

博士論文

破骨細胞分化において

RANKLにより活性化される遺伝子群の解析

中 村 春 彦

「目次」	
1.要旨	……………3
2.序文	……………4
3.方法	……………12
4.結果	……………17
5.考察	……………23
6.謝辞	……………28
参考文献	……………29
表	……………41
図	……………42

破骨細胞分化において

RANKL により活性化される遺伝子群の解析

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 中村 春彦

1. 要旨

生体における遺伝子発現の制御には、エピジェネティックな要素が大きな役割を果たしている。ヒストン H3 リジン 4 のトリメチル化 (H3K4me3) は遺伝子発現を活性化させ、ヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化 (H3K27me3) はそれを抑制することが報告されている。破骨細胞は骨吸収（破壊）を担う多核巨細胞であり、単球-マクロファージ系の前駆細胞が細胞融合することによって最終分化する。申請者は、RANKL 刺激による破骨細胞分化において H3K4me3 と H3K27me3 の網羅的な ChIP シークエンスを行い、エピジェネティックに制御されている新たな分子 Protocadherin-7 (Pcdh7) を同定した。Pcdh7 の遺伝子ノックダウンにより機能を低下させると、破骨細胞融合関連遺伝子の発現および破骨細胞の融合、分化が抑制された。本研究により、Pcdh7 が破骨細胞の細胞融合を通じて分化を促進させていることが示された。

2. 序文

近年、平均寿命の伸長や高齢社会の到来により、高齢者の ADL (activities of daily living) の維持、健康寿命の伸長が社会的な課題となってきた。介護が必要となる主な原因として、脳血管疾患や認知症などと共に運動器疾患があげられる。運動器疾患の中では関節疾患と転倒・骨折が同程度あり、特に要介護度の高い群では転倒・骨折の割合が多い (1)。そのため、変形性関節症や関節リウマチに代表される関節疾患や骨折を引き起こす要因となる閉経後や加齢性の骨粗鬆症の治療戦略の立案が重要となってきた。

骨の恒常性は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収により保たれている (図 1 A) (2, 3)。関節リウマチなどの慢性炎症、閉経や加齢等でこのバランスが崩れ、骨吸収が骨形成に対して優位になると、骨量が低下し、骨脆弱性を生じて骨破壊、骨折の原因となる (図 1 B)。破骨細胞は、骨吸収を担う巨大な多核細胞であり、造血幹細胞から単球・マクロファージ系の前駆細胞、破骨前駆細胞を経て分化する (図 2) (2, 3)。

造血幹細胞は M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) 刺激を受けて単球・マクロファージ系の破骨前駆細胞へと分化する (2, 3)。前駆細胞の M-CSF 受容体 (c-Fms ; *Csf1r*) に M-CSF が結合すると、増殖や生存が促進される (4)。さらに転写因子 activating transcription factor 4 (ATF4) を介して RANK (receptor activator of NF- κ B ; *Tnfrsf11a*) の発現が誘導される (5)。また、RANK の発現には非古典的 Wnt

リガンドである Wnt5a が受容体である receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (Ror2)に結合することによるシグナルも関与することも明らかにされている (6)。

RANK は TNF (tumor necrosis factor) 受容体ファミリーに属し、破骨前駆細胞、破骨細胞に発現する。そのリガンドである RANKL (RANK ligand) は TNF スーパーファミリーに属するサイトカインであり、主に膜結合型と可溶型として存在し、破骨前駆細胞の RANK に結合し、破骨細胞への分化誘導を生じさせる (7, 8)。RANKL は破骨細胞分化に必須の因子であり、RANKL を欠損したマウスやヒト変異患者では破骨細胞が存在せず、重度の大理石骨病を呈する (2, 9)。通常の骨代謝においては、破骨前駆細胞に作用する RANKL はモデリング期においては骨芽細胞や軟骨細胞、リモデリング期には骨細胞を中心とした間葉系の細胞が発現し、破骨前駆細胞の分化を誘導すると考えられている (10, 11)。一方、関節リウマチなどの病的な骨破壊においては、滑膜線維芽細胞や浸潤した T 細胞の一部 (exFoxp3 Th17 細胞等) が、破骨細胞を分化させる RANKL の供給源になっている可能性が示唆されている (12)。また、骨芽細胞や骨細胞は RANKL を発現する一方で、可溶性受容体であるオステオプロテジェリン (osteoprotegerin: OPG) も産生する (2, 3)。OPG は RANK に対して競合的に RANKL に結合し、破骨細胞分化を強力に抑制している (2, 3)。

RANKL が破骨前駆細胞の RANK に結合すると、adaptor タンパクである TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) を介して TGF- β activated kinase 1 (TAK1), NF- κ B, activator protein-1 (AP-1), mitogen-activated protein kinase (MAPK)などが活性化される

(2, 3)。その結果破骨細胞分化のマスター転写因子 Nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) の発現および自己増幅が誘導され、破骨細胞は最終分化に至る (2, 3)。また、NFATc1 は、ヒストン修飾の変化によるエピジェネティックな制御も受けていることが最近報告されている (13)。NFATc1 は、破骨細胞分化において中心的で支配的な機能を果たす転写因子であり、破骨細胞の分化や融合、機能、生存にかかわる遺伝子を発現制御し、破骨細胞への運命を決定づける (2, 3, 14, 15)。

RANKL/RANK は、破骨細胞分化を決定するシグナル伝達系であるが、その経路を支える共刺激システム、Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) 系の存在も近年明らかになってきた。ITAMは、免疫系の細胞の受容体に広く含まれており、活性化のシグナルを伝達する。Osteoclast-associated receptor (OSCAR) 等の受容体から、ITAM 配列を持つアダプター蛋白質の Fc receptor common γ subunit (FcR γ) と DAP12 にシグナルが伝達される。さらに、Syk, phospholipase C γ (PLC γ) を介し、RANK シグナルと協働してカルシウムシグナル、カルシニューリンを活性化させ、NFATc1 の核内移行、活性化を誘導する (16)。また、calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV), cAMP-response element-binding protein (CREB) を介して c-Fos の発現を誘導し、AP-1 の活性化を通じて NFATc1 を誘導する (17)。

破骨細胞は、分化の過程で前駆細胞同士が融合することにより多核巨細胞となる (2, 3, 18)。NFATc1 は、Dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP), Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP) や V-type proton ATPase

subunit d2 (Atp6v0d2) 等を活性化する。DC-STAMP の発現は、転写因子である microphthalmia-associated transcription factor (MITF) によっても正に制御されており、T cell acute lymphocytic leukemia 1 (Tal1) により抑制される (19)。DC-STAMP や OC-STAMP を欠損したマウスでは TRAP (*Acp5*; tartrate-resistant acid phosphatase type 5) 陽性の単核の破骨細胞は存在するが、多核の細胞は存在しないことが報告されている (20, 21)。Atp6v0d2 の欠損マウスでも破骨前駆細胞の細胞融合の障害による骨量の増加が観察されている (22)。すなわち、多核化、巨大化は破骨細胞の骨吸収能に貢献していると考えられている。

破骨細胞分化の過程では、分化を抑制する **negative regulation** のシステムも見出されており、破骨細胞分化抑制因子として **interferon regulatory factor-8 (Irf8)**, **MafB**, **B cell lymphoma 6 (Bcl-6)** などがあげられる。Irf8 は NFATc1 の発現や機能を阻害することにより破骨細胞分化を抑制する (23)。MafB は c-Fos や MITF と結合し、NFATc1 や OSCAR の発現を抑制する (24)。Bcl-6 は破骨前駆細胞において NFATc1, カテプシン K (Ctsk), DC-STAMP 遺伝子のプロモーター上でこれらの発現を阻害している (25)。

一方、RANK の下流で発現が誘導される転写因子 **B lymphocyte-induced maturation protein 1 (Blimp-1**; 遺伝子名 *Prdm1*) は、破骨前駆細胞に発現している Irf8、Mafb、Bcl-6 などを抑制することで、破骨細胞分化を正に制御している (25, 26)。破骨細胞の分化、活性化においてこれらの抑制因子の制御も重要な過程となっている (図 2)。

成熟した破骨細胞は、骨表面に接着し酸や蛋白質分解酵素を分泌し、骨吸収を行う。

NFATc1 が活性化されると、破骨細胞は $\alpha_v\beta_3$ インテグリンによって骨表面に接着し、c-Src 依存性シグナルにより、アクチンリング、波状縁を形成するが、これらの活性化には M-CSF や RANK からのシグナルも関与していることが報告されている (27)。

NFATc1 は骨吸収機能に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) や Ctsk などの蛋白質分解酵素発現を誘導する (2, 3)。また、蛋白質分解酵素や H^+ イオンと Cl^- イオンの分泌のための分泌小胞輸送や小胞融合には、Rab7, pleckstrin homology domain containing family M member 1 (Plekhm1), sorting nexin 10 (Snx10) などが関わっていることも見出されている (28-31)。さらに、V 型 ATPase と chloride channel protein-7 (CLC-7), osteopetrosis associated transmembrane protein 1 (Ostm1) の働きにより H^+ イオンと Cl^- イオンの分泌が生じ、骨の強固なミネラルを溶解する (31-33)。これら破骨細胞の機能に関わる *PLEKHM1* と *SNX10*、V 型 ATPase をコードする *TCIRG1*、*CLC-7* をコードする *CLCN1* や *OSTM1* はヒトの大理石骨病の責任遺伝子として見出されている (31)。

破骨細胞の寿命は生体内では約 2 週間程度と考えられており、骨芽細胞の寿命の約 2-3 か月、骨細胞の 1-20 年等と比較すると非常に短い。このため、破骨細胞の生存能も破骨細胞数、骨吸収活性に大きな影響を与える。M-CSF は Bcl-2 を活性化させ破骨前駆細胞の生存に関与する (34)。また、Bcl-2 ファミリーである Bcl-xl, Myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) がアポトーシスを抑制することによって生存に働いていることが報告されている (35, 36)。一方、Bcl-2-like protein 11 (Bim)や Noxa は逆にア

ポトシスを誘導すると考えられている (37, 38)。

様々な細胞外からの刺激も破骨細胞分化に関わっていると考えられている。

Sema3A は骨芽細胞系の細胞から分泌され、破骨細胞分化を抑制し、骨芽細胞分化を促進する (39)。IL-2 や IL-4、IL-10、interferon- β (IFN- β)、IFN- γ 等のサイトカインは破骨細胞分化に抑制的に働き、TGF- β 1、IL-1、IL-6、TNF- α 等は破骨細胞分化、機能に促進的に働くことが知られている (2, 3)。

破骨細胞による骨吸収の異常な亢進は骨粗鬆症や癌の骨転移、関節リウマチにおける骨破壊などにおいて中心的な役割を担っている。破骨細胞の骨吸収能を決定する因子としては、分化 (破骨細胞数、多核化等の形態)、機能 (細胞あたりの骨吸収能)、生存 (寿命) が挙げられる。前述のように、これらには非常に多くの分子が関わっている (図 2)。これらのことから、破骨細胞の分化や機能、生存に関するさらなる研究は、今後の新しい有用な治療法の開発に貢献すると考えられる。

遺伝子の発現はそのゲノム配列だけではなく、エピジェネティックな要素によっても制御されている (40, 41)。エピジェネティックな要素には、ヒストンのメチル化やアセチル化などの修飾、DNA のメチル化やマイクロ RNA などが挙げられる (40)。特定のリジン残基のアセチル化は遺伝子発現を活性化する一方で、メチル化はその部位により遺伝子発現の活性化や抑制に働くことが知られている (41)。ヒストン H3 リジン 4 のトリメチル化 (H3K4me3) はヌクレオソームリモデリング酵素を誘導し、ヒストンのアセチル化を生じることで遺伝子発現を活性化させ (42, 43)、ヒストン H3

リジン27のトリメチル化 (H3K27me3) はクロマチンをコンパクトに折りたたむことで遺伝子発現を抑制する (44, 45)。破骨細胞においては、前述のようにマスター転写因子である NFATc1 がヒストン修飾の変化によるエピジェネティックな制御を受けている。破骨細胞分化に伴い NFATc1 のプロモーター領域は、H3K27me3 (転写抑制) と H3K4me3 (転写活性化) が共存する bivalent domain [H3K4me3(+)H3K27me3(+)] から H3K4me3 のみが存在する monovalent domain [H3K4me3(+)H3K27me3(-)] に変化することが見出されており、この変化に伴う H3K27 の脱メチル化は Jmjd3 の制御下にあることが報告されている (13)。このことから、破骨細胞分化においてもヒストンのメチル化をはじめとするエピジェネティックな制御が重要な役割を果たしていることが示唆される。

カドヘリンはカルシウム依存性の細胞接着タンパクであり、古典的カドヘリン、デスモソーマルカドヘリン、プロトカドヘリンなどに分類される (46, 47)。破骨細胞においては、E-カドヘリンが破骨前駆細胞の融合に関わっているという *in vitro* の報告や、カドヘリン-6 や N-カドヘリンが骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養での破骨細胞分化に関与する可能性が報告されている (48-50)。しかしながら、その他のカドヘリンによる破骨細胞への関与は明らかになっていない。

本研究においては、破骨細胞分化に関与する新たな分子の同定と、破骨細胞分化におけるエピジェネティックな制御の重要性を解明することを目的とした。そのために、RANKL 刺激による破骨細胞分化の過程で H3K4me3 と H3K27me3 に対するクロマチ

ン免疫沈降 (ChIP ; Chromatin immunoprecipitation) シークエンスを行い、ヒストン修飾が NFATc 1 と同様に H3K4me3(+)H3K27me3(+)から H3K4me3(+)H3K27me3(-)に変化する遺伝子を網羅的に解析した。同時に行った RNA シークエンスで発現量が高く、破骨細胞分化に伴い上昇する遺伝子を抽出し、候補遺伝子群から *Pcdh7* (Protocadherin-7) に着目し、破骨細胞分化における新たな役割を見出した。

3. 方法

破骨細胞分化実験

6 週齢の BL6/J マウスの長管骨から骨髄を採取し、10 ng/ml の M-CSF を加えた α MEM (Minimum essential medium) + 10% FBS (Fetal bovine serum) 培地で 2-3 日培養し、骨髄由来単球マクロファージ前駆細胞 (BMM ; bone marrow-derived monocyte/macrophage precursor cells) を作成した。これらの細胞あるいはこれらの細胞にレトロウイルスを感染させた細胞 (後述) を、上記に RANKL (12.5 または 25 ng/ml) を加えた培地で 3-4 日培養し、破骨細胞を分化させた。シクロスポリン A (5 μ g/ml) を用いる実験では RANKL と同時に添加した。RANKL 刺激後の検体は PBS (Phosphate buffered saline) で洗浄後、4%パラホルムアルデヒド溶液下に 15 分間室温静置し固定した。アセトン (50%) エタノール(50%)溶液を加え、30 秒静置した。TRAP 染色液 (Naphthol AS-MX phosphate 0.1 mg/ml、N,N-Dimethylformamide 10 μ l/ml、Fast red violet LB salt 0.6 mg/ml、TRAP Buffer [酢酸 Na 5.44 g/l、酒石酸 Na 10.5 g/l]) で 5 分間室温静置し TRAP 染色を行った。破骨細胞分化は特記なき場合は TRAP 陽性の 3 核以上の細胞を計数し評価した。イメージングサイトメーターを用いる場合は HCS CellMask Deep Red stain と Hoechst 33342 下に室温に 30 分静置し、細胞膜と核を染色し、細胞毎の核数とその核数をもった細胞数を自動計測した(図 3A)。

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

培養した BMM または破骨細胞を採取し、遠心して上清を除去したのち SDS (sodium dodecyl sulfate) 溶解液 (50 mM Tris-HCl [PH 8.0]、1% SDS、10 mM EDTA、Complete Protease Inhibitor Cocktail) に懸濁した。1分ごとに30秒の超音波処理 (output level 2、50% duty) を6サイクル行った。8°C、15000回転で10分遠心して上清を ChIP 希釈液 (20 mM Tris-HCl [PH 8.0]、150 mM NaCl、2mM EDTA、1% Triton X-100) で10倍希釈した。H3K4me3、H3K27me3 に対する抗体とプロテイン A セファローズビーズを 0.05 mg/ml BSA (bovine serum albumin) を加えた ChIP 希釈液内で結合させ、これらと検体を 4°C で6時間温置した。洗浄後、elution buffer (50 mM Tris-HCl [PH 8.0]、10 mM EDTA、1% SDS) 内に 65°C で温置し、pronase 1.5 µg を加え 4°C で2時間、42°C で6時間処理し、脱架橋 DNA を得た。得られた DNA を PCR purification kit で精製した。

Illumina cluster station と Genome Analyzer IIx を用いて大量並行シークエンスを行った。得られた配列をマウスゲノム (build 36; National Center for Biotechnology Information) と比較し、Model-based analysis of ChIP-Seq を用いてピークの検出を行った (51)。

定量的逆転写 PCR 及び RNA シークエンス解析

培養した細胞に 6 cm 培養皿 1 枚あたり 350 μ l の ISOGEN を加え細胞を懸濁し、室温にて 5 分間静置した。100 μ l のクロロホルムを加え混和し、2-3 分室温で静置した。4°C 12000 g で 15 分遠心し、水相を採取し、200 μ l のイソプロパノールを加えた。5-10 分室温で静置し、4°C 12000 g で 10 分遠心し、上清を除去した。沈殿に 70%エタノールを 1 ml 加え、4°C 12000 g で 5 分遠心し、上清を除去、DEPC 処理水 30 μ l に溶解し、RNA を得た。

RNA シークエンスは、TruSeq RNA Sample Preparation Kits を用いてライブラリーを作成し、Illumina Genome Analyzer IIx を用いて行った。

定量的逆転写 PCR は、上記で得られた RNA の濃度を測定し、0.5 μ g を Superscript III reverse transcriptase を用いて逆転写して得られた cDNA を用いて行った。0.5 μ g の RNA を DEPC 処理水で 8 μ l になるよう溶解し、RT Reaction Mix を 10 μ l、RT Enzyme Mix を 2 μ l 加え、25°C で 10 分、50°C で 30 分、85°C で 5 分処理した。*E.coli* RNase H を 2 単位加え、37°C で 20 分間温置し、cDNA を作成した。cDNA 検体に SYBR Green Realtime PCR Master Mix とプライマーを加え、LightCycler apparatus で定量的逆転写 PCR を行った。プライマー配列を表 1 に示す。mRNA 量は Gapdh を基準として比較した。

shRNA を用いた遺伝子のノックダウン

shRNA (short hairpin RNA) は RNAi Consortium の shRNA ライブラリーから得られた配列をもとに構築した。標的 RNA を RNAi-Ready pSIREN-RetroQ ZsGreen Vector に挿入して作成した。標的配列を表 2 に示す。計画した相補的なオリゴ配列を 50 μ M になるよう 0.1 M NaCl 溶液に溶解した。99°C で 2 分温置し、4°C まで 2 時間で冷却することによりアニーリングを行った。検体を PSIREN と ligation high ver.2 と混合し、16°C で 30 分温置し ligation を行った。ligation 溶液を DH5 α 大腸菌と混合し、4°C 30 分、42°C 30 秒、4°C 2 分に置いた後、SOC 溶液 750 μ l を加え、37°C で 60 分間撹拌した。アンピシリンを加えた LB プレートにこれを播種し、37°C で一晩培養した。コロニーをピックアップし、アンピシリンを加えた LB 溶液 3 ml を加え、37°C で撹拌しながら 12-16 時間培養した。QIAprep Spin Miniprep Kit を用いて Miniprep を行い、得られた検体をシーケンス解析した。目的とする配列を含むベクターを有するコロニーをピックアップし、アンピシリンを加えた LB 溶液 3 ml を加え 37°C で撹拌しながら 4-8 時間培養した。得られた溶液をアンピシリンを加えた LB 溶液 50 ml に加え、37°C で撹拌しながら 12-16 時間培養した。QIAGEN Plasmid Midi Kit を用いて Midiprep を行い、pSIREN-RetroQ-ZsGreen-shCd97、pSIREN-RetroQ-ZsGreen-shPcdh7、pSIREN-RetroQ-ZsGreen-shLuciferase の DNA 溶液を得た。これらを 3 μ g ずつ FugeneHD 9 μ l を加えた Opti-MEM 溶液に加え、混和し、15 分室温で静置した後に DMEM 中で培養したパッケージング細胞である PLAT-E に加え、37°C で 24 時間温置した。溶液

を新しい DMEM に交換し、さらに 24 時間温置し、上清を 45 μm のフィルターに通し、パッケージング細胞を除去し、ウイルス溶液を得た。ウイルス溶液を RANKL 刺激前の BMM にポリブレンを 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加え 24 時間感染させた。shCd97-1 と shPcdh7-1 を shCd97、shPcdh7 として記載した。shCd97-2 と shPcdh7-2 を用いた結果は shCd97-1 と shPcdh7-1 を用いた結果と同様の傾向を示した。

骨吸収実験

前項の様にレトロウイルスを感染させた後 RANKL 刺激を行った破骨細胞を 0.05% Trypsin-EDTA を用いて採取した。破骨細胞数を計数し、同数の破骨細胞を dentine slice 上で 10 ng/ml の M-CSF 及び 25ng/ml の RANKL を加えた $\alpha\text{MEM} + 10\%$ FBS 培地を用いて 2 日間培養した。Dentine slice は培養終了後 1 M アンモニア水に浸し、15 分室温で静置した。洗浄後 0.5% トルイジンブルー溶液で 1 分間染色し、洗浄し、乾燥した。撮影した画像を画像解析ソフト (Microanalyzer) を用いて吸収窩の面積を定量化して shLuc 群を 1 として比較した。

統計解析

有意差検定は特記なき場合は two-tailed Student *t* test を用いて行った (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、NS ; 有意差なし)。すべてのデータは平均 \pm 標準誤差 (n 数は 3 以上) で表記した。

4. 結果

H3K4me3 と H3K27me3 の ChIP シークエンスを用いた破骨細胞関連遺伝子の同定

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新たな破骨細胞関連遺伝子を同定するために、BMM と RANKL 刺激後の成熟破骨細胞において H3K4me3 と H3K27me3 の ChIP シークエンスを行った。H3K4me3 のピークは 10% 以上が転写開始領域に位置し、半分以上が転写開始領域から 5 kb 以内に位置していた。それに対して、H3K27me3 のピークは転写開始領域に位置しているものは非常に少なく、転写開始領域から 5 kb 以内に位置しているものは 20% 以下であった (図 4A)。

この結果を用いて、破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 と同様に BMM では H3K4me3(+)/H3K27me3(+) タイプのヒストン修飾パターンを示し、成熟破骨細胞では H3K4me3(+)/H3K27me3(-) パターンに変化する遺伝子を分類した (図 4B、C)。H3K4me3 の相対的濃縮度は 4 (破骨細胞での全遺伝子の平均が 3.19) 以上を陽性と定義した。H3K27me3 の相対的濃縮度は 1 (BMM での平均が 0.83) 以上を陽性、0.8 (破骨細胞での平均が 0.64) 未満を陰性と定義した。

BMM では解析に用いた全 21815 遺伝子中、2006 遺伝子が H3K4me3(+)/H3K27me3(+) パターンを示した。また、成熟破骨細胞では 7552 遺伝子が H3K4me3(+)/H3K27me3(-) パターンを示した。BMM では H3K4me3(+)/H3K27me3(+) パターンを示し、成熟破骨細胞では H3K4me3(+)/H3K27me3(-) に変化するものは 579 遺伝子であった (図 4B)。これらの遺伝子の中には *Nfatc1*、*Nfkb2*、*Prdm1* などの破骨細胞の分化に関連する遺伝

子が含まれていた (図 8A)。

579 遺伝子の中から、創薬の標的となりやすい細胞膜に局在する分子であり、RNA シークエンスで相対的な発現量が 20 (全遺伝子の平均値は 16.2) 以上であり、破骨細胞分化に伴い 20%以上の上昇が確認される遺伝子に着目し解析した。その結果、候補遺伝子として *Cav1*、*Cd82*、*Cd97*、*Pam*、*Pcdh7*、*Sdc1*、*Sema4d*、*Sigmar1*、*Slc11a2*、*Tfrc* の 10 遺伝子が同定された (図 4B)。その中で、既に骨代謝への関与が報告されている *Cav1*、*Cd82*、*Pam*、*Sdc1*、*Sema4d*、*Tfrc* は解析の候補から除外した (52-57)。残りの *Cd97*、*Pcdh7*、*Sigmar1*、*Slc11a2* について遺伝子領域とヒストンメチル化修飾のピークとの関連を解析したところ *Sigmar1*、*Slc11a2* の H3K27me3 のピークが破骨前駆細胞では転写開始領域や遺伝子座に合致しないことから候補遺伝子として棄却した (図 5A)。最終的に、破骨細胞分化においてエピジェネティックな修飾を受け、発現量が上昇している *Cd97* と *Pcdh7* にフォーカスを絞って解析を進めた。

破骨細胞分化における NFAT による *Cd97* と *Pcdh7* の発現制御

マウスの骨髄細胞を RANKL で刺激した実験系で、*Cd97* と *Pcdh7* の発現は破骨細胞への分化に伴い増加していた (図 5B)。シクロスポリン A はカルシニューリンの阻害を通じて NFATc1 を阻害することにより破骨細胞分化を抑制するが、過去の報告と同様、シクロスポリン A の添加により、破骨細胞の形成は有意に低下し、RANKL による *Nfatc1* の発現も抑制された (図 5C、D) (14)。シクロスポリン A の添加により、破骨細胞分化に伴う *Cd97* と *Pcdh7* の発現は有意に抑制され、カルシニューリンの抑制を介しているため(図 3B)、NFATc1 そのものの抑制によるこれらの遺伝子発現への影響が今後の課題ではあるが、これらが NFATc1 の制御下にある遺伝子であることが示唆された (図 5D)。

Pcdh7 のノックダウンによる破骨細胞分化の抑制

破骨細胞分化における CD97 と Pcdh7 の役割を明らかにするため、レトロウイルスを用いた shRNA の導入による CD97 と Pcdh7 のノックダウン実験を行った (図 6A)。感染効率は、ベクター配列に含まれている緑色蛍光タンパクである Zsgreen の発現を蛍光顕微鏡にて評価した。80%以上の細胞が Zsgreen 陽性であり、shRNA 発現レトロウイルスベクターによって破骨前駆細胞に効率よく遺伝子導入されていることが確認できた (図 6B)。タンパク質レベルでの発現の確認は行っていないが、RANKL 刺激後の破骨細胞での *Cd97* と *Pcdh7* の mRNA 発現は shCD97 と shPcdh7 の導入により有意に抑制された (図 6C)。Pcdh7 のノックダウンでは TRAP 陽性多核細胞の形成が有意に低下する一方、CD97 のノックダウンでは、破骨細胞形成に変化は見出せなかった (図 6D)。さらに、破骨細胞の骨吸収能に対する CD97 と Pcdh7 の働きを明らかにするため、それぞれのノックダウン破骨細胞を用いて吸収窩形成実験を行ったが、どちらの遺伝子のノックダウンにおいても shLuc 群との有意差は見出さなかった (図 6E)。これらの結果から、Pcdh7 が破骨細胞の分化を制御していること、一方破骨細胞の活性化には関与していないことが示唆された。CD97 に関しては、この実験では有意な結果は出なかったが、より高効率に発現抑制することにより shLuc 群との有意差が出る可能性は残されていると考えられる。

Pcdh7 による破骨細胞分化における細胞融合関連遺伝子の発現制御

Pcdh7 の破骨細胞分化制御機構における役割を明らかにするため、Pcdh7 のノックダウン細胞において、破骨細胞分化および機能に関連する遺伝子発現を定量的逆転写 PCR にて解析した。Pcdh7 を抑制した場合、*Mitf*、*Dcstamp*、*Ocstamp* および *Atp6v0d2* の発現が shLuc 群と比較して低下していた (図 7A)。一方、*Tnfrsf11a*、*Csf1r*、*Fos*、*Nfatc1*、*Prdm1*、*Irf8*、*Mafb*、*Ctsk*、*Clcn7* および *Acp5* の発現に変化は見られなかった (図 7A)。*Dcstamp*、*Ocstamp* 及び *Atp6v0d2* は破骨細胞の融合・多核化に関連する遺伝子であり、MITF は *Dcstamp* の発現を制御する転写因子であることが報告されていることから (19)、Pcdh7 は破骨細胞分化過程において、細胞融合に関与する分子である可能性が示唆された。

破骨細胞分化における細胞融合について明確に評価するために、イメージングサイトメーターを用いて新たな破骨細胞の分化・細胞融合の評価系を構築した(図 3A)。破骨細胞の含有する核数とその破骨細胞数をグラフ化することで、累乗曲線に極めてよく近似されることが明らかになった (shLuc 群 ; 近似曲線 $y=27922x^{-2.84}$ 相関係数 $R^2=0.996$ 、shPcdh7 群 ; $y=52532x^{-3.55}$ $R^2=0.987$)。このグラフから、核数の少ない破骨細胞数 (8 核以下) では、shLuc 群と shPcdh7 群間に有意差はないが、核数の多い破骨細胞数 (9 核以上) は shPcdh7 群で有意に低下していることが明らかになった (図

7B)。この結果は、Pcdh7 の機能低下が破骨細胞の多核化に抑制的に作用することを示しており、破骨細胞分化の過程において、Pcdh7 が細胞融合関連遺伝子の発現を促進することで細胞融合を制御する分子であると考えられた。

5. 考察

ヒストン修飾をはじめとしたエピジェネティックな修飾は、様々な細胞の分化の過程において遺伝子発現を制御している(40, 41)。破骨細胞分化においても、マスター転写因子である NFATc1 のプロモーターにおいてヒストン H3 の修飾パターンが H3K4me3(+)H3K27me3(+) の bivalent domain から H3K4me3(+)H3K27me3(-) の monovalent domain へと変化し、発現制御に関与している可能性が示されている (13)。本研究では、発現量が著しくは上昇していないため発現解析においては見出され難いが、破骨細胞分化において重要な遺伝子を同定するために、ヒストン修飾の変化に着目して候補遺伝子の絞り込みを行った。その結果、NFATc1 と同様のヒストン修飾制御を受ける Pcdh7 が破骨細胞分化過程において、細胞融合制御に関与していることが示唆された。Pcdh7 は腫瘍細胞への関連が報告されているが、破骨細胞への関与は知られていない。Pcdh7 は NFATc1 依存性に誘導され、DC-STAMP、OC-STAMP や Atp6v0d2 等、破骨細胞の細胞融合関連分子や DC-STAMP を制御している MITF の発現を制御することで細胞融合過程に関与し、破骨細胞分化を促進的に制御していると考えられた (図 9A)。

本研究では、ChIP シークエンスによる解析から、破骨細胞分化におけるマスター転写因子である NFATc1 と同様に、破骨細胞分化に伴ってプロモーター領域のヒストン修飾パターンが、H3K4me3(+)H3K27me3(+)から H3K4me3(+)H3K27me3(-)に変化する遺伝子を同定した (図 4B、C)。これらの遺伝子では、遺伝子発現の活性化に関与

する H3K4me3 は破骨前駆細胞の段階から既に修飾されており、抑制に働く H3K27me3 が脱メチル化を受けることにより遺伝子発現が活性化されている。このタイプのヒストン修飾の変化は、ES 細胞から神経幹細胞への分化誘導過程における分化関連遺伝子の発現制御でも重要性が報告されている (58, 59)。破骨細胞分化の過程での *Nfatc1* の H3K27 の脱メチル化は *Jmjd3* が担っていることが報告されているが (13)、*Pcdh7* における H3K27 の脱メチル化酵素はまだ明らかになっておらず、今後の研究課題であると考えられる。また、*Sigmar1*、*Slc11a2* の H3K27me3 のピークが破骨前駆細胞では転写開始領域や遺伝子座に合致しないことから候補遺伝子としては棄却したが、必ずしもそのことだけから重要な役割を果たしている可能性はないとは断定できない。*Tnfrsf11a*、*Csf1r*、*Mitf*、*Ctsk*、*Cln7*、*Acp5* などの破骨細胞関連遺伝子は、破骨前駆細胞では H3K4me3(+)H3K27me3(+)で修飾されておらず、全ての破骨細胞関連遺伝子が同じヒストン修飾の変化を生じているわけではないが、成熟破骨細胞では H3K4me3(+)H3K27me3(-)の修飾を受けていることから、H3K4me3 と H3K27me3 の修飾がこれらの遺伝子の発現にも重要な役割を果たしていると考えられる (図 8B)。

一方で、破骨細胞分化を抑制する *Irf8* や *Mafb* 等の遺伝子は、破骨前駆細胞で H3K4me3(+)H3K27me3(+)と、NFATc1 や *Pcdh7* と同じ修飾をとるが、成熟破骨細胞では H3K4me3(-)H3K27me3(+)と遺伝子発現が抑制される型の修飾に変化する (図 8C)。

前述の ES 細胞から神経幹細胞等への分化についての研究においても、同様の抑制性変化を示す遺伝子が報告されている (58, 59)。以上のことから、H3K4 と H3K27 のメ

チル化修飾の変化が、破骨細胞分化における遺伝子発現の経時的な制御においても重要な役割を果たしていることが示唆される。

細胞融合は、遊走、認識、接着及び膜の融合などの過程を経て生じ、そこには様々なシグナル経路が関わっている (18, 60)。前述のように、カドヘリンはカルシウム依存性の接着タンパクであり、構造の違いから、古典的カドヘリン、デスモソーマルカドヘリン、プロトカドヘリンなどに分類される (47, 48)。細胞融合に関与するカドヘリンとして、破骨細胞の E カドヘリンや、筋芽細胞の M カドヘリン、N カドヘリンなどが挙げられる (18, 48, 60)。破骨細胞における E カドヘリンや筋芽細胞における N カドヘリンは主に細胞接着の過程に関与しており、筋芽細胞における M カドヘリンは細胞接着の過程に加えシグナル伝達にも関与している (18, 60)。Pcdh7 はプロトカドヘリンファミリーに属しており、神経細胞や癌細胞で細胞接着や他の分子の制御因子として働くことが知られている (61, 62)。本研究から破骨細胞の細胞融合に機能する新規分子 Pcdh7 が同定され、細胞融合の関連遺伝子のシグナル伝達に関与していることが示唆された (図 9B)。

従来、破骨細胞の細胞融合の評価にはある核数以上の多核細胞の数や単位面積当たりの核数の合計など、視覚を基盤にした計測法が用いられてきた。しかし、その閾値となる核数の決定や解析の個人差など、多くの問題が存在することも事実である。免疫学的な解析の基盤となるフローサイトメトリー法では、特定の核数を持つ細胞の数を計測することは可能だが、多核の破骨細胞は細胞形態が大きすぎるため、その分析

は不可能である。本研究では、イメージングサイトメーターを用いた細胞融合の評価方法を新たに構築した。今後、この評価法が破骨細胞の分化研究に大きく貢献することが期待される。

近年、骨粗鬆症による骨脆弱性骨折が社会的な問題となってきた。骨粗鬆症に対する治療薬としては、カルシウム剤、ビタミン D 製剤、ビタミン K 製剤、選択的エストロゲン受容体モジュレーターや骨形成促進剤であるテリパラチド等多数あるが、最も多く用いられているのは骨吸収抑制剤である。骨吸収は主に巨大な多核細胞である破骨細胞によって担われており、破骨細胞による過剰な骨吸収は様々な疾患での骨量低下や骨破壊、骨折を生じさせる。骨吸収抑制剤は破骨細胞の分化、機能、生存能などを抑えることにより骨吸収を抑制する。現在用いられている骨吸収抑制剤としては、ビスホスホネート製剤、デノスマブがあり、カテプシン K 阻害剤も近く臨床で用いられることが予想される。破骨細胞の分化を抑制する RANKL 抗体であるデノスマブは破骨細胞による骨吸収を抑制する作用がある (63)。カテプシン K 阻害剤は破骨細胞の骨吸収能を阻害し、他の骨吸収阻害剤でみられる骨形成の抑制作用を持たない (64)。ビスホスホネート製剤は破骨細胞の活性化抑制およびアポトーシスの誘導を通じて骨吸収を抑制する (65)。これらの薬剤は関節リウマチによる骨量の低下や、腫瘍による骨破壊に対しても用いられている。

このように、破骨細胞分化や RANKL のシグナル伝達の制御機構を理解することは、破骨細胞による骨吸収を阻害し、様々な疾患から生じる骨量の減少を抑制する薬剤の

開発をすすめる基礎となってきた。しかし、現在の治療法では十分に骨量を維持することができない症例も存在し、また、非定型大腿骨骨折や顎骨壊死などの副作用も課題となっている。それらを克服し、よりよい治療法を開発するために、さらなる破骨細胞に関する理解、研究が必要とされている。今後、KO マウスを用いた *in vivo* の実験や疾患との関連性の検討、Pcdh7 の破骨細胞融合関連分子の制御における詳細なメカニズムの解明などが課題となるが、本研究において明らかになった破骨細胞分化におけるヒストン修飾の重要性と Pcdh7 の細胞融合への関与についての知見が、新たな治療法の開発への一助となることが期待される。

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なご指導を頂いた整形外科学教室の田中栄教授、免疫学教室の高柳広教授、東京医科歯科大学医歯学総合研究科分子情報伝達学教室の中島友紀准教授に心より感謝致します。加えて、共同研究をさせていただきました先端科学技術研究センターの油谷浩幸教授、整形外科学教室の安井哲郎先生、伊沢直広先生、分子情報伝達学教室の林幹人先生にも感謝の意を表します。また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた整形外科学教室、免疫学教室、東京医科歯科大学医歯学総合研究科の先生方、ありがとうございました。

「参考文献」

1. 厚生労働省. 平成 22 年国民生活基礎調査. 2010
2. Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends in Endocrinology and Metabolism*;23(11):582-590. 2012
3. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature Reviews: Immunology*;7(4):292-304. 2007
4. Ross FP, Teitelbaum SL. $\alpha_v\beta_3$ and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunological Reviews*;208:88-105. 2005
5. Cao H, Yu S, Yao Z, Galson DL, Jiang Y, Zhang X, Fan J, Lu B, Guan Y, Luo M, Lai Y, Zhu Y, Kurihara N, Patrene K, Roodman GD, Xiao G. Activating transcription factor 4 regulates osteoclast differentiation in mice. *Journal of Clinical Investigation*;120(8):2755-2766. 2010
6. Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S, Nishita M, Marumo K, Martin TJ, Minami Y, Takahashi N. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nature Medicine*;18(3):405-412. 2012
7. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N,

Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*;95(7):3597-3602. 1998

8. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*;93(2):165-176. 1998

9. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*;397(6717):315-323. 1999

10. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*;17(10):1231-1234. 2011

11. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nature Medicine*;17(10):1235-1241.

2011

12. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, Tanaka S, Bluestone JA, Takayanagi H. Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into T_H17 cells in autoimmune arthritis. *Nature Medicine*;20(1):62-68. 2014

13. 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*. *Journal of Bone and Mineral Research*;26(11):2665-2671. 2011

14. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Developmental Cell*;3(6):889-901. 2002

15. Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, Morita I, Wagner EF, Mak TW, Serfling E, Takayanagi H. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *Journal of Experimental Medicine*;202(9):1261-1269.

2005

16. Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, Takayanagi H, Takai T. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature*;428(6984):758-763.

2004

17. Sato K, Suematsu A, Nakashima T, Takemoto-Kimura S, Aoki K, Morishita Y, Asahara H, Ohya K, Yamaguchi A, Takai T, Kodama T, Chatila TA, Bito H, Takayanagi H. Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway. *Nature Medicine*;12(12):1410-1416. 2006
18. Oursler MJ. Recent advances in understanding the mechanisms of osteoclast precursor fusion. *Journal of Cellular Biochemistry*;110(5):1058-1062. 2010
19. Courtial N, Smink JJ, Kuvardina ON, Leutz A, Gothert JR, Lausen J. Tall regulates osteoclast differentiation through suppression of the master regulator of cell fusion *DC-STAMP*. *FASEB Journal*;26(2):523-532. 2012
20. Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y, Suda T. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *Journal of Experimental Medicine*;202(3):345-351. 2005
21. Miyamoto H, Suzuki T, Miyauchi Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Hoshi H, Hashimoto K, Yoshida S, Hao W, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Takeya M, Toyama Y, Miyamoto T. 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(6):1289-1297. 2012

22. Lee SH, Rho J, Jeong D, Sul JY, Kim T, Kim N, Kang JS, Miyamoto T, Suda T, Lee SK, Pignolo RJ, Koczon-Jaremko B, Lorenzo J, Choi Y. v-ATPase V₀ subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nature Medicine*;12(12):1403-1409. 2006
23. Zhao B, Takami M, Yamada A, Wang X, Koga T, Hu X, Tamura T, Ozato K, Choi Y, Ivashkiv LB, Takayanagi H, Kamijo R. Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nature Medicine*;15(9):1066-1071. 2009
24. Kim K, Kim JH, Lee J, Jin HM, Kook H, Kim KK, Lee SY, Kim N. MafB negatively regulates RANKL-mediated osteoclast differentiation. *Blood*;109(8):3253-3259. 2007
25. Miyauchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, Sakamoto A, Iwasaki R, Hoshi H, Miyamoto K, Hao W, Yoshida S, Morioka H, Chiba K, Kato S, Tokuhisa T, Saitou M, Toyama Y, Suda T, Miyamoto T. The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis. *Journal of Experimental Medicine*;207(4):751-762. 2010
26. Nishikawa K, Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kato S, Kodama T, Takahashi S, Calame K, Takayanagi H. 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(7):3117-3122. 2010

27. Teitelbaum SL. The osteoclast and its unique cytoskeleton. *Annals of the New York Academy of Sciences*;1240:14-17. 2011
28. Zhao H, Laitala-Leinonen T, Parikka V, Vaananen HK. Downregulation of small GTPase Rab7 impairs osteoclast polarization and bone resorption. *Journal of Biological Chemistry*;276(42):39295-39302. 2001
29. Van Wesenbeeck L, Odgren PR, Coxon FP, Frattini A, Moens P, Perdu B, MacKay CA, Van Hul E, Timmermans JP, Vanhoenacker F, Jacobs R, Peruzzi B, Teti A, Helfrich MH, Rogers MJ, Villa A, Van Hul W. Involvement of PLEKHM1 in osteoclastic vesicular transport and osteopetrosis in incisors absent rats and humans. *Journal of Clinical Investigation*;117(4):919-930. 2007
30. Zhu CH, Morse LR, Battaglini RA. SNX10 is required for osteoclast formation and resorption activity. *Journal of Cellular Biochemistry*;113(5):1608-1615. 2012
31. Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nature Reviews: Endocrinology*;9(9):522-536. 2013
32. Lee BS, Gluck SL, Holliday LS. Interaction between vacuolar H⁺-ATPase and microfilaments during osteoclast activation. *Journal of Biological Chemistry*;274(41):29164-29171. 1999
33. Weinert S, Jabs S, Supanchart C, Schweizer M, Gimber N, Richter M, Rademann J,

Stauber T, Kornak U, Jentsch TJ. Lysosomal pathology and osteopetrosis upon loss of H^+ -driven lysosomal Cl^- accumulation. *Science*;328(5984):1401-1403. 2010

34. Lagasse E, Weissman IL. Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell*;89(7):1021-1031. 1997

35. Iwasawa M, Miyazaki T, Nagase Y, Akiyama T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Yasui T, Matsumoto T, Nakamura T, Kato S, Hennighausen L, Nakamura K, Tanaka S. The antiapoptotic protein Bcl-xL negatively regulates the bone-resorbing activity of osteoclasts in mice. *Journal of Clinical Investigation*;119(10):3149-3159. 2009

36. Masuda H, Hirose J, Omata Y, Tokuyama N, Yasui T, Kadono Y, Miyazaki T, Tanaka S. Anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 regulates cell viability and bone-resorbing activity of osteoclasts. *Bone*;58:1-10. 2014

37. Akiyama T, Bouillet P, Miyazaki T, Kadono Y, Chikuda H, Chung UI, Fukuda A, Hikita A, Seto H, Okada T, Inaba T, Sanjay A, Baron R, Kawaguchi H, Oda H, Nakamura K, Strasser A, Tanaka S. Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *EMBO Journal*;22(24):6653-6664. 2003

38. Idrus E, Nakashima T, Wang L, Hayashi M, Okamoto K, Kodama T, Tanaka N, Taniguchi T, Takayanagi H. The role of the BH3-only protein Noxa in bone homeostasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*;410(3):620-625. 2011

39. Hayashi M, Nakashima T, Taniguchi M, Kodama T, Kumanogoh A, Takayanagi H.

Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature*;485(7396):69-74. 2012

40. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape.

Cell;128(4):635-638. 2007

41. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome.

Cell;128(4):669-681. 2007

42. Pray-Grant MG, Daniel JA, Schieltz D, Yates JR, 3rd, Grant PA. Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation.

Nature;433(7024):434-438. 2005

43. Santos-Rosa H, Schneider R, Bernstein BE, Karabetsou N, Morillon A, Weise C, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. Methylation of histone H3 K4 mediates association of

the Isw1p ATPase with chromatin. *Molecular Cell*;12(5):1325-1332. 2003

44. Francis NJ, Kingston RE, Woodcock CL. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science*;306(5701):1574-1577. 2004

45. Ringrose L, Ehret H, Paro R. Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes. *Molecular Cell*;16(4):641-653.

2004

46. Yoshida C, Takeichi M. Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell*;28(2):217-224.

1982

47. Halbleib JM, Nelson WJ. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes and Development*;20(23):3199-3214. 2006
48. Mbalaviele G, Chen H, Boyce BF, Mundy GR, Yoneda T. The role of cadherin in the generation of multinucleated osteoclasts from mononuclear precursors in murine marrow. *Journal of Clinical Investigation*;95(6):2757-2765. 1995
49. Mbalaviele G, Nishimura R, Myoi A, Niewolna M, Reddy SV, Chen D, Feng J, Roodman D, Mundy GR, Yoneda T. Cadherin-6 mediates the heterotypic interactions between the hemopoietic osteoclast cell lineage and stromal cells in a murine model of osteoclast differentiation. *Journal of Cell Biology*;141(6):1467-1476. 1998
50. Shin CS, Her SJ, Kim JA, Kim DH, Kim SW, Kim SY, Kim HS, Park KH, Kim JG, Kitazawa R, Cheng SL, Civitelli R. Dominant negative N-cadherin inhibits osteoclast differentiation by interfering with beta-catenin regulation of RANKL, independent of cell-cell adhesion. *Journal of Bone and Mineral Research*;20(12):2200-2212. 2005
51. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Liu XS. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biology*;9(9):R137. 2008
52. Hada N, Okayasu M, Ito J, Nakayachi M, Hayashida C, Kaneda T, Uchida N, Muramatsu T, Koike C, Masuhara M, Sato T, Hakeda Y. Receptor activator of NF- κ B ligand-dependent expression of caveolin-1 in osteoclast precursors, and high dependency of

osteoclastogenesis on exogenous lipoprotein. *Bone*;50(1):226-236. 2012

53. Iwai K, Ishii M, Ohshima S, Miyatake K, Saeki Y. Expression and function of transmembrane-4 superfamily (tetraspanin) proteins in osteoclasts: reciprocal roles of Tspan-5 and NET-6 during osteoclastogenesis. *Allergol Int*;56(4):457-463. 2007

54. Birnbaum RS, Howard GA, Roos BA. Ontogeny of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase activity in rapidly mineralizing bone from neonatal mouse. *Endocrinology*;124(6):3134-3136. 1989

55. Kelly T, Suva LJ, Nicks KM, MacLeod V, Sanderson RD. Tumor-derived syndecan-1 mediates distal cross-talk with bone that enhances osteoclastogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*;25(6):1295-1304. 2010

56. Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, Takayanagi H. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nature Medicine*;17(11):1473-1480. 2011

57. Ishii KA, Fumoto T, Iwai K, Takeshita S, Ito M, Shimohata N, Aburatani H, Taketani S, Lelliott CJ, Vidal-Puig A, Ikeda K. Coordination of PGC-1 β and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. *Nature Medicine*;15(3):259-266. 2009

58. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells.

Cell;125(2):315-326. 2006

59. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*;448(7153):553-560. 2007

60. Abmayr SM, Pavlath GK. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development*;139(4):641-656. 2012

61. Yoshida K, Yoshitomo-Nakagawa K, Seki N, Sasaki M, Sugano S. Cloning, expression analysis, and chromosomal localization of BH-protocadherin (PCDH7), a novel member of the cadherin superfamily. *Genomics*;49(3):458-461. 1998

62. Kim SY, Yasuda S, Tanaka H, Yamagata K, Kim H. Non-clustered protocadherin. *Cell Adh Migr*;5(2):97-105. 2011

63. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, Kutilek S, Adami S, Zanchetta J, Libanati C, Siddhanti S, Christiansen C. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *New England Journal of Medicine*;361(8):756-765. 2009

64. Duong le T. Therapeutic inhibition of cathepsin K-reducing bone resorption while maintaining bone formation. *Bonekey Rep*;1:67. 2012

65. Xu XL, Gou WL, Wang AY, Wang Y, Guo QY, Lu Q, Lu SB, Peng J. Basic research and clinical applications of bisphosphonates in bone disease: what have we learned over the last 40 years? *Journal of Translational Medicine*;11:303. 2013

表 1 定量的逆転写 PCR に使用したプライマー配列

遺伝子名	Forward配列	Reverse配列
Cd97	GCCACGGTCAACTACACCAT	GGCAGCTACTTGTTGGGTTT
Pcdh7	CTACCACCAGCCAACACATTT	TGTATGGATGTACACGCATCTG
Tnfrsf11a	GTGCTGCTCGTTCCACTG	AGATGCTCATAATGCCTCTCCT
Csf1r	CGAGGGAGACTCCAGCTACA	GACTGGAGAAGCCACTGTCC
Fos	GGGACAGCCTTTCCTACTACC	GATCTGCGCAAAGTCCTGT
Nfatc1	TCCAAAGTCATTTTCGTGGA	CTTTGCTTCCATCTCCCAGA
Prdm1	GGCTCCACTACCCTTATCCTG	TTTGGGTTGCTTTCCGTTT
Irf8	GAGCCAGATCCTCCCTGACT	GGCATATCCGGTCACCAGT
Mafb	GCAGGTATAAACGCGTCCAG	TGAATGAGCTGCGTCTTCTC
Mitf	GCAGAGCAGGGCAGAGAGT	CATCAATTACATCATCCATCTGC
Ctsk	CGAAAAGAGCCTAGCGAACA	TGGGTAGCAGCAGAAACTTG
Cln7	CCTGTGGTGGAGGATGTAGG	ATAAGCTGGGAACGCAGGAT
Acp5	CGTCTCTGCACAGATTGCAT	AAGCGCAAACGGTAGTAAGG
Dstamp	AAGCTCCTTGAGAAACGATCA	CAGGACTGGAAACCAGAAATG
Ocstamp	AGCCCAGCCTAAGTTGTCAC	AGTAGCCCCAGCCTTAGGAG
Atp6v0d2	AAGCCTTTGTTTGACGCTGT	GCCAGCACATTCATCTGTACC
Gapdh	CATGGCCTTCCGTGTTTCTA	GCGGCACGTCAGATCCA

表 2 shRNA に用いた標的配列

	標的配列
shCd97-1	5'-GATTCCGAGTGTCTCACTTAA-3'
shCd97-2	5'-GCGTCTGTAACCTGGGATATA-3'
shPcdh7-1	5'-ACGTTCCCTCCATCGAAATTC-3'
shPcdh7-2	5'-CCAGTTGAGATTCACAGTAAT-3'

図1 骨吸収と骨形成により維持される骨の恒常性

A 正常な骨で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維持されている。

B 骨吸収が骨形成に対して優位になると骨量の低下を生じる。

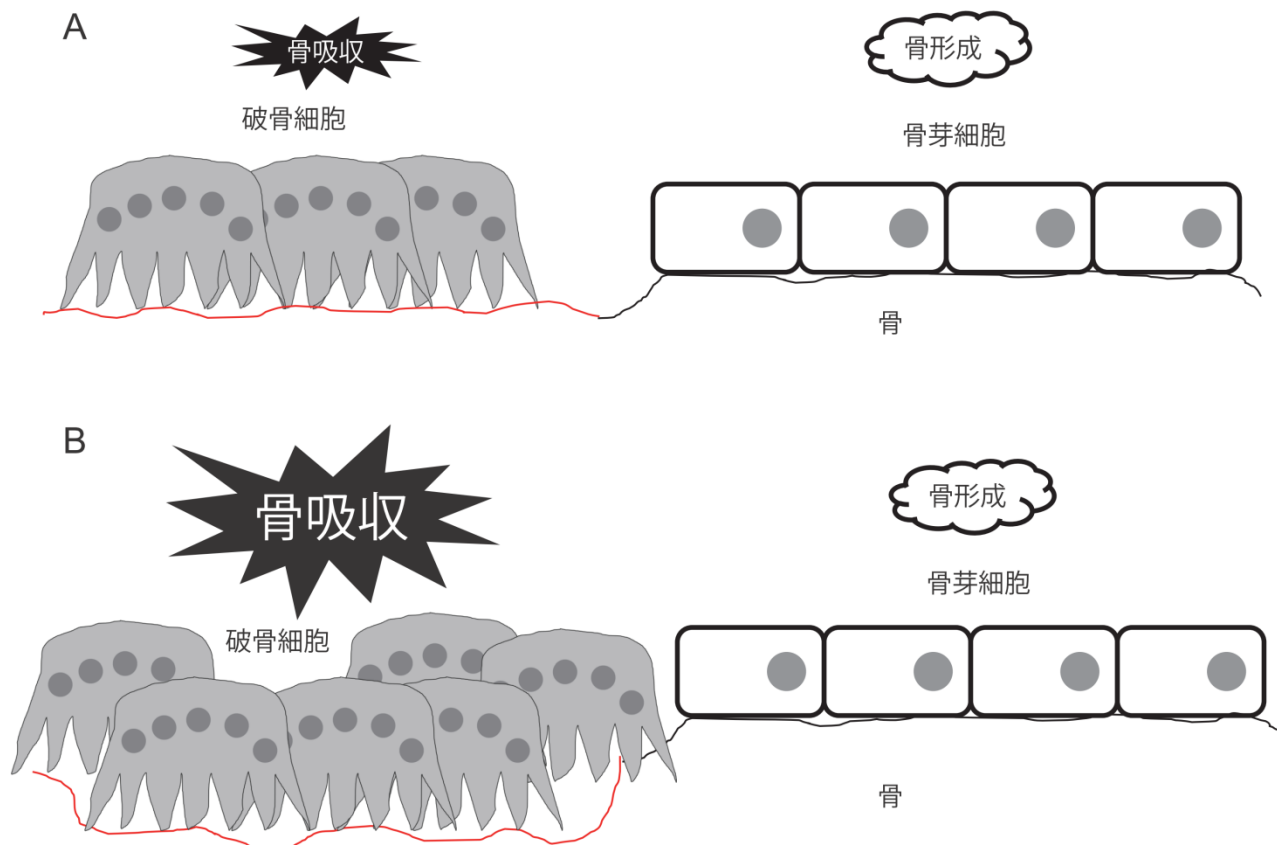
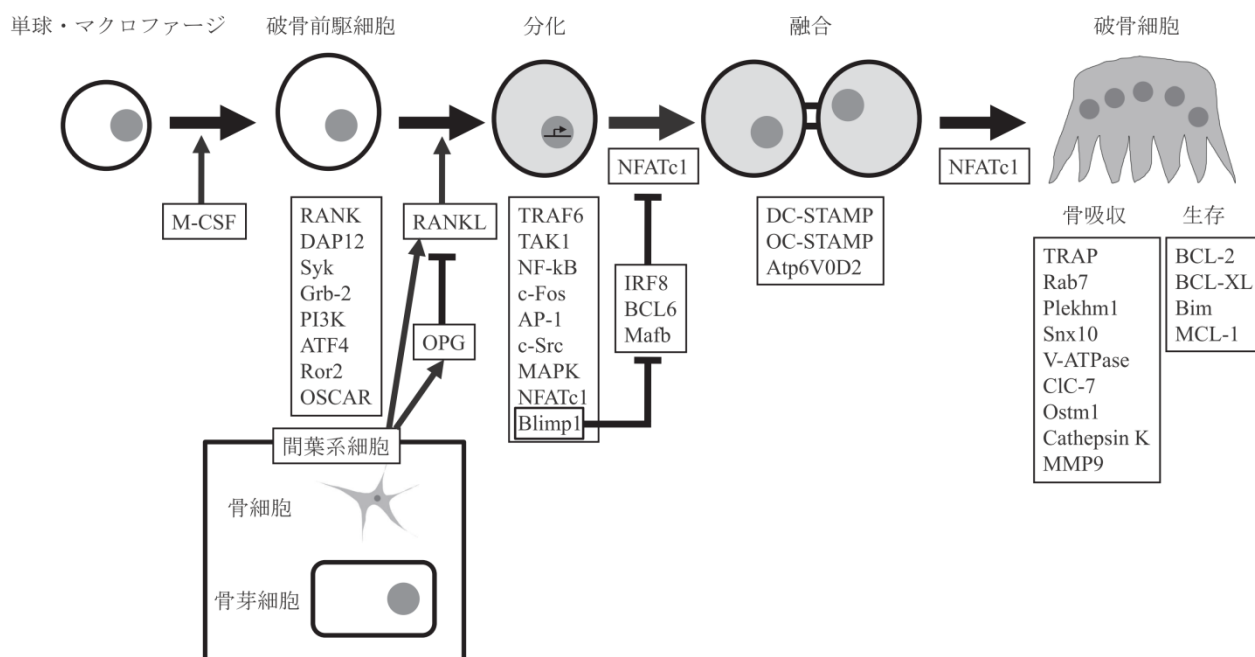


図2 破骨細胞の分化と活性化に関する遺伝子

単球・マクロファージ系の細胞から M-CSF、RANKL 刺激により細胞融合を経て巨大で多核な細胞へと分化し、骨吸収活性をもつ。



単球・マクロファージ系
破骨前駆細胞

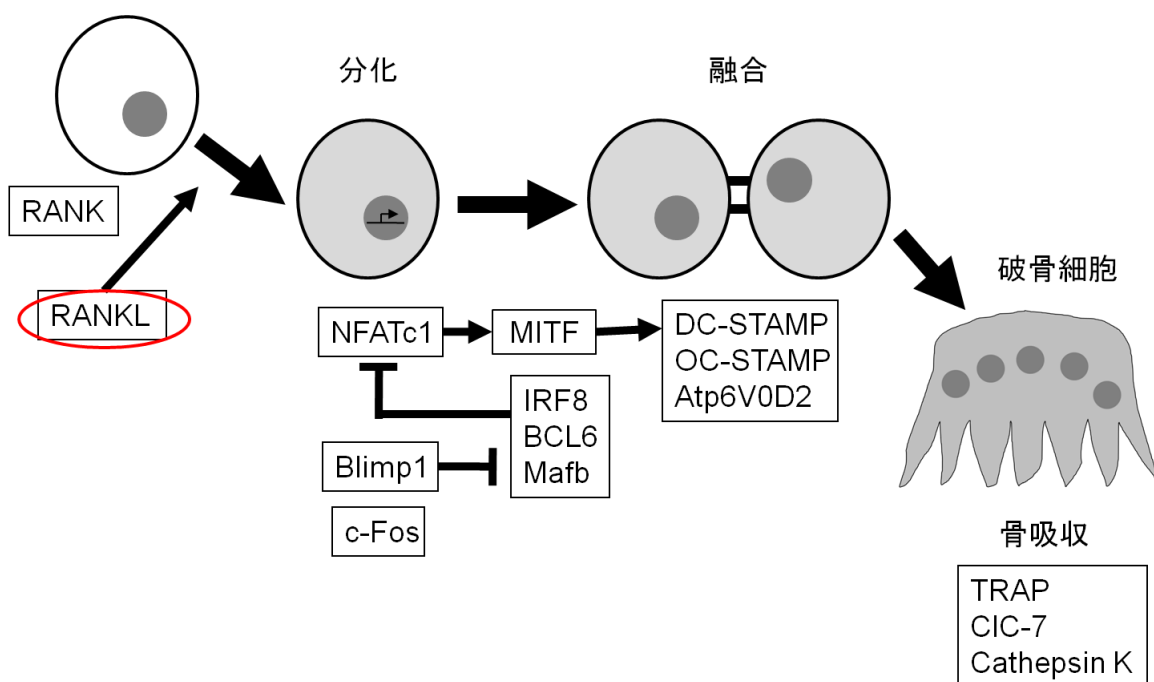
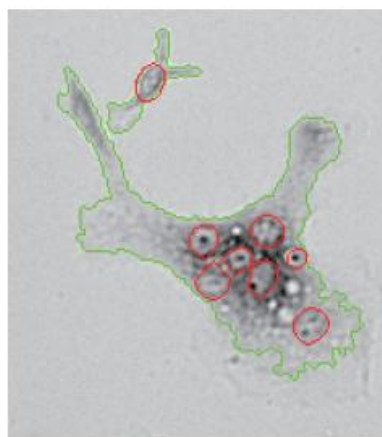
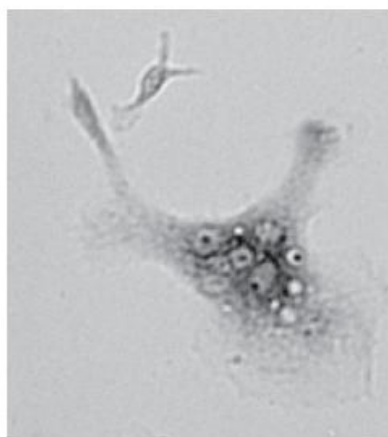


図 3A イメージングサイトメーターと TRAP、核、細胞膜染色の認識

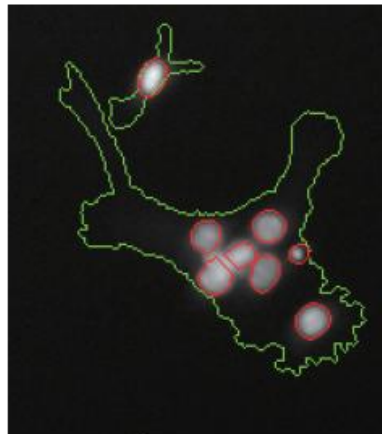


イメージングサイトメーター

TRAP



Hoechst



Cell mask

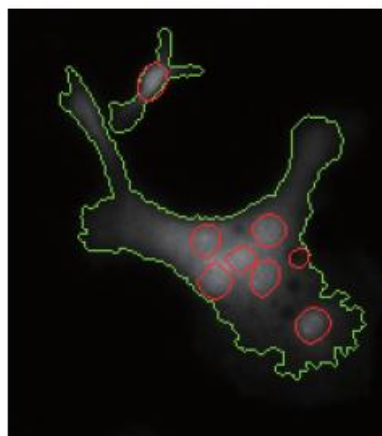
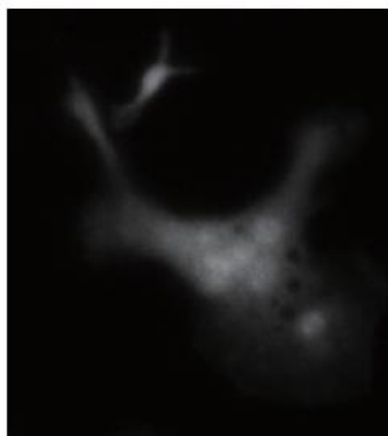


図 3B シクロスポリン A の作用機序

単球・マクロファージ系
破骨前駆細胞

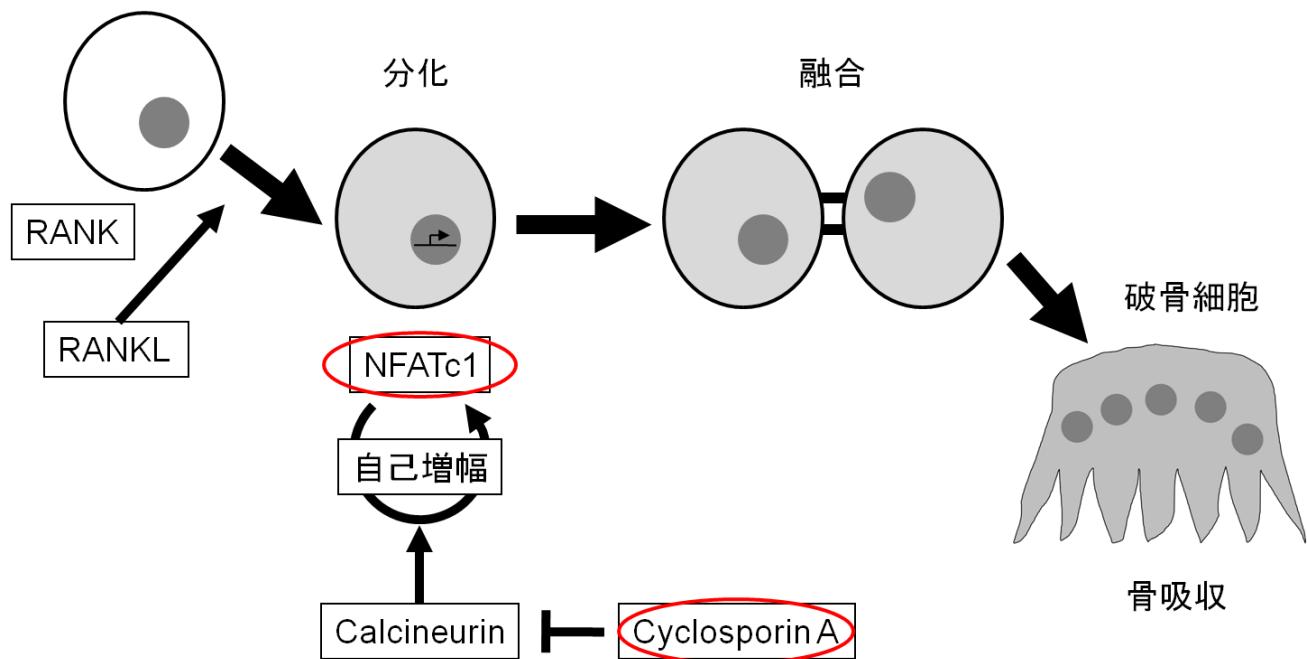


図4 ChIP シークエンスを用いた破骨細胞分化における H3K4me3 と H3K27me3 の修飾変化

A ヒストン修飾部位と遺伝子の位置関係。H3K4me3 と H3K27me3 のピーク位置と遺伝子座や転写開始領域との位置関係。TSS ; transcription start sites(転写開始領域)

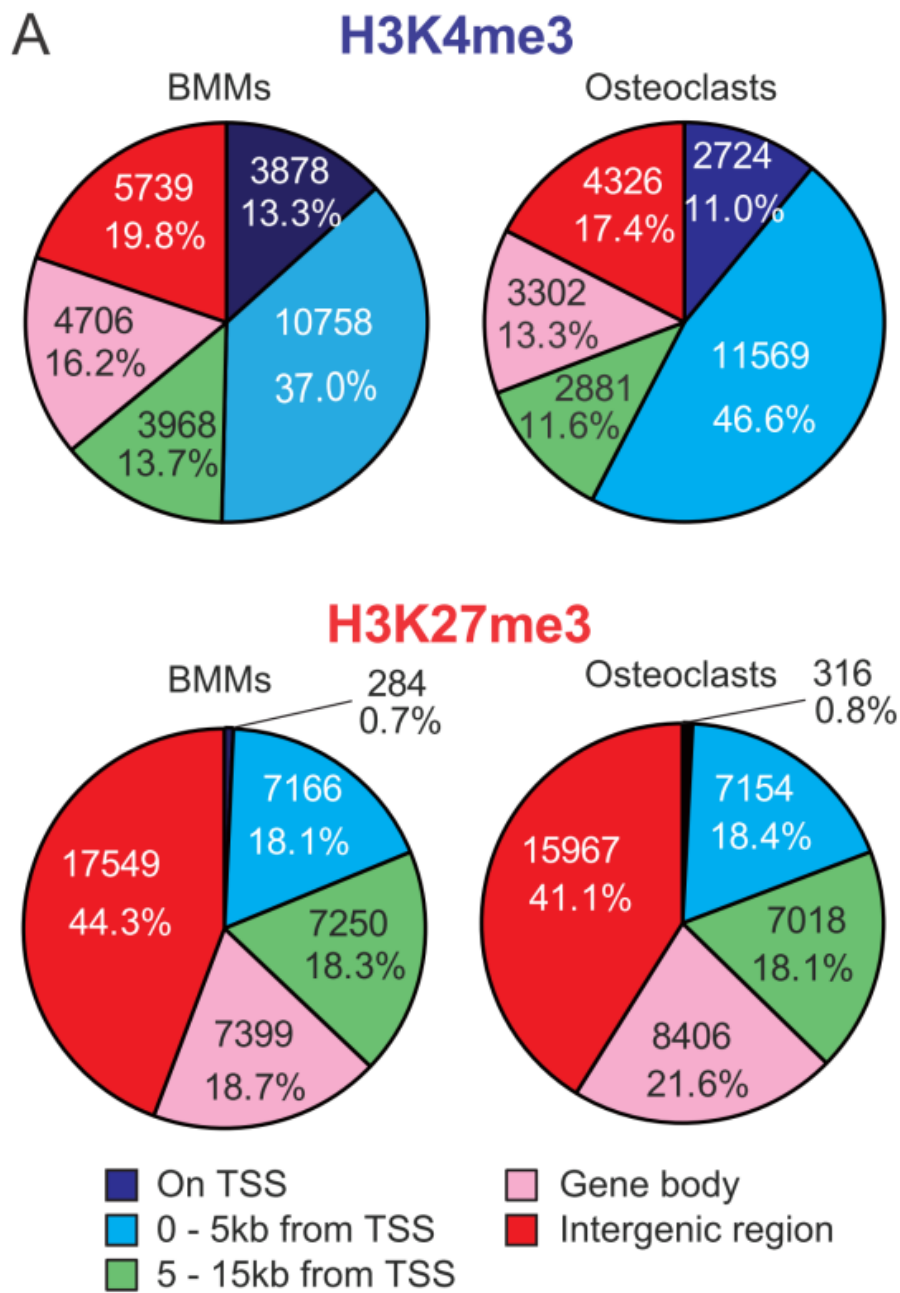


図 4

B ChIP シーケンスと RNA シーケンスを用いた破骨細胞分化のヒストン修飾により制御される遺伝子のプロファイリング。

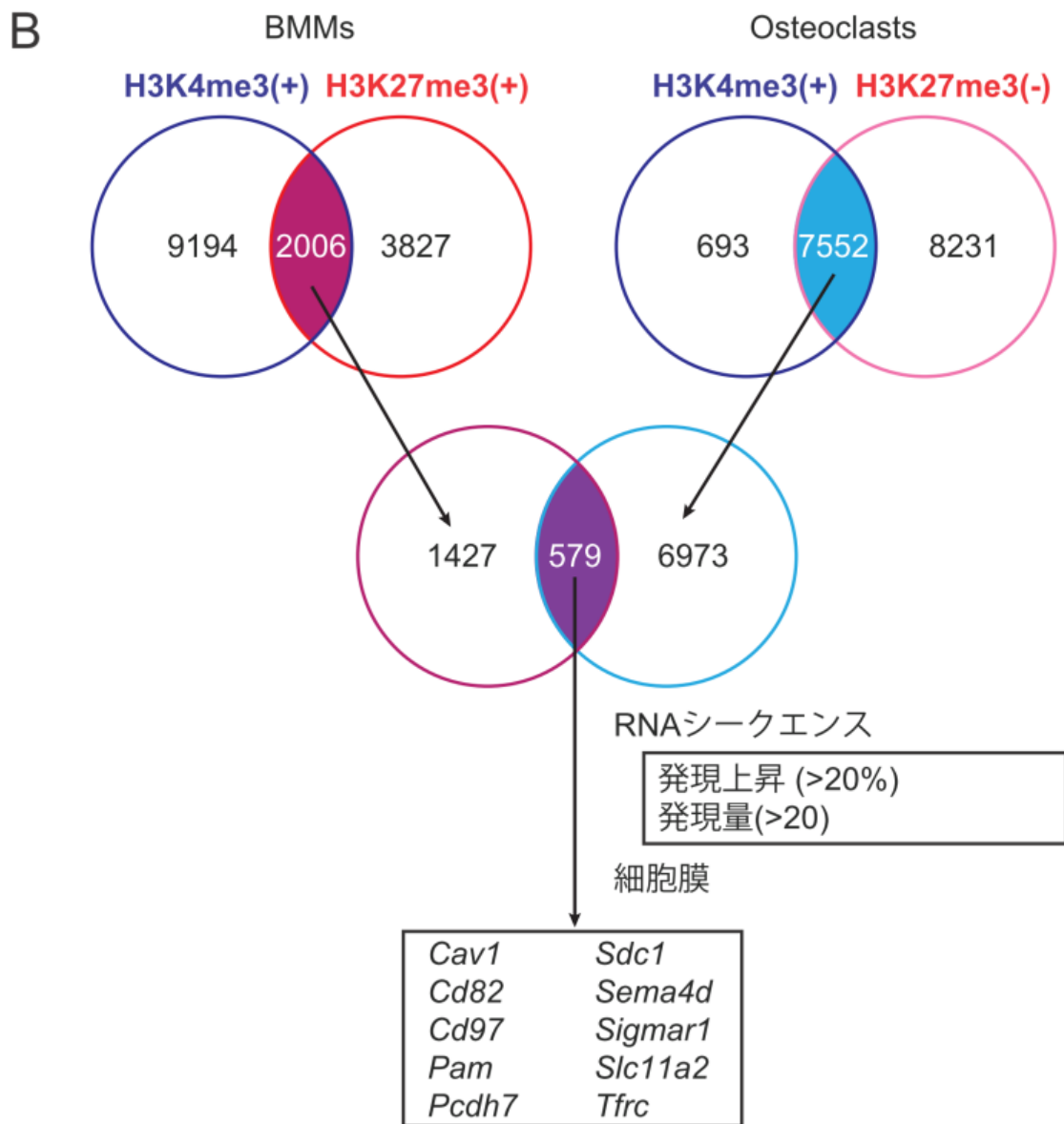


図 4

C ヒストン修飾の準備状態から活性型への変化の概念図。破骨前駆細胞では H3K4me3(+)/H3K27me3(+) で修飾されているが、破骨細胞では H3K4me3(+)/H3K27me3(-) に変化。

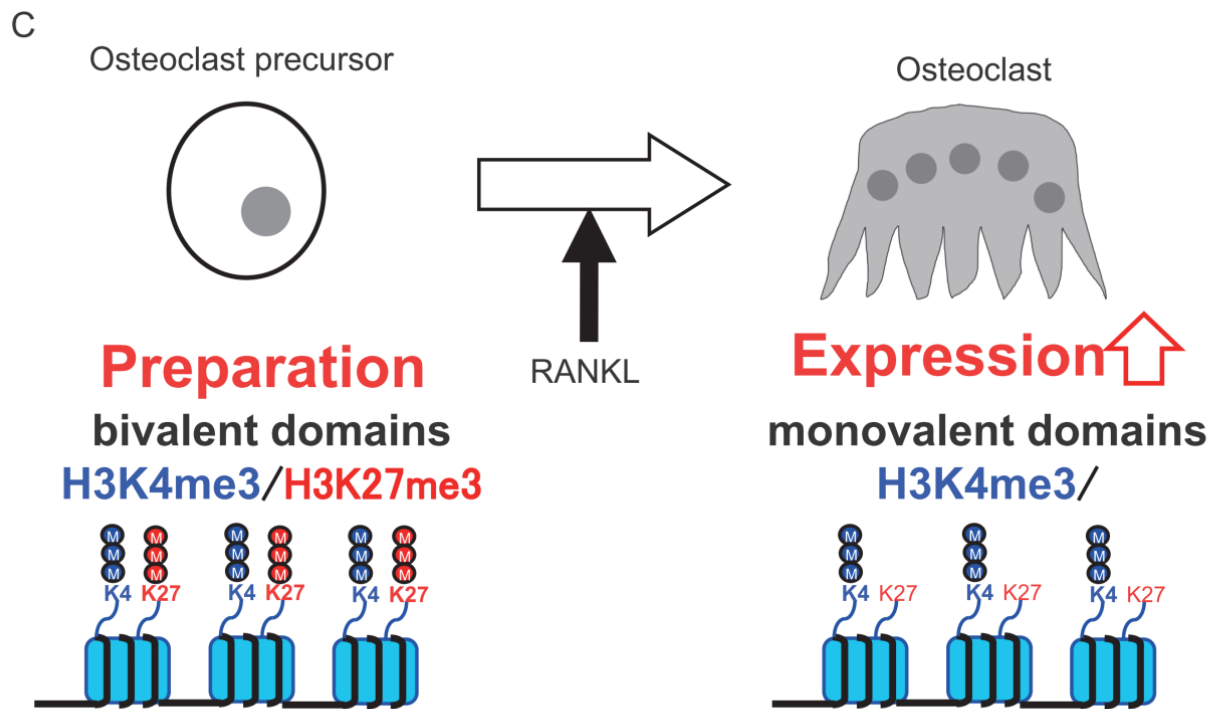


図 5 破骨細胞分化の過程でエピジェネティックな変化により制御される候補遺伝子の同定

A 候補遺伝子と *Nfatc1* の転写開始領域付近の H3K4me3 と H3K27me3 に対する ChIP シークエンス。

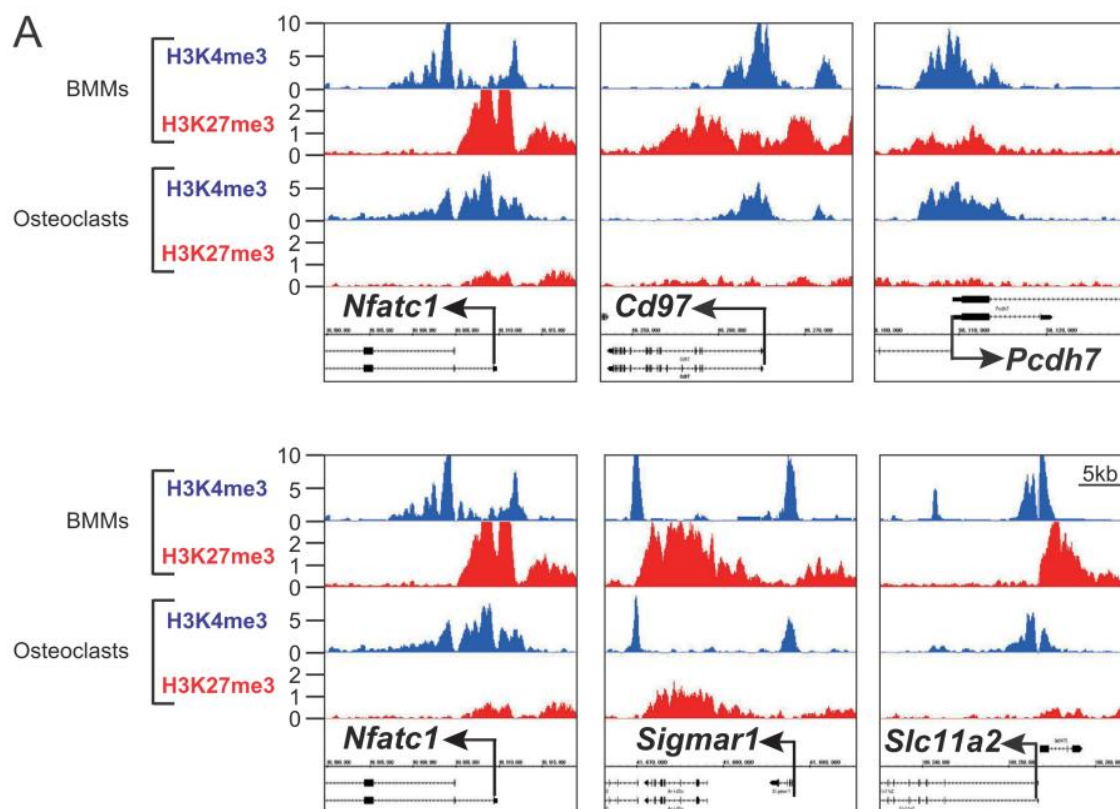


図 5

B 破骨細胞分化の過程における *Nfatc1*、*Cd97* 及び *Pcdh7* の mRNA の発現推移。有意差検定はすべて day0 と比較。

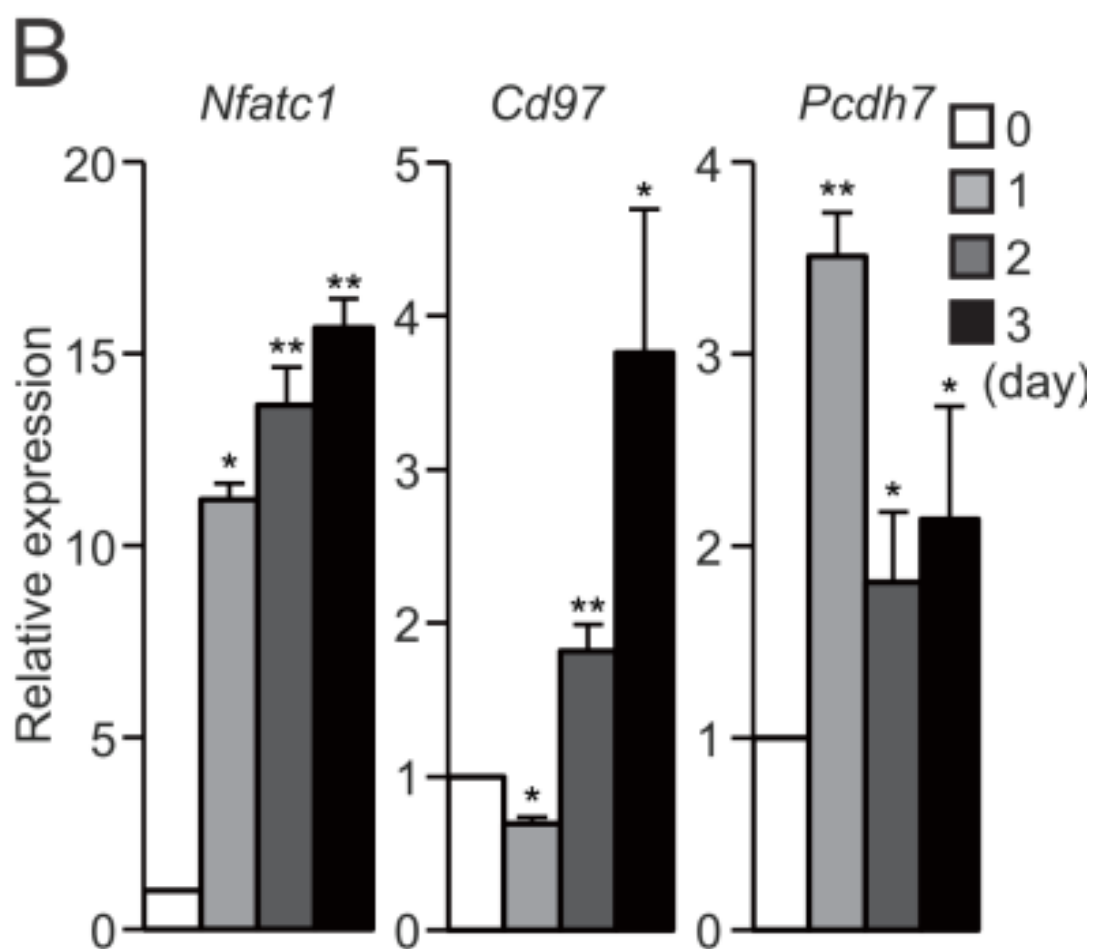


図 5

C シクロスポリン A (CsA) の破骨細胞分化への影響。

D 破骨細胞分化の過程でシクロスポリン A を投与した時の *Nfatc1*、*Cd97* 及び *Pcdh7* の mRNA の発現量の変化。day3 で比較。Control ; DMSO のみ投与群

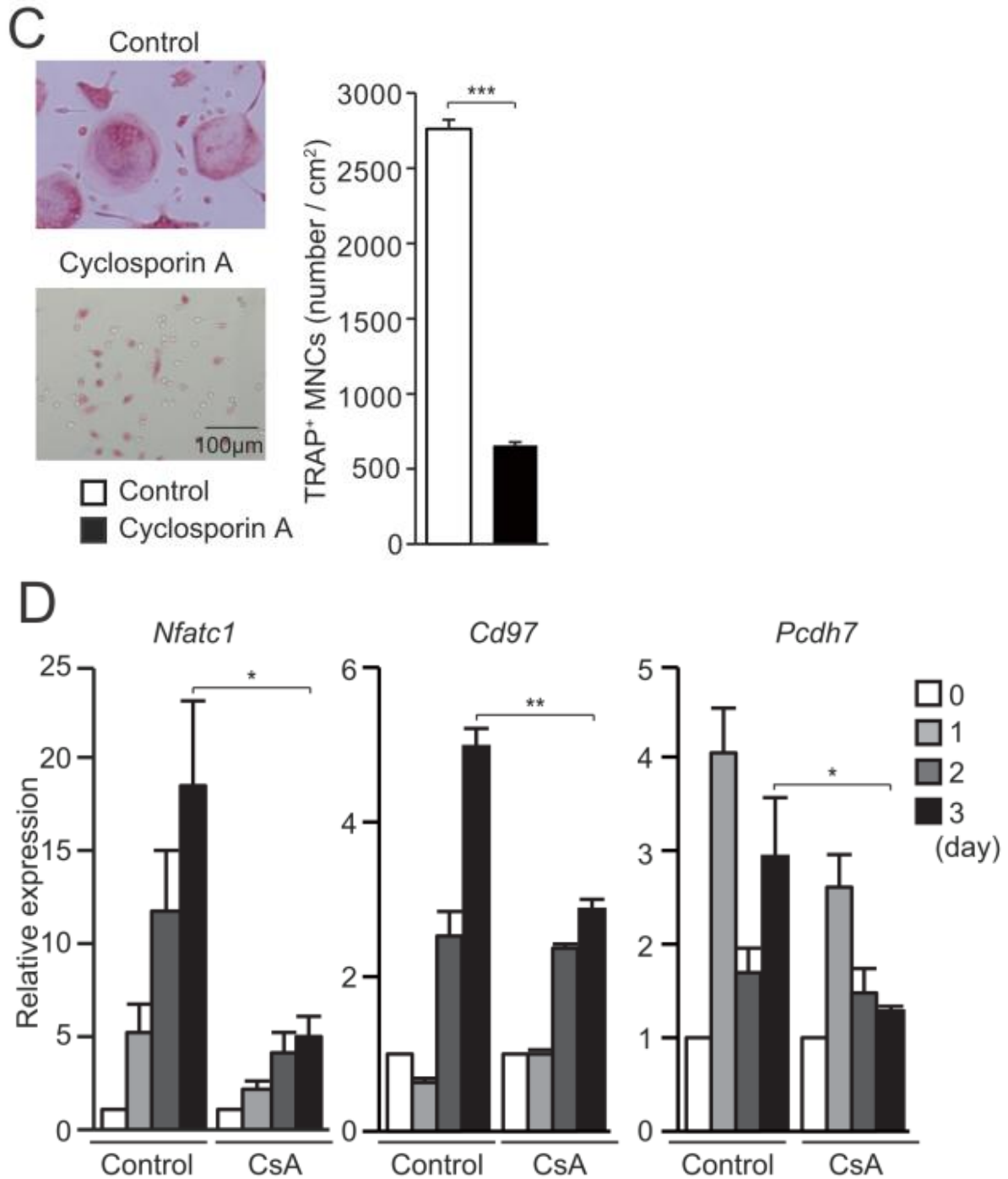


図6 CD97とPcdh7のノックダウンによる破骨細胞分化と骨吸収への影響。

A *in vitro*での破骨細胞培養とレトロウイルス感染プロトコル。

B 骨髄細胞にレトロウイルスを感染させてM-CSF及びRANKL刺激下で培養後の位相差顕微鏡写真と蛍光顕微鏡写真。レトロウイルスが感染した細胞はZsreenを発現し緑色の蛍光を放つ。Control ; shLuc

C shRNAを用いたCD97とPcdh7のノックダウンの系でのCd97、Pcdh7のshLuc群に対するmRNAの発現比。Control ; shLuc

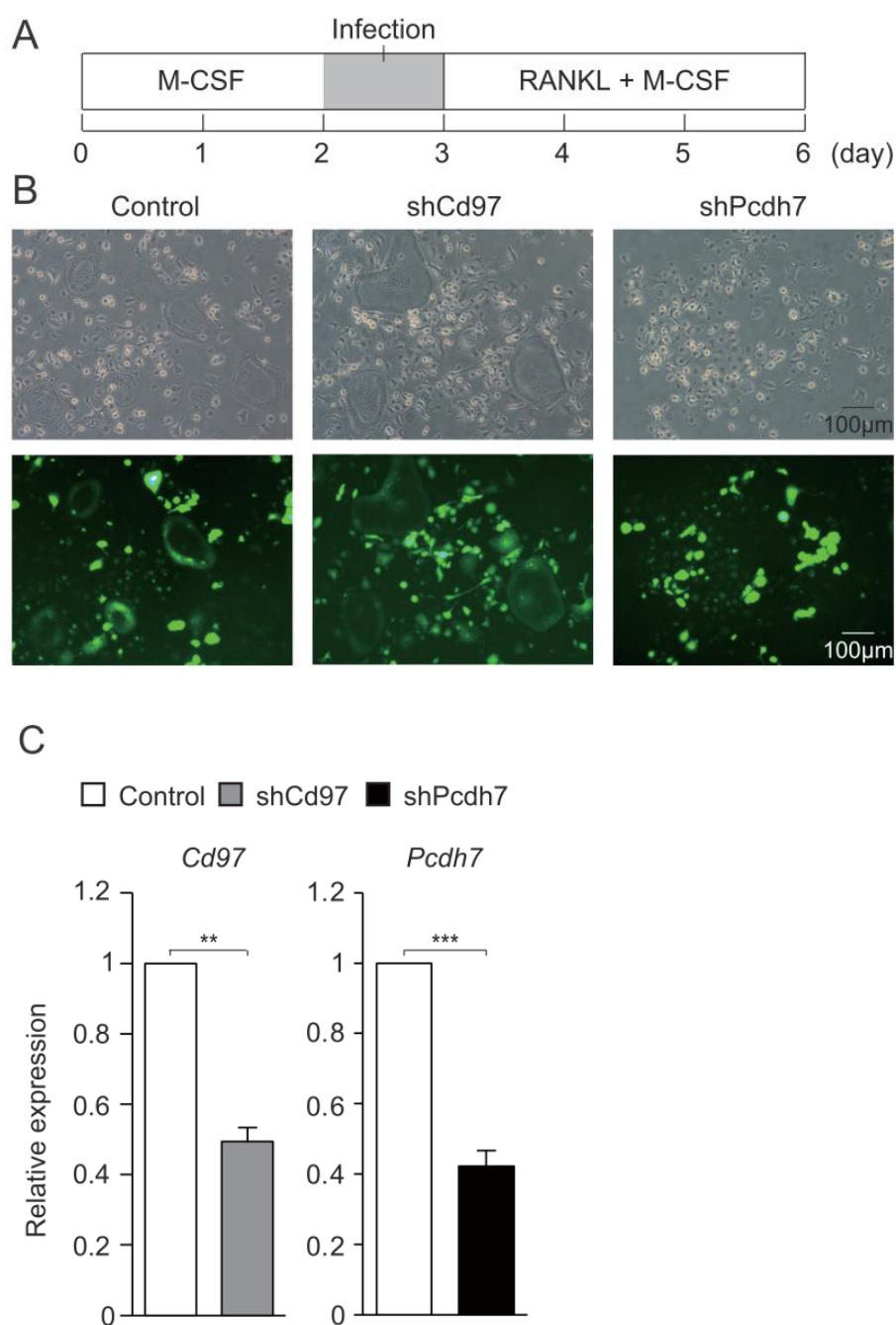


図 6

D 破骨細胞分化に対する Cd97 と Pcdh7 のノックダウンの効果。

E 破骨細胞による骨吸収活性に対する Cd97 と Pcdh7 のノックダウンの効果。

Control ; shLuc

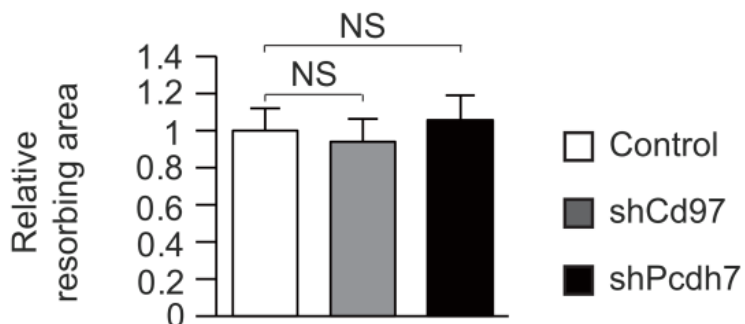
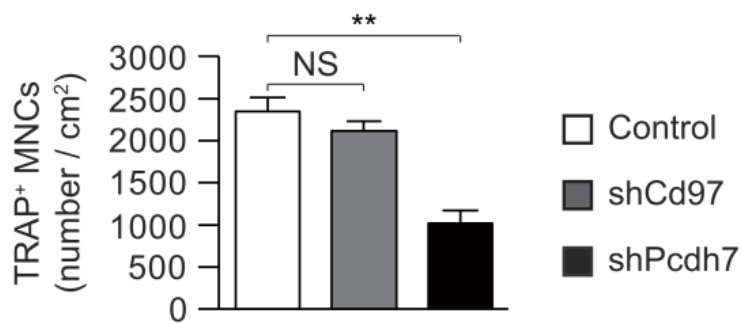
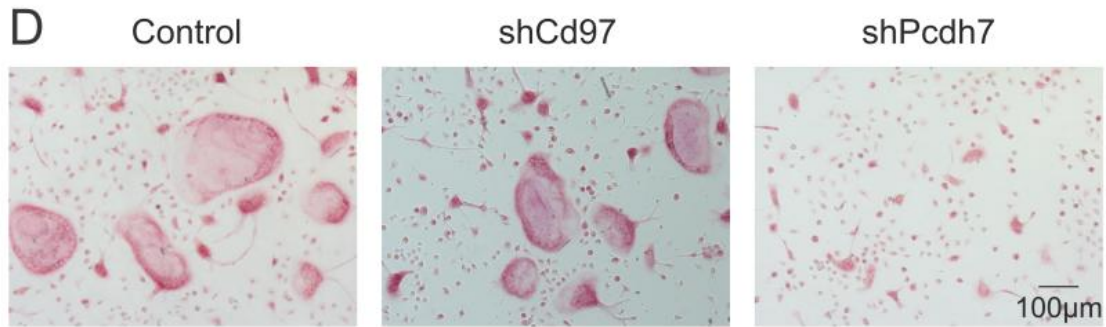


図7 破骨細胞分化における *Pcdh7* のノックダウンによる遺伝子発現の変化

A *Pcdh7* のノックダウンによる破骨細胞関連遺伝子の発現量の変化。shLuc 群の day3 と sh*Pcdh7* 群の day3 を比較。Control ; shLuc

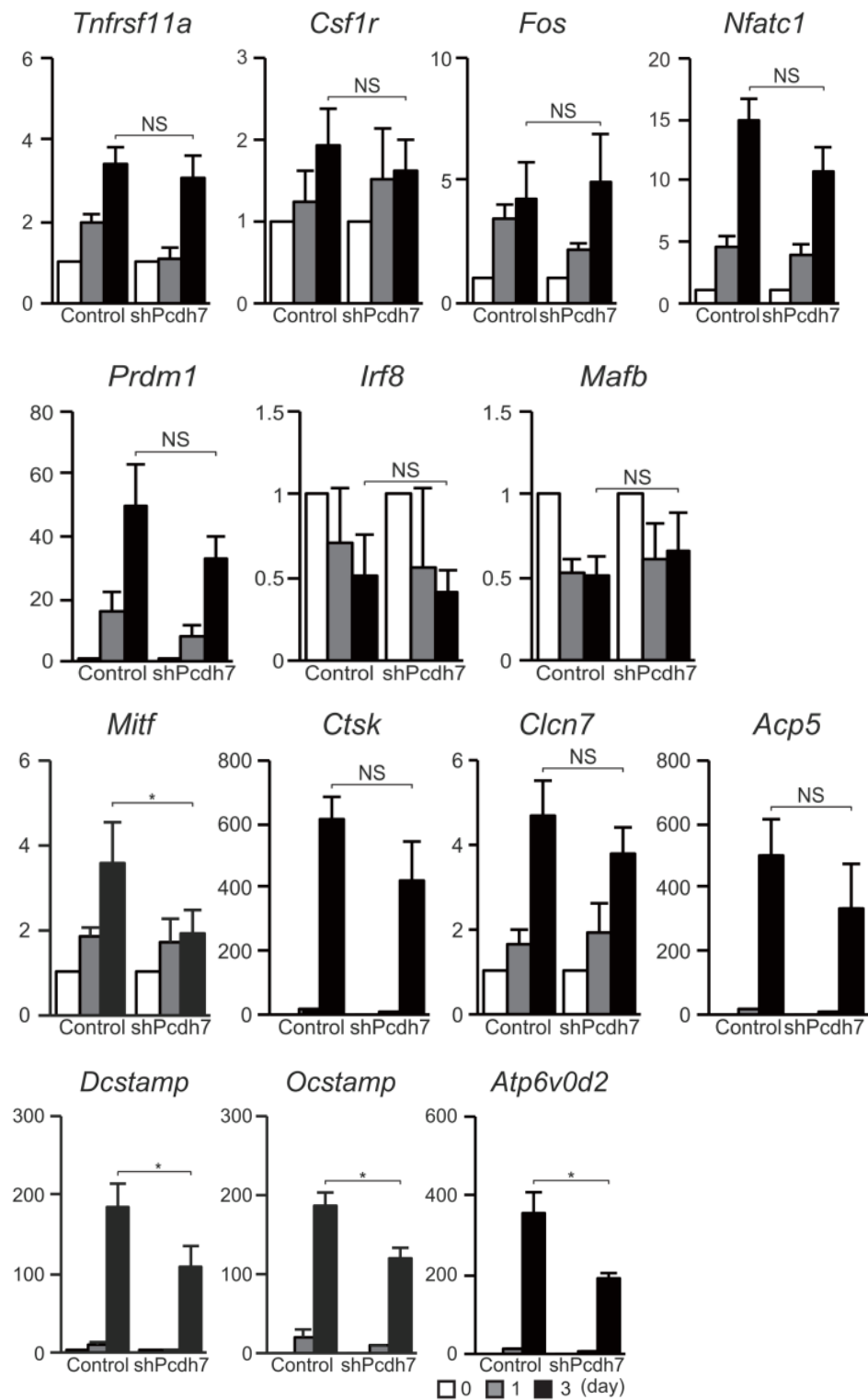


図 7

B shLuc 群と Pcdh7 のノックダウン群における破骨細胞の融合のイメージングサイトメーターを用いた評価。X 軸はそれぞれの細胞内の核数。Y 軸はその核数を含む細胞の数。shLuc 群と Pcdh7 それぞれの累乗近似曲線を作成。対数変換後、Two-way ANOVA 及び Bonferroni テストを用いて shLuc 群と shPcdh7 群を比較し有意差検定を実施 (n=4)。Control ; shLuc

B

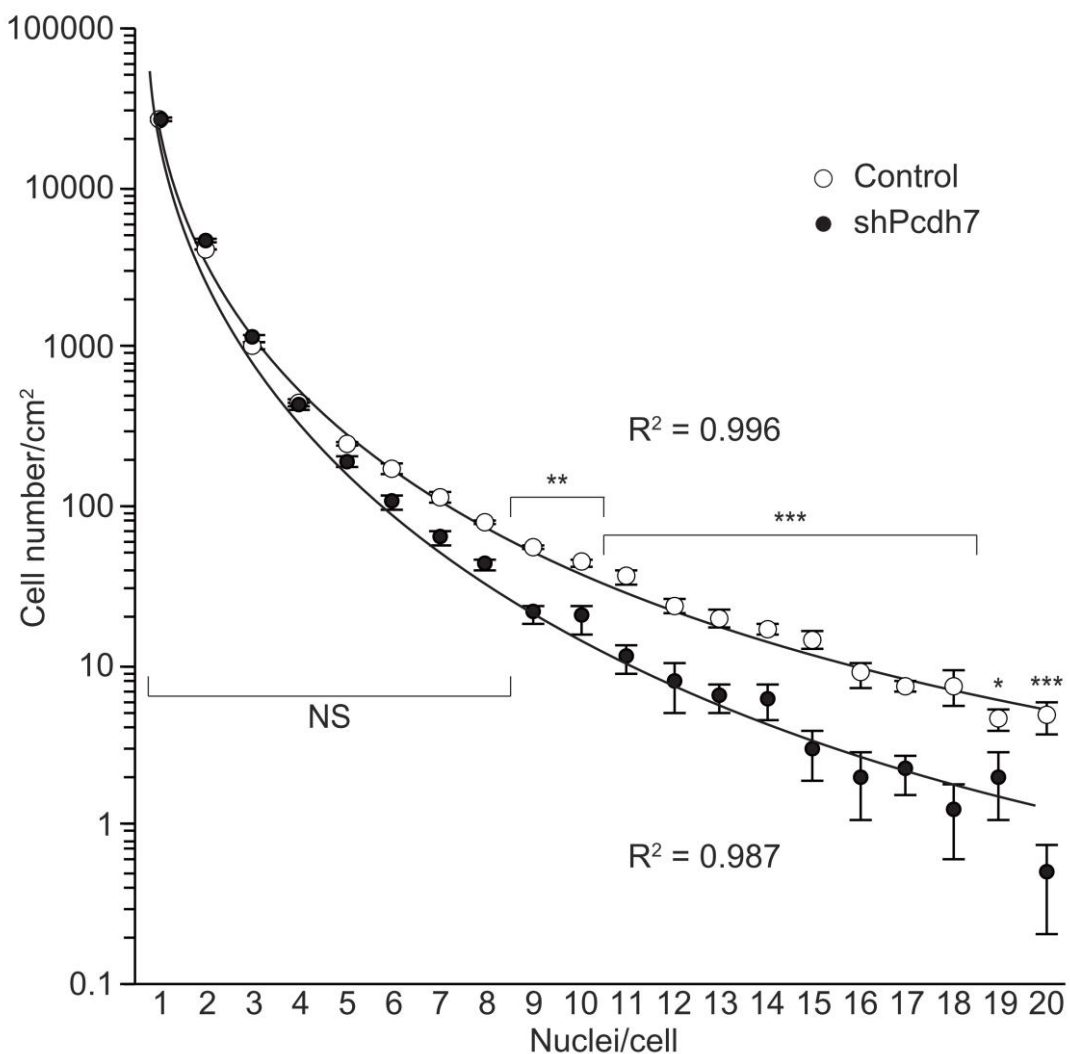


図8 破骨細胞分化の過程での破骨細胞関連遺伝子の H3K4me3 と H3K27me3 の ChIP シークエンス。

A *Nfatc1*、*Nfkb2*、*Prdm1* は破骨細胞分化に伴い H3K4me3(+)/H3K27me3(+)から H3K4me3(+)/H3K27me3(-)に変化していた。

B *Tnfrsf11a*、*Csf1r*、*Mitf*、*Ctsk*、*Cln7*、*Acp5* は成熟破骨細胞において H3K4me3(+)/H3K27me3(-)で修飾されていた。

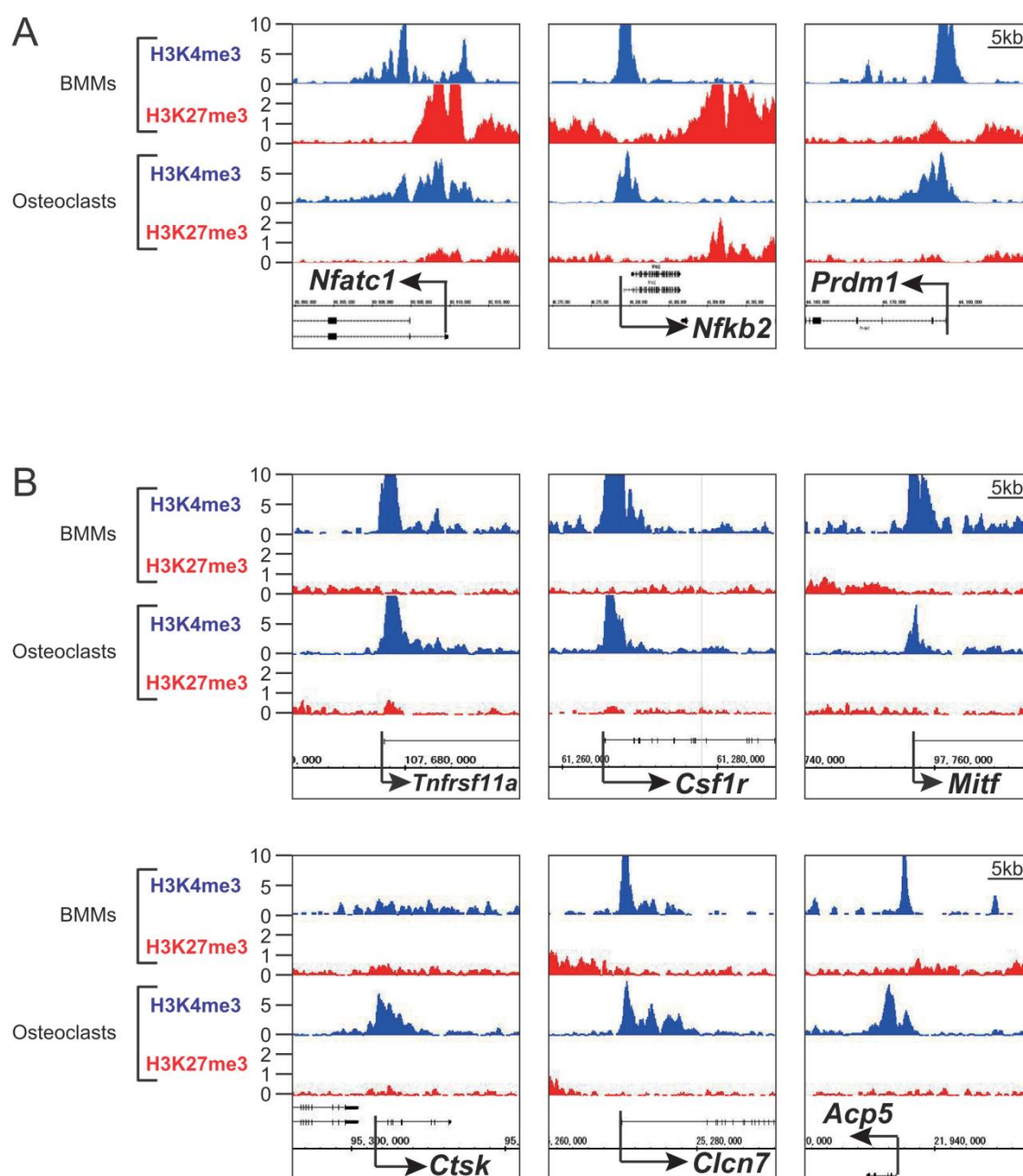


図 8

C *Irf8*、*Mafb* は破骨細胞分化に伴い H3K4me3(+)H3K27me3(+) から H3K4me3(-)H3K27me3(+)に変化していた。

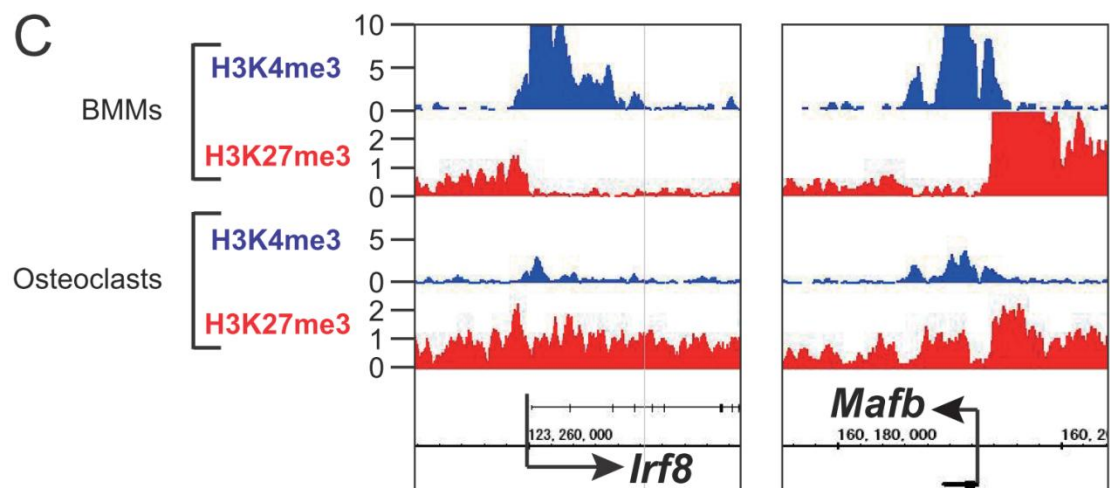


図9 破骨細胞分化における Pcdh7 の役割と機能

A Pcdh7 は NFATc1 の下流でヒストンのメチル化の変化に伴って活性化され、MITF や DC-STAMP、OC-STAMP、Atp6v0d2 の制御を通じて細胞融合を促進する。

B カドヘリンの細胞融合に対する役割。破骨細胞での E-カドヘリンや筋芽細胞での N-カドヘリンは細胞融合の中の接着の段階で働く。Pcdh7 は M カドヘリンのように細胞融合におけるシグナル伝達に関与している。

