

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 中村 春彦

骨の恒常性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により保たれている。破骨細胞による骨吸収の亢進に伴う骨量の低下は、骨粗鬆症や関節リウマチ、腫瘍による骨破壊などの病態に深く関係している。単球 - マクロファージ系の細胞が macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 刺激により破骨前駆細胞に分化し、さらに骨芽細胞や骨細胞などの間葉系細胞が発現する receptor activator of nuclear factor- κ B (NF- κ B) ligand (RANKL) の作用で破骨前駆細胞は破骨細胞へと分化する。破骨細胞は tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 陽性の多核巨細胞であり、破骨細胞分化におけるマスター転写因子である nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) の活性化などを通じ破骨前駆細胞が互いに融合することにより形成される。破骨細胞の融合にかかわる因子としては DC-STAMP (dendritic cell specific transmembrane protein) や OC-STAMP (osteoclast stimulatory transmembrane protein)、Atp6v0d2 (V-ATPase subunit d 2) などが知られている。また、DC-STAMP は microphthalmia-associated transcription factor (MITF) によっても制御されており、T cell acute lymphocytic leukemia 1 (TAL1) により抑制される。

近年、アセチル化やメチル化などのヒストン修飾や DNA のメチル化、micro RNA などのエピジェネティックな要素が遺伝子発現や細胞の分化、機能などに大きく関与していることが分かってきた。中でも、ヒストン H3 リジン 4 のトリメチル化 (H3K4me3) と、ヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化 (H3K27me3) は、それぞれ遺伝子発現の活性化と抑制にかかわっていることが知られている。破骨細胞分化の過程で、マスター転写因子である NFATc1 がこれらのヒストン修飾の変化により制御されており、H3K4me3(+)/H3K27me3(+)から H3K4me3(+)/H3K27me3(-)へと変化することが知られている。同様のヒストン修飾の変化は ES 細胞から神経幹細胞へと分化する際の神経幹細胞関連遺伝子においても報告されている。

そこで申請者は、新たな破骨細胞分化関連遺伝子を発見するために、マウスの骨髄細胞に対する RANKL 刺激による破骨細胞分化過程において、NFATc1 と同じ H3K4me3(+)H3K27me3(+)から H3K4me3(+)H3K27me3(-)へと変化する遺伝子を ChIP シークエンスにより絞り込んだ。解析に用いた全 21836 遺伝子の中で、破骨前駆細胞において H3K4me3(+)H3K27me3(+)であったものが 2006 遺伝子、成熟破骨細胞において H3K4me3(+)H3K27me3(-)であったものが 7552 遺伝子であった。これらから、破骨細胞分化に伴い H3K4me3(+)H3K27me3(+)から H3K4me3(+)H3K27me3(-)へと変化するものとして 579 遺伝子が同定された。この中には既に報告がある *Nfatc1* に加え、*Nfkb* や *Prdm1* などの破骨細胞に関連する遺伝子が含まれていた。RNA シークエンスにより遺伝子発現が一定値以上でかつ増加傾向にある遺伝子を絞り込み、創薬のターゲットとなりやすい細胞膜に局在する分子を候補として、その分化における機能を解析することとした。結果として絞り込まれた 10 遺伝子 (*Cav1*, *Cd82*, *Cd97*, *Pam*, *Pcdh7*, *Sdc1*, *Sema4d*, *Sigmar1*, *Slc11a2*, *Tfrc*) の内、骨代謝において既に報告がある *Cav1*, *Cd82*, *Pam*, *Sdc1*, *Sema4d*, *Tfrc* を除外し、残った *Cd97*, *Pcdh7*, *Sigmar1*, *Slc11a2* についてヒストンメチル化修飾のピークとの関連をみたところ、*Sigmar1*, *Slc11a2* の破骨前駆細胞の H3K27me3 の波は転写開始領域や遺伝子座に合致していなかった。これらのことから、*Cd97*, *Pcdh7* に絞って解析を進めることとした。

骨髄細胞を RANKL 刺激し破骨細胞を分化させる系で、カルシニューリン阻害を介して NFAT を阻害する作用を持つシクロスポリン A を添加し、*Cd97* と *Pcdh7* に対する NFATc1 の制御について解析を行った。*Cd97* および *Pcdh7* は共にシクロスポリン A により RANKL 刺激に伴う発現上昇が阻害され、NFATc1 の制御下にあることが示唆された。さらに、破骨前駆細胞に対して CD97 または *Pcdh7* (protocadherin-7) の shRNA を導入することにより遺伝子発現を抑制し、破骨細胞分化に対するこれらの遺伝子の関与を調べた。CD97 発現抑制群では破骨細胞数の対照群との有意差は生じなかったのに対して、*Pcdh7* 発現抑制群では、対照群に対し、有意に破骨細胞数が減少していた。また、破骨細胞機能に対するこれらの遺伝子の関与を調べるために、shRNA による遺伝子発現抑制の群で吸収窩形成実験を行ったところ、こちらは、形成された吸収窩の面積において CD97 発現抑制群、*Pcdh7* 発現抑制群ともに対照群との有意差が生じなかった。これらのことから、*Pcdh7* は NFATc1 の制御下で破骨細胞分化に働いていると考えられた。

さらに *Pcdh7* が破骨細胞分化にどのように関わっているかを解析するために、定量的逆転写 PCR

を用いて、RANKL による破骨細胞分化の過程での、対照群と *Pcdh7* 発現抑制群での破骨細胞関連遺伝子の発現量推移の差異を調べた。*Pcdh7* 発現抑制群では、*Dcstamp*、*Ocstamp*、*Atp6v0d2* などの破骨細胞融合にかかわる遺伝子と、DC-STAMP を制御している *Mitf* の発現が対照群に対し有意に低下していた。それに対し、M-CSF や RANKL の受容体、c-Fos や NFATc1 などの分化にかかわる転写因子、*Blimp1* や *Irf8*、*Mafb* などの破骨細胞分化抑制系とその阻害に関連する遺伝子、*Ctsk*、*Clen7*、*Acp5* などの破骨細胞機能に関する遺伝子の発現量は対照群と *Pcdh7* 発現抑制群との有意差がなかった。*Pcdh7* は破骨細胞の融合に関連する遺伝子を制御し、破骨細胞分化を誘導しているものと考えられた。

Pcdh7 の発現抑制による細胞融合の評価を行うために、イメージングサイトメーターを用いて、1 つ 1 つの細胞のもつ核数の分布を解析した。含有核数ごとの細胞数のグラフは、高い相関係数 (対照群 $R^2=0.996$ 、*Pcdh7* 抑制群 $R^2=0.987$ 、 R^2 ; 相関係数) で累乗近似を行うことができた。8 核以下の細胞の数では対照群と *Pcdh7* 発現抑制群の有意差はなかったが、9 核以上の細胞の数は *Pcdh7* 発現抑制群で有意に減少していた。これらのことから、*Pcdh7* の発現抑制により破骨細胞の融合が障害されていることが示された。

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、デスマ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。*Pcdh7* はプロトカドヘリンファミリーに属しており、神経細胞やがん細胞などで細胞接着やシグナル伝達に働くことが報告されている。細胞の融合は遊走、認識、接着、膜の融合という段階を経て完成する。E-カドヘリンは破骨細胞で、N-カドヘリンは筋芽細胞で細胞融合の接着の段階に働いており、M-カドヘリンは筋芽細胞で細胞接着の段階とシグナル伝達の両方に働いている。*Pcdh7* は、破骨細胞の融合に関連する遺伝子の発現を制御することにより融合に働いていると考えられた。

以上のことから、破骨細胞分化において *Pcdh7* は NFATc1 の下流で MITF や破骨細胞融合関連分子 (DC-STAMP、OC-STAMP、*Atp6v0d2*) を制御し、破骨前駆細胞の融合による破骨細胞の多核化に働いていることが示唆された。本研究によって、新しい破骨細胞分化関連分子である *Pcdh7* を同定し、新しい破骨細胞の融合や分化を評価する方法を確立した。*Pcdh7* の破骨細胞融合関連分子の制御の詳細や、H3K27 の脱メチル化に働いている酵素などに関しては今後の研究課題として残っているが、本研究により得られた知見は、破骨細胞の研究のさらなる発展と、それによる骨代謝機構の理解の進展、骨関連疾患の治療法の開発などへの応用へ貢献するものと考えられる。