光標識リン酸カルシウム固層化プレートで培養した際の培養液上清の蛍光強度の変化。
(**, $P = 0.001$; ***, $P < 0.001$; $n = 3$.)

(B) 培養 6 日後のプレートの骨吸収窩の面積。(***, $P < 0.001$; $n = 3$.)

多核破骨細胞形成が阻害される *Hhex* 過剰発現群では骨吸収活性が定性的にも定量的にも減少
した。

図22

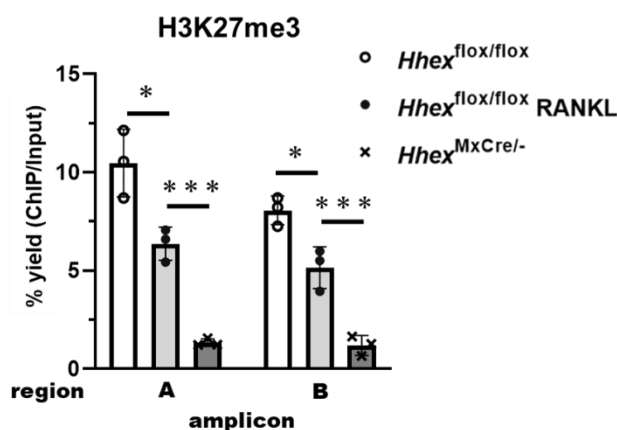


図22. 各 BMMs の *Cdkn2a* 遺伝子座における H3K27me3 の ChIP qPCR 解析

Hhex^{flox/flox} マウスからの BMMs に M-CSF を添加し培養したもの、*Hhex*^{flox/flox} マウスからの BMMs に M-CSF と RANKL を添加し培養したもの、および *Hhex*^{MxCre/-} マウスの BMMs に M-CSF を添加し培養したものに対して、抗 H3K27me3 抗体を用いて ChIP を行い、*Cdkn2a* 遺伝子座の各領域の回収率を評価した。region A, *Cdkn2a* upstream promoter ; region B, *Cdkn2a* Exon 1α. (*, $P=0.02$; ***, $P < 0.001$; n = 10.)

図23

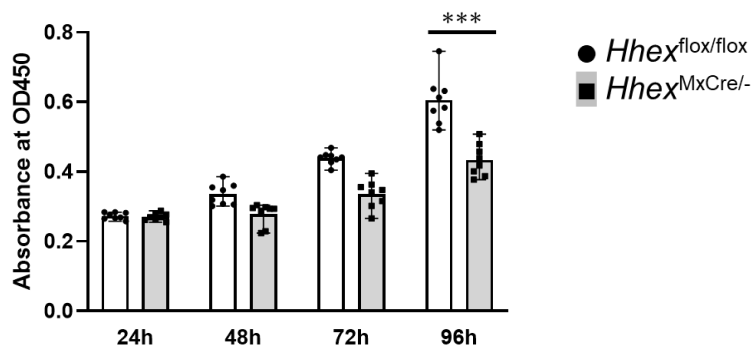


図23. *Hhex*^{flox/flox} および *Hhex*^{MxCre/-} マウスの BMMs の細胞増殖率

WST-8 を用いて M-CSF 存在下での *Hhex*^{flox/flox} および *Hhex*^{MxCre/-} マウスの BMMs の細胞増殖率を評価した。(***, $P < 0.001$; n = 10.)

Hhex^{MxCre/-} マウスの BMMs は *Hhex*^{flox/flox} マウスの BMMs と比べ細胞増殖の有意な減少が観察された。

図24

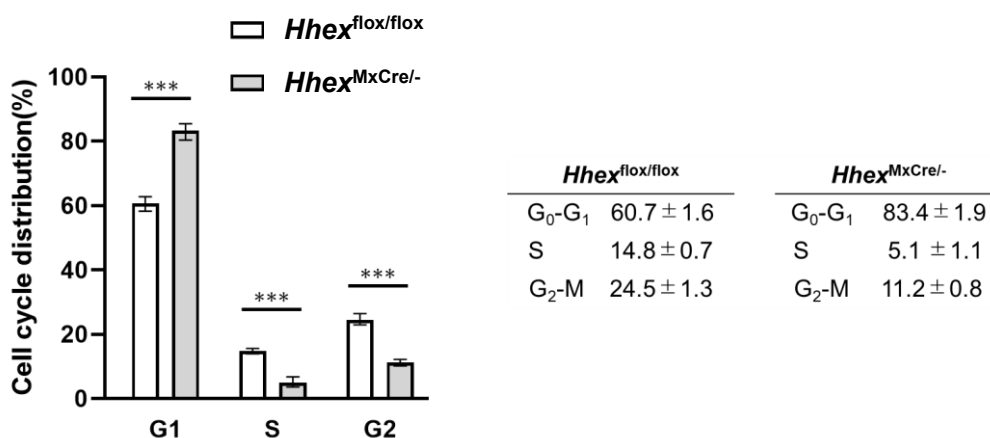


図24. *Hhex*^{flox/flox} および *Hhex*^{MxCre/-}マウスの BMMs の細胞周期分布

フローサイトメトリーを使用して M-CSF 存在下の *Hhex*^{flox/flox} および *Hhex*^{MxCre/-}マウスの BMMs の細胞周期を分析した。(***, $P < 0.001$; $n = 4$.)

Hhex をノックアウトした BMMs では、G1 期は 60.7%±1.6%から 83.4%±1.9%に増加し、S 期は 14.8%±0.7%から 5.1%±1.1%に減少した。

図25

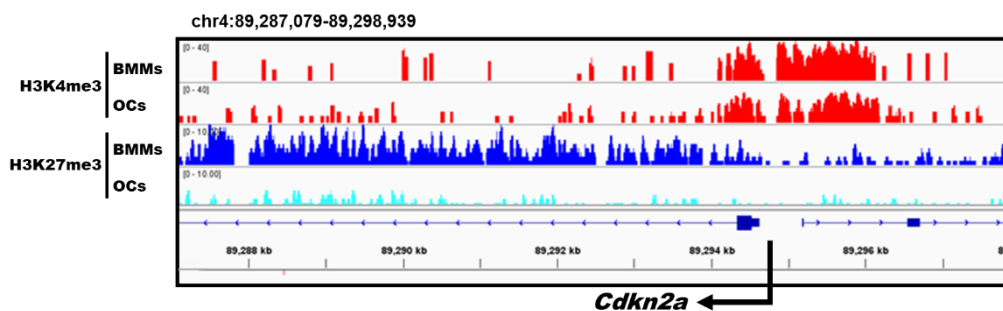


図25. 破骨細胞分化過程における *Cdkn2a* 周囲の ChIP-seq 結果

Cdkn2a の シスエレメントでの BMMs および OCs における H3K4me3 と H3K27me3 修飾変化を評価した。BMMs と比較し破骨細胞の *Cdkn2a* のシスエレメントでの H3K27me3 修飾が減少したのに対し、H3K4me3 修飾は両群で明らかな差がなかった。

図26

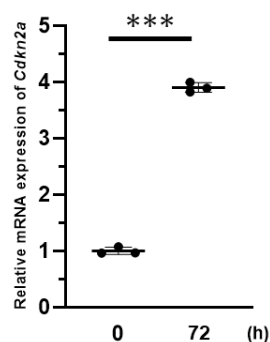


図26. 破骨細胞分化における *Cdkn2a* の mRNA 発現変化

リアルタイム PCR による M-CSF 存在下の BMMs に対して RANKL 刺激を加える前と 72 時間後の *Cdkn2a* の mRNA 発現。 (***, $P < 0.001$; $n = 3$.)

BMMs に RANKL を添加し 72 時間後の *Cdkn2a* の mRNA 発現は増加した。

図27

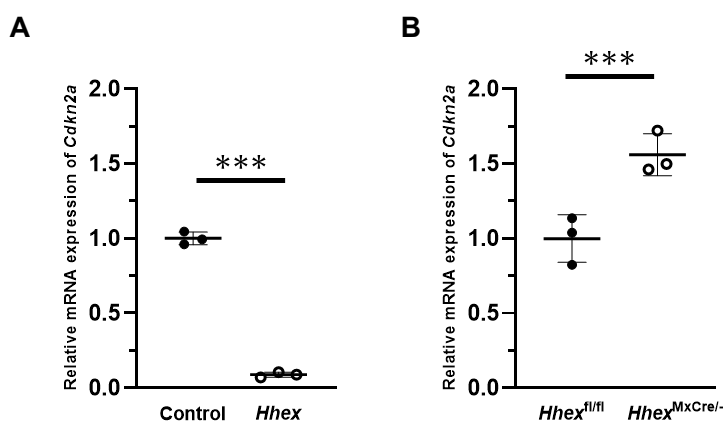


図27. BMMs における *Hhex* 発現調節による *Cdkn2a* 発現変化

(A) *Hhex* を過剰発現する BMMs における *Cdkn2a* のリアルタイム PCR による mRNA の発現変化。

(***, $P < 0.001$; $n = 3$.) Control, pMX-IRES-Puro ; *Hhex*, pMX-Hhex-IRES-Puro.

Hhex を過剰発現した BMMs では *Cdkn2a* の発現は抑制された。

(B) *Hhex* 発現を抑制した *Hhex*^{MxCre/-}マウスの BMMs における *Cdkn2a* のリアルタイム PCR による mRNA の発現変化。 (***, $P < 0.001$; $n = 3$.)

Hhex を発現抑制した BMMs では *Cdkn2a* の発現は増加した。

4-7. *Cdkn2a* 発現抑制による破骨細胞分化への影響

Hhex を過剰発現した BMMs での多核破骨細胞形成の抑制が、*Cdkn2a* によるものか確認するために、ShRNA を用いて *Cdkn2a* をノックダウンした BMMs を作成し、RANKL 刺激による破骨細胞分化を試みた。リアルタイム PCR により scrambled ShRNA を導入したコントロールと比較して、RANKL 刺激後の *Cdkn2a* の発現増加が抑制されることを確認した (図28)。この *Cdkn2a* 発現が抑制された BMMs はコントロールと比較して多核破骨細胞形成が著明に抑制された (図29)。

図28

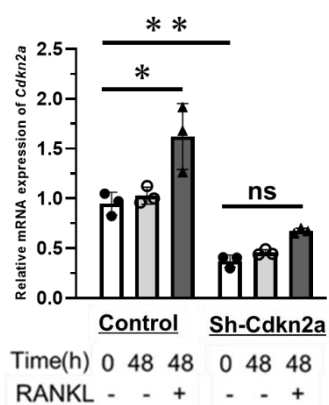


図28. ShRNA による *Cdkn2a* の発現抑制

ShRNA により *Cdkn2a* をノックダウンした BMMs における *Cdkn2a* のリアルタイム PCR による mRNA の発現変化。(*, $P=0.04$; **, $P=0.002$; ns, $P>0.05$; $n=3$.)

Control, Scrambled ShRNA; Sh-Cdkn2a, *Cdkn2a* ShRNA.

Cdkn2a に対する ShRNA レンチウイルス粒子を感染させた BMMs は *Cdkn2a* の発現が抑制された。

図29

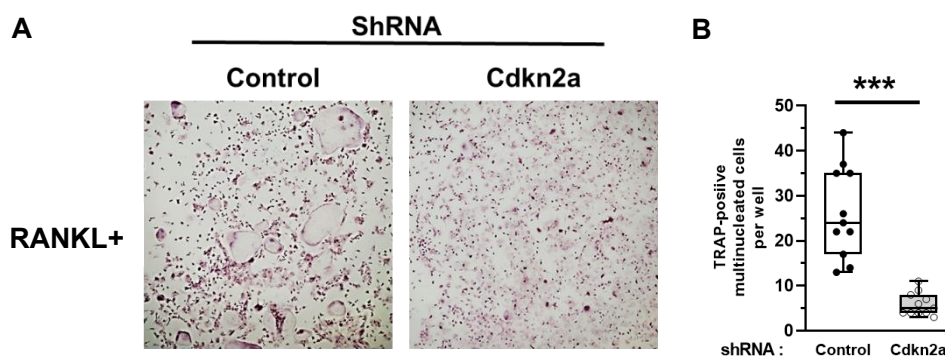


図29. *Cdkn2a* をノックダウンした BMMs からの破骨細胞形成

(A) ShRNA により *Cdkn2a* 発現を抑制した BMMs に M-CSF および RANKL を添加し、4 日後に TRAP 染色を行った。(Bar=100 μ m) (B) 1 ウェルあたりの TRAP 陽性 MNC の数。

(***, $P<0.01$; $n=10$.) Control, Scrambled ShRNA; Cdkn2a, *Cdkn2a* ShRNA.

Scrambled ShRNA を感染させたコントロールと比較して *Cdkn2a* ShRNA を感染させた BMMs は多核破骨細胞形成が抑制された。

第 5 章 考察

我々はホメオボックス遺伝子属の転写因子である *Hhex* が、BMMS に RANKL を添加することで誘導されるエピジェネティック修飾によって下方制御され、細胞周期の進行を調節することによって多核破骨細胞形成において重要な役割を果たすことを実証した。RANKL 刺激に応答して、*Hhex* の転写開始点周囲のヒストン修飾が、H3K4me3 および H3K27me3 が bivalent な状態から H3K27me3 のみの monovalent な状態に変化し、H3K27ac 修飾は減少した (図3)。これらの修飾変化は *Hhex* の mRNA (図4) およびタンパク質の発現変化 (図5) と関連しており、*Hhex* の発現が破骨細胞分化の過程でエピジェネティックな制御により抑制されたことを示唆している。*Hhex* の上流因子としては、FK506 により NFATc1 の核内移行を抑制することで RANKL による *Hhex* の発現減少が抑制されたこと (図7) から、RANKL が誘導する *Hhex* の発現減少は NFATc1 に依存していることが考えられた。そして、NFATc1 により発現が増加する *Blimp-1* は、*Irf8*、*MafB*、*Bcl6* などの破骨細胞分化の負の調節因子を下方制御することにより破骨細胞分化を促進し、*Blimp-1* をノックアウトしたマウスでは破骨細胞分化において *Hhex* の発現減少が抑制されること^{28,29}、*Blimp-1* をノックダウンした BMMs に RANKL 刺激を加えても *Hhex* の発現減少が抑制されること (図8) などから、*Hhex* は NFATc1 により発現が増加する *Blimp-1* によって下方制御されていることが考えられた。

Hhex はホメオボックス遺伝子ファミリーに属する遺伝子で *Prh* (Proline-rich homeodomain)としても知られる。HHEX タンパク質は、ホメオボックスにコードされるホメオドメインと呼ばれるヘリックス・ターン・ヘリックス構造モチーフの DNA 結合ドメインを含み転写因子として機能する。また、*Hhex* の N 末端ドメインは、他の DNA 結合ドメインに融合すると、ホメオドメインとは独立して転写を抑制する⁴⁹。一方、C 末端ドメインは酸性アミノ酸を多く含み、胆汁酸のトランスポーターである sodium/bile acid co-transporter の転写活性化に関与している⁵⁰。そのため、*Hhex* は標的遺伝子の promoter へ結合する直接的なメカニズムと、他の転写因子の活性を調節することにより標的遺伝子の発現を調節する間接的なメカニズムを介して、転写を抑制したり活性化したりすることができると考えられる。

HHEX は、ホモオリゴマーとして存在し⁵¹、ヒトとマウスの HHEX タンパク質は、ホメオドメイン全体では 1 つのアミノ酸のみが異なり、HHEX タンパク質全体では 94%が同一であり種間で高度に保存されている⁵²。また、*Hhex* は、鳥類およびヒトの造血細胞で最初に同定され、他のホメオボックス蛋白と同様に、転写および転写後調節によって、細胞の発達と分化を調節していることが報告されている^{53,54}。*Hhex* が調節する遺伝子には細胞周期の制御や成長因子シグナル伝達経路に関与するものもある。また、*Hhex* は、細胞周期に影響する多くのタンパク質と直接タンパク質間相互作用を起こすため、細胞増殖の強力な調節因子としても機能する。

発生において、*Hhex* は体軸の形成と、肝臓、膵臓、心臓、甲状腺、血管系や造血系などの器官形成を調節しており、*Hhex* のコンベンショナルノックアウトマウスは胎生致死となる⁴⁰⁻⁴²。成人では、造血の複数のステップを調節し、細胞増殖を制御しており、*Hhex* の変異は、白血病、甲状腺がん、乳がんなどに関連している。また、*Hhex* はほぼすべての系統の初期造血前駆細胞で発現しており、これらの細胞の最終分化時に発現が抑制される^{53,55}。造血系における *Hhex* のコンディショナルノックアウトマウスの既報では、*Hhex* が初期の B 細胞系統のリンパ球の発達に重要であることが示されているが⁵⁶⁻⁵⁹、骨恒常性と破骨細胞系統における *Hhex* の役割は明らかにされていない。*Hhex* は多くの組織の様々な発生段階において発現するため、その機能について明確な結論を出すことは非常に困難である。しかし、*Hhex* は造血および血管系の分化の初期段階で高度に発現し、顆粒球などの一部を除き分化に伴って下方制御されるという傾向がある^{54,60}。したがって、造血および血管系において *Hhex* の活性は造血および血管新生に必要な細胞分化や増殖の抑制に関連しており、これらの細胞の増殖と分化に必要な多くの遺伝子の発現を制御していると考えられる。

我々は破骨細胞系列細胞における *Hhex* の役割を分析するために、*in vitro* 実験を行い、BMMs での *Hhex* 過剰発現が RANKL による多核破骨細胞の発生を抑制することを発見した(図10)。一方、*Hhex* 発現を抑制させた BMMs では多核破骨細胞形成は増加した(図12)。

さらに、破骨細胞形成における *Hhex* の役割を、*Hhex*^{MxCre/-}マウスを使用した *in vivo* 実験によっても確認した。この系では Poly(I:C)投与により BMMs の *Hhex* が薬剤誘導的にノックアウトされ(図13)、破骨細胞数増加を伴う海綿骨量の減少を示した(図15、16)。同様の表現型は破骨細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスである *Hhex*^{ΔOC/-}マウスでも観察された(図18、19)。これらの結果は、*Hhex* が *in vitro* および *in vivo* の両方で破骨細胞系列細胞の負の調節因子であることを示している。

Hhex を過剰発現することで、多核破骨細胞形成は阻害されたが、破骨細胞の多核化と骨吸収活性の関係性は不明であった。そのため、*Hhex* 過剰発現 BMMs に RANKL 刺激を加えた非多核破骨細胞の骨吸収活性を評価した。その結果、非多核破骨細胞は多核破骨細胞と比較し、骨吸収活性が低下した(図21)。このことから、破骨細胞による骨吸収効率には多核化が関与しており、*Hhex* コンディショナルノックアウトマウスの *in vivo* での骨量減少は多核破骨細胞形成増加の結果起こっていることが示唆された。しかし、*Hhex* の発現変化によって、破骨細胞関連遺伝子の発現や、融合・多核化に関わる *Dc-stamp* の発現に変動はなかった(図20)。

破骨細胞分化や多核化に関わる他の因子として、これまでに細胞周期調節の重要性がいくつかの研究結果で示されている。岡橋らは RANKL が p21 と p27 の一過性発現を誘導し、アンチセンスオリゴヌクレオチドによりこれらの発現を抑制すると破骨細胞分化が強く阻害されたことを報告している⁶¹。Sankar らは、p21 および p27 をダブルノック

クアウトしたマウスが、破骨細胞の減少による大理石骨病を発症したと報告している⁶²。また、Kwon らは、*in vitro* の破骨細胞分化の実験において、M-CSF を添加しないと G0/G1 期での細胞周期の停止が誘発され破骨細胞分化が促進したと報告している⁶³。他にも、小笠原らは破骨細胞前駆細胞において *Cdk6* が RANKL 刺激により下方制御され、*Cdk6* を過剰発現すると破骨細胞形成が抑制されたと報告している⁶⁴。これらの報告は、細胞周期調節が破骨細胞の分化に多大な影響を与えていることを示唆している。

そして実際に、高橋らは細胞周期を停止した *cell cycle-arrested quiescent cell* が破骨細胞前駆細胞であり、RANKL に応答して急速に成熟破骨細胞に分化するということを示している^{46,47}。また、Rahman らは Fucci 細胞周期指標を使用して、RANKL 刺激により融合する多核破骨細胞の核は G0/G1 期であり、破骨細胞前駆細胞は細胞融合時には細胞周期を停止していることを明らかにした⁶⁵。これらの報告をまとめると、RANKL が BMMs の細胞周期停止を誘導することで破骨細胞の分化が促進されることが示唆される。

そこで、RANKL 刺激により発現が抑制される *Hhex* が、細胞周期調節を介して多核破骨細胞形成を抑制するメカニズムについて検討した。以前から、マウスの造血細胞での *Hhex* 過剰発現はリンパ系腫瘍を誘発すること⁶⁶ や、ヒトの急性骨髄性白血病で *HHEX* が高レベルに発現し、発癌性融合タンパク質である MLL-ENL によって引き起

こされる骨髄性白血病の発症に関与することが報告されている⁴⁸。さらに、HHEX はサイクリン依存性キナーゼ阻害因子である *Cdkn2a* 遺伝子に結合し、PRC2 と直接相互作用して、H3K27me3 を介したエピジェネティックな制御により遺伝子発現を抑制することで、急性骨髄性白血病の発生に寄与している⁴⁸。このことから、*Hhex* は *Cdkn2a* を介して細胞増殖や細胞周期の調節に関与していることが示唆された。

そこで我々は、*Hhex* が *Cdkn2a* を介して BMMs の細胞周期を調節することにより破骨細胞分化に影響を与えているという仮説を立て検証を行った。まず、既報に従い⁴⁸、*Hhex* が減少することで *Cdkn2a* 遺伝子座の H3K27me3 が脱メチル化されるかを確認するため、抗 H3K27me3 抗体による ChIP を行った(図22)。その結果、RANKL 刺激を加えていない BMMs と比較し、RANKL 刺激により *Hhex* が減少した BMMs 並びに *Hhex* コンディショナルノックアウトマウスの BMMs では、免疫沈降された *Cdkn2a* 遺伝子座の上流 promoter および Exon1α 領域の DNA フラグメントのエンリッチメントが減少していた。このことから、*Hhex* の減少により *Cdkn2a* 遺伝子座の H3K27me3 が脱メチル化されることが示された。

Hhex が減少することで、*Cdkn2a* の発現が促進され、細胞増殖や細胞周期が活性化されることが予想されたが、実際に *Hhex*^{MxCre/-}マウスの BMMs の細胞増殖は抑制された(図23)。そして、フローサイトメトリーにより細胞周期分布を分析すると、BMMs における *Hhex* の欠失が、S 期の細胞の割合を減少させ、G1 期の細胞の割合を増加さ

せることが示された(図24)。

また、BMMs と破骨細胞の ChIP-seq の解析を行い、RANKL 刺激による破骨細胞分化に伴い *Cdkn2a* のシスエレメントでの H3K4me3 修飾には変化がないが H3K27me3 修飾が減少し、遺伝子発現が活性化される傾向にあることを明らかにした(図25)。そして実際に、*Cdkn2a* の mRNA 発現は破骨細胞分化に伴い増加していた(図26)。また、*Hhex* を過剰発現させた BMMs では、*Cdkn2a* の発現は減少し、逆に *Hhex* の発現が抑制された BMMs では *Cdkn2a* の発現は増加した(図27)。このことから、*Hhex* 発現の増減に伴い、*Cdkn2a* の発現は相反する挙動を示すことが明らかになった。これらは、RANKL 刺激による破骨細胞分化時に *Hhex* が減少し、*Cdkn2a* の発現が促進されるという仮説と矛盾しない結果であった。

そして実際に、*Hhex* 過剰発現 BMMs が *Cdkn2a* 発現の抑制を介して多核破骨細胞形成を阻害しているかを検証するために、ShRNA を用いて *Cdkn2a* をノックダウンした BMMs を作成し、RANKL 刺激による破骨細胞分化を試みたところ、*Cdkn2a* 発現が抑制された BMMs からの多核破骨細胞形成は著明に抑制された(図28、29)。これらの結果から、*Hhex* は *Cdkn2a* を下方制御することにより、BMMs の細胞周期進行を調節しており、RANKL による細胞周期停止と多核破骨細胞形成には *Hhex* のダウンレギュレーションが必要であると結論付けた。

Cdkn2a と骨との関係に関してはいくつかの報告がある。Farr らは、骨微小環境にお

ける *Cdkn2a* 発現老化細胞が加齢に伴う骨量減少に関与しており、*Cdkn2a* 発現細胞を除去することで骨量減少が改善されたことを報告している⁶⁷。Li らは、*Cdkn2a* ノックアウトマウスでは、卵巣摘出によって起こる骨量減少が、破骨細胞分化の抑制により軽減されたことを示した⁶⁸。さらに、*Hhex* の一塩基多型である rs2497306 は、血清 DHEAS レベルの調節によってヒトの老化と関連していた⁶⁹ ことを考えると、*Hhex*-*Cdkn2a* は加齢に伴う骨量減少に関与している可能性が示唆される。しかし、破骨細胞以外の骨関連細胞の *Hhex* と *Cdkn2a* の役割は不明であり、加齢に伴う骨量減少における *Hhex* の役割を解明するにはさらなる研究が必要である。

この研究にはいくつかの **limitation** がある。1 つ目は、細胞周期の調節が、RANKL によって誘導される破骨細胞の分化にどのように影響するか不明なことだ。細胞周期の停止自体は細胞分化には必ずしも必要ではないが、細胞周期停止と最終分化の間には一定の関連があることは広く知られている⁷⁰。また、哺乳類において、細胞周期は CDKs と CDKIs のバランスによって調節されており、細胞の最終分化は細胞周期からの不可逆的な逸脱と関連があると言われている⁷¹⁻⁷³。武藤らは、破骨細胞前駆細胞が骨表面に沿って細胞周期が停止した細胞であることを特定した⁴⁷。そして、Rahman らは、RANKL が破骨細胞分化の初期段階で BMMs の DNA 合成と細胞増殖を刺激し、分化後半に G1 期での細胞周期停止を引き起こすと報告した⁶⁵。したがって、*Hhex* を介した CDKIs の抑制は、*Hhex* が発現している破骨細胞分化初期段階では BMMs

の増殖を促進するのに対し、RANKL による *Hhex* のダウンレギュレーションが起こると細胞周期の停止を誘発している可能性がある。もちろん細胞周期の停止が破骨細胞の分化に影響を与えるメカニズムを特定するには、さらなる研究が必要と考えられる。

また、細胞周期の停止が多核破骨細胞形成にどのように関与しているのかの考察には、マクロファージの融合にインテグリンやカドヘリンを代表とした様々な接着分子を介した細胞接着が重要な因子であるという報告も無視できない⁷⁴。例えば、E-カドヘリンの細胞接着部位を阻害するペプチドを添加すると多核破骨細胞形成は減少する⁷⁵。また、インテグリンと複合体を形成するテトラスパニンスーパーファミリーである、CD9 や CD81 をノックアウトしたマウスでは、多核破骨細胞形成が亢進した⁷⁶。これらのことから、細胞接着因子が多核破骨細胞形成に大きく関わっていることが示唆される。現在までのところ、細胞周期進行中に接着複合体がどのように制御されるのか、また接着シグナルが細胞周期にどのように影響するのかについては解明されていない。しかし、これまでの研究から、細胞周期の進行が細胞接着シグナルを調整し、細胞接着の変化が細胞周期を制御するという、細胞周期と細胞接着のクロストークのメカニズムの存在が示唆されており⁷⁷、さらなる解明が期待される。

limitation の 2 つ目は、Cre の選択に関するものだ。Conventional な *Hhex* ノックアウトマウスは、胎生致死であることが知られている⁴⁰⁻⁴²。そこで、我々はまず Rank Cre を用いてコンディショナルノックアウトマウスを作製したが、発生に重要な細胞や組織で

Cre 遺伝子が発現するためなのか、残念ながらこのマウスも胎生致死であった。また、LysM Cre マウスでは、*Hhex* のノックアウト効率は不十分だった。そのため、主に Mx-1 Cre マウスを使用し、その結果を *Ctsk* Cre マウスで確認することにした。*Ctsk* Cre は破骨細胞ではない細胞も標的としているという報告があり、*Ctsk* は破骨細胞分化の初期でなく成熟期に多く発現していることから^{78 79}、この研究に用いるには適切な Cre ではないかもしれない。しかし、当科で以前に行った RNA-seq 解析により、RANKL 刺激前の BMMs でも *Ctsk* 遺伝子が発現していることがわかっており³⁷、破骨細胞分化の初期段階で *Hhex* 遺伝子をノックアウトするには十分だと考えられた。実際に、western blotting により、*Hhex*^{ΔOC/-}マウスの BMMs において HHEX 蛋白の発現が効率的に減少していることが確認できている(図17)。また、先行研究では、*Ctsk* Cre マウスを利用して、*Blimp-1* などの破骨細胞分化の初期段階で発現する遺伝子をノックアウトしている^{28,29}ことから *Ctsk* Cre を使用し実験を行った。

limitation の 3 つ目は、in vitro において *Hhex*^{MxCre/-}マウスと *Hhex*^{ΔOC/-}マウスの BMM の HHEX 蛋白は同程度に欠失したが(図13、17)、in vivo では *Hhex*^{ΔOC/-}マウスの有意な骨量減少は OVX を施さないと確認できず、*Hhex*^{MxCre/-}マウスと *Hhex*^{ΔOC/-}マウスの骨表現型が異なっていたことである。この差の正確な理由は不明だが、我々は生体内では in vitro と異なりすべての BMMs が成熟破骨細胞に分化するわけではないという in vitro と in vivo の環境の違いに起因しているのではないかと推測している。さらに、

Mx-1 Cre が他の因子に影響を与え、それが間接的に破骨細胞の分化に影響を与えている可能性も考えられた。

Mx-1 Cre が影響を与える他の因子の1つとして VEGF が挙げられる。Noy らは HHEX が *Vegf* 遺伝子とその受容体である *Vegfr-1* および *Vegfr-2* 遺伝子の promoter 領域に直接結合し、それらの転写を抑制することにより、VEGF-VEGF 受容体軸を制御していることを明らかにしている⁸⁰。そして、肺や心臓、副腎など多くの正常組織から発現することで知られる VEGF は、VEGFR-2 を介してマウスの骨髄の破骨細胞前駆細胞に作用して破骨細胞への分化を促進すると報告されている⁸¹。これらのことから、*Hhex*^{MxCre/-}マウスにおいて全身の細胞でノックアウトされた *Hhex* が VEGF-VEGFR シグナルを調節することで破骨細胞分化に影響を与えている可能性は否定できない。

また OVX に関しては、上記の通り、破骨細胞分化を促進し骨吸収の差を明瞭にすることを目的におこなったが^{44,45}、*Hhex*^{ΔOC/-}マウスが *Hhex*^{fl/fl} マウスと比較し OVX 後に骨量に有意な差が出たことに関しては考察が必要である。OVX によって引き起こされる骨量減少は、T 細胞や間質細胞を含む骨髄細胞による破骨細胞形成を促進するサイトカインの産生増加と関連しているという報告があり⁸²、*Hhex* のノックアウトが T 細胞や間質細胞に影響を与え、OVX 後の *Hhex*^{ΔOC/-}マウスの破骨細胞の分化や骨吸収を促進した可能性も否定できない。

加えて、今回の実験では *Hhex*^{MxCre/-}マウスの骨形態計測において骨形成パラメー

ターに有意な差がなかったため、骨芽細胞に対する *Hhex* ノックアウトによる影響は検討していない。既報でマウスの頭蓋冠由来骨芽細胞の分化段階における *Hhex* 発現に有意な差はみられなかった⁸³が、*Hhex* ノックアウトによる骨量低下に対する骨芽細胞や骨細胞の影響を完全には否定できないため、今後さらなる検討が必要と考える。

最後に、これまでの結果の臨床的意義を明確にする必要がある。上記のように、*Hhex* の *Cdkn2a* 制御機構は、細胞老化を調節することにより、加齢に伴う骨量減少に関与している可能性がある。興味深いことに、GWAS では、*HHEX* および *CDKN2A* 遺伝子の SNP と 2 型糖尿病との関連が報告されている^{84,85}。2型糖尿病の患者は骨粗鬆症性骨折のリスクが高いことが知られており、*HHEX* 遺伝子発現の変動がこれらの患者の骨脆弱性に関与している可能性が考えられる。そのため、臨床において2型糖尿病患者の *HHEX* 発現と骨塩密度との関係を調査することは、糖尿病患者の骨粗鬆症に対する新たな治療戦略につながる研究になり得る。

第 6 章 結論

本研究では、破骨細胞分化において、RANKL 刺激により H3K4me3 や H3K27me3 などのヒストン修飾が変化し、エピジェネティックな制御により発現が抑制される遺伝子のなかでホメオボックスファミリーに属する転写因子である *Hhex* を同定し、破骨細胞分化における機能解析を行った。そして、NFATc1 依存性に発現が抑制される *Hhex* が、*Cdkn2a* を介して細胞周期を調節することにより、RANKL が誘導する多核破骨細胞形成を負に調節することを示した。この研究は、骨粗鬆症によって誘発される骨量減少と骨折を抑制するための革新的な研究対象として、*Hhex* の重要性を提起した。

第 7 章 謝辞

本研究は 2018 年 4 月から 2020 年 3 月まで慶應大学医学部整形外科学教室で、2020 年 4 月から 2022 年 3 月までは東京大学大学院医学系研究科感覚・運動機能医学講座整形外科学教室第一研究室で行われた。

本研究にあたり、指導や支援を頂いた多くの方々に感謝致します。本研究の立案・遂行にあたり、東京大学大学院医学系研究科感覚・運動機能医学講座整形外科学教室教授 田中栄先生、前慶應義塾大学医学部整形外科学教室准教授・現熊本大学医学部整形外科学教室教授 宮本健史先生に多大なご指導を頂き深く感謝致します。また、本研究に対し的確な助言や実験方法指導をして頂いた東京大学大学院医学系研究科感覚・運動機能医学講座整形外科学教室准教授 齋藤琢先生、同教室講師 小俣康德先生 と 東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター臨床医工学部門助教 岡田寛之先生に感謝申し上げます。

研究室においてさまざまな支援を頂いた助手の杉田様、本間様、千々松様、佐藤様、小林様、谷川様と、多くの助言をしてくださった研究室の先生方、実験を支えてくださったすべての皆様に感謝しお礼を申し上げます。

最後に、本研究ならびに学業全般にわたって支援してくれた家族に深く感謝します。

第 8 章 参考文献

1. Yoshimura, N., *et al.* Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **27**, 620-628 (2009).
2. Qu, X., *et al.* Bone mineral density and all-cause, cardiovascular and stroke mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Cardiol* **166**, 385-393 (2013).
3. Seeman, E. & Delmas, P.D. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* **354**, 2250-2261 (2006).
4. Kanis, J.A. Treatment of osteoporotic fracture. *Lancet* **1**, 27-33 (1984).
5. Lorenzo, J., Horowitz, M. & Choi, Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocrine Reviews* **29**, 403-440 (2008).
6. Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature Reviews. Immunology* **7**, 292-304 (2007).
7. Khosla, S. & Hofbauer, L.C. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *The lancet. Diabetes & Endocrinology* **5**, 898-907 (2017).
8. Tanaka, S., Tanaka, Y., Ishiguro, N., Yamanaka, H. & Takeuchi, T. RANKL: A therapeutic target for bone destruction in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* **28**, 9-16 (2018).
9. Suda, T., *et al.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Reviews* **20**, 345-357 (1999).
10. Tanaka, S., Nakamura, K., Takahashi, N. & Suda, T. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system. *Immunological Reviews* **208**, 30-49 (2005).
11. Tanaka, S., *et al.* Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *The Journal of Clinical Investigation* **91**, 257-263 (1993).
12. Tanaka, S. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the RANKL/RANK/OPG system. *American Journal of Nephrology* **27**, 466-478 (2007).
13. Theill, L.E., Boyle, W.J. & Penninger, J.M. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annual Review of Immunology* **20**, 795-823 (2002).
14. Lazner, F., Gowen, M., Pavasovic, D. & Kola, I. Osteopetrosis and osteoporosis: two sides of the same coin. *Human Molecular Genetics* **8**, 1839-1846 (1999).
15. Okamoto, K., *et al.* Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. *Physiological Reviews* **97**, 1295-1349 (2017).
16. Takayanagi, H., *et al.* Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Developmental Cell* **3**, 889-

- 901 (2002).
17. Asagiri, M., *et al.* Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *The Journal of Experimental Medicine* **202**, 1261-1269 (2005).
 18. Nakashima, T., Hayashi, M. & Takayanagi, H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* **23**, 582-590 (2012).
 19. Lee, B.S., Gluck, S.L. & Holliday, L.S. Interaction between vacuolar H(+)-ATPase and microfilaments during osteoclast activation. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 29164-29171 (1999).
 20. Weinert, S., *et al.* Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H+-driven lysosomal Cl-accumulation. *Science* **328**, 1401-1403 (2010).
 21. Yagi, M., *et al.* DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *The Journal of Experimental Medicine* **202**, 345-351 (2005).
 22. 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. *Journal of Bone and Mineral Research* **27**, 1289-1297 (2012).
 23. Nakamura, H., *et al.* Global epigenomic analysis indicates protocadherin-7 activates osteoclastogenesis by promoting cell-cell fusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **455**, 305-311 (2014).
 24. Iwasawa, M., *et al.* The antiapoptotic protein Bcl-xL negatively regulates the bone-resorbing activity of osteoclasts in mice. *The Journal of Clinical Investigation* **119**, 3149-3159 (2009).
 25. Masuda, H., *et al.* Anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 regulates cell viability and bone-resorbing activity of osteoclasts. *Bone* **58**, 1-10 (2014).
 26. Akiyama, T., *et al.* Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *The EMBO Journal* **22**, 6653-6664 (2003).
 27. Zhao, B., *et al.* Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nature Medicine* **15**, 1066-1071 (2009).
 28. Miyauchi, Y., *et al.* The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis. *The Journal of Experimental Medicine* **207**, 751-762 (2010).
 29. Nishikawa, K., *et al.* Blimp1-mediated repression of negative regulators is required for osteoclast differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 3117-3122 (2010).
 30. Kim, K., *et al.* MafB negatively regulates RANKL-mediated osteoclast differentiation. *Blood* **109**, 3253-3259 (2007).
 31. Yasui, T., Hirose, J., Aburatani, H. & Tanaka, S. Epigenetic regulation of osteoclast differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1240**, 7-13 (2011).
 32. Yasui, T., *et al.* Epigenetic regulation of osteoclast differentiation: possible involvement of Jmjd3 in the histone demethylation of Nfatc1. *Journal of Bone and Mineral Research* **26**, 2665-2671

- (2011).
33. Howe, F.S., Fischl, H., Murray, S.C. & Mellor, J. Is H3K4me3 instructive for transcription activation? *BioEssays* **39**, 1-12 (2017).
 34. Roth, S.Y., Denu, J.M. & Allis, C.D. Histone acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* **70**, 81-120 (2001).
 35. Saksouk, N., Simboeck, E. & Déjardin, J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics & Chromatin* **8**, 3 (2015).
 36. Bernstein, B.E., *et al.* A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315-326 (2006).
 37. Izawa, N., *et al.* Cooperation of PU.1 With IRF8 and NFATc1 Defines Chromatin Landscapes During RANKL-Induced Osteoclastogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research* **34**, 1143-1154 (2019).
 38. Kurotaki, D., Yoshida, H. & Tamura, T. Epigenetic and transcriptional regulation of osteoclast differentiation. *Bone* **138**, 115471 (2020).
 39. Goldring, S.R. & Gravallese, E.M. Mechanisms of bone loss in inflammatory arthritis: diagnosis and therapeutic implications. *Arthritis Research* **2**, 33-37 (2000).
 40. Keng, V.W., *et al.* Homeobox gene Hex is essential for onset of mouse embryonic liver development and differentiation of the monocyte lineage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **276**, 1155-1161 (2000).
 41. Martinez Barbera, J.P., *et al.* The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* **127**, 2433-2445 (2000).
 42. Hallaq, H., *et al.* A null mutation of Hhex results in abnormal cardiac development, defective vasculogenesis and elevated Vegfa levels. *Development* **131**, 5197-5209 (2004).
 43. Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M. & Rajewsky, K. Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**, 1427-1429 (1995).
 44. Weitzmann, M.N. & Pacifici, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *The Journal of Clinical Investigation* **116**, 1186-1194 (2006).
 45. Sun, L., *et al.* FSH directly regulates bone mass. *Cell* **125**, 247-260 (2006).
 46. Mizoguchi, T., *et al.* Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *The Journal of Cell Biology* **184**, 541-554 (2009).
 47. Muto, A., *et al.* Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. *Journal of Bone and Mineral Research* **26**, 2978-2990 (2011).
 48. Shields, B.J., *et al.* Acute myeloid leukemia requires Hhex to enable PRC2-mediated epigenetic repression of Cdkn2a. *Genes & Development* **30**, 78-91 (2016).
 49. Guiral, M., Bess, K., Goodwin, G. & Jayaraman, P.S. PRH represses transcription in hematopoietic cells by at least two independent mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 2961-2970 (2001).

50. Kasamatsu, S., *et al.* Identification of the transactivating region of the homeodomain protein, hex. *Journal of Biochemistry* **135**, 217-223 (2004).
51. Soufi, A. & Jayaraman, P.S. PRH/Hex: an oligomeric transcription factor and multifunctional regulator of cell fate. *The Biochemical Journal* **412**, 399-413 (2008).
52. Bedford, F.K., Ashworth, A., Enver, T. & Wiedemann, L.M. HEX: a novel homeobox gene expressed during haematopoiesis and conserved between mouse and human. *Nucleic Acids Research* **21**, 1245-1249 (1993).
53. Crompton, M.R., *et al.* Identification of a novel vertebrate homeobox gene expressed in haematopoietic cells. *Nucleic Acids Research* **20**, 5661-5667 (1992).
54. Manfioletti, G., *et al.* Differential expression of a novel proline-rich homeobox gene (Prh) in human hematolymphopoietic cells. *Blood* **85**, 1237-1245 (1995).
55. Jayaraman, P.S., Frampton, J. & Goodwin, G. The homeodomain protein PRH influences the differentiation of haematopoietic cells. *Leukemia Research* **24**, 1023-1031 (2000).
56. Jackson, J.T., *et al.* A crucial role for the homeodomain transcription factor Hhex in lymphopoiesis. *Blood* **125**, 803-814 (2015).
57. Goodings, C., *et al.* Hhex is Required at Multiple Stages of Adult Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Differentiation. *Stem Cells* **33**, 2628-2641 (2015).
58. Jackson, J.T., *et al.* Hhex Regulates Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Stress Hematopoiesis via Repression of Cdkn2a. *Stem cells* **35**, 1948-1957 (2017).
59. Bogue, C.W., Zhang, P.X., McGrath, J., Jacobs, H.C. & Fuleihan, R.L. Impaired B cell development and function in mice with a targeted disruption of the homeobox gene Hex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 556-561 (2003).
60. Guo, Y., *et al.* The homeoprotein Hex is required for hemangioblast differentiation. *Blood* **102**, 2428-2435 (2003).
61. Okahashi, N., *et al.* Osteoclast differentiation is associated with transient upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1). *Journal of Cellular Biochemistry* **80**, 339-345 (2001).
62. Sankar, U., Patel, K., Rosol, T.J. & Ostrowski, M.C. RANKL coordinates cell cycle withdrawal and differentiation in osteoclasts through the cyclin-dependent kinase inhibitors p27KIP1 and p21CIP1. *Journal of Bone and Mineral Research* **19**, 1339-1348 (2004).
63. Kwon, M., *et al.* Synchronized Cell Cycle Arrest Promotes Osteoclast Differentiation. *International Journal of Molecular Sciences* **17**(2016).
64. Ogasawara, T., *et al.* Osteoclast differentiation by RANKL requires NF-kappaB-mediated downregulation of cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6). *Journal of Bone and Mineral Research* **19**, 1128-1136 (2004).
65. Motiur Rahman, M., *et al.* Proliferation-coupled osteoclast differentiation by RANKL: Cell

- density as a determinant of osteoclast formation. *Bone* **81**, 392-399 (2015).
66. George, A., Morse, H.C., 3rd & Justice, M.J. The homeobox gene Hex induces T-cell-derived lymphomas when overexpressed in hematopoietic precursor cells. *Oncogene* **22**, 6764-6773 (2003).
 67. Farr, J.N., *et al.* Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nature Medicine* **23**, 1072-1079 (2017).
 68. Li, J., Karim, M.A., Che, H., Geng, Q. & Miao, D. Deletion of p16 prevents estrogen deficiency-induced osteoporosis by inhibiting oxidative stress and osteocyte senescence. *American journal of Translational Research* **12**, 672-683 (2020).
 69. Zhai, G., *et al.* Eight common genetic variants associated with serum DHEAS levels suggest a key role in ageing mechanisms. *PLoS genetics* **7**, e1002025 (2011).
 70. Myster, D.L. & Duronio, R.J. To differentiate or not to differentiate? *Current Biology* **10**, R302-304 (2000).
 71. Buttitta, L.A. & Edgar, B.A. Mechanisms controlling cell cycle exit upon terminal differentiation. *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 697-704 (2007).
 72. Sherr, C.J. & Roberts, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development* **13**, 1501-1512 (1999).
 73. Aliprantis, A.O., *et al.* NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *The Journal of Clinical Investigation* **118**, 3775-3789 (2008).
 74. Helming, L. & Gordon, S. Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends in Cell Biology* **19**, 514-522 (2009).
 75. Mbalaviele, G., Chen, H., Boyce, B.F., Mundy, G.R. & Yoneda, T. The role of cadherin in the generation of multinucleated osteoclasts from mononuclear precursors in murine marrow. *The Journal of Clinical Investigation* **95**, 2757-2765 (1995).
 76. Takeda, Y., *et al.* Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *The Journal of Cell Biology* **161**, 945-956 (2003).
 77. Jones, M.C., Zha, J. & Humphries, M.J. Connections between the cell cycle, cell adhesion and the cytoskeleton. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **374**, 20180227 (2019).
 78. Winkeler, C.L., Kladney, R.D., Maggi, L.B., Jr. & Weber, J.D. Cathepsin K-Cre causes unexpected germline deletion of genes in mice. *PLoS One* **7**, e42005 (2012).
 79. Ruiz, P., *et al.* CathepsinKCre mediated deletion of β catenin results in dramatic loss of bone mass by targeting both osteoclasts and osteoblastic cells. *Scientific Reports* **6**, 36201 (2016).
 80. Noy, P., Williams, H., Sawasichai, A., Gaston, K. & Jayaraman, P.S. PRH/Hhex controls cell survival through coordinate transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor signaling. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 2120-2134 (2010).

81. Yang, Q., *et al.* VEGF enhancement of osteoclast survival and bone resorption involves VEGF receptor-2 signaling and beta3-integrin. *Journal of the International Society for Matrix Biology* **27**, 589-599 (2008).
82. Li, J.Y., *et al.* Ovariectomy disregulates osteoblast and osteoclast formation through the T-cell receptor CD40 ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 768-773 (2011).
83. Khayal, L.A., *et al.* Transcriptional profiling of murine osteoblast differentiation based on RNA-seq expression analyses. *Bone* **113**, 29-40 (2018).
84. Miyake, K., *et al.* Construction of a prediction model for type 2 diabetes mellitus in the Japanese population based on 11 genes with strong evidence of the association. *Journal of Human Genetics* **54**, 236-241 (2009).
85. Saxena, R., *et al.* Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* **316**, 1331-1336 (2007).