

博士論文

破骨細胞分化・機能を制御する遺伝子の解析

中村伸哉

目次

要旨	4 頁
第 1 章 序文	5 頁
第 2 章 方法	10 頁
2-1. 実験試薬	
2-2. 実験動物	
2-3. 破骨細胞培養、染色	
2-4. ChIP-seq	
2-5. RNA-seq	
2-6. 骨密度計測、骨形態計測	
2-7. 骨吸収能アッセイ (Pit formation assay)	
2-8. 破骨細胞生存能アッセイ (Survival assay)	
2-9. リアルタイム PCR	
2-10. Western blotting	
2-11. データ解析	

第3章 結果

16 頁

3-1. 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、かつ、

Nfatc1 によって誘導される遺伝子群の同定

3-2. 33 の遺伝子群からの 1 遺伝子の選択

3-3. 破骨細胞分化における *Cadm1* のエピジェネティックな制御と

mRNA 発現変化

3-4. *Cadm1* KO マウスの解析

3-5. *Cadm1* 欠損による破骨細胞接着関連遺伝子への影響

3-6. *Cadm1* 欠損による骨芽細胞への影響

第4章 考察

39 頁

第5章 結論

45 頁

第6章 謝辞

46 頁

第7章 参考文献

47 頁

要旨

破骨細胞分化過程において、H3K4me3, H3K27me3 の変化によるエピジェネティックな制御を受け、かつ、NFATc1 に誘導される遺伝子を同定することで、破骨細胞分化において重要と考える遺伝子を抽出し、その中の細胞膜、細胞接着に関連する遺伝子、*Cadm1* (*cell adhesion molecule 1*) に関して、破骨細胞における分化・機能の解析を行った。

Cadm1 はアクチンリングの形成に関与する FAK (focal adhesion kinase) , Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2) というタンパクを介して破骨細胞の分化・機能抑制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1章 序文

骨は骨芽細胞による骨形成、破骨細胞による骨吸収のバランスが保たれることにより、形態や機能などの恒常性が維持されている。そのバランスが何らかの原因により破綻した場合、骨組織に様々な病的状態を引き起こす。例えば高齢者の骨粗鬆症においては、一般的に骨吸収・骨形成の双方が亢進しているが、相対的に骨吸収量が骨形成量を上回るために骨量減少を来し、それが原因となって骨折や変性につながる。急速な高齢化に伴い、日本の骨粗鬆症患者数は増加しつつあり、現在 1300 万人程度であると推測されている (1)。骨粗鬆症に伴う脆弱性骨折に対する治療費用や介護費用は莫大であり、医療経済的観点からも骨粗鬆症の治療・脆弱性骨折の予防は極めて重要である。骨粗鬆症治療薬としては、ビスホスホネート (bisphosphonates : BP)、選択的エストロゲン受容体モジュレーター (selective estrogen receptor modulators : SERM) などの骨吸収抑制薬が中心であった。その骨密度増加効果、脆弱性骨折リスク低下効果は臨床試験により証明され、多大な恩恵をもたらしているが、BP では骨吸収・骨形成の双方を抑制することによると考えられる顎骨壊死や大腿骨非定型骨折といった合併症が、SERM ではエストロゲン受容体に作用することによる静脈血栓症といった重篤な合併症が報告されている。破骨細胞の分化・活性化のより詳細な

メカニズムを解明することは、新たな治療法の開発につながりうる重要な研究であると考えられる。

破骨細胞は骨髄由来の単球系細胞が分化・融合して形成される、単球・マクロファージ系の多核巨細胞である (2)。破骨細胞の分化・活性化に必要な不可欠なシグナルとして RANKL-RANK 系シグナルが知られている (3)。RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B) は TNF (tumor necrosis factor) 受容体ファミリーに属する膜タンパクであり、破骨細胞分化過程において単核の破骨細胞前駆細胞の時点から発現している。また、そのリガンドである RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) は TNF ファミリーに属する膜結合型サイトカインであり、骨芽細胞や骨髄間質細胞において、活性型ビタミン D3、プロスタグランジン E2、副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone : PTH) などにより誘導される。RANKL-RANK 系シグナルの破骨細胞分化における重要性は、RANK および RANKL のノックアウトマウスが破骨細胞欠損による骨吸収不全に起因する大理石骨病を呈することからも明らかである (4)。RANKL-RANK 系シグナルによって誘導される転写因子の中で破骨細胞分化のマスター転写因子として知られているのが NFATc1 (nuclear factor of activated T cells 1) である。Takayanagi らは、骨髄細胞由来マクロファージ (bone marrow-derived macrophages : BMMs) に対する M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) および RANKL 刺激後の

transcriptome 変化の解析から、NFATc1 の破骨細胞分化における重要性を示した (5)。NFATc1 は AP-1 (activator protein 1) やカルシウムシグナルによって誘導され、CTSK (Cathepsin K) や ACP5 (acid phosphatase 5, tartrate resistant) といった破骨細胞特異的遺伝子を誘導するとともに、自らの発現を誘導 (auto-amplification) することが知られている (6)。

近年ビッグデータ解析の技術進歩とともに、胚性幹細胞などにおけるエピジェネティックな分化制御機構の解明が進んできた。エピジェネティックな分化制御とは、クロマチンへの後天的な修飾により DNA の配列変化を伴うことなく遺伝子発現が制御される現象で、その後天的な修飾にはアセチル化、メチル化、リン酸化などが含まれる (7)。ヒストン H3 の 4 番目のリジンと 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3, H3K27me3) に関しては、H3K4me3 が転写亢進、H3K27me3 は転写抑制に寄与することが報告されている。胚性幹細胞 (embryonic stem cell) を用いた研究から、細胞が未分化な段階では H3K4 と H3K27 の双方のトリメチル化修飾 (bivalent domain) により転写が抑制されているが、細胞分化に伴い H3K27me3 が脱メチル化され、H3K4 のトリメチル化修飾のみ (monovalent domain) になり転写が誘導される遺伝子は細胞分化に重要な役割を果たすことが示された (8)。

破骨細胞におけるエピジェネティックな分化制御機構に関してもいくつかの

報告がある。Yasui らは *Jumonji domain-containing 3 (Jmjd3)* による H3K27me3 の脱メチル化が破骨細胞分化に重要な役割をもつことを報告した (9)。Nakamura らは破骨細胞の分化過程で bivalent domain から monovalent domain に変化する遺伝子群から注目した *protocadherin-7 (Pcdh7)* に関して、破骨細胞の融合・多核化において重要であることを報告した (10)。クロマチンは開かれた状態 (open chromatin) になることで、その部位への転写因子の結合が可能となるため、open chromatin 領域は転写制御に重要な役割を果たす。Open chromatin 領域を網羅的に同定する方法として、DNase-seq (DNase I hypersensitive sites sequencing) と FAIRE-seq (Formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements sequencing) が知られている。前者は chromatin が open になっている部位では DNase I による分解が起こりやすいということを利用し、DNase I によって分解されない closed chromatin 領域を抽出する手法である (11)。一方、後者は chromatin 構造をホルムアルデヒドで架橋した後、超音波で DNA を断片化し、フェノール・クロロホルム抽出を行うことで open chromatin 領域を直接抽出する手法である (12)。

Inoue らは DNase-seq により open chromatin 領域へ結合しうる転写因子を motif 解析で同定し、それらの転写因子をノックダウンすると破骨細胞分化が抑制されることを示した (13)。Omata らは FAIRE-seq により破骨細胞分化マーカー遺伝子周囲における open chromatin 領域の FAIRE シグナルが TGF- β 刺激によって

促進されることを明らかにした (14)。DNA のメチル化はゲノムインプリンティングや X 染色体の不活化などに関与しており、正常発生に必須である。DNA のメチル化を担うものとして Dnmt1 (DNA methyltransferase 1) , Dnmt3a, Dnmt3b が知られており、Dnmt1 は主にメチル化の維持に、Dnmt3a, Dnmt3b は *de novo* なメチル化の生成に関わると言われている (15)。Nishikawa らは RNA-seq から破骨細胞の分化過程で Dnmt3a の発現が上昇すること、破骨細胞特異的 Dnmt3a ノックアウトマウスが骨量増加を示すことから、Dnmt3a による DNA のメチル化が破骨細胞分化を制御していることを示し、さらに破骨細胞分化を抑制することが知られている Irf8 (interferon regulatory factor-8) (16)が Dnmt3a によって制御されることを示した (17)。しかしながら、破骨細胞におけるエピジェネティックな分化制御機構は未だに解明されていないことが山積している。

本研究の目的は、破骨細胞分化において、H3K4me3, H3K27me3 に関して 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で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、また、そのうちの 1 遺伝子に関して破骨細胞の分化・機能の解析をすることである。

第2章 方法

2-1. 実験試薬

培養に用いた Alpha-minimum essential medium (α -MEM) および fetal bovine serum (FBS) は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) から、M-CSF は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) から、RANKL はオリエンタル酵母工業株式会社 (滋賀県、日本) から、FK506 は Astellas Pharma US, Inc. (Deerfield, IL, USA) から購入した。

ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation sequencing) に用いた抗 trimethyl-histone H3 lysine 4 抗体は Active Motif (Carlsbad, CA, USA) から、抗 trimethyl-histone H3 lysine 27 抗体は Millipore (Billerica, MA, USA) から購入した。抗 Nfatc1 抗体は東京大学先端科学技術研究センター血管生物学分野南研究室より供与頂いた。

Western blotting に用いた、抗 FAK (focal adhesion kinase) 抗体、抗 Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2) 抗体および抗 Src 抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) から購入した。

2-2. 実験動物

C57BL/6 系統の野生型マウス (WT マウス) は三協ラボサービス株式会社 (東

京都、日本)より購入した。C57BL/6 系統の *Cadm1* ノックアウトマウス (*Cadm1*^{-/-} マウス) は国際医療福祉大学桃井隆教授 (現東京医科大学病態生理 女子栄養大学研究所客員教授) より供与頂き、東京大学医学部附属病院南研究棟屋上整形外科動物実験飼育室にて維持した。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。

2-3. 破骨細胞培養、染色

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、100 ng/ml M-CSF および 10%FBS 含有 α -MEM で 2 日間培養し、M-CSF 依存性の接着細胞を BMMs として回収した。その BMMs をさらに、M-CSF を 10 ng/ml、RANKL を 100 ng/ml 添加した 10%FBS 含有 α -MEM で 3~5 日間培養することで破骨細胞 (osteoclasts : OCs) を得た。

破骨細胞を識別するために、3.7%ホルマリンで固定後、アセトンとエタノールの混合液 (1:1) を加え、pH 5.0 の酒石酸存在下に、N, N-dimethyl formamide、naphthol AS-MX phosphate (Sigma-Aldrich) を加え、Fast red violet LB salt (Sigma-Aldrich) で染色 (TRAP 染色) し、TRAP 陽性で 3 核以上の多核細胞を破骨細胞と判断した。

アクチンリングの形成評価のために、3.7%ホルマリンで固定後、ローダミン
ファロイジンにて染色した。

2-4. ChIP-seq

細胞を formaldehyde で固定、glycine で中和、回収し、超音波破碎の後、8 °C,
15000rpm で 10 分遠心分離、上清を回収した。各抗体とともに protein A/G beads
とともに incubate し、免疫沈降物を DNA の脱クロスリンク後、PCR purification kit
(Qiagen GmbH, Hilden, Germany) にて精製した。cBot Cluster Generation system、
Genome Analyzer Iix system (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて、シーケン
スした。

2-5. 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) にてライブラリーを作成、Genome Analyzer Iix
system (Illumina) にて、シーケンスした。

2-6. 骨密度計測、骨形態計測

8 週齢の雄マウスに体重 1 kg あたり 10 mg のカルセインを sacrifice の 4 日前、

1 日前の 2 回、皮下注射した後、sacrifice した。後肢を採取し、70%エタノールで固定し、DCS-600R system (Aloka 社、東京都、日本) を用いて骨密度を測定した。その後、後肢を非脱灰のまま glycol methacrylate に包埋し 3 μm の厚さにスライスした標本を作製、トルイジンブルーおよび TRAP 染色を行い、OsteoMeasure (OsteoMetrics, Decatur, GA, USA) を用いて骨形態計測した。

2-7. 骨吸収能アッセイ (Pit formation assay)

dentin 切片上で M-CSF+RANKL 刺激にて破骨細胞を 4 日間培養した後、トルイジンブルー染色で骨吸収窩を同定した。

2-8. 破骨細胞生存能アッセイ (Survival assay)

分化後の破骨細胞の培養液より M-CSF および RANKL を除去し、それを time 0 とし、そこから数時間経過ごとに TRAP 染色を行い、破骨細胞数を計測し、time 0 の破骨細胞数で除した値を生存率とした。

2-9. リアルタイム PCR

RNeasy mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) で mRNA 抽出を行い、Prime Script RT reagent kit (タカラバイオ株式会社、滋賀県、日本) で逆転写を行い、

cDNA を得た。SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ株式会社)、Thermal Cycler Dice Real-Time System を用いて、リアルタイム PCR を行った。すべて triplicate で行い、*β-actin* 発現で標準化した。プライマー配列は以下のように設計した。

β-actin forward, 5'-TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3';

β-actin reverse, 5'-AAGAAGGAAGGCTGGAAAAGAG-3';

Cadm1 forward, 5'-GAAGGACAGCAGGTTTCAGC-3';

Cadm1 reverse, 5'-TCAACTGCCGTGTCTTTCTG-3';

Nfatc1 forward, 5'-CAAGTCTCACCACAGGGCTCACTA-3';

Nfatc1 reverse, 5'-GCGTGAGAGGTTTCATTCTCCAAGT-3';

Ctsk forward, 5'-GGACCCATCTCTGTGTCCAT-3';

Ctsk reverse, 5'-CCGAGCCAAGAGAGCATATC-3';

Dc-stamp forward, 5'-TCCTCCATGAACAAACAGTTCCAA-3';

Dc-stamp reverse, 5'-AGACGTGGTTTtaggaatgcagctc-3';

Acp5 forward, 5'-CCATTGTTAGCCACATA-3';

Acp5 reverse, 5'-TCAGATCCATAGTGAAACCGCAAG-3';

Rankl forward, 5'-CAATGGCTGGCTTGGTTTCATAG-3';

Rankl reverse, 5'-CTGAACCAGACATGACAGCAGCTGGA-3';

Opg forward, 5'-GACCACAATGAACAAGTGGCTGT-3';

Opg reverse, 5'-CCAGTTTCTGGGTCATAATGCAA-3'.

2-10. Western blotting

RIPA buffer (1% Tween20, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.25 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF (Sigma-Aldrich)) を用いて、タンパクを回収した。SDS-PAGE にて、PVDF メンブレンに転写し、ブロッキングの後、各抗体で incubate、HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Promega, Madison, WI, USA) で incubate した。バンドは ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) にて発光、検出した。

2-11. データ解析

データは平均値±SD で表示した。2 群間の有意差検定には Student の T 検定を用い、p 値 0.05 未満を有意とした。

第3章 結果

3-1. 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、かつ、Nfatc1 によって誘導される遺伝子群の同定

転写開始点 (transcription start site : TSS) 周囲 (5 kbp 以内) において、BMMs の段階では H3K4me3, H3K27me3 両者のピークを有する bivalent domain を形成し、OCs に分化するとともに H3K4me3 単独ピークの monovalent domain を形成する遺伝子で、RNA-seq の結果から OCs における遺伝子発現が高いものとして 49 遺伝子に絞り込んだ。さらに OCs の段階で TSS 周囲に Nfatc1 の結合があるものという条件により、33 の候補遺伝子に絞り込んだ (表 1)。それら候補遺伝子の中には auto-amplification することが知られている *Nfatc1* 自身 (6) および破骨細胞の酸産生における重要性が既に報告されている *Carbonic anhydrase 2* (*Car2*) (18) などが含まれており、ChIP-seq の結果、および絞り込み手法の妥当性が確認された (図 1A, B)。

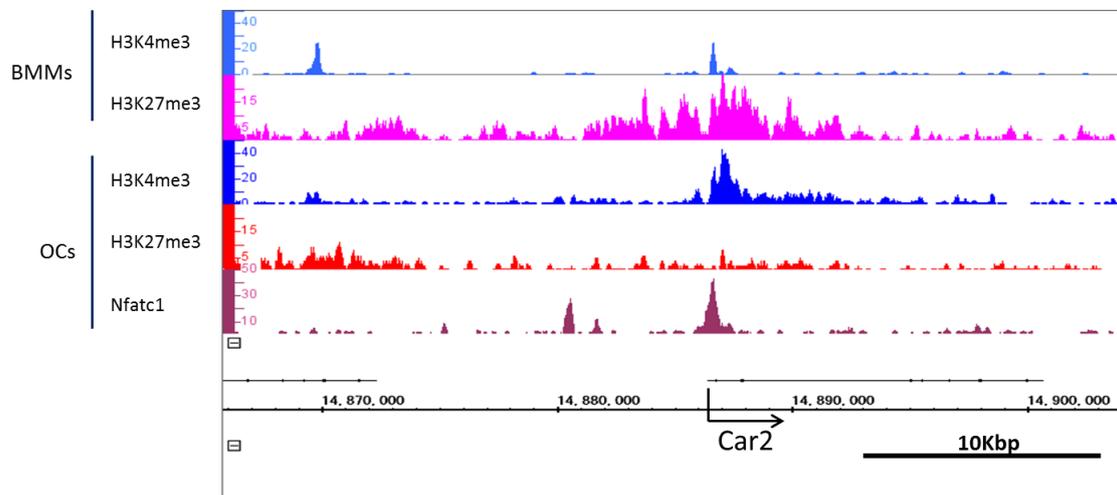
表 1

破骨細胞分化において転写開始点 (TSS) 周囲で、**bivalent domain** から **monovalent domain** に変化し、かつ、破骨細胞において **Nfatc1** の結合がある、33 の遺伝子群

<i>4930506M07Rik</i>	<i>D10Bwg1379e</i>	<i>Rab34</i>
<i>Adcy3</i>	<i>Edil3</i>	<i>Rab38</i>
<i>Arhgef12</i>	<i>Fbxo32</i>	<i>Rnd1</i>
<i>Atrn1</i>	<i>Lgals3</i>	<i>Rps6ka2</i>
<i>Bahd1</i>	<i>Met</i>	<i>Rusc2</i>
<i>Cadm1</i>	<i>Msi2</i>	<i>Sdc1</i>
<i>Car2</i>	<i>Myo1d</i>	<i>Sh3bgrl2</i>
<i>Cd109</i>	<i>Nfatc1</i>	<i>Tmcc3</i>
<i>Cd97</i>	<i>Plxna2</i>	<i>Tspan17</i>
<i>Cdyl2</i>	<i>Plxnd1</i>	<i>Vegfa</i>
<i>Cgnl1</i>	<i>Ppap2a</i>	<i>Zfp462</i>

図 1

A



B

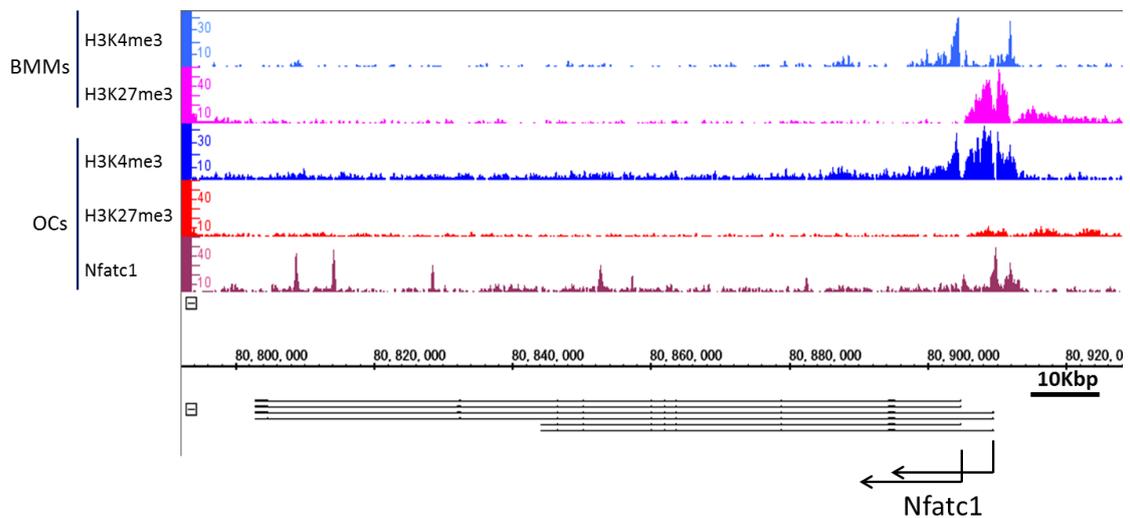


図 1. 破骨細胞分化過程における Car2, Nfatc1 周囲での ChIP-seq 結果

Car2(A)および Nfatc1(B)の転写開始点 (TSS) 周囲での骨髄細胞由来マクロファージ (BMMs)、破骨細胞 (OCs) における H3K4me3, H3K27me3 修飾変化と OCs における Nfatc1 結合。

3-2. 33 の遺伝子群からの 1 遺伝子の選択

33 の遺伝子群に関して、DAVID ツールを用いて gene ontology 解析を行った (表 2)。破骨細胞は分化過程では細胞同士が接着・融合することで成熟していき、骨吸収の際にも骨に破骨細胞が接着することが必須であり、破骨細胞の分化・機能には接着・融合といった因子が重要な役割を果たすことが知られている。gene ontology 解析の結果、細胞膜関連の遺伝子が多く含まれていた。

本研究ではそれら細胞膜関連遺伝子、細胞接着関連遺伝子の中で、*cell adhesion molecule1* (*Cadm1*) に注目した。*Cadm1* は当初、肺非小細胞癌の癌抑制遺伝子として同定され、*tumor-suppressor in lung cancer-1* (*TSLC1*) と名付けられた遺伝子である (19)。その後、様々な分野でその機能が解明され、*immunoglobulin superfamily 4* (*IGSF4*)、*Nectin like molecules 2* (*NECL2*)、*synapse cell adhesion molecule-1* (*SYNCAM1*)、*spermatogenic immunoglobulin superfamily* (*sgIGSF*) といった多数の別名を有する (20)。BioGPS により公表されているマウスの各組織における *Cadm1* の発現は図 2 の通りであり、肺、脳神経系、マクロファージ系などの臓器に比較的限局して発現していた。

Cadm1 は、臨床的には自閉症のファミリー内でミスセンス変異があること (21)、外側基底膜に存在し、細胞間接着を介して形態維持、癌の転移制御などに関与していること (20)などが報告されている。ノックアウトマウスも作成され

ており、*Cadm1*^{-/-}マウスは情動の障害を示すこと (22)、精子形成の障害に伴い雄が不妊を示すこと (23)が報告されている。しかしこれまで骨組織における *Cadm1* の役割は明らかになっていない。本研究では *Cadm1* の破骨細胞に関する機能解析を行うこととした。

表 2

33 遺伝子 (表 1) の gene ontology 解析

$P < 0.1$ の Term を P 値が小さいものから列挙した。Cadm1 に下線を引いて示した。

Term	Count	%	P Value	Genes
semaphorin receptor complex	2	6.9	0.014	<i>Plxna2, Plxnd1</i>
cell surface	5	17.24	0.015	<i>Cd109, Lgals3, Met, Sdc1, Vegfa</i>
extracellular exosome	10	34.48	0.016	<i>Arhgef12, <u>Cadm1</u>, Car2, Edil3, Lgals3, Myo1d, Rab34, Rusc2, Sdc1, Sh3bgrl2</i>
basolateral plasma membrane	3	10.34	0.033	<i><u>Cadm1</u>, Car2, Myo1d</i>
membrane	17	58.62	0.041	<i>Adcy3, Arhgef12, Atrnl1, <u>Cadm1</u>, Car2, Cd109, Lgals3, Met, Plxna2, Plxnd1, Rab34, Rab38, Rnd1, Sdc1, Tmcc3, Tspan17, Vegfa</i>
plasma membrane	11	37.93	0.043	<i>Adcy3, Atrnl1, <u>Cadm1</u>, Car2, Cd109, Met, Plxna2, Plxnd1, Rab38, Rnd1, Vegfa</i>
phagocytic vesicle	2	6.9	0.057	<i>Rab34, Rab38</i>
cytoplasmic vesicle	4	13.79	0.062	<i>Myo1d, Rab34, Rab38, Rusc2</i>
myosin complex	2	6.9	0.074	<i>Cgnl1, Myo1d</i>
cytoplasm	15	51.72	0.087	<i>Adcy3, Arhgef12, Car2, Fbxo32, Lgals3, Met, Msi2, Nfatc1, Rab34, Rab38, Rnd1, Rps6ka2, Rusc2, Sdc1, Vegfa</i>
axon	3	10.34	0.096	<i><u>Cadm1</u>, Car2, Myo1d</i>

図 2

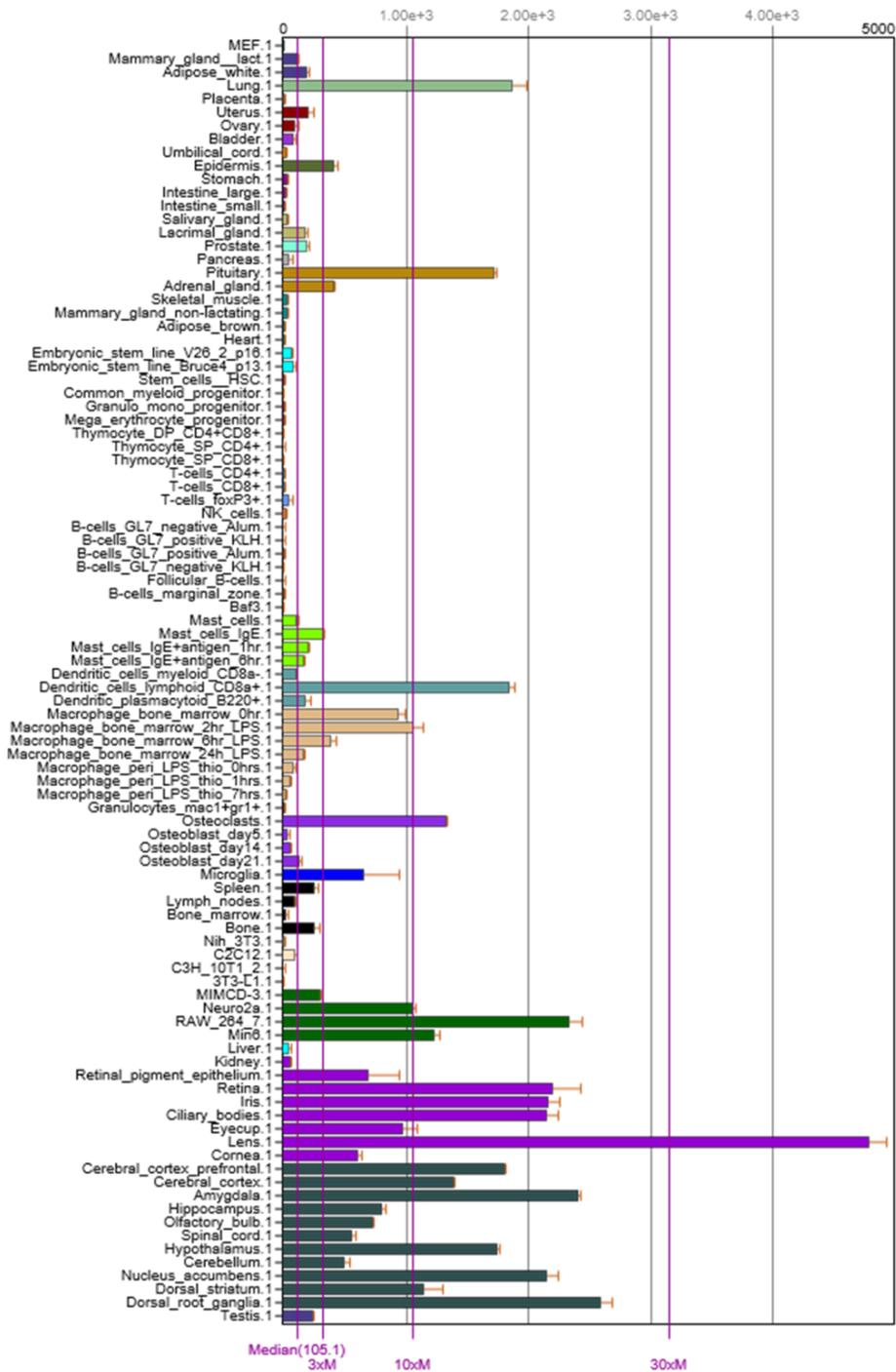


図 2. Cadm1 のマウス各組織における発現

BioGPS による、Cadm1 のマウス各組織における発現。組織特異性がみられた。

3-3. 破骨細胞分化における *Cadm1* のエピジェネティックな制御と mRNA 発現変化

破骨細胞分化における *Cadm1* 遺伝子の転写開始点周囲での H3K4me3, H3K27me3 変化および Nfatc1 の結合は、図3のようであった。*Cadm1* の mRNA 発現は、分化マーカーである *Ctsk* が上昇するのに伴い、3~4 倍程度の上昇がみられた (図4)。破骨細胞分化過程で FK506 (カルシニューリン、Nfat 阻害剤) を加えると、その mRNA 発現上昇は抑制された (図5)。

図3

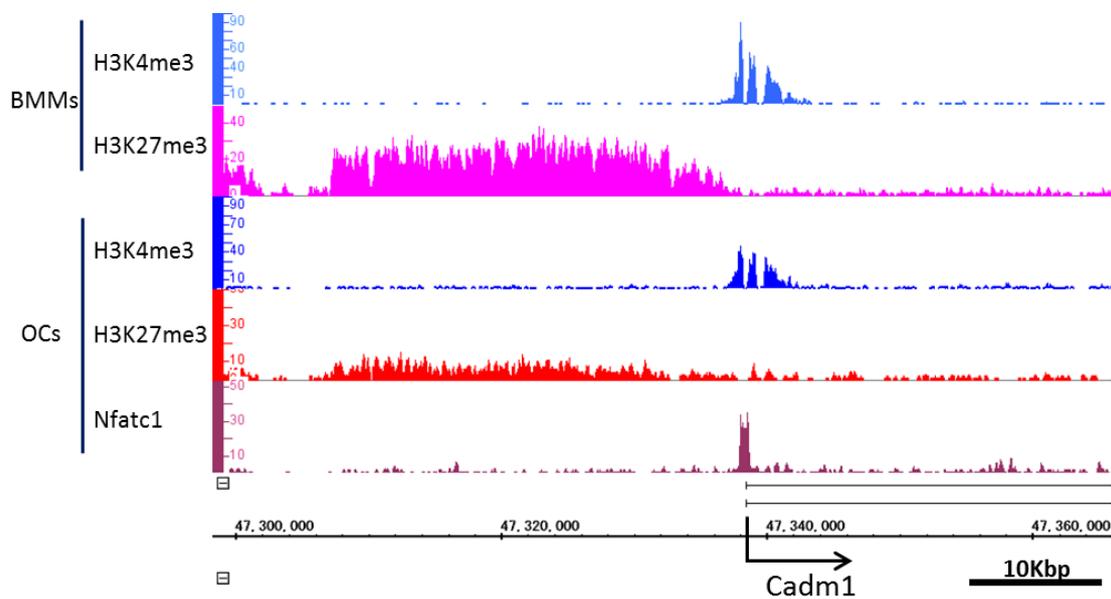
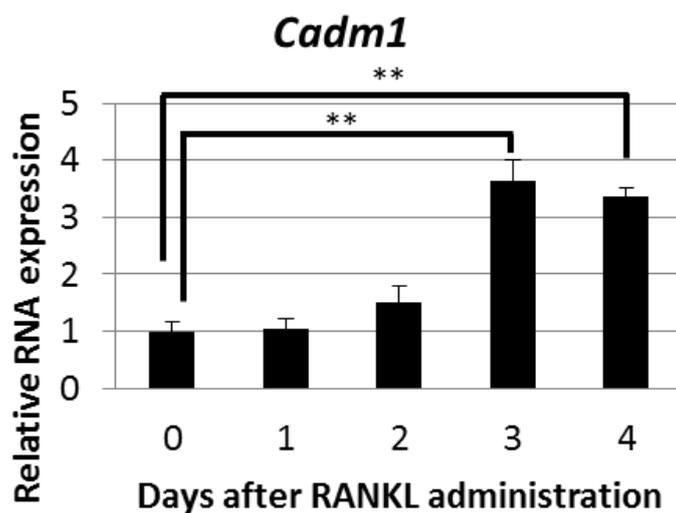


図3. 破骨細胞分化過程における *Cadm1* 周囲での ChIP-seq 結果

Cadm1 の TSS 周囲での BMMs、OCs における H3K4me3, H3K27me3 修飾変化と OCs における Nfatc1 結合。

図 4

A



B

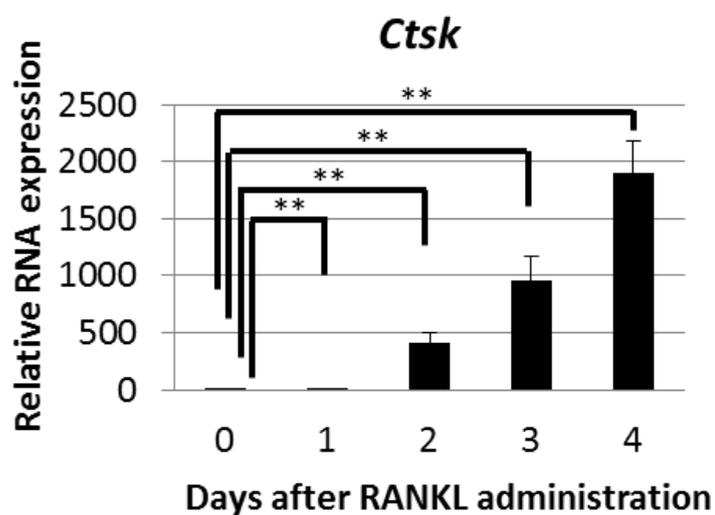


図 4. 破骨細胞分化における *Cadm1* および *Ctsk* の mRNA 発現変化

リアルタイム PCR による、WT マウスの骨髄細胞の破骨細胞培養系における *Cadm1*(A), *Ctsk*(B) の mRNA 発現変化 (**, $P < 0.01$; $n = 3$)。

破骨細胞分化過程で、*Ctsk* 上昇とともに、*Cadm1* の発現も上昇がみられた。

図 5

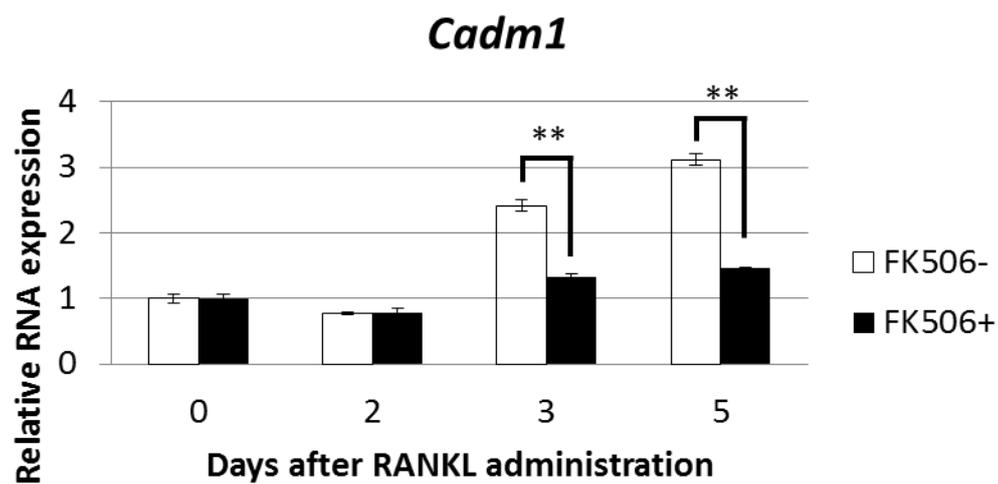


図 5. 破骨細胞分化における FK506 の効果

リアルタイム PCR による、WT マウスの骨髄細胞の破骨細胞培養系における *Cadm1* の mRNA 発現変化に対する FK506 投与の効果 (**, $P < 0.01$; $n = 3$)。FK506 投与により破骨細胞分化に伴う *Cadm1* 発現上昇は抑制された。

3-4. *Cadm1* KO マウスの解析

雄 8 週齢の WT マウスと *Cadm1*^{-/-} マウスそれぞれ 5 匹ずつの大腿骨骨密度を測定すると、*Cadm1*^{-/-} マウスで骨密度の有意な低下がみられた (図 6)。骨組織切片をトルイジンブルー染色、TRAP 染色し、骨形態計測を行った (図 7A, B)。*Cadm1*^{-/-} マウスで、単位骨量 (bone volume per total volume : BV/TV) が有意差はないものの低下傾向を示し ($p=0.050$)、骨梁数 (trabecular number : Tb.N) は有意な低下が、骨梁間隙 (trabecular separation : Tb.Sp) は有意な上昇がみられた。これらの結果から、*Cadm1* が骨恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。一方で、骨吸収に関わるパラメーターは、吸収面 (eroded surface per bone surface : ES/BS)、破骨細胞面 (osteoclast surface per bone surface : Oc.S/BS)、破骨細胞数 (osteoclast number per bone surface : N.Oc/BS) に関して有意差がなく、骨形成に関わるパラメーターも、骨芽細胞面 (osteoblast surface per bone surface : Ob.S/BS)、石灰化面 (mineralizing surface per bone surface : MS/BS)、骨形成率 (bone formation rate per bone surface : BFR/BS) に関して有意差がなかった (図 7A, B)。

図 6

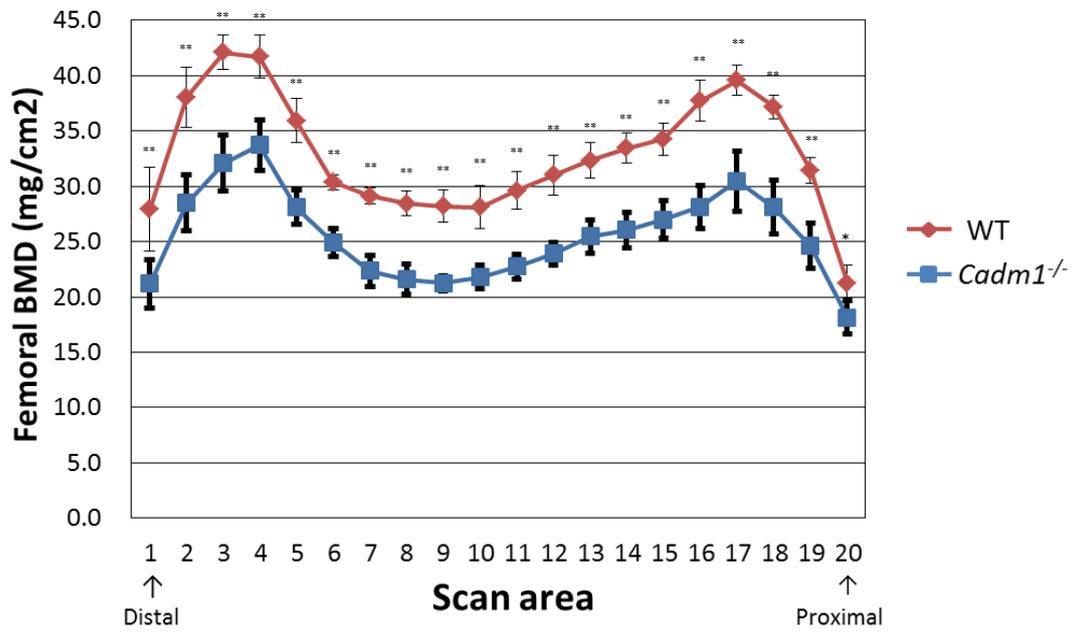


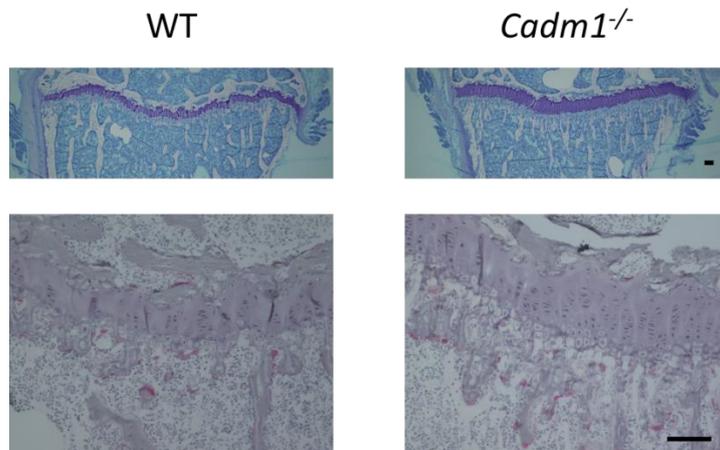
図 6. WT マウスおよび *Cadm1*^{-/-}マウスの大腿骨骨密度

8 週齢の雄 WT マウスおよび *Cadm1*^{-/-}マウスの大腿骨骨密度 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; $n = 5$)。

Cadm1^{-/-}マウスが有意な骨密度低下を示した。

図 7

A



B

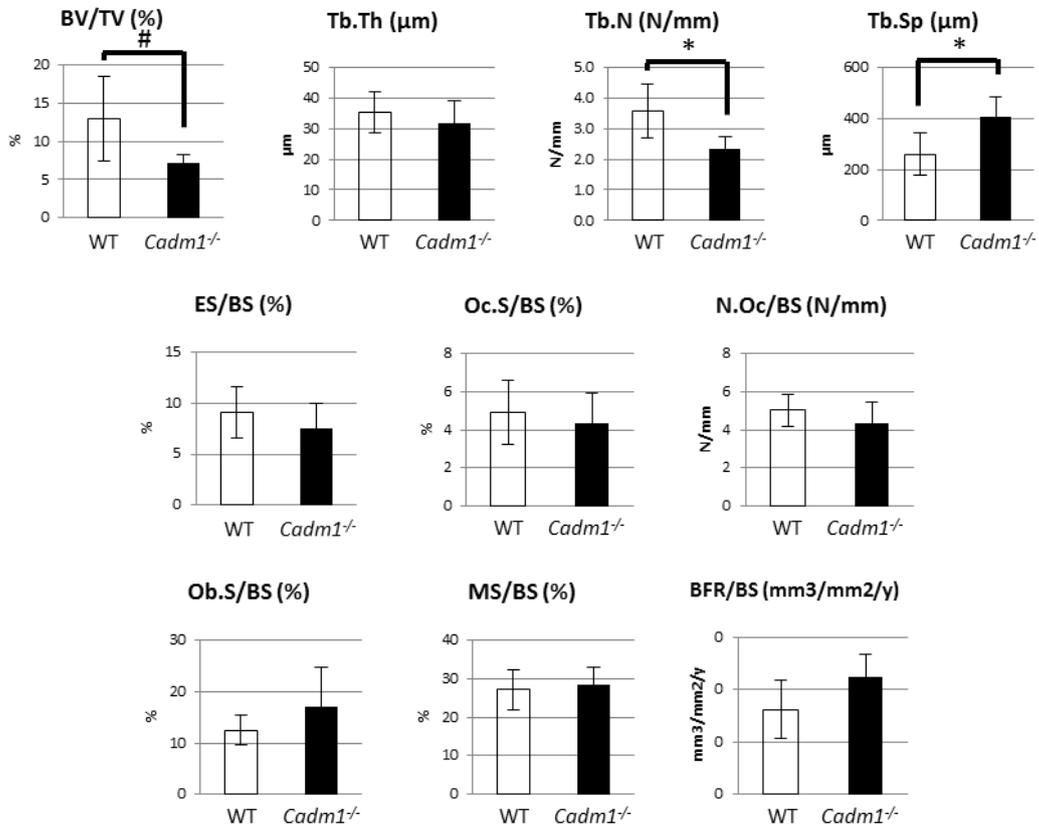


図 7. WT マウスおよび *Cadm1*^{-/-}マウスの骨組織像および骨形態計測

(A) 8 週齢の雄 WT マウス (左) および *Cadm1*^{-/-}マウス (右) の脛骨近位部の骨組織像のトルイジンブルー染色 (上) と TRAP 染色 (下) (Bars, 100 μm)。

(B) 8 週齢の雄 WT マウス (左) および *Cadm1*^{-/-}マウス (右) の脛骨近位部骨形態計測 (#, $P < 0.1$; *, $P < 0.05$; $n = 5$)。

BV/TV (bone volume per total volume : 単位骨量)、Tb.Th (trabecular thickness : 骨梁幅)、Tb.N (trabecular number : 骨梁数)、Tb.Sp (trabecular separation : 骨梁間隙)、ES/BS (eroded surface per bone surface : 吸収面)、Oc.S/BS (osteoclast surface per bone surface : 破骨細胞面)、N.Oc/BS (osteoclast number per bone surface : 破骨細胞数)、Ob.S/BS (osteoblast surface per bone surface : 骨芽細胞面)、MS/BS (mineralizing surface per bone surface : 石灰化面)、BFR/BS (bone formation rate per bone surface : 骨形成率)。

Cadm1^{-/-}マウスが単位骨量の低下傾向、骨梁数の有意な低下、骨梁間隙の有意な上昇を示した。

次に *Cadm1*^{-/-}マウスにおける骨密度低下に破骨細胞が関与している可能性を検討するために、WT マウスと *Cadm1*^{-/-}マウスそれぞれから採取した骨髄細胞を用い、破骨細胞分化誘導を行い、TRAP 染色で破骨細胞の形成 (図 8)、リアルタイム PCR で破骨細胞分化マーカー (図 9)、survival assay で破骨細胞生存能 (図 10)、Pit formation assay で骨吸収能 (図 11) を評価した。WT 破骨細胞と *Cadm1* 欠損破骨細胞で破骨細胞形成には有意差がなかった (図 8)。しかしながら、*Nfatc1*, *Ctsk*, *Dc-stamp*, *Acp5* といった破骨細胞分化マーカーは、その差はわずかではあるものの、*Cadm1* 欠損破骨細胞で有意に上昇した (図 9)。survival assay においても、その差はわずかではあったが、*Cadm1* 欠損破骨細胞で生存能の上昇がみられた (図 10)。Pit formation assay においては、*Cadm1* 欠損破骨細胞で骨吸収能の上昇がみられた (図 11)。以上の結果から、*Cadm1* が破骨細胞分化・機能に関して負の制御を行っていることが示唆された。

図 8

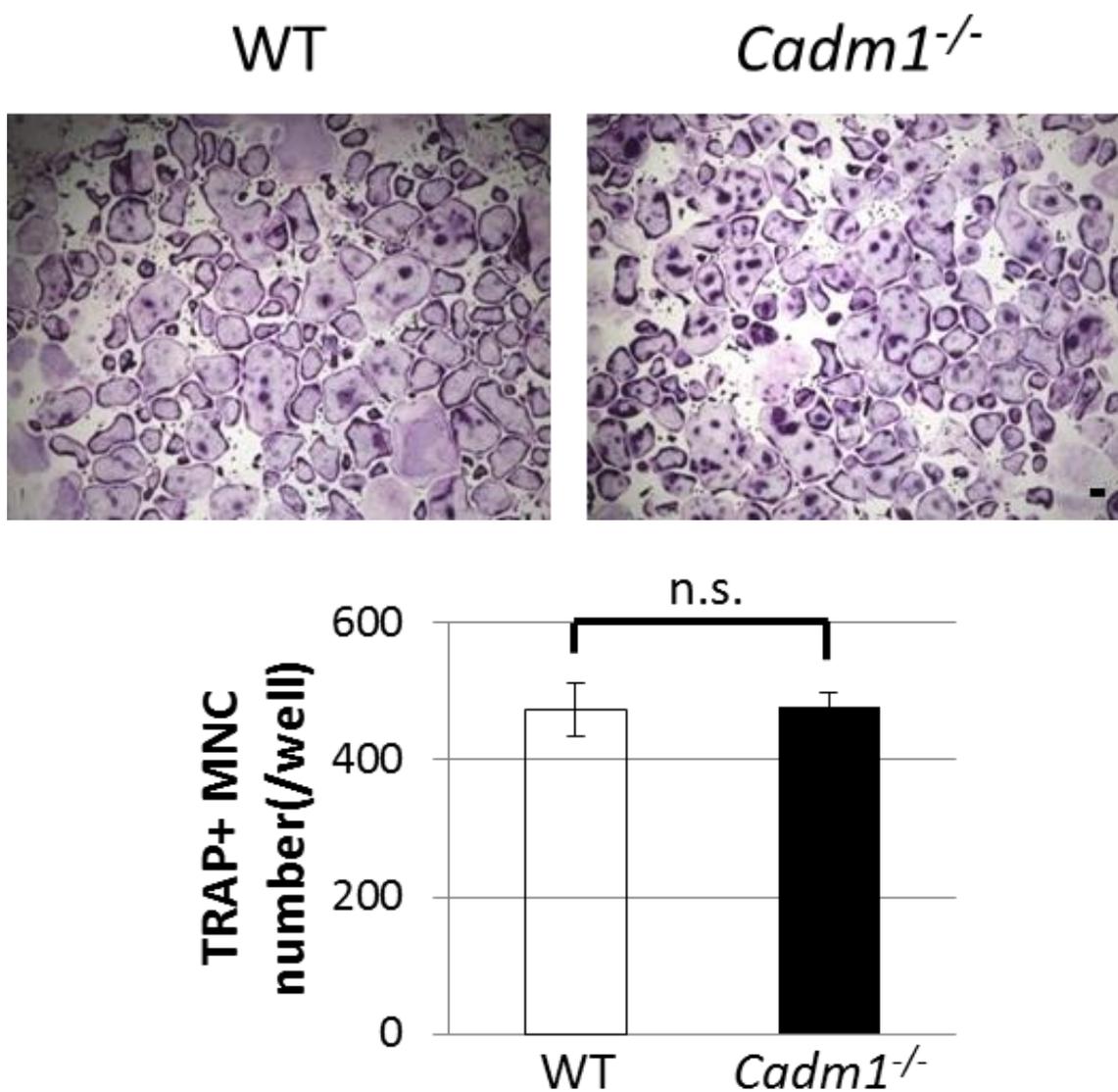


図 8. WT 破骨細胞および *Cadm1*^{-/-}破骨細胞の破骨細胞形成

WT マウス (左) および *Cadm1*^{-/-}マウス (右) 由来の骨髄細胞からの破骨細胞系において、M-CSF+RANKL 刺激後 4 日の細胞を TRAP 染色し、破骨細胞を同定した (上、Bar,100 μ m)。TRAP 陽性で 3 核以上の多核細胞 (multi-nucleated cell : MNC) を破骨細胞とし、96well plate 内の破骨細胞数を計測した (下、n.s., not significant; $n = 3$)。

破骨細胞形成に有意差はなかった。

図 9

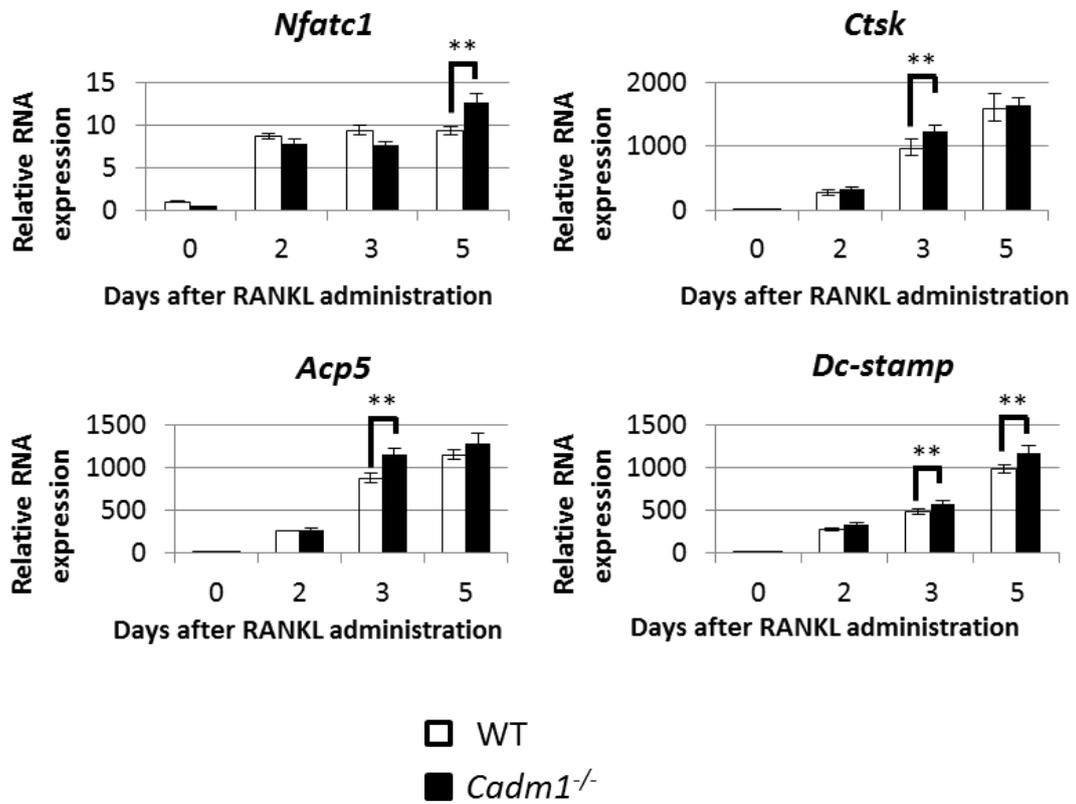


図 9. WT 破骨細胞および *Cadm1*^{-/-} 破骨細胞の破骨細胞分化マーカー発現

リアルタイム PCR による、WT 破骨細胞および *Cadm1*^{-/-} 破骨細胞の破骨細胞分化マーカー発現変化 (**, $P < 0.01$; $n = 3$)。

Cadm1^{-/-} 破骨細胞で、破骨細胞分化マーカーの有意な発現上昇がみられた。

図 10

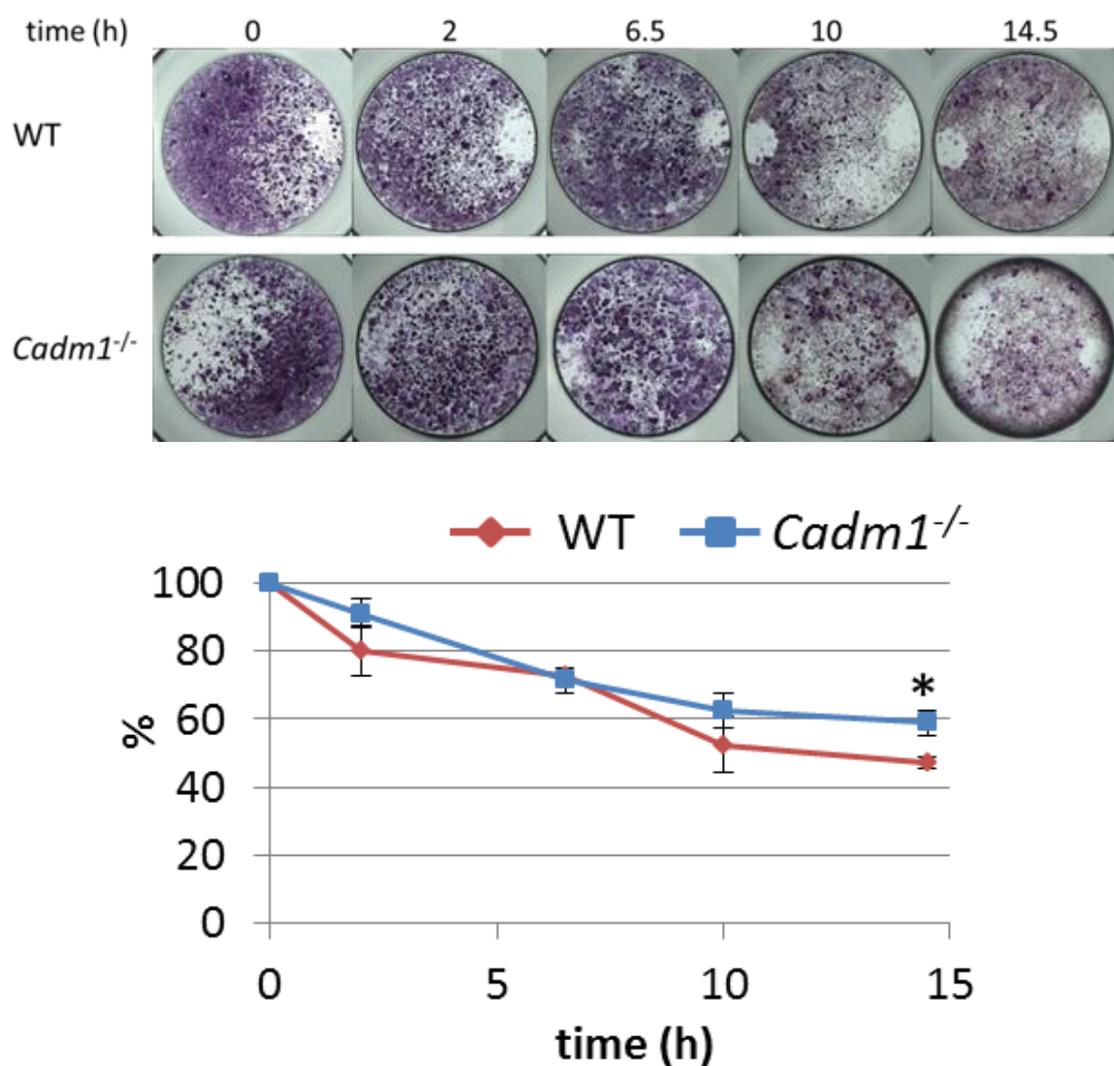


図 10. WT 破骨細胞および *Cadm1*^{-/-}破骨細胞の生存能

M-CSF+RANKL 刺激 4 日間で得られた、WT 破骨細胞および *Cadm1*^{-/-}破骨細胞の培養液から M-CSF+RANKL を除去し、各時間経過後の TRAP 染色像 (上)。各時間の TRAP 陽性、多核の破骨細胞数を time 0 のもので除した値を生存率 (%) とし、生存率の時間変化をプロットした (下、*, $P < 0.05$; $n = 4$)。

Cadm1^{-/-}破骨細胞で有意な生存率上昇がみられた。

図 11

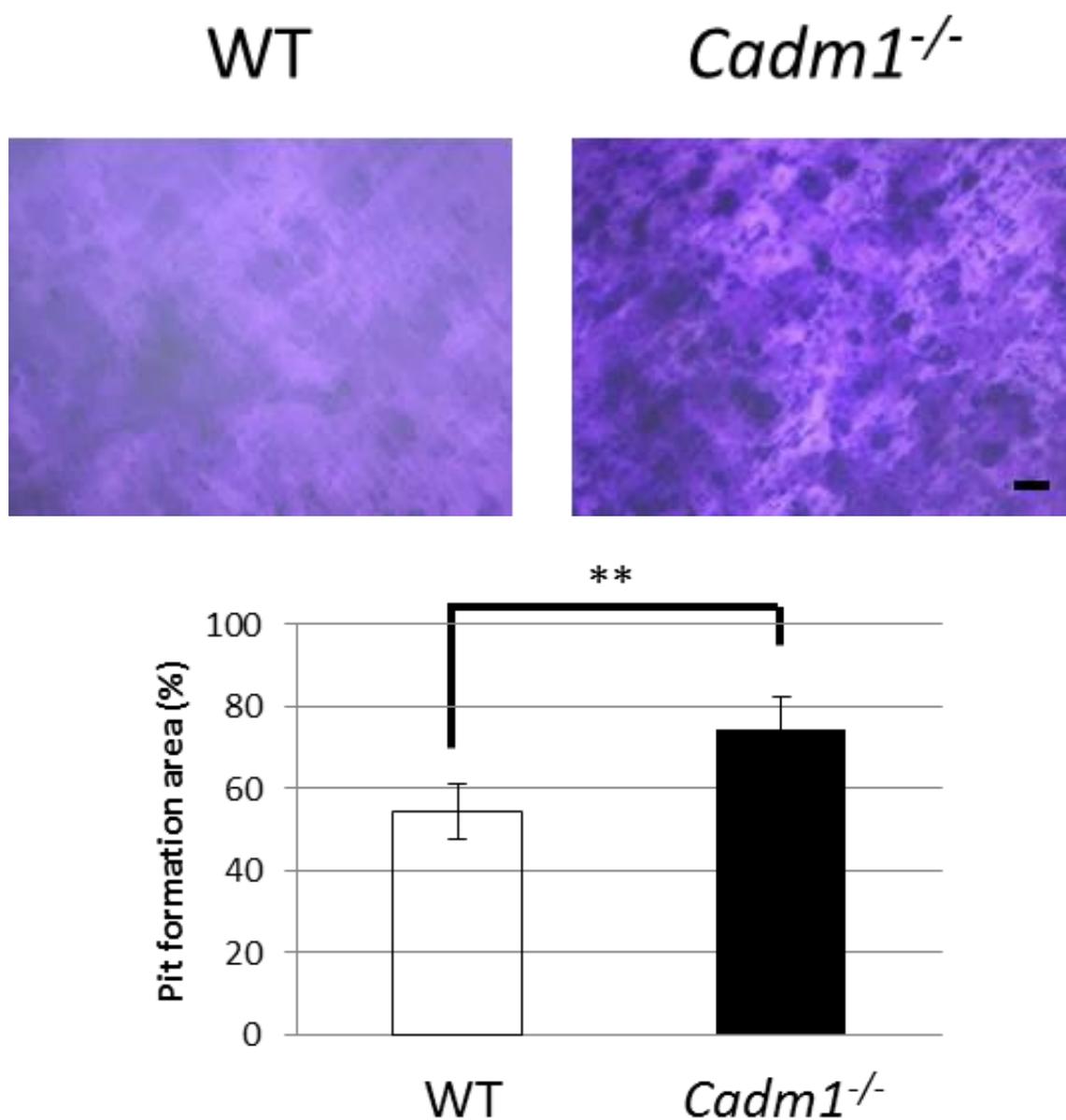


図 11. WT 破骨細胞および *Cadm1*^{-/-}破骨細胞の骨吸収能

dentin スライス上で WT 破骨細胞（左）および *Cadm1*^{-/-}破骨細胞（右）を M-CSF+RANKL 刺激にて 4 日間培養した後、トルイジンブルー染色で骨吸収窩を同定した（上、Bar,100 μ m）。骨吸収窩面積の割合を骨吸収能の指標とした（下、**, $P < 0.01$; $n = 6$ ）。

Cadm1^{-/-}破骨細胞で有意な骨吸収能上昇がみられた。

3-5. *Cadm1* 欠損による破骨細胞接着関連遺伝子への影響

Cadm1 が破骨細胞分化・機能に関して負の制御を行っていることが示唆され、特に *Cadm1* 欠損破骨細胞で骨吸収の上昇が顕著であったことから、破骨細胞が骨吸収する際に重要なアクチンリングの形成を評価したが、WT 破骨細胞と *Cadm1* 欠損破骨細胞でその差は明らかではなかった (図 12)。しかしながら、アクチン染色による本検討は、定量的な評価には適さないため、さらなる分子メカニズムの評価のために Western blotting にてアクチンリングの形成に関わる分子のタンパク発現変化を評価した。アクチンリングの形成に関わる分子として、FAK, Pyk2, c-Src が知られており、Integrin $\alpha V\beta 3$ からのシグナルがそれらの分子を活性化し、骨吸収において重要な役割を果たすといわれている (24)。また、*Cadm1* は別名の NECL2 (Nectin like molecules 2) が示す通り Nectin 様の免疫グロブリンであるが、Nectin からのシグナルは c-Src を活性化することが知られている (25)。そこで、Western blotting にて FAK, Pyk2, Src のタンパク発現を評価したところ、Src は WT 破骨細胞と *Cadm1* 欠損破骨細胞で差がみられなかったが、FAK, Pyk2 は *Cadm1* 欠損破骨細胞で上昇がみられた (図 13)。また、FAK, Pyk2 のリン酸化タンパクの発現上昇も確認された (未発表)。このことから、*Cadm1* が FAK, Pyk2 の活性化を抑制していることが示唆された。

図 12

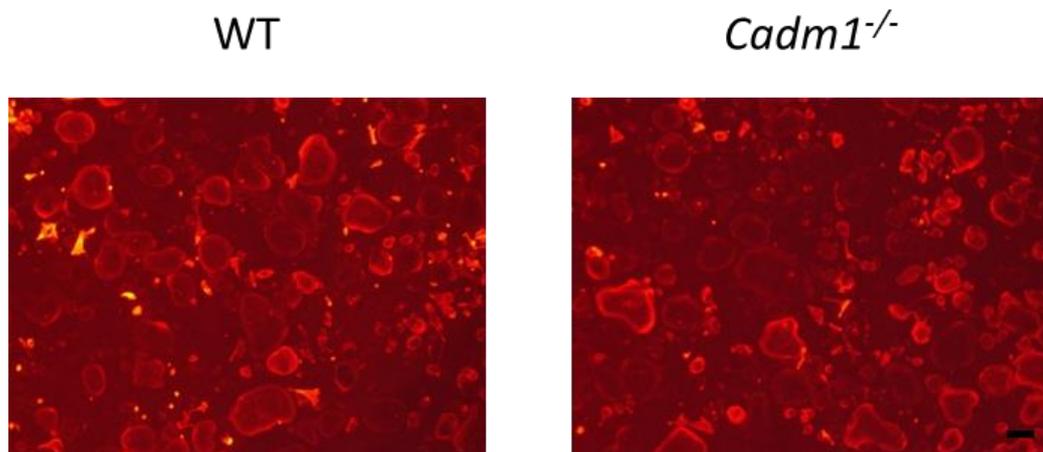


図 12. WT 破骨細胞および *Cadm1*^{-/-}破骨細胞のアクチンリング形成

WT 破骨細胞（左）および *Cadm1*^{-/-}破骨細胞（右）をローダミンファロイジンにて染色した(Bar,100 μ m)。

アクチンリングの形成に明らかな差はなかった。

図 13

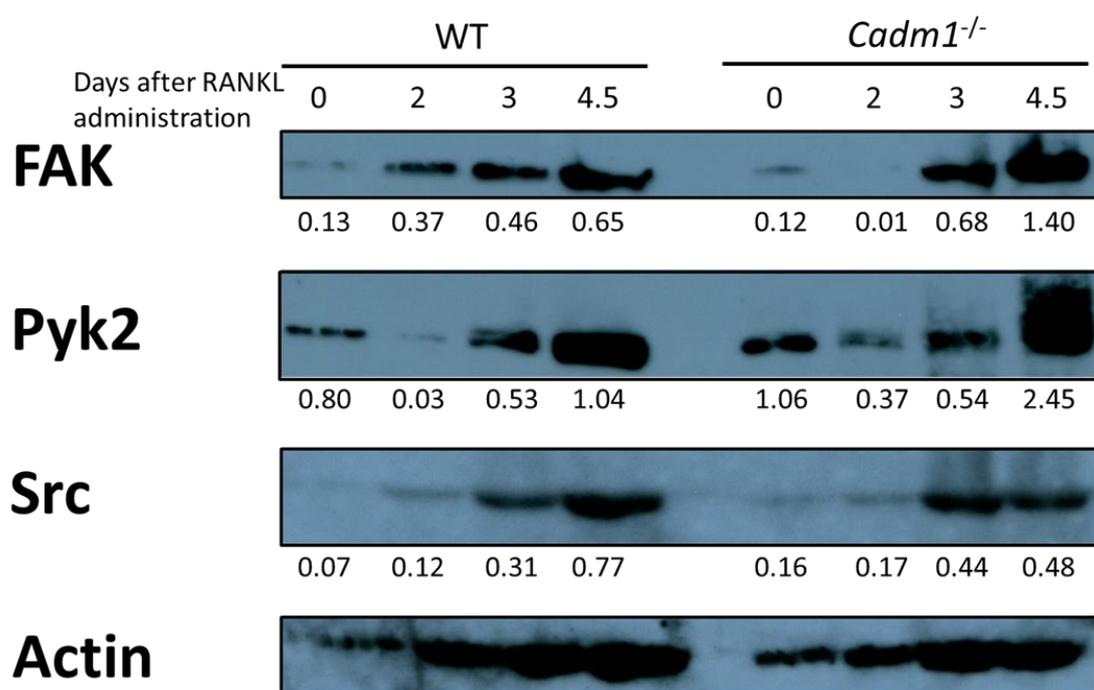


図 13. WT 破骨細胞および *Cadm1*^{-/-}破骨細胞のタンパク発現

WT 破骨細胞 (左) および *Cadm1*^{-/-}破骨細胞 (右) の分化過程において、FAK, Pyk2, Src というアクチンリングの形成に関与するタンパクの発現を Western blotting にて評価した。アクチンを内部コントロールとして、densitometry にて発現濃度を数値化し、下に表記した。

Cadm1^{-/-}破骨細胞において、FAK, Pyk2 のタンパク発現上昇が示唆された。

3-6. *Cadm1* 欠損による骨芽細胞への影響

骨の恒常性維持には破骨細胞と骨芽細胞のカップリング機構が重要である。骨芽細胞に発現した RANKL が破骨細胞の RANK に作用することで破骨細胞の分化を誘導する一方で、骨芽細胞から分泌されるオステオプロテジェリン (osteoprotegerin : OPG) は RANK 同様、TNF 受容体ファミリーに属するタンパクで、RANKL への結合性を示し、RANK の結合を競合的に阻害し、破骨細胞の分化を抑制する方向に働く (3)。つまり、破骨細胞の分化は骨芽細胞における RANKL と OPG の発現のバランスによって調節されていると言える。そこで、WT マウスと *Cadm1*^{-/-}マウスの新生仔頭蓋冠より分離した骨芽細胞に対して、Vit D3 を添加し、RANKL 発現を誘導し、*RANKL*, *OPG* の mRNA 発現を評価した (図 14)。結果、*Cadm1* 欠損骨芽細胞で、*Opg* 発現低下による *Rankl/Opg* 比の有意な上昇がみられた。一方で、骨芽細胞分化マーカーである *Runx2* 発現には有意差はみられず (図 15)、骨芽細胞機能の異常は示唆されなかった。

図 14

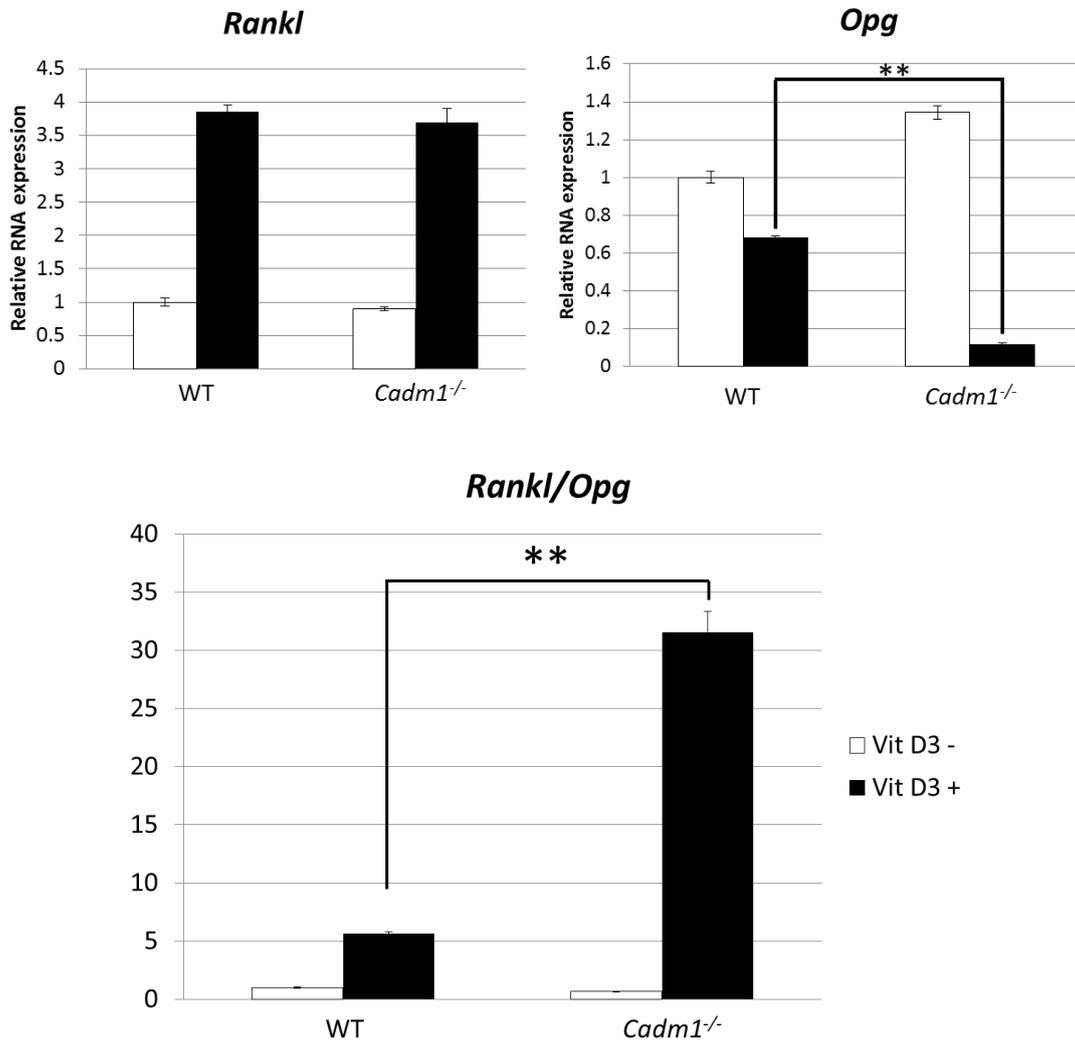


図 14. WT 骨芽細胞および *Cadm1*^{-/-}骨芽細胞の *Rankl*, *Opg* 発現および *Rankl/Opg* 比

リアルタイム PCR による WT 骨芽細胞および *Cadm1*^{-/-}骨芽細胞の Vit D3 刺激に対する *Rankl*, *Opg* の mRNA 発現変化 (上)、および *Rankl/Opg* 変化 (下) (**, $P < 0.01$; $n = 3$)。

Cadm1^{-/-}骨芽細胞で *Opg* 発現低下による、*Rankl/Opg* の有意な上昇がみられた。

図 15

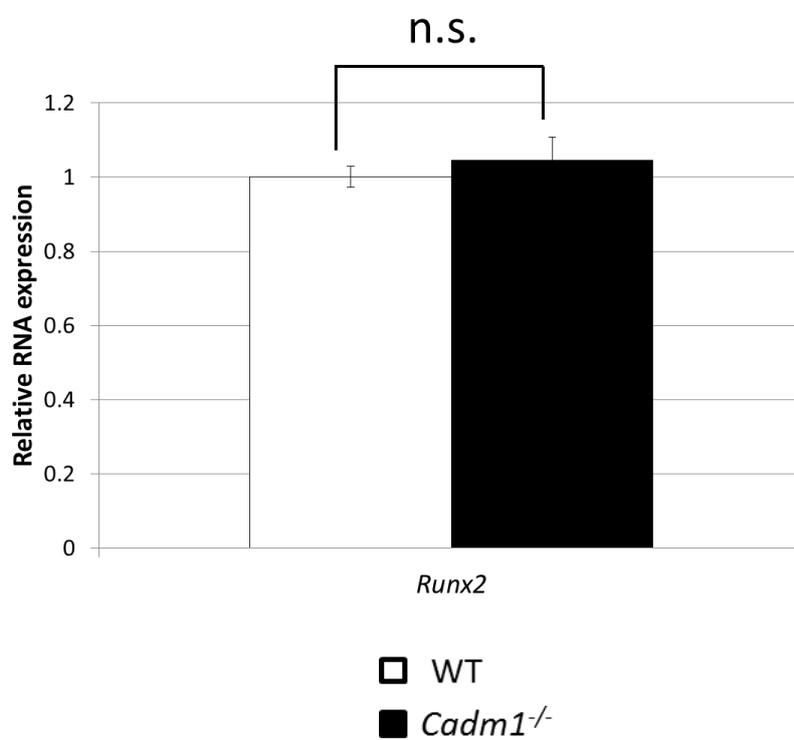


図 15. WT 骨芽細胞および *Cadm1*^{-/-}骨芽細胞の *Runx2* 発現

リアルタイムPCRによるWT骨芽細胞および*Cadm1*^{-/-}骨芽細胞の*Runx2*のmRNA発現変化 (n.s., not significant; *n* = 3)。

Runx2 発現に有意差はみられなかった。

第4章 考察

単球・マクロファージ系の破骨細胞の分化は複雑なメカニズムにより制御されている。サイトカインの要素としては、骨芽細胞・骨髄間質細胞に発現する RANKL による正の制御、骨芽細胞に発現する OPG による負の制御を受け、コントロールされている (3)。一方で、転写因子の要素としては、AP-1, BLIMP1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1), NFATc1 による正の誘導 (6)、BCL6 (B cell lymphoma 6), IRF8 による負の誘導 (26, 16)を受け、コントロールされている。さらにエピジェネティックな制御としては、H3K4me3, H3K27me3 に関する制御として、NFATc1 の bivalent domain から monovalent domain への変化を介して正の制御 (9)を、DNA のメチル化に関する制御として、Dnmt3a による DNA のメチル化が IRF8 を介して負の制御 (17)を行うことが知られている。本研究では TSS において H3K4me3, H3K27me3 に関する制御として、分化過程で bivalent domain から monovalent domain へ変化し、さらに Nfatc1 が結合する遺伝子という条件により、破骨細胞分化に重要な役割を果たす可能性が高い遺伝子群を抽出した (表 1)。その遺伝子群の中の *Cadm1* に関する解析において、*Cadm1* が破骨細胞分化を抑制 (図 9) し骨吸収能を低下 (図 11) させることが示された。すなわち、*Cadm1* は H3K4me3, H3K27me3 に関して、bivalent domain から

monovalent domain への変化によるエピジェネティックな制御を受け、かつ *Nfatc1* の標的となるが、破骨細胞分化・機能に対して負の制御をするということが示唆され、破骨細胞分化における H3K4me3, H3K27me3 に関するエピジェネティックな制御において、新規の負の制御機構分子の可能性を提起したといえる。

破骨細胞分化における feedback 機構としては、破骨細胞から放出されるケモカイン MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) などによって positive-feedback 制御を受ける (27)が、一方で、破骨細胞から放出される ephrinB2 などによって negative-feedback 制御を受ける (28)。NFATc1 は AP-1 によって誘導されるとともに auto-amplification によって NFATc1 自身によっても誘導され (29, 30)、*CTSK* や *ACP5* といった破骨細胞特異的遺伝子の発現を誘導し、破骨細胞分化のマスターレギュレーターとして働くが、NFATc1 の negative-feedback 機構による破骨細胞分化の負の制御に関してはいまだ知られていない。本研究による我々の発見は破骨細胞分化における NFATc1 依存性のエピジェネティックな制御の新たな負の制御メカニズムを提起しうる発見といえる。

Cadm1 は 3 つの細胞外免疫グロブリン様ループをもつ細胞接着分子で、インテグリンなどと細胞接着複合体を形成し、アクチンタンパクを制御することが知られている (20)。また、破骨細胞分化において、免疫グロブリンが破骨細胞分化を直接的に制御する作用を要することも知られている (31)。したがって、

破骨細胞分化において、免疫グロブリン様の *Cadm1* も細胞内の接着因子を介して、破骨細胞分化を制御していることが予想された。実際、アクチンリングの形成に関与する FAK, Pyk2 のタンパク発現が *Cadm1* 欠損破骨細胞で上昇していることが示された (図 13)。一方で、c-Src のタンパク発現は変化なく、*Cadm1* が c-Src とは独立した破骨細胞の細胞骨格形成に関与している可能性が示唆された。*Cadm1* がどのようなメカニズムで FAK, Pyk2 というアクチンリングの形成に関与するタンパクを制御しているのかという点に関しては検討できていないが、Nectin は Src を活性化する (25)が、一方で Nectin 様のタンパクである *Cadm1* は FAK, Pyk2 を抑制するという事実は興味深く、Nectin と *Cadm1* との関連性などの視点からも今後の更なる研究の必要性がある。

本研究の限界は *Cadm1* のグローバルなノックアウトマウスを用いたことである。破骨細胞分化・機能に対する、ある遺伝子の影響の解析を行う上では、その遺伝子の flox マウスと破骨細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Rank-cre マウスや Ctsk-cre マウスなどとを交配することによって得られる、破骨細胞特異的にその遺伝子がノックアウトされたマウスを用いるのが理想的である。しかし、本研究では、グローバルなノックアウトマウスを用いた。マウスの各組織における *Cadm1* の発現は肺や脳神経系、マクロファージ系などに比較的限局している (図 2)。*Cadm1* のグローバルノックアウトマウスは、低体重、

小脳低形成に伴う自閉症様変化を呈するという報告がある (32)。低体重と低骨密度の関連は否定できないが、本研究で用いた 8 週齢の雄マウスにおいては、WT マウスとの比較で、体重に有意差はなかった。また、自閉症などの神経疾患と骨密度との関連は特に知られていない。

Cadm1 の正常骨芽細胞における発現はあまりみられないが、骨に対する影響は示唆されるため、骨芽細胞に関しても解析を行った。その結果、*Cadm1* が骨芽細胞分化には影響しないが、骨芽細胞の *Opg* 発現減少を介して破骨細胞分化を抑制している可能性が示唆された (図 14, 15)。すなわち骨芽細胞の側面からも破骨細胞分化抑制機構が働いている可能性が示唆された。このことは、破骨細胞単独での培養系における破骨細胞分化マーカーが *Cadm1*^{-/-}破骨細胞において有意な上昇がみられたが、その差はわずかであったことを説明しうる結果ともいえる。実際 *Cadm1* はヒト骨芽細胞での発現がみられ、骨肉腫の診断的マーカーになりうるという報告もされており (33)、今後更なる骨芽細胞に関する解析を行うことも重要と考えられる。

骨の恒常性維持において、破骨細胞と骨芽細胞の相互作用 (クロストーク) の重要性はよく知られている。*RANKL-RANK* 系シグナルはその最たるものであるが、他にも *ephrinB2/EphB4*, *ephrinA2/EphA2*, *Sema4D/PlexinB1* などのシグナルの関与が知られている (34, 28, 35, 36)。これらのシグナルの検討や破骨細胞と骨

芽細胞の共存培養系における検討などを行うことにより、更なる見地も得られ
うると考えられる。

Cadm1^{-/-}マウスにおける骨密度低下は破骨細胞の分化マーカー亢進、生存能上
昇、骨吸収能上昇といった様々な要素が関与していることが示唆された。また、
骨芽細胞とのカップリング機構も関与していると考えられた。これは破骨細胞
の分化過程でのデータから絞り込んだ遺伝子であることから全く予期してい
なかった結果である。*Cadm1*^{-/-}マウスの骨形態計測において、骨梁数の上昇、骨
梁間隙の低下は有意差をもって示されたが、骨量は増加傾向があるものの有意
差がみられなかった。この要因としてはWTマウスと*Cadm1*^{-/-}マウス5匹ずつの
検討であったというサンプルサイズの小ささが影響していると考えられた。ま
た、破骨細胞数に差がなかったことは*in vitro*においても破骨細胞形成に差がな
かったことと一致した結果といえるが、吸収面にも差がみられなかった点は*in
vitro*において骨吸収能が亢進したことで乖離しており、皮質骨量の低下に伴い
正確な骨吸収・骨形成パラメーターの測定が困難となったことが影響している
可能性が考えられた。

本研究を骨粗鬆症などの骨吸収が異常に亢進した病態に対する新たな治療法
開発に結びつけるには乗り越えねばならない課題が多々ある。その一つとして、
*Cadm1*が膜タンパク質であることがあげられる。*Cadm1*を治療標的とした場合、

その可溶化タンパクの精製が必要と考えられるが、それは一朝一夕には成しえないであろう。

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。高齢化の進んでいく現代社会において、骨免疫分野の発展に伴う骨粗鬆症治療の更なる進歩は、QOL (Quality of life) 改善や医療費削減といった観点からも今後の社会に寄与すると考える。

第5章 結論

破骨細胞分化過程において、H3K4me3, H3K27me3 の変化によるエピジェネティックな制御を受け、かつ、NFATc1 に誘導される遺伝子を同定することで、破骨細胞分化において重要と考える遺伝子を抽出し、その中の細胞膜、細胞接着に関連する遺伝子、*Cadm1* (*cell adhesion molecule 1*) に関して、破骨細胞における分化・機能の解析を行った。

Cadm1 は FAK, Pyk2 を介して、破骨細胞の骨吸収能を負に制御していた。すなわち、*Cadm1* は NFATc1 依存性エピジェネティックな破骨細胞分化制御における負の制御分子であった。

第6章 謝辞

本研究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および慶應大学医学部整形外科学教室にて行われた。

次世代シーケンサーを用いた研究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 油谷浩幸教授指導の下、行った。

本研究にあたり、次の先生方に感謝いたします。

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 田中栄教授、慶應義塾大学医学部整形外科学教室 宮本健史先生に多大なご指導を頂き、感謝いたします。

Cadm1^{-/-}マウスを供与頂いた国際医療福祉大学 桃井隆教授、抗 *Nfatc1* 抗体を供与頂いた東京大学先端科学技術研究センター血管生物学分野 南研究室に感謝いたします。

研究室においてさまざまな仕事をお手伝い頂いた実験助手の杉田さん、さまざまなアドバイスを頂いた同僚の先生方に感謝いたします。

第7章 参考文献

1. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会：骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015年版，ライフサイエンス出版，ii，2015.
2. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 423(6937):337-42, 2003.
3. Tanaka S. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the RANKL/RANK/OPG system. *Am J Nephrol*. 27(5):466-78, 2007.
4. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol*. 20:795-823, 2002.
5. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 3(6):889-901, 2002.
6. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 7(4):292-304, 2007.
7. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 21(3):381-395, 2011.
8. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, et al. A bivalent

- chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. 125(2):315-26, 2006.
9. Yasui T, Hirose J, Tsutsumi S, Nakamura K, Aburatani H, Tanaka S. Epigenetic regulation of osteoclast differentiation: possible involvement of Jmjd3 in the histone demethylation of Nfatc1. *J Bone Miner Res*. 26(11):2665-71, 2011.
 10. Nakamura H, Nakashima T, Hayashi M, Izawa N, Yasui T, Aburatani H, et al. Global epigenomic analysis indicates protocadherin-7 activates osteoclastogenesis by promoting cell-cell fusion. *Biochem Biophys Res Commun*. 455(3-4):305-11, 2014.
 11. Song L, Crawford GE. DNase-seq: a high-resolution technique for mapping active gene regulatory elements across the genome from mammalian cells. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010(2):pdb.prot5384, 2010.
 12. Gaulton KJ, Nammo T, Pasquali L, Simon JM, Giresi PG, Fogarty MP, et al. A map of open chromatin in human pancreatic islets. *Nat Genet*. 42(3):255-9, 2010.
 13. Inoue K, Imai Y. Identification of novel transcription factors in osteoclast differentiation using genome-wide analysis of open chromatin determined by DNase-seq. *J Bone Miner Res*. 29(8):1823-32, 2014.
 14. Omata Y, Yasui T, Hirose J, Izawa N, Imai Y, Matsumoto T, et al. Genomewide

- comprehensive analysis reveals critical cooperation between Smad and c-Fos in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.* 30(5):869-77, 2015.
15. Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene.* 20(24):3139-55, 2001.
 16. Zhao B, Takami M, Yamada A, Wang X, Koga T, Hu X, et al. Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nat Med.* 15(9):1066-71, 2009.
 17. Nishikawa K, Iwamoto Y, Kobayashi Y, Katsuoka F, Kawaguchi S, Tsujita T, et al. DNA methyltransferase 3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosylmethionine-producing metabolic pathway. *Nat Med.* 21(3):281-7, 2015.
 18. Sly WS, Hu PY. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem.* 64:375-401, 1995.
 19. Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, et al. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet.* 27(4):427-30, 2001.
 20. Murakami S, Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Murakami Y. Trans-homophilic interaction of CADM1 activates PI3K by forming a complex with MAGuK-family proteins MPP3 and Dlg. *PLoS One.* 9(9):e110062, 2014.

21. Zhiling Y, Fujita E, Tanabe Y, Yamagata T, Momoi T, Momoi MY. Mutations in the gene encoding CADM1 are associated with autism spectrum disorder. *Biochem Biophys Res Commun.* 377(3):926-9, 2008.
22. Takayanagi Y, Fujita E, Yu Z, Yamagata T, Momoi MY, Momoi T, et al. Impairment of social and emotional behaviors in *Cadm1*-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 396(3):703-8, 2010.
23. Fujita E, Kouroku Y, Ozeki S, Tanabe Y, Toyama Y, Maekawa M, et al. Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking RA175/TSLC1/SynCAM/IGSF4A, a cell adhesion molecule in the immunoglobulin superfamily. *Mol Cell Biol.* 26(2):718-26, 2006.
24. Ray BJ, Thomas K, Huang CS, Gutknecht MF, Botchwey EA, Bouton AH. Regulation of osteoclast structure and function by FAK family kinases. *J Leukoc Biol.* 92(5):1021-8, 2012.
25. Takai Y, Miyoshi J, Ikeda W, Ogita H. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(8):603-15, 2008.
26. Miyauchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, Sakamoto A, Iwasaki R, Hoshi H, et al. The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone

- homeostasis. *J Exp Med.* 207(4):751-62, 2010.
27. Miyamoto K, Ninomiya K, Sonoda KH, Miyauchi Y, Hoshi H, Iwasaki R, et al. MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 383(3):373-7, 2009.
28. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab.* 4(2):111-21, 2006.
29. Matsuo K, Galson DL, Zhao C, Peng L, Laplace C, Wang KZ, et al. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos. *J Biol Chem.* 279(25):26475-80, 2004.
30. Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med.* 202(9):1261-9, 2005.
31. Negishi-Koga T, Gober HJ, Sumiya E, Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, et al. Immune complexes regulate bone metabolism through FcR γ signalling. *Nat Commun.* 6:6637, 2015.
32. Fujita E, Tanabe Y, Imhof BA, Momoi MY, Momoi T. *Cadm1*-expressing synapses on Purkinje cell dendrites are involved in mouse ultrasonic vocalization activity.

PLoS One. 7(1):e30151, 2012.

33. Inoue T, Hagiyaama M, Enoki E, Sakurai MA, Tan A, Wakayama T, et al. Cell adhesion molecule 1 is a new osteoblastic cell adhesion molecule and a diagnostic marker for osteosarcoma. *Life Sci.* 92(1):91-9, 2013.
34. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys.* 473(2):201-9, 2008.
35. Irie N, Takada Y, Watanabe Y, Matsuzaki Y, Naruse C, Asano M, et al. Bidirectional signaling through ephrinA2-EphA2 enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis. *J Biol Chem.* 284(21):14637-44, 2009.
36. Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, et al. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat Med.* 17(11):1473-80, 2011.