

博士論文

論文題目 網羅的遺伝子解析手法を用いた TGF- β の
RANKL 誘導性破骨細胞分化に対する作用機序の解明

氏名 小俣 康德

目次

	頁
第一章 要旨	7
第二章 序論	9
第三章 実験材料及び方法	18
3-1 実験試薬	
3-2 破骨細胞分化誘導法	
3-3 細胞の染色法	
3-4 ChIP シーケンス	
3-5 FAIRE シーケンス	
3-6 マイクロアレイ解析	
3-7 ウェスタンブロット、免疫沈降法	
3-8 統計解析	
第四章 結果	26
4-1 TGF- β の破骨細胞分化に与える作用	
4-2 Smad 標的遺伝子群の同定と解析	
4-3 Smad の転写共役因子の同定と解析	
4-4 Smad、c-Fos 結合領域の全ゲノム解析	

4-5 破骨細胞マスター因子 *NfatC1* と Smad、c-Fos の
相互作用

第五章	考察	40
第六章	結語	51
第七章	謝辞	52
第八章	参考文献	53
	図表	64

略 語

AP-1; activator protein-1

BMM; bone marrow macrophage

BMP; bone morphogenic protein

ChIPseq; chromatin immunoprecipitation sequence

DAP12; DNAX-activating protein of 12 kDa

DNA; deoxyribonucleic acid

FAIREseq; formaldehyde assisted isolation of regulatory elements sequence

FBN; fibrillin

FBS; fetal bovine serum

Fos; FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog

GDF; growth differentiation factor

IB; immunoblot

IFN; interferon

IL; interleukin

IP; immunoprecipitation

ITAM; immunoreceptor tyrosine-based activation motif

Jmjd; jumonji domain containing

LAP; latency associated protein

NfatC1; nuclear factor of activated T cells 1

MAPK; mitogen activating protein kinase

M-CSF; macrophage-colony stimulating factor

MEM; minimum essential medium

MH; mad homology

mRNA; messenger ribonucleic acid

RANK(L); receptor activator for nuclear factor- κ B (ligand)

RA; Rheumatoid arthritis

TGF- β ; transforming growth factor-beta

ODF; osteoclast differentiation factor

OPG; osteoprotegerin

PBS; phosphate-buffered saline

PCR; polymerase chain reaction

PLA; proximity ligation assay

SDS; sodium dodecyl sulfate

Smad; sma and mad (mothers against decapentaplegic)

TNF; tumor necrosis factor

TRAF; TNF receptor-associated factor

第1章 要旨

破骨細胞は単球・マクロファージ系細胞が M-CSF、RANKL の作用を受け、多核巨細胞へ分化して形成される。成熟破骨細胞は酸を分泌して骨吸収する。TGF- β は細胞の分化、増殖、アポトーシス、血管新生など多彩な機能活性をもつサイトカインであり、破骨細胞分化に対して促進的に作用する。本研究では TGF- β により誘導される Smad 標的遺伝子の同定とその破骨細胞分化に及ぼす作用機序について、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析を行った。その結果 Smad2/3 はプロモーター領域に多く結合し、転写調節を行っていることが示唆された。また Smad2/3 の結合モチーフの解析によって AP-1 分子が候補分子として上がり、破骨細胞分化に必須な因子である c-Fos と Smad の関係を調べた。2 分子は細胞内において共局在を示し、RANKL 刺激後の ChIPseq の解析からもオープンクロマチン領域における 2 分子の共局在が示された。破骨細胞分化のマスター制御因子である *NfatC1* 遺伝子上での変化を調べると、Smad シグナルの阻害下では *NfatC1* 遺伝子への c-Fos の結合シグナル量が減少した。反対に c-Fos ノックアウト細胞を用いて Smad のゲノム上への応答性を調べたところ、RANKL と TGF- β 刺激を加えても Smad の結合が抑制された状態であった。これらの結果から、破骨細胞分化過程において Smad と c-Fos は

クロマチンリモデリングを介してゲノム上へ結合し、相互に協調して働き、また *NfatC1* 遺伝子の転写調節に関わることが示唆された。

第2章 序論

破骨細胞は骨髄マクロファージ系細胞から分化した多核の巨細胞で、酸を分泌して骨を溶解し、骨芽細胞とともに骨のリモデリング機構に関わっている。その分化・機能の異常は骨粗鬆症、関節リウマチ (RA)、腫瘍、大理石病といった様々な病態に深く関わる事が知られている (1)。特に骨粗鬆症は年齢とともに増加し、患者数は 1,000 万人を超えると推計されている。高齢化の著しいわが国では骨折や寝たきりの原因にも繋がるため、早急な社会的、包括的な医療対策が必要となっている。また RA の患者数も 70 万人~80 万人にのぼり、潜在的な患者数を加味すると人口の 1%程度存在すると言われている。これらの疾患・病態はわが国だけで見られるものではなく、世界全体での患者数は極めて多いため、そのメカニズム解明への基礎的研究や治療薬開発が盛んである。近年これらに対する数々の生物学的治療製剤が台頭してきているが、重度の骨粗鬆症、疾患活動性の高い RA、骨折に対する治療・予防薬としては、いまだなお改善が求められている。したがって破骨細胞の分化・機能制御を解明することは、これらの臨床的課題や社会的ニーズに対して解決の糸口になり得ると考えられる。

破骨細胞分化には RANK-RANKL (receptor activator of nuclear kappa-B ligand) シグナルが重要な役割を担っているが、関連する遺伝子の制御メカニズムについては依然不明な点が多い。破骨細胞は M-CSF (macrophage-colony stimulating factor)、RANKL という 2 つのサイトカインが単球・マクロファージ系細胞に作用して成熟・分化する (2)。破骨細胞の形成には M-CSF だけでは不十分であり、骨芽細胞と造血幹細胞の直接的な相互作用が必要であることが知られていたが、長らくこの相互作用に関わる破骨細胞分化因 ODF (osteoclast differentiation factor) は同定されなかった。1997 年には破骨細胞分化阻害因子である OPG (osteoprotegerin) がクローニングされた (3)。OPG は TNF (tumor necrosis factor) 受容体ファミリーの一つであるが、その過剰発現マウスでは大理石骨病様の病態を呈し、破骨細胞の分化異常を示した。OPG の発見がきっかけとなり、1998 年に OPG に結合する分子として ODF が同定された (4)。その結果 ODF は活性型 T 細胞上に発現する TNF ファミリーの一つとして知られていた RANKL であることが明らかになった (5) (図 1)。

破骨細胞分化における RANKL/RANK 伝達経路の重要性は、マウスの遺伝学的研究により明らかになった。RANKL、あるいは RANK ノックアウトマウスでは骨組織に破骨細胞が全く存在せず、大理石骨病様の病態を呈する (6)。また OPG を全身投与したラットや RANKL ノックアウトマウスが関節炎による骨破

壊に抵抗性であることから、RANKL/RANK系が関節炎における骨破壊においても重要な役割を果たすことが証明された。RANKLはTNF受容体スーパーファミリーであるRANKと結合することによりその作用を発現する。リガンドの結合はRANKの3量体化とTNF受容体関連因子TRAF (TNF receptor-associated factor) ファミリーの受容体への結合を誘導し、TRAF6下流のシグナル分子であるNF- κ B, c-Jun, p38 MAPK (mitogen activating protein kinase) などが活性化されて成熟・分化する。またITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)、モチーフを有するDAP12 (DNAX-activating protein of 12 kDa)、FcR γ などの共シグナルの重要性も報告されている (7) (8)。RANKLのRANKへの結合は、これらのシグナルを介してカルシウムシグナルを誘導し、破骨細胞分化のマスター因子である*NfatC1* (nuclear factor of activated T cell 1) の発現を誘導する (9)。

RANKL誘導性破骨細胞分化を修飾するサイトカインの存在も明らかにされつつある。分化に抑制的に働く因子としてはIFN (interferon)- γ , β などがあり (10)、促進的に働く因子としてはIL (interleukin)-1、TGF- β などがあげられる (11) (12)。

TGF- β はユビキタスに発現し、細胞の接着、増殖、分化、浸潤、アポトーシス、血管新生、創傷治癒など多彩な機能活性をもつ。また多くのサブファミリ

一分子が存在し、BMP (bone morphogenic protein)、GDF (growth differentiation factor)、アクチビン、インヒビンなどがある。ヒトでは40種類近くのTGF- β サブファミリーの存在が確認されている。

ヒトでTGF- β に関わる疾患のひとつに Camurati-Engelmann disease があげられる (13)。CED の発生頻度は 1/10 万以下で男女比は 3:2、非常に稀な常染色体優性遺伝疾患である (14)。長幹骨の過剰な増殖性の膜性骨化を特徴とし、進行性骨幹異形成症 (progressive diaphyseal dysplasia) などとも呼ばれる。CED の原因遺伝子が TGF- β をコードする遺伝子 (19q13.1-q13.3) の変異であることが 2000 年に報告され (15)、さらに TGF- β 1 の LAP (latency associated protein) ドメインの変異が原因であることがわかった (16)。この変異によって CED では TGF- β は small latent form を形成せずに、活性型として遊離しやすくなることが明らかにされた。

また TGF- β 受容体に対する変異疾患も見つかっている。Loeys-Dietz 症候群は I 型または II 型 TGF- β 受容体遺伝子の変異によって起こる常染色体優性遺伝性疾患である (17)。全身性結合織障害を特徴とするマルファン症候群に類似した臨床症候 (大動脈瘤、大動脈解離、関節弛緩、胸郭変形、側彎症、クモ状指) を呈する。マルファン症候群では Fibrillin1 遺伝子の異常 (15q21.1) によって起こることが知られている (18)。

また TGF- β は RA の病態にも深く関わることが知られており、TGF- β 受容体阻害剤によって滑膜線維芽細胞の増殖を抑えたという報告もある (19)。実際に RA の滑膜中には TGF- β が多く存在することが知られており、RA の治療対象になり得ることを示唆している。

また TGF- β の作用の一つに血管新生があげられ、血管系へ関与が報告されている。Osler-Weber-Rendu 病、遺伝性出血性毛細血管拡張症は常染色体優性の出血傾向を示す遺伝性疾患であるが、その責任遺伝子は HHT1 (Endoglin) と HHT2 (ALK1) であることが明らかにされた。ともに TGF- β 受容体の変異によっておこることが知られている (20) (21)。

TGF- β のシグナル伝達の解明は 2 種類の受容体の発見から始まった (22)。

TGF- β のシグナル伝達は I 型および II 型受容体を介して行われ、それらは細胞内にセリン・スレオニンキナーゼドメインを有する (図 2)。リガンドの結合によって II 型受容体のリン酸化及び活性化が起こり、続いて I 型受容体に伝播されて 4 量体を形成する。活性化された I 型受容体は下流分子である Smad タンパクのリン酸化を起し、シグナル伝達を開始する (23)。Smad には Smad1 から Smad8 まで 8 種類存在し、大きく 3 つのカテゴリー R-Smad (receptor-activated Smad; Smad1,2,3,5,8)、Co-Smad (common mediator Smad; Smad4)、I-Smad (inhibitory Smad; Smad6,7) に分類される (24) (25)。

R-Smad は Smad4 と量体を形成して核内に移行し転写活性を示し、細胞増殖、分化、生存などを調節する遺伝子の発現を制御する。Smad6/7 は Smad シグナルのネガティブフィードバック作用を持ち、I 型受容体に働き R-Smad の活性化を阻害する。Smad 分子は核と細胞質を行き来することが可能であるが、TGF- β 受容体のリン酸化が起こっている間は長く核内に留まる。

TGF- β シグナルはSmad2、Smad3を活性化する。これらのタンパクは2つのN末端MH (mad homology) ドメインを有する (MH1、MH2)。MH1ドメインは核内移行やDNAへの結合や転写に必要なドメインで、MH2はタンパクのオリゴマー化の促進に必要なドメインで効率的な転写活性化に作用している領域である。Smad2、Smad3のMH2ドメインはほぼ同一であるが、MH1ドメインの相同性については2/3以下の相同率といわれており、Smad2にはSmad3にはない2か所のアミノ酸配列の伸長が存在する。核内ではSmad3とSmad4のMH1ドメインは5'-GTCT-3'を認識する (26) (27)。一方Smad2MH1ドメインの伸長部分では十分にDNAに結合できないことが示されているが、一方でexon3を欠失したSmad2ではDNAへの結合能を有しているという報告もある (28) (29)。他の転写因子は単独で結合し転写活性を示し得るが、SmadはDNAへの結合能が低いため別の転写活性因子を要し、クロマチン構造を制御する他の分子が必要となる (30)。

近年遺伝子を取り巻くヒストンや DNA のメチル化など修飾要素を網羅的に解析する次世代シーケンサーが開発された。分子に対する特異的な抗体を用いることで直接的なゲノムへの応答を網羅的に調べることができるようになった。ヒストンはクロマチン（染色体）を構成するタンパクの一群であり、DNA を核内に収納する役割を持つ。5 種類のヒストン H1、H2A、H2B、H3、H4 が存在し、コアヒストンと呼ばれる H2A、H2B、H3、H4 はヒストンオクタマー（8 量体）を形成し、146 bp の DNA を左巻きに約 1.65 回巻きつける（ヌクレオソーム）。主なヒストン H3、H4 のメチル化部位はその末端部分（H3K4、H3K9、H3K27、H3K36、H4K20）やヌクレオソーム中心（H3K79）に存在する。ヒストンのメチル化は約 50 年前に発見されているが (31)、遺伝子発現制御との関連が指摘されるようになったのは比較的最近であった。Stahl らは *Tetrahymena* の核にメチル化した H3K4 が存在し、転写活性との関連性を報告した (32)。クロマチン構造を制御する機構としては DNA メチル化、翻訳後ヒストン修飾、ヒストン変異体、クロマチン・リモデリング、ノンコーディング RNA のクロマチン修飾の制御等が知られている。細胞ではエピジェネティックな制御のもと、遺伝情報の伝達が行われている。リジン残基はモノ (me1)、ジ (me2)、トリ (me3) メチル化され、タンパクと結合して様々な生理活性をもたらす。クロマチン免疫沈降法を用いて、リジン上のメチル化の部位や状態を抗体によって抽

出し、ヒストンメチル化をゲノム上にマッピングすることができる。遺伝子発現のデータとヒストンメチル化のマッピングデータとを合わせることで、遺伝子活性の制御メカニズムを調べることが可能となる。遺伝子の活性、不活性に関連する修飾部位は限定されており、転写活性の示す遺伝子上のプロモーター領域には H3K4me3 が、遺伝子全体には H3K36 me3 がエンリッチした状態で観察される。一方で H3K27me3 は遺伝子の発現抑制に関わることが示されている。

遺伝子の活性化はH3K4me3と強い相関があるが、遺伝子の静止についてはクロマチン免疫沈降によってH3K27me3が関連することが示されている。ES細胞ではH3K27me3はH3K4me3と同部位に共存し、これをbivalent markと呼ぶ(33)。Bivalentな状態の遺伝子は発現が抑制された状態にある。分化段階の細胞では、bivalent markが減弱しており、発現上昇または静止した遺伝子はH3K4me3やH3K27me3によって特徴付けられている(34)。すなわちH3K4me3は遺伝子の発現や活性化に関与し、H3K27me3はその発現の抑制に関わる。

破骨細胞の分化過程においてもヒストン修飾の変化を解析することで新たな制御メカニズムが解明できると考えられた。当研究室ではこれまで TGF- β の破骨細胞分化に及ぼす作用について研究を行ってきた。Yasui らは Smad シグナルが RANK 下流の TRAF6 との複合体形成に作用することを明らかにした(12)。

TGF- β 単独で破骨細胞形成はされないため、Smad のゲノム上への応答やの転写共役因子などによっても、RANK/RANKL シグナル系を制御しているのではないかと考えられた。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いて Smad 標的遺伝子や転写共役因子によって制御される破骨細胞分化について、エピジェネティックな修飾変化やクロマチンのリモデリングの解析を交えながら、網羅的な遺伝子解析を行った。

第3章 実験材料および方法

3-1 実験材料

培養試薬に用いた M-CSF は R&D Systems 社 (Minneapolis, MN) から、TGF- β 、SB431542 は Sigma-Aldrich 社 (St Louis, MO) から購入した。GST-RANKL はオリエンタル酵母工業株式会社長浜生物化学研究所 (滋賀県) から供与頂いた。Alpha-minimum essential medium (alpha-MEM)、fetal bovine serum (FBS) は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) から購入した。ChIPseq に用いた抗 Smad2/3 抗体は BD biosciences 社 (San Jose, CA, USA) から、抗 trimethyl-histone H3 lysine 4 抗体は Activemotif (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 c-Fos 抗体は Santa Cruz biotechnology 社 (Santa Cruz, CA, USA) から購入した。

ウェスタンブロットや免疫沈降法で用いた抗 phospho-Smad2/3 抗体、抗 Smad2/3 抗体、抗 phospho-c-Fos 抗体、抗 c-Fos 抗体は Cell Signaling Tech. 社 (Beverly, MA, USA) から、抗 Pol2 抗体は Santa Cruz Biotech.社 (Santa Cruz, CA, USA)から購入した。2次抗体試薬 HRP-conjugated goat anti-mouse、

anti-rabbit IgG は Promega 社 (Madison, WI) から、発光液 ECL Plus を Amersham Biosciences 社 (Piscataway, NJ) から購入した。

3-2 破骨細胞分化誘導法

4~5 週齢雄 ddY マウスの下肢骨より骨髓細胞を採取し、M-CSF (100 ng/ml) を含む 10 % FBS 含有 α -MEM で 5 日間培養し、骨髓マクロファージ細胞 (BMM) を形成させた。BMM は破骨細胞前駆細胞として用い、さらに M-CSF (10 ng/ml) と RANKL (100 ng/ml) で 3~5 日間培養することで破骨細胞が形成される。c-Fos ノックアウトマウスは東京大学免疫学教室高柳研究室より供与して頂いた。その脾臓細胞を用いた実験では、10% FBS 含有 α -MEM + M-CSF (100 ng/ml) による培養期間を 5~7 日間培養し BMM へと分化誘導させ、その後 RANKL 刺激を開始した。TGF- β (0.1, 1, 2, 10 ng/ml) 及び SB431542 (0.1, 1, 10 μ M) はそれぞれ α -MEM 溶液中に添加した。SB431542 は I 型 TGF- β 受容体のキナーゼに結合して、TGF- β シグナルを遮断する阻害剤である。

3-3 細胞の染色法

3-3-1 TRAP 染色

TRAP は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase) と呼ばれる破骨細胞特異酵素であり、多核の TRAP 陽性細胞を破骨細胞として検鏡することができる。

3.7 % ホルマリンで細胞を固定し、アセトンとエタノールを等量加え、酒石酸存在下 (pH 5.0)、N,N-dimethyl formamide (Wako pure chemical industries, Ltd.) 中の naphthol AS-MX phosphate (Sigma-Aldrich, Co. LLC) を基質として Fast red violet LB salt (Sigma-Aldrich, Co. LLC) で約 20 分間染色すると分化した破骨細胞が赤色に染まる。

3-3-2 細胞免疫染色

6 well dish 上にカバーグラスを敷いて細胞を播種し、培養する。3.7 % ホルマリンで細胞を固定後 PBS で 2 回洗浄、0.2 % Triton X-100 で細胞膜を変性させた後、再度洗浄する。2 % BSA 含有 PBS を使って 1 時間ブロッキングを行う。ブロッキング溶液に一次抗体を希釈し、カバーグラス上にアプライ、常温で 1 時間～オーバーナイトで反応させる。二重染色を行うため、抗体は異なる生物種由来の抗体を使う。PBS で 2 回洗浄した後、二次抗体を希釈したブロッキング溶液で 30 分～1 時間程度遮光して常温静置する。再度 PBS で洗浄する。Hoechst 33258 をブロッキング溶液に溶かした溶液をアプライし、30 分常温静

置し核染色を行う。封入剤を使って封入、風乾させる。細胞の検鏡は蛍光顕微鏡 BZ-8100 (KEYENCE) を使った。

3-3-3 PLA法

PLA (proximity ligation assay) は DuoLink II (Olink Bioscience) を用いて行う細胞免疫染色の手法で、細胞内の 2 分子の近接性を調べる実験手法である (35)。2 種類の異なる生物種の二次抗体を使用し、それぞれのプローベを用いてそれらを架橋、結合、増殖させ、近接した 2 分子の存在を示す蛍光スポットを顕鏡する。2 分子の結合を示すものではないが、40 nm 以下の近接性を示す場合に蛍光スポットが形成される。基本的には細胞免疫染色の手法に準じ、具体的な実験手技は以下の通りである。

6 well dish 上にカバーグラスを敷いて細胞を播種、培養する。3.7 % ホルマリンで細胞を固定する。Triton X-100 で細胞表面を変性させた後ブロッキングし、一次抗体は抗 Smad2/3 マウス抗体 (Santa Cruz, CA, USA) および抗 c-Fos ラビット抗体 (Santa Cruz, CA, USA) を用いて培養した。マウス抗体に対しては proximity ligation assay probe Minus を、ラビット抗体に対しては proximity ligation assay probe Plus を使用し、蛍光標識された 2 つのプローベ

を架橋、結合、増殖させる。核を DAPI で染色し、封入後蛍光顕微鏡 BZ-8100 で観察した。近接性を示すスポットは蛍光の斑点（緑色）で示される。

3-4 ChIPシーケンス

マウス骨髄マクロファージ細胞を15 cm培養皿で培養し、約80%コンフルエントの状態に細胞を回収した。細胞をformaldehydeで固定した後、glycineを添加し中和させた。冷却したphosphate-buffered saline (PBS) で2回洗浄し、細胞を回収した。サンプルを超音波破碎後、8 °C 15,000 rpmで10分間遠心分離し、上清を回収した。DNAを脱クロスリンクさせた後、PCR purification kit (Qiagen; Germantown, MD, USA) を用いて精製した。

ChIPサンプルはIllumina cluster station及び1G Analyzer (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) を用いて過去の報告された手法に準じてシーケンシングを行った (36)。得られたシーケンスデータをマウスゲノムにマッピングした。

3-5 FAIREシーケンス

FAIRE (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements) の実験はGiresiらの発表した方法に従って行った (37)。実験の概要を以下に記載する。Formaldehydeを添加して常温10分間培養した後、glycineで中和した。細胞を

回収して冷却したPBSで2回洗浄した後、nuclear lysis bufferに溶解した。超音波処理器を使ってDNAを断片化した後遠心し、上清を回収した。Phenol/chloroform抽出を行い、水層に存在するヌクレオソームに結合していないDNAを回収した。サンプルを脱クロスリンクさせ、ethanol precipitationによって精製しPCR purification kit (Qiagen) を用いて精製した。

3-6 マイクロアレイ解析

TRIzolを用いてtotal RNAを回収し、GeneChip (Affymetrix; Santa Clara, CA, USA) を用いた。Total RNAより合成されたビオチン標識cRNAをGeneChip Mouse Genome MOE430 2.0 oligonucleotide array (Affymetrix; Santa Clara, CA, USA) にかけた。アレイをstreptavidin-phycoerythrinによって蛍光染色し、データをAffymetrix scannerで収集した。Microarray Suite software 5.0を用いてプローベセット毎にaverage difference (AD) を算出し、遺伝子発現強度を数値化した。全AD値が平均化して100となるようにADを標準化した。1アレイデータはそれぞれのサンプル毎に得られた。

3-7 ウェスタンブロット、免疫沈降法

3-7-1 ウェスタンブロット

タンパク抽出はすべて氷上で行った。細胞を冷却 PBS で 2 回洗浄し、TNE バッファー (1 % NP-40, 10 mM Tris-HCl [pH 7.8], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 10 µg/ml aprotinin) でセルスクレイパーを用いて蛋白を回収した。回収液を 4 °C で 1 時間攪拌後、15,000 rpm で 10 分間遠心し上清を回収した。Protein Assay Kit II (BIO RAD 社) を用いて吸光度を計測し、タンパク定量を行った。β-mercaptoethanol 含有 4Xsample buffer を加え、96°C 4 分煮沸し、電気泳動に用いた。等量のタンパクを目的の分子量に応じて 7.5-15% ないし 15% の SDS ポリアクリルアミドゲル (Invitrogen) で電気泳動し、泳動終了後のゲル上の蛋白をニトロセルロースメンブレン (BIO RAD 社) に転写した。抗体の非特異的結合を防ぐため 6% スキムミルクを加えた TBST 溶液でブロッキングしたのち、目的とする蛋白の一次抗体と反応させた。二次抗体には HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Promega 社) または goat anti-rabbit IgG (Promega 社) を用い、発光液 ECL Plus Western Blotting Detection System (GE healthcare 社) を使って特異的なバンドを検出した。Re-blotting には 50 °C の Stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 100 mM 2-mercaptoethanol) 中で 15 分間振とうさせることでメンブレンから抗体を解離させた後に、ブロッキングし一次抗体を使って再度同様の手技を繰り返した。

3-7-2 免疫沈降法

Protein G-agarose を pre-clear として加え、4 °C で 1 時間攪拌したのち軽く遠心し上清を回収した。IP 用の抗体を加え氷上で 1-2 時間放置したのち、protein G-agarose を加え 4 °C で 1 時間攪拌し、軽く遠心して上清を除去した。Wash buffer で3回洗浄後、軽く遠心して上清を除去した。ペレットとなっている免疫沈降複合体に β -mercaptoethanol含有2Xsample buffer を加え、95 °C 3 分間煮沸後目的とする抗体を用いてウェスタンプロットと同様に blottingを行った。

3-8 統計解析

SPSS (PAWS Statistics18) を用いて統計解析を行った。結果は平均±標準偏差として表記した。3群以上の平均値の検定にはANOVAないしはKruskal-Wallis検定を行った。2群間の平均値の検定にはStudent の t 検定を用いて検討した。

第4章 結果

4-1 TGF- β の破骨細胞分化に与える作用

TGF- β のRANKL誘導性破骨細胞分化促進作用

マウスの骨髄由来細胞に対しGST-RANKL (100 ng/ml) 刺激を加え、72、84、96時間後に細胞を固定しTRAP染色を行った (図3A)。コントロール群、TGF- β (0.1 ng/ml) 添加群ではRANKL刺激後84時間で破骨細胞が急速に増加し、96時間では大部分の細胞のアポトーシスが見られた。84時間におけるTGF- β 添加群での破骨細胞形成はコントロール群よりも増加した。TGF- β 受容体阻害剤であるSB431542 (10 μ M) を添加した群では破骨細胞形成が殆ど見られなかった。各刺激別のTRAP陽性多核細胞数について比較を行った (図3B)。RANKL刺激後84時間におけTGF- β 群での破骨細胞数の増加は、コントロール群、SB431542添加群に比べて有意に増加していた。

4-2 Smad標的遺伝子群の同定と解析

Smad標的遺伝子とヒストン修飾の解析

TGF- β は細胞表面の2種類のI、II型受容体に結合してシグナル伝達を開始する(図2)。I型受容体のGS部位のリン酸化が起こり、下流分子であるSmadタンパクがリン酸化される。2つのリン酸化したR-Smad2分子がCo-Smad (Smad4) 1分子と結合し、3量体を形成する。量体は核内に移行しゲノム上に結合した後、転写活性を示す。

BMMをTGF- β (1 ng/ml)を含む培養液で5日間培養し細胞を回収し、抗Smad2/3抗体を用いてChIPseqを行った。図4A、Cは本研究で行った実験データ解析結果の一例である。Smad標的遺伝子の抽出には、遺伝子の転写開始点から10 kb上流から1stイントロンまでの間に、Smad結合シグナル量が8以上である領域および遺伝子を抽出した(図4A)。その結果、2,786か所、903遺伝子のSmad標的領域および遺伝子が抽出された。

Smad標的遺伝子の特性を調べるにあたり、ヒストン修飾の解析も合わせて行った。H3K4me3修飾は遺伝子の発現に関与し、H3K27me3修飾は遺伝子発現の抑制に関わることが知られている(図4B)。すなわち細胞の分化に関わる重要な遺伝子においては、H3K4とH3K27がともにトリメチル化されている状態(bivalent status)では遺伝子発現は静止した状態にあり、細胞の分化段階ではH3K27のトリメチル化修飾が外れ(monovalent status)、遺伝子発現が誘導さ

れる。図4Cはヒストン修飾の変化の一例である。Smad6は抑制性Smad分子としてTGF- β 刺激が加わると発現が誘導されることが知られている。図よりSmad6のプロモーター領域にはSmad2/3が結合していることがわかる。またTGF- β 刺激によってヒストン修飾はbivalentな状態からmonovalentな状態へ変化しており、遺伝子発現の状態に変化したことが示されている。

Smad2/3標的遺伝子の発現プロファイル

TGF- β 刺激後の遺伝子の経時的な発現変化を解析した (図5)。BMMをTGF- β (2 ng/ml) で刺激後0、1.5、3、6、12時間後にmRNAを回収した。各サンプルにおいてマイクロアレイを行い発現解析した。刺激前と比較した発現変化をヒートマップ表示し (図5A)、発現上昇を赤で、発現抑制を緑で表示した。中央の横線の並びはSmad2/3標的遺伝子を示している。右図はGSEAエンリッチメントスコア (濃縮率) をプロットした。Smad2/3標的遺伝子は図の上方に多く存在し、TGF- β によって発現は上昇し、遺伝子の濃縮率も高かった。

またTGF- β 刺激後発現上昇または抑制された全遺伝子中の割合を算出した (図5B)。TGF- β 刺激前 (0時間) の発現量と比較し、発現上昇 (2倍以上) あるいは抑制 (0.5倍以下) の遺伝子の全遺伝子中の割合を示した。Smad2/3標的遺伝子はTGF- β 刺激によって発現する傾向にあることがわかった。

ゲノム上のSmad2/3結合領域および転写開始点周囲のSmad2/3シグナル量の解析

抗Smad抗体を用いたChIPseqによって、Smad分子がゲノム上へ広く結合することがわかった。そこでSmad分子がゲノム上で遺伝子のどの部分に多く結合するかを詳細に解析した。Smad2/3のゲノム上への結合領域について、一般のChIPseq解析ツールCEAS (Galaxy/Cistrome) を用いて解析を行った (図6A)。その結果Smad2/3は、ゲノム全体と比較して、Smad標的遺伝子ではプロモーター領域に多く結合することがわかった ($p < 0.001$)。また転写開始点周囲でのSmad2/3シグナル量を解析すると、Smad2/3は転写開始点付近を中心としてゲノム上に結合していることがわかった (図6B)。

続いて遺伝子の発現プロファイル別のSmadシグナル量の比較解析を行った (図6C)。マイクロアレイ解析によって得られた遺伝子発現量を刺激前の発現量 (0時間) と比較して発現上昇した遺伝子群 (2倍以上)、変化なし、発現抑制した遺伝子群 (0.5倍以下) に分けた。それぞれの遺伝子群について転写開始点周囲におけるSmad2/3シグナル量をプロットすると、遺伝子発現が上昇した群では発現が変化しない遺伝子群あるいは発現抑制された遺伝子群と比較して、シグナル量が多い結果を示した。

TGF- β 、SB431542刺激によるヒストン修飾の変化の解析

Smadシグナル中心付近のヒストン修飾の変化。SB431542刺激群と比べてTGF- β 刺激群ではH3K4me3シグナル量が大きく、一方H3K27me3シグナルは低い結果を示した (図7A)。

遺伝子発現上昇、抑制遺伝子群における、転写開始点付近でのヒストン修飾について解析を行った。マイクロアレイのデータを用いて各刺激前の発現と比較して2倍以上発現が上昇した遺伝子群と0.5倍以下に抑制された遺伝子群に分けて解析を行った (図7B)。H3K4me3シグナルについては遺伝子発現、抑制群で差は見られなかった (図7B①)。一方、H3K27me3に関しては遺伝子発現上昇群ではTGF- β 刺激群はSB421542刺激群に比べて低いシグナルを示した。一方、遺伝子発現抑制群では両者の差は見られなかった (図7B②)。

Smad標的遺伝子群の機能解析

Gene ontology (関連する機能を持つ遺伝子群をカテゴリー化する) 解析をDAVIDと呼ばれる一般解析ツールを用いて行った (図8)。Biological process (生物学的プロセス) に関するカテゴリーを抽出した。表は有意差があり占拠率の高

いものから順にならべたものである。細胞内活性、細胞接着、転写、細胞増殖にかかわるカテゴリーが抽出された。

小括1

TGF- β はRANKL誘導性破骨細胞分化に対して促進的に作用した。TGF- β 下流分子であるSmad2/3のゲノム上への応答について網羅的な遺伝子解析を行うためにChIPseqを行った。Smad2/3はプロモーター領域に多く結合し、TGF- β によって発現が上昇する遺伝子群で特に結合シグナル量が多かった。またヒストン修飾は遺伝子発現が見られた群でH3K27me3のシグナル量が低い結果であった。Gene ontology解析からもSmad標的遺伝子に転写を制御する遺伝子が多いことがわかった。

4-3 Smadの転写共役因子の同定と解析

Smad2/3結合モチーフの同定とSmad2/3シグナル量の解析

Smad2/3結合モチーフ解析について、一般解析ツールSeqpos (Galaxy/

Cistrome) を用いて解析を行った。Smad2/3結合シグナルピーク中心から±100 bpの領域に含まれるSmad2/3結合モチーフを調べた結果、AP-1 (Fos) が高率に検出された (図9A)。グラフではSmad2/3結合中心周囲のSmad (青) 及びAP-1 (赤) のモチーフ数をプロットした。AP-1モチーフ数はSmad2/3結合シグナルピーク中心に多く存在した。

続いてモチーフを有する遺伝子におけるSmad2/3結合シグナル量の比較を行った (図9B)。SmadモチーフとAP-1モチーフを共に遺伝子上に有する遺伝子群 (Smad-AP1モチーフ群) とSmadモチーフのみ有する遺伝子群 (Smadモチーフ群) に分けて、それぞれのSmad結合シグナル量を解析したところ、前者のシグナル量が有意に高かった ($p < 0.05$)。

TGF-β刺激によるc-Fos発現制御と核・細胞質分画の変化およびc-FosとSmadの結合解析 (ウェスタンプロット、免疫沈降法)

TGF-β、RANKL刺激時のc-Fos、リン酸化c-Fosの発現変化についてウェスタンプロットを用いて解析した (図10A)。RANKL刺激後24時間でのリン酸化c-Fosの発現は1 μM以上のSB431542添加によって低下した。また、RANKL、TGF-β刺激時の核内および細胞質におけるSmad (①) およびc-Fos (②) タンパクの発現変化について調べた (図10B)。核内へのSmadおよびc-FosはSB431542

の存在下では大きく阻害され、TGF- β 存在下で強く発現していることがわかった。それぞれRANKL、SB431542およびTGF- β による各刺激時間は1時間である。

さらに免疫沈降法によってSmadとc-Fosの結合の有無を調べた (図10C)。① c-Fos (IP)とphospho-Smad2 (IB)、② c-Fos (IP) とphospho-Smad2 (IB)、③ phospho-Smad2 (IP) とphospho-c-Fos (IB)、④ phospho-c-Fos (IP) とphospho-Smad2 (IB) の結合を調べたところ、それぞれの2分子の結合はSB431542存在下では阻害され、一方TGF- β 刺激では2分子の結合が強く現れることがわかった。それぞれRANKL、SB431542およびTGF- β による刺激時間は2時間である。

Smadとc-Fosの共局在性の検証 (細胞免疫染色)

BMMをRANKL (100 ng/ml)、TGF- β (2 ng/ml)あるいはSB431542 10 μ Mで刺激した後、細胞を固定し、抗Smad抗体、抗c-Fos抗体を用いて細胞免疫染色を行った (図11)。Smadとc-Fosは細胞質優位に染色され、TGF- β 添加群では核内の染色がともに強く現れた (図11A-1)。またRANKL刺激後の核内c-Fos陽性細胞の割合についてグラフ化すると (図11A-2)、TGF- β 添加群では核内c-Fos陽性細胞の割合が6時間をピークに増加するのに対して、SB431542添加群ではRANKL刺激後核内c-Fos陽性細胞の割合は低い状態であった。

PLA (proximity ligation assay) 法による2分子の近接性についての検証をおこなった (図11B)。PLA法は細胞免疫染色の手法を用いて、2分子が十分近接している時に (< 40 nm) 蛍光スポットを形成するものである。SB431542とRANKL添加群においては、核内におけるSmad-c-Fos複合体 (緑色のスポット) は殆ど見られず、核を避けるように細胞質によく見られた。一方、TGF- β とRANKLで刺激した群では核内に複合体を示すスポットの形成が確認された (図11B-1)。また、PLA法を使った細胞免疫染色における核内Smad-c-Fos複合体を示すスポット数の比べたところ (図11B-2)、TGF- β +RANKL群ではSB431542+RANKL群に比べて有意にスポット数の増加を認めた。

小括2

Smad2/3 の結合モチーフの解析によって、AP-1 分子が候補分子として上がった。破骨細胞分化に必須な因子である c-Fos と Smad の関係を調べた。核内タンパクの発現を解析すると、TGF- β と RANKL の刺激によって核内 c-Fos、Smad の発現が上昇し、SB431542 を用いた共刺激ではそれらの発現が低下していた。c-Fos と Smad の直接的な結合を免疫沈降法によって確認し、細胞免疫染色の手法によって 2 分子の細胞内における共局在を示した。

4-4 Smad、c-Fos 結合領域の全ゲノム解析

Smadとc-Fosの結合領域およびシグナル量の解析 (ChIPseq、FAIREseq)

BMMをRANKL (100 ng/ml)、TGF- β (1 ng/ml) またはSB431542 (10 μ M) で24時間刺激し細胞を回収、抗Smad2/3抗体、抗c-Fos抗体を用いてChIPseqおよびFAIREseqを行った。図12-Aではオープンクロマチン領域でのSmadおよびc-Fos結合領域をベン図で示した。オープンクロマチン領域において(シグナル10以上の領域)、Smad単独の結合領域は2,058か所、c-Fos単独の結合領域は2,877か所存在し、Smadとc-Fosが共在する領域も3,075か所と多く存在することがわかった。またFAIREseqシグナルピーク中心に、その近傍存在するモチーフを解析ツールTRANSFACで調べたところ、SmadやAP1のモチーフがオープンクロマチンピーク近傍に存在することがわかった(図12-B)。さらにSB431542+RANKLおよびTGF- β +RANKL刺激後のサンプルにおけるFAIREseqシグナル量を比較すると(図12-C)、TGF- β +RANKL刺激後サンプルのFAIREseqシグナルはSB431542+RANKLサンプルに比べ有意に高く、TGF- β が加わることでクロマチンリモデリングがより起こりやすい状況であることが考えられた。続いて、Smad、c-Fos結合の局在性とFAIREseqシグナル量

との関係を調べた (図12-D)。Smad、c-Fosの結合がともに存在する領域においてはFAIREseqシグナル量も他と比べて有意に高いことがわかる。すなわち2分子が共在することがクロマチン構造の変化や転写の調節に寄与する可能性が示唆された。

FAIREseqシグナルピーク中心付近のSmadおよびc-Fos結合量を解析すると (図12-E)、FAIREseqシグナルピークを中心としてSmad、c-Fosともにシグナルが高くなっており、2分子の局在が近いことが推察された。Smadおよびc-Fosシグナルピーク中心近傍での2分子の結合量の比較を行った (図12-F)。c-Fosシグナルピークを中心として±250 bp内のSmadとc-Fosの結合量と分布を示した (①)。縦軸はc-Fos標的遺伝子の配列で、シグナル量の高い遺伝子から順に上方から配列されている。c-Fosシグナルピークを中心にとっているため、c-Fosシグナル量を示す下図では中心付近に強くバンドが現れる。一方Smad (上図) もc-Fosシグナルピークを中心によく結合することがわかる。図②は①と同様にSmadシグナルピークを中心として±250 bp内のSmadとc-Fosの結合量と分布を示した図である。c-FosもSmadシグナルピーク中心によく結合することがわかった。さらに実際にSmad、c-Fosが遺伝子のどの部分に結合するか調べたところ (図12-G,H)、ともに転写開始点周囲に結合することがわかった。Smad、c-Fosは転写調節に寄与していることが考えられた。

4-5 破骨細胞マスター因子 *NfatC1* 遺伝子と Smad、c-Fos の相互作用

*NfatC1*遺伝子上のヒストン修飾の変化、Smad、c-Fosの結合およびオープンクロマチン構造の変化についての解析 (ChIPseq、FAIREseq)

BMMをTGF- β (1 ng/ml) またはSB431542 (10 μ M) で5日間培養し細胞を回収した。またRANKL刺激後のサンプルとして刺激後24時間の細胞を採取した。抗H3K4me3、抗H3K27me3抗体、抗Smad2/3抗体、抗c-Fos抗体を用いてChIPseqを行った。また転写因子の結合を示すオープンクロマチン領域の検索にFAIREseqを行った (図13A)。

*NfatC1*遺伝子上におけるこれらの変化を調べたところ、ヒストン修飾はTGF- β が加わった状態でもbivalentな状態のままであり、RANKL添加前では変化が見られなかった。RANKL添加後のFAIREseqによるオープンクロマチン領域を調べると、SB431542を加えた状態に比べてTGF- β +RANKLでは*NfatC1*遺伝子上におけるシグナル量が高かった。SmadのChIPseqではRANKL添加前後で*NfatC1*遺伝子上に結合していることがわかった。またc-FosのChIPseqによっ

てSB431542を加えた状態ではc-Fosの結合は殆ど見られないのに対して、TGF- β を加えたサンプルではc-Fosの結合がオープンクロマチン領域を中心に見られた。

TGF- β あるいはSB431542とRANKL刺激後の*NfatC1*遺伝子の発現変化について、経時的にその発現レベルを調べた (図13B)。TGF- β 単独の刺激では*NfatC1*遺伝子の発現変化は殆ど見られず、TGF- β +RANKL刺激後に発現上昇し、SB431542添加群では発現変化は見られなかった。

オープンクロマチン領域 (図13A *; chr18:80888463-80888701) におけるSmadおよびc-FosのChIP-qPCRによる解析を行った (図13C)。その結果Smad、c-FosともにChIP結合量はTGF- β +RANKLで高く、SB431542を添加した群では低い状態であった。

そこでc-Fosノックアウトマウスの脾臓由来細胞に対してTGF- β とRANKLの刺激を加え、c-Fosを欠失した状態におけるSmadのゲノム上への結合を調べた (図13D)。オープンクロマチン領域 (図13A *; chr18:80888463-80888701) におけるSmadのChIP-qPCRを行った。ワイルドタイプ細胞ではTGF- β 刺激にตอบสนองしてSmadのChIP結合量の上昇が見られたのに対して、ノックアウト細胞ではTGF- β によるSmadのChIP結合の上昇が見られなかった。

小括3

RANKL刺激後のSmadとc-FosのChIPseqを行ったところ、Smadとc-Fosの結合する領域が多く存在することがわかり、さらに2分子の結合が存在する領域においてFAIREseqのシグナル量が高いことがわかった。FAIREseqのシグナル中心にはSmadやc-Fosの結合モチーフが多く存在し、実際にピークを中心としてそれらがゲノム上に結合していることがわかった。全ゲノム解析によってSmadとc-Fosが共局在することがわかった。

破骨細胞分化制御因子である*NfatC1*遺伝子上におけるエピジェネティックな修飾変化を解析すると、ヒストン修飾はTGF- β 刺激後もbivalentな状態が維持されていた。RANKL刺激後のFAIREseqのシグナル量はTGF- β 刺激で増加しており、その領域にはSmadとc-Fosの結合が見られた。Smadシグナルを阻害すると、*NfatC1*遺伝子へのc-Fosの結合シグナル量が減少した。これとは逆にc-Fosをノックアウトした細胞を用いてSmadのゲノム上への応答性を調べたところ、c-Fosノックアウト細胞ではRANKLとTGF- β 刺激を加えてもSmadの結合が抑えられた状態のままであった。

第5章 考察

TGF- β 下流分子Smadはリン酸化を受けて核内に移行し、転写活性を示す。

YasuiらはSmadがTRAF6に結合することで、RANKL/RANKシグナルを制御していることを報告した (12)。TGF- β シグナル下流分子Smad3がTRAF6に結合し、RANKL刺激により誘導されるTRAF6-TAB2-TAK1-TAB1複合体の形成に作用していると考えられた。本研究において、Smad分子のゲノムにもたらす直接的な作用を解析するためにChIPseqを行った。そこで得られたデータを用いてモチーフ解析を行った結果AP-1が高率に検出された。そこで破骨細胞の分化過程において必須の因子であるc-FosとSmadの関わりについて解析を進めた。核内タンパクの発現解析によって、TGF- β とRANKLの刺激により核内におけるc-FosとSmadの発現が上昇することや免疫沈降法によって2分子が直接的に結合することがわかった。またさらに細胞免疫染色によっても分子の局在が明らかとなり、PLA法によりTGF- β とRANKLの刺激により核内での近接した2分子の局在が明らかとなった。こうしたことから破骨細胞分化過程において、RANKLシグナルとともにSmadシグナルが必須であることがわかり、Smadとc-FosのChIPseqによる解析を進めた。*NfatC1*の遺伝子のオープンクロマチン領域にはSmadとc-Fosが共局在することが明らかとなった。これらの結果からc-Fosと

Smadが協調して核内に移行し、*NfatC1*の転写を調節し破骨細胞分化を制御していることが推察された (図14)。

SmadとAP-1の2分子の相互作用について調べた報告もいくつか存在する。

ZhangらはSmad3、4とc-Jun、c-Fosの転写活性と分子間の結合を調べた (38)。

Smad4単独刺激による転写活性は低いですが、Smad3とSmad4の共刺激では高い転写活性を示し、さらにc-Jun、c-Fosとともに共刺激すると転写活性が増すことを示した。またc-Jun、c-FosとSmad3との直接的な結合についても免疫沈降法を用いて明らかとしている。またSmadとAP-1の2分子が遺伝子の転写を制御しているという報告は他にもある。NorwitzらはGnRH受容体遺伝子の転写活性に2分子の協調したプロモーター上への結合がsynergisticに作用することを示している (39)。また、Sundqvistらbreast cancer cell lineでTGF- β 刺激前後におけるSmadとAP-1の細胞内での局在性についてPLAを用いて解析した (40)。

TGF- β 刺激によってSmad2/3とc-Fos、Fra-1との共局在を示すスポットが核内に現れた。さらにmmp-10やpai-1プロモーターへのChIP-qPCRの解析によってSmad2/3-Fra-1複合体がTGF- β による遺伝子の発現に寄与していると報告した。

転写因子はゲノム上の小さな結合認識領域に結合する (41)。この選択性は他の因子の誘導と関連し、クロマチンリモデリングへと繋がる。本研究において、TGF- β 受容体の阻害によって、Smadのリン酸化及び核内への移行が阻害され、

さらにはc-Fosの誘導を阻害した。Smadとc-Fosの共局在によってFAIREseqのシグナル量が高くなったことは2つの分子の存在がクロマチン構造の変化をもたらしていると考えられる。このように、2分子のゲノム上への結合協調作用、クロマチンリモデリングに与える影響について他にも報告されている。Biddieらはc-Fosのドミナントネガティブ体を用いて、グルココルチコイドレセプター (GR) のChIPseqおよびクロマチンリモデリングを調べるDNase I のChIPseqを行った。c-Fos作用を欠失させると、DNase I のシグナル量は減り、さらにGRのシグナル量も減弱した。このことからGRのゲノム上への結合はc-Fosがコントロールしていることが分かった。本研究でも*NfatC1*遺伝子上でのc-Fosの結合を調べた結果、SB431542を用いた場合にはc-Fosの結合が阻害されていることがわかった。

TGF- β により活性化するSmad2/3の標的遺伝子群の解析では、Smad2/3は遺伝子のプロモーター上に多く結合し、TGF- β 刺激によってそれらの発現が上昇することが確かめられた。そのことはヒストン修飾の変化からも確認され、H3K4me3、H3K27me3といったヒストンのトリメチル化の変化を調べることで発現制御を説明付けることができた。

転写の活性化は様々なメカニズムを経て制御されている。転写は一般に少なくとも2つの段階が関与し、1つ目はRNAポリメラーゼ II がプロモーター領

域にリクルートされて、転写開始前複合体 PIC (pre-initiation complex) を形成することである (42)。しかしながら PIC は DNA の立体構造を変えるが転写機構としては不十分であり、RNA ポリメラーゼ II の失活後、それに引き続く転写伸長機構 (elongation) が必要である。ヒストンのメチル化にはこれらの 2 つの過程に関わって制御していると考えられている。活性化した遺伝子のプロモーター領域にはトリメチル化した H3K4me3 が豊富に見られ、クロマチン修飾因子等のタンパクの結合部位となっている。クロマチン修飾因子は転写開始領域でクロマチン構造を開いて、転写機構への結合を促す。ヒストン修飾は Trithorax group (TrxG) 複合体と Polycomb group 複合体によって、バランスをとりながら制御されていることが明らかにされてきた。RNA ポリメラーゼ II が転写開始領域に結合した後、C 末端ドメイン (CTD) の Ser5 リン酸化が起こる。TrxG・Mll1 複合体がリン酸化 CTD に結合すると H3K4 のトリメチル化および H4 アセチル化を引き起こし、これによって転写が開始する。RNA ポリメラーゼ II がヌクレオソーム上を移動するためにはクロマチン構造が弛緩していなければならない、FACT 複合体と H2A/H2B ダイマーの相互作用が必要である (43) (44)。このようにヒストン修飾は転写伸長機構に関わっており、クロマチン構造の再構築に関わる重要な機能をもっている。遺伝子の活性化は H3K4me3

と強い相関があるが、遺伝子の発現静止についてはクロマチン免疫沈降によって H3K27me3 が関連することが示されている。

H3K4me3とH3K27me3と同部位に共存するbivalentな状態の遺伝子は発現が抑制された状態にある。分化段階の細胞では、bivalent markが減弱し、H3K27me3が外れることで遺伝子の活性が起こる (34)。TGF- β によってSmad標的遺伝子におけるヒストン修飾の変化を解析すると、H3K4me3が高く、H3K27me3が低い状態を示し、遺伝子が発現する方向にあることが示された。このことはさらに遺伝子を発現上昇した群と静止した群にわけてそれぞれヒストン修飾を調べることで、遺伝子発現とヒストン修飾の変化の関連性を示すことができた。またさらにクロマチンが弛緩した領域、オープンクロマチン領域を調べるためにFAIREseqによる解析を行った。TGF- β とSB431542で刺激したサンプルのFAIREseqのシグナル量を比較すると前者で有意に高い値を示し (図12C)、このことからゲノム上への応答がSmadシグナルによって制御されていることがわかる。またgene ontology解析ツールDAVIDを用いてSmad標的遺伝子の特徴を調べると (図8)、細胞内シグナル、転写制御などとの関連があげられ、Smadはそれ自身の直接的な転写制御とは別に転写に関わる遺伝子も広汎に動かしているということがわかった。

ES細胞を始めとして、その発生初期におけるヒストン修飾制御が解明されてきた。破骨細胞は単球・マクロファージ系細胞から融合・多核化されて形成されるが、破骨細胞についても同様にエピジェネティックな遺伝子の発現制御が関わっていると考えられる。最近われわれは破骨細胞分化において重要な役割を担う転写因子である *NfatC1* が、*Jmjd3* を介した H3K27me3 の脱メチル化によってエピジェネティックな制御を受けていることを報告した(45)。

H3K27me3 は遺伝子の発現抑制に関わるヒストン修飾であるが、トリメチル化が外れる遺伝子は発現状態にあると考えられる。ChIP シーケンスを用いてヒストン修飾 (H3K4me3/H3K27me3) について調べると、成熟分化した破骨細胞では *NfatC1* 遺伝子の転写開始点付近における H3K27me3 の発現が低下していることがわかった。すなわち RANKL 刺激に伴いヒストン修飾は bivalent status から monovalent status に変化していることが確認された。また RANKL 刺激によってヒストン脱メチル化酵素である *Jmjd3* が *NfatC1* 遺伝子上に誘導された。*Jmjd3* のノックダウンによって H3K27me3 の脱メチル化が減少し、RANKL による破骨細胞分化が大幅に抑制された。

TGF- β あるいはTGF- β 受容体をコードする遺伝子の異常について序論で述べた。Smad分子についてもその変異型マウスの報告がある。Smad2変異胚は前方臓側内胚葉形成障害を来し、マウスは前後軸の極性障害のためE8.5までの胎生

致死を示す (46)。Smad3変異マウスは生存可能であるが、4~6か月齢で消化管腫瘍のため死亡する (47)。ヒト消化管腫瘍での変異を調べた研究においてもSmad2、3、4遺伝子の変異との関連も報告されている (48)。Smad4変異マウスのホモ接合体は胎生致死を示すが、ヘテロ接合体は正常であった (49)。このSmad4ヘテロノックアウトマウスと腺腫ポリープのモデルマウス (Apc-delta716) をかけ合わせると、腺腫の悪性化、浸潤などが進行した。Smad5はR-Smadの1分子でBMPシグナルに関与する。Smad5ノックアウトマウスは胎生致死で、E9.5-E11.5で羊膜、消化管、心臓、頭蓋、神経管の形成異常が原因で致死する (50)。このようにSmadの変異マウスの解析が報告されているが多くが胎生致死であり、比較的長期間生存するSmad3変異体マウスにおいて骨の表現型に関する報告はない。TGF- β ファミリー分子は多数存在し、一つのSmadの変異体は他のTGF- β サブファミリー分子に作用する影響が大きいと考えられる。したがって破骨細胞分化においてSmad分子が必須であるかについて、破骨細胞特異的にSmadをノックアウトした変異マウスの作出、その骨組織の解析等が必要であると考えられた。

SmadのChIPseqによってゲノムワイドにSmadの結合部位を調べることで、Smad結合部位近傍に存在する他の転写因子の検索が可能となる。Smadのモチーフ解析によって、c-FosやJunといったAP-1分子が候補として挙げられた (図9A)。

転写因子であるAP-1はFos、Jun、ATF、CREBファミリー分子から構成され、Fosタンパク (c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2) はJunファミリー分子とヘテロダイマーを形成し、Junタンパク (c-Jun、JunB、JunD) はホモダイマーあるいはFosファミリー分子とヘテロダイマーを形成し転写活性を有する (51)。AP-1は細胞外シグナルを核内に伝達し、ゲノム上のAP-1が結合することで特異遺伝子の活性化を起こす。したがって細胞の分化、増殖、アポトーシス、腫瘍形成など様々な機能活性を有する (52)。C-Fosノックアウトマウスは生存・生殖可能で、破骨細胞を欠損するため大理石骨病を呈する (53) (54)。さらに骨髓腔非開大、骨髓造血系障害やリンパ球減少症をきたし、歯芽の萌出もみられない。c-Fosの標的遺伝子として*NfatC1*が同定され、c-Fos依存的的に破骨細胞分化が促進されることが示された (9)。またc-Fosノックアウト細胞に*NfatC1*を強制発現させると破骨細胞形成が見られたことから、c-Fosノックアウトにおける破骨細胞分化が起きない理由は*NfatC1*の欠失によることが原因と考えられた (55)。Junファミリー分子については、JunB、c-Junともに胎生致死を呈する。JunBのコンディショナルノックアウトマウスの表現型では骨粗鬆症を呈することが報告されている (56)。

FAIREseqは、ホルムアルデヒドがヌクレオソームに結合していないDNA領域と比べてヌクレオソームに結合している領域のDNAの抽出に適していること

を利用した手法である。FAIREは*Saccharomyces cerevisiae*で初めて報告され、続いてヒトでもFAIREはヌクレオソームを除いた領域で転写開始点やエンハンサーやサイレンサーを含む下流制御領域などを抽出することができることが報告された (57)。しかしながらヒト細胞の実験では、認識される領域は大部分遺伝子から離れた領域にあることがわかり、どのような機能や分子が結合するかなどわかっていない部分もある (58)。一方、DNase-seqはDNase I 酵素による切断が転写開始点周囲にあることから、その周囲に存在するオープンクロマチン領域の検出に優れている。Smadもc-Fosも転写因子であり、プロモーター領域に結合する点を考慮するとFAIREseqによる解析だけではなく、DNase-seqによる解析も必要と考えられた。しかしながらFAIREはプロモーターから離れた領域のクロマチン構造の認識についてはDNase I よりも優れており、エンハンサーなどの修飾因子の解析には向いていることも事実である。

本研究では*NfatC1*遺伝子上のヒストン修飾の変化を見ると、SB431542を加えた条件、TGF- β を加えた条件ともにH3K4me3、H3K27me3ともにマークが入った状態であった。TGF- β 添加条件ではH3K4me3のシグナル量が軽度多い傾向にあったが著明な変化ではなかった。*NfatC1*のmRNA発現量の変化をみてもTGF- β によって発現の変動をみなかったことに一致している。H3K4me3はアクセル、H3K27me3はブレーキに例えられ、bivalentな状態ではアクセルとブレ

一キが共に踏まれた静止した状態を示しており、どちらの方向にも進み得る多能性を有した状態と考えることができる。分化に伴いbivalent mark (H3K4me3/H3K27me3) からmonovalent mark (H3K4me3) へと変わる機序については不明な点が多いが、DNA複製の際に2つのmarkが同時に複製されるのではなく、どちらか一つのmarkしか新しいクロマチン構造には反映されないという仮説が立てられている。またbivalent markは分化の前段階、すなわちそれを進める準備状態であるとの見方もある。ES細胞では主な多能性遺伝子であるNanog、Sox2、Oct4はH3K4me3が高発現している。分化段階ではこれらの遺伝子が一時的にbivalentな状態となることが発見されており、分化多能性を有した状態と言える (59)。Yasuiらの報告 (45) でも、RANKL刺激後の*NfatC1*遺伝子でのヒストン修飾の変化はH3K4me3 monovalentな状態に変化していることが報告されており、RANKL添加前のTGF- β の存在は遺伝子の活性化に備えた準備段階であることが示唆された。

*NfatC1*遺伝子上のオープンクロマチン領域はイントロンに存在し、この領域においてSmadとc-Fosの結合領域が一致した。遺伝子のプロモーターから少し離れた位置に存在するこの2つの分子は、恐らくエンハンサーとして遺伝子の発現制御に関わっているのではないかと推察された。今後DNAアセチル化のChIPseqやSmadまたはc-Fosのノックアウト細胞を使ったこの領域におけるク

ロマチン構造の変化や転写の制御について詳細に調べる必要があると考えられた。

TGF- β シグナル制御による骨に対する薬理作用および効果について調べた研究も報告されている (60)。EdwardsらはTGF- β に対する抗体1D11を用いて、マウスの骨量への作用を μ CTを用いて解析した。その結果骨芽細胞の増殖と破骨細胞の減少により、骨量増加効果があることを示した。このことは本研究によって解明された、TGF- β 下流のSmadのc-Fosとのゲノミックな相互作用を介した破骨細胞分化制御機構を裏付ける1つの研究報告と言える。TGF- β の多岐にわたる生理機能を考えると、ヒトへの応用は慎重な解析・検討が必要であり、今後の課題でもあると考えられた。

第6章 結語

TGF- β はRANKL誘導性破骨細胞分化に対して促進的に作用した。エピジェネティックな修飾変化を交えたSmad2/3の全ゲノム解析とTGF- β の破骨細胞分化に及ぼす作用機序について、次世代シーケンサーを用いて網羅的な遺伝子解析を行った。その結果Smad2/3の共役因子として転写因子AP-1分子であるc-Fosを同定した。タンパクを用いた免疫沈降法や細胞免疫染色などの解析によって、2つの分子が結合し、協調して核内に移行して作用することが明らかとなった。またSmad、c-Fosのシグナルの阻害または欠失によって、互いのゲノム上への結合が阻害されたことから、2分子はクロマチンリモデリングを介してゲノム上へ結合し、相互に協調して働いて、*NfatC1*遺伝子の転写調節に関わることを示唆された。

第7章 謝辞

本研究は主に、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において、平成22年4月から平成26年3月の間に行なわれた。

研究は整形外科第一研究室を中心として、多くの研究者による指導や支援を頂いて行われた。貴重な研究機会を与えて下さった東京大学整形外科学教室前教授中村耕三先生には深く感謝致します。また、本研究の立案・遂行にあたり多大な指導を頂いた東京大学整形外科学教室教授田中栄先生には心より感謝致します。次世代シーケンサーを用いた解析は東京大学先端科学技術研究センター教授油谷浩幸先生の指導の下行われた。

また同研究室の実験・研究室助手山口様、杉田様には日々の実験において細部に渡る支援を頂いた。

多くの方々の指導や支援によって本研究を行えたことに深く感謝致します。

最後に東京大学大学院医学系研究科における4年間の研究生活を支えてくれた家族、妻真弓、長男孝徳、長女美緒に感謝を示したい。

第8章 参考文献

1. Tanaka S. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the RANKL/RANK/OPG system. *Am J Nephrol.* 2007;27(5):466-78.
2. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature.* 1990;345(6274):442-4.
3. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89(2):309-19.
4. 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.* 1998;93(2):165-76.
5. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(7):3597-602.
6. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:795-823.
 7. Paloneva J, Mandelin J, Kiialainen A, Bohling T, Prudlo J, Hakola P, Haltia M, Konttinen YT, Peltonen L. DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. *J Exp Med.* 2003;198(4):669-75.
 8. Mocsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, Majumdar S, Lanier LL, Lowell CA, Nakamura MC. The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(16):6158-63.
 9. 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. *Dev Cell.* 2002;3(6):889-901.
 10. Takayanagi H, Kim S, Taniguchi T. Signaling crosstalk between RANKL and interferons in osteoclast differentiation. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S227-32.

11. Fox SW, Fuller K, Chambers TJ. Activation of osteoclasts by interleukin-1: divergent responsiveness in osteoclasts formed in vivo and in vitro. *J Cell Physiol.* 2000;184(3):334-40.
12. Yasui T, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Matsumoto T, Masuda H, Hirose J, Omata Y, Yasuda H, Imamura T, Nakamura K, Tanaka S. Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF-beta through molecular interaction between Smad3 and Traf6. *J Bone Miner Res.* 2011;26(7):1447-56.
13. Eastell R, Cedel SL, Wahner HW, Riggs BL, Melton LJ, 3rd. Classification of vertebral fractures. *J Bone Miner Res.* 1991;6(3):207-15.
14. Neuhauser EB, Shwachman H, et al. Progressive diaphyseal dysplasia. *Radiology.* 1948;51(1):11-22.
15. Kinoshita A, Saito T, Tomita H, Makita Y, Yoshida K, Ghadami M, Yamada K, Kondo S, Ikegawa S, Nishimura G, Fukushima Y, Nakagomi T, Saito H, Sugimoto T, Kamegaya M, Hisa K, Murray JC, Taniguchi N, Niikawa N, Yoshiura K. Domain-specific mutations in TGFB1 result in Camurati-Engelmann disease. *Nat Genet.* 2000;26(1):19-20.
16. Saito T, Kinoshita A, Yoshiura K, Makita Y, Wakui K, Honke K, Niikawa N, Taniguchi N. Domain-specific mutations of a transforming growth factor (TGF)-beta 1

latency-associated peptide cause Camurati-Engelmann disease because of the formation of a constitutively active form of TGF- β 1. *J Biol Chem.* 2001;276(15):11469-72.

17. Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N, Xu FL, Myers LA, Spevak PJ, Cameron DE, De Backer J, Hellemans J, Chen Y, Davis EC, Webb CL, Kress W, Coucke P, Rifkin DB, De Paepe AM, Dietz HC. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet.* 2005;37(3):275-81.

18. Magenis RE, Maslen CL, Smith L, Allen L, Sakai LY. Localization of the fibrillin (FBN) gene to chromosome 15, band q21.1. *Genomics.* 1991;11(2):346-51.

19. Sakuma M, Hatsushika K, Koyama K, Katoh R, Ando T, Watanabe Y, Wako M, Kanzaki M, Takano S, Sugiyama H, Hamada Y, Ogawa H, Okumura K, Nakao A. TGF- β type I receptor kinase inhibitor down-regulates rheumatoid synoviocytes and prevents the arthritis induced by type II collagen antibody. *Int Immunol.* 2007;19(2):117-26.

20. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al. Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet.* 1994;8(4):345-51.

21. Shovlin CL. Molecular defects in rare bleeding disorders: hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thromb Haemost.* 1997;78(1):145-50.
22. Massague J, Attisano L, Wrana JL. The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol.* 1994;4(5):172-8.
23. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell.* 2008;134(3):392-404.
24. Graff JM, Bansal A, Melton DA. Xenopus Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF beta superfamily. *Cell.* 1996;85(4):479-87.
25. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 2003;425(6958):577-84.
26. Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J, Pavletich NP. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell.* 1998;94(5):585-94.
27. Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Kern SE. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell.* 1998;1(4):611-7.
28. Dennler S, Huet S, Gauthier JM. A short amino-acid sequence in MH1 domain is responsible for functional differences between Smad2 and Smad3. *Oncogene.* 1999;18(8):1643-8.

29. Dunn NR, Koonce CH, Anderson DC, Islam A, Bikoff EK, Robertson EJ. Mice exclusively expressing the short isoform of Smad2 develop normally and are viable and fertile. *Genes Dev.* 2005;19(1):152-63.
30. Ross S, Cheung E, Petrakis TG, Howell M, Kraus WL, Hill CS. Smads orchestrate specific histone modifications and chromatin remodeling to activate transcription. *EMBO J.* 2006;25(19):4490-502.
31. Allfrey VG, Mirsky AE. Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science.* 1964;144(3618):559.
32. Strahl BD, Ohba R, Cook RG, Allis CD. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(26):14967-72.
33. 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.* 2006;125(2):315-26.
34. 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*. 2007;448(7153):553-60.

35. Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, Landegren U. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*. 2006;3(12):995-1000.

36. Wakabayashi K, Okamura M, Tsutsumi S, Nishikawa NS, Tanaka T, Sakakibara I, Kitakami J, Ihara S, Hashimoto Y, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, Sakai J. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop. *Mol Cell Biol*. 2009;29(13):3544-55.

37. Giresi PG, Lieb JD. Isolation of active regulatory elements from eukaryotic chromatin using FAIRE (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements). *Methods*. 2009;48(3):233-9.

38. Zhang Y, Feng XH, Derynck R. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature*. 1998;394(6696):909-13.

39. Norwitz ER, Xu S, Xu J, Spiryda LB, Park JS, Jeong KH, McGee EA, Kaiser UB. Direct binding of AP-1 (Fos/Jun) proteins to a SMAD binding element facilitates both

gonadotropin-releasing hormone (GnRH)- and activin-mediated transcriptional activation of the mouse GnRH receptor gene. *J Biol Chem.* 2002;277(40):37469-78.

40. Sundqvist A, Zieba A, Vasilaki E, Herrera Hidalgo C, Soderberg O, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH, Landegren U, Ten Dijke P, van Dam H. Specific interactions between Smad proteins and AP-1 components determine TGFbeta-induced breast cancer cell invasion. *Oncogene.* 2013;32(31):3606-15.

41. Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, Li W, Meyer CA, Szary AJ, Eeckhoute J, Shao W, Hestermann EV, Geistlinger TR, Fox EA, Silver PA, Brown M. Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell.* 2005;122(1):33-43.

42. Core LJ, Lis JT. Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science.* 2008;319(5871):1791-2.

43. Belotserkovskaya R, Reinberg D. Facts about FACT and transcript elongation through chromatin. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14(2):139-46.

44. Jamai A, Puglisi A, Strubin M. Histone chaperone spt16 promotes redeposition of the original h3-h4 histones evicted by elongating RNA polymerase. *Mol Cell.* 2009;35(3):377-83.

45. 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.* 2011;26(11):2665-71.
46. Waldrip WR, Bikoff EK, Hoodless PA, Wrana JL, Robertson EJ. Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell.* 1998;92(6):797-808.
47. Zhu Y, Richardson JA, Parada LF, Graff JM. Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell.* 1998;94(6):703-14.
48. Fleming NI, Jorissen RN, Mouradov D, Christie M, Sakthianandeswaren A, Palmieri M, Day F, Li S, Tsui C, Lipton L, Desai J, Jones IT, McLaughlin S, Ward RL, Hawkins NJ, Ruzskiewicz AR, Moore J, Zhu HJ, Mariadason JM, Burgess AW, Busam D, Zhao Q, Strausberg RL, Gibbs P, Sieber OM. SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2013;73(2):725-35.
49. Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, Matsui M, Seldin MF, Taketo MM. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell.* 1998;92(5):645-56.

50. Chang H, Huylebroeck D, Verschueren K, Guo Q, Matzuk MM, Zwijsen A. Smad5 knockout mice die at mid-gestation due to multiple embryonic and extraembryonic defects. *Development*. 1999;126(8):1631-42.
51. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1072(2-3):129-57.
52. Jochum W, Passegue E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene*. 2001;20(19):2401-12.
53. Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V. Pleiotropic effects of a null mutation in the *c-fos* proto-oncogene. *Cell*. 1992;71(4):577-86.
54. Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Mohle-Steinlein U, Ruther U, Wagner EF. Bone and haematopoietic defects in mice lacking *c-fos*. *Nature*. 1992;360(6406):741-5.
55. Matsuo K, Galson DL, Zhao C, Peng L, Laplace C, Wang KZ, Bachler MA, Amano H, Aburatani H, Ishikawa H, Wagner EF. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking *c-Fos*. *J Biol Chem*. 2004;279(25):26475-80.
56. Kenner L, Hoebertz A, Beil FT, Keon N, Karreth F, Eferl R, Scheuch H, Szremska A, Amling M, Schorpp-Kistner M, Angel P, Wagner EF. Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *J Cell Biol*. 2004;164(4):613-23.

57. Nagy PL, Cleary ML, Brown PO, Lieb JD. Genomewide demarcation of RNA polymerase II transcription units revealed by physical fractionation of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(11):6364-9.
58. Song L, Zhang Z, Grassegger LL, Boyle AP, Giresi PG, Lee BK, Sheffield NC, Graf S, Huss M, Keefe D, Liu Z, London D, McDaniel RM, Shibata Y, Showers KA, Simon JM, Vales T, Wang T, Winter D, Clarke ND, Birney E, Iyer VR, Crawford GE, Lieb JD, Furey TS. Open chromatin defined by DNaseI and FAIRE identifies regulatory elements that shape cell-type identity. *Genome Res*. 2011;21(10):1757-67.
59. Pan G, Tian S, Nie J, Yang C, Ruotti V, Wei H, Jonsdottir GA, Stewart R, Thomson JA. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007;1(3):299-312.
60. Edwards JR, Nyman JS, Lwin ST, Moore MM, Esparza J, O'Quinn EC, Hart AJ, Biswas S, Patil CA, Lonning S, Mahadevan-Jansen A, Mundy GR. Inhibition of TGF β signaling by 1D11 antibody treatment increases bone mass and quality in vivo. *J Bone Miner Res*. 2010;25(11):2419-26.

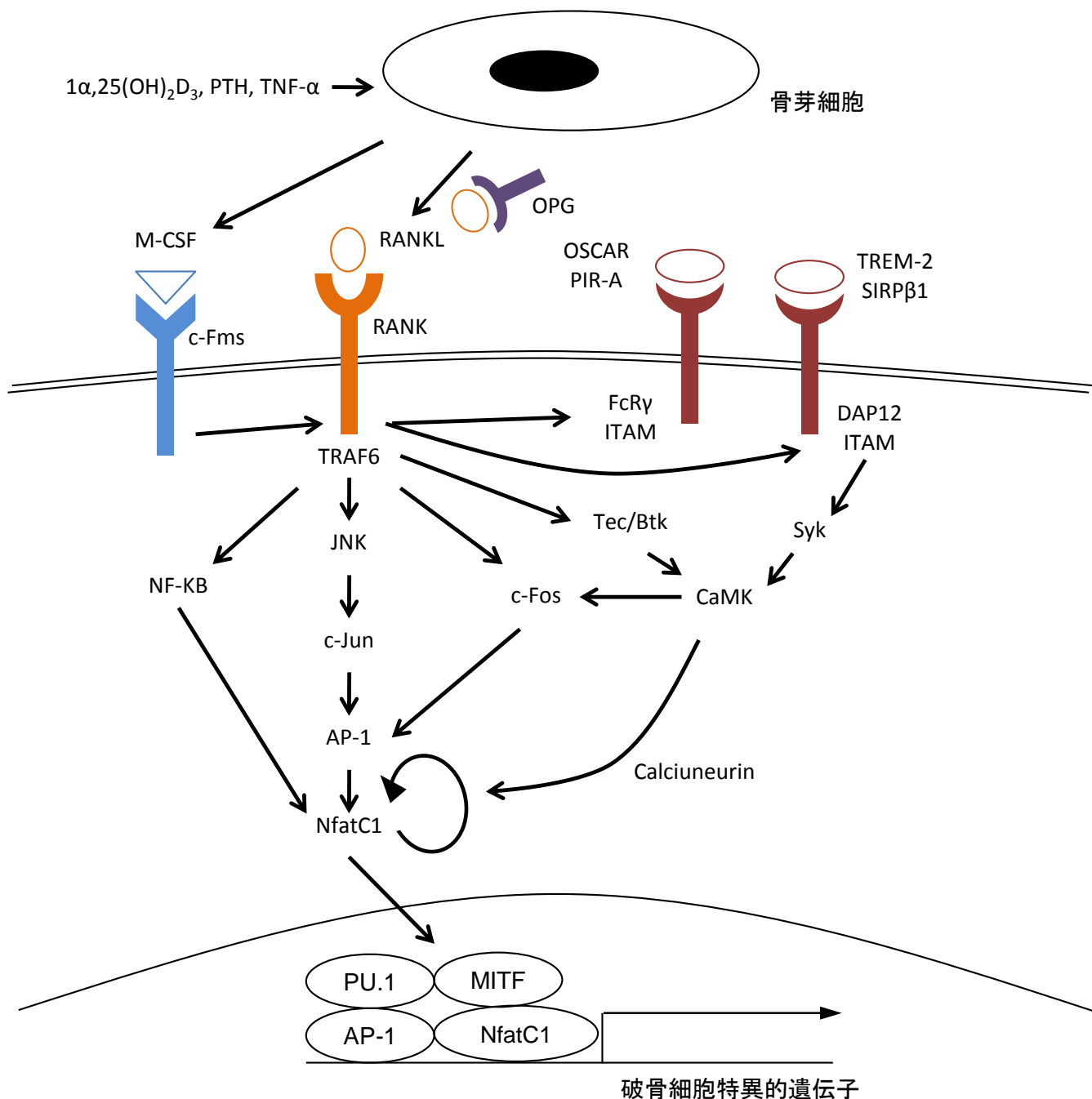


図 1 RANKL下流の破骨細胞分化のシグナル経路

1α, 25 (OH)₂ D₃、PTH、TNF-αなどの刺激により骨芽細胞系よりM-CSFやRANKLが放出されて骨髄細胞上の各種受容体に結合する。OPGはRANKLと結合することで、RANKとRANKLの結合を競合的に阻害する。RANKLはRANKと結合してRANKの3量体化とTRAFファミリーの誘導をもたらす。特にTRAF6は破骨細胞の形成に重要である。RANKL刺激に伴いNF-κB、c-JUN N末端キナーゼ、p38 MAPKなどの下流シグナル分子が活性化され破骨細胞の形成を促進する。ITAM、DAP12、FcRγなどの共刺激系シグナル伝達も破骨細胞分化に関わり、カルシウムシグナルを誘導し破骨細胞形成の転写促進因子であるNfatC1を誘導する。NfatC1は破骨細胞形成に関わる転写因子PU.1、AP-1、MITFなどの発現を誘導する。

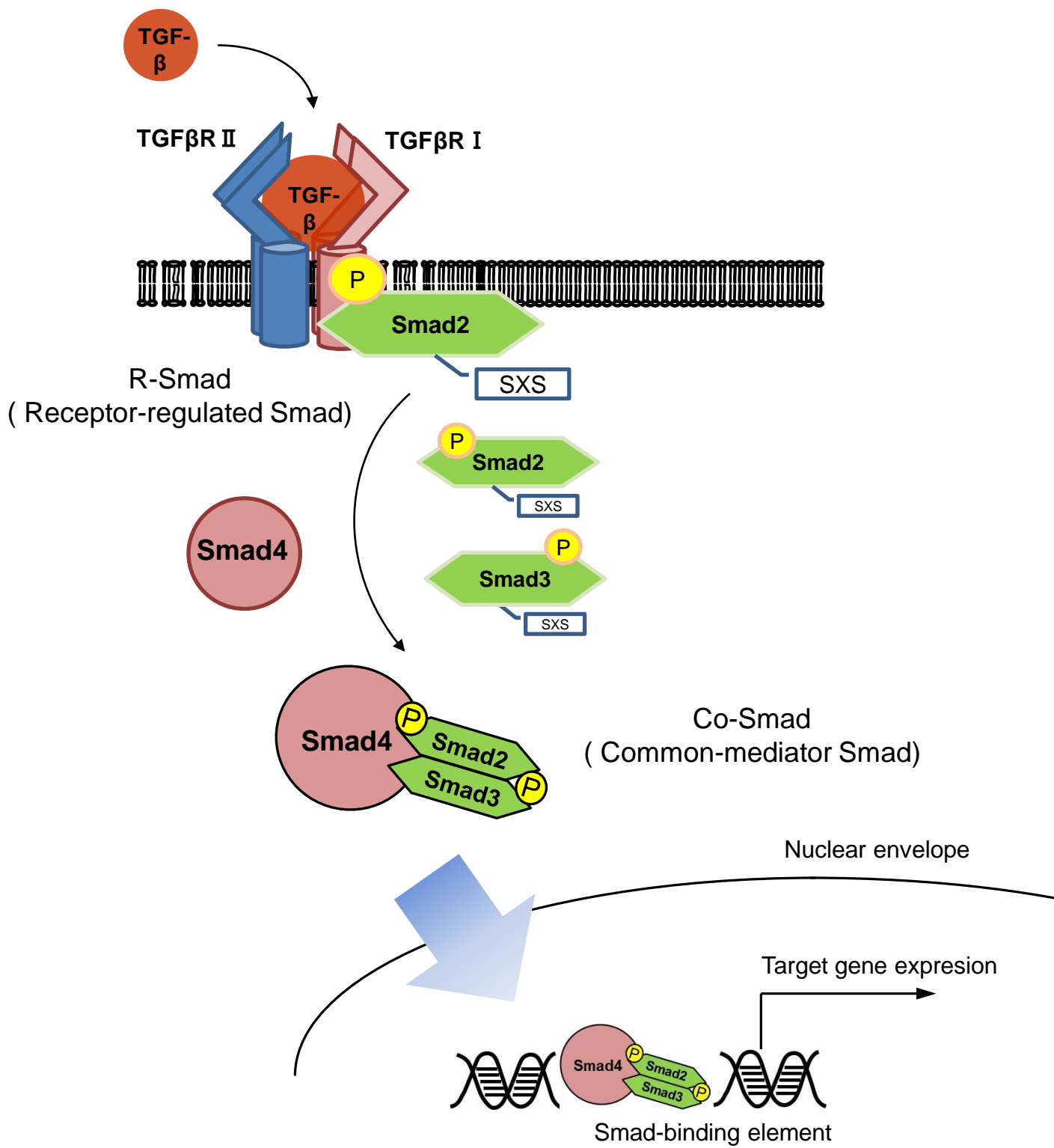
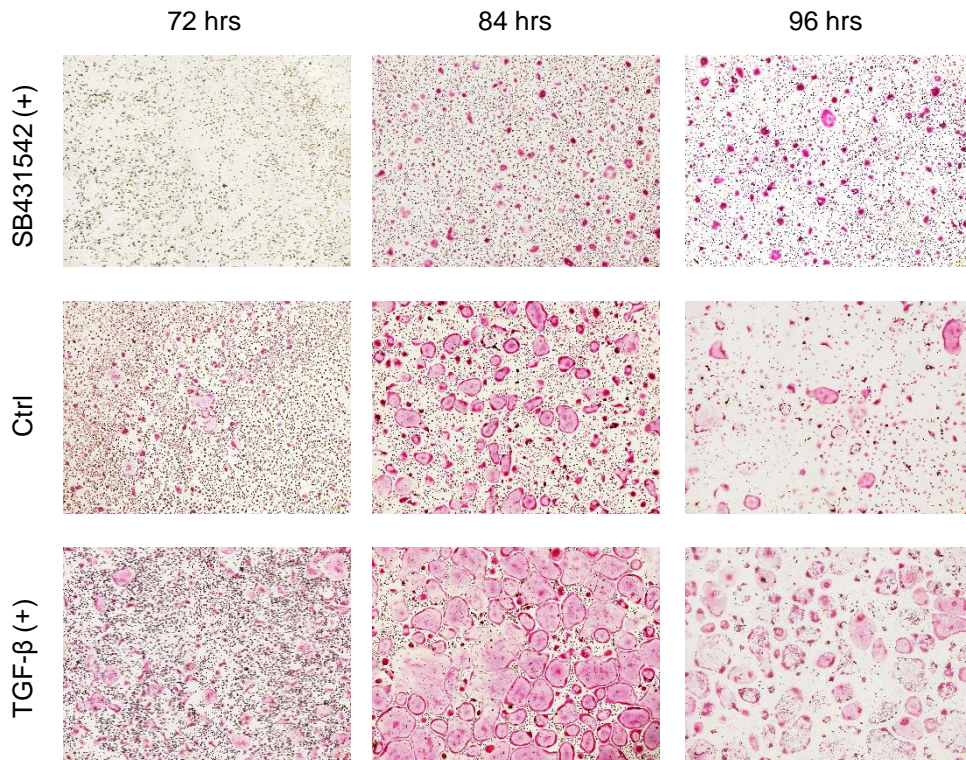


図 2 TGF-β下流のSmadシグナル経路

TGF-βは細胞表面の2種類のtype I、II 受容体に結合してシグナル伝達を開始する。Type I レセプターのGS部位のリン酸化が起こり、下流分子であるSmadタンパクがリン酸化される。2つのリン酸化したR-Smad2分子がCo-Smad (Smad4) 1分子と結合し、3量体を形成する。量体は核内に移行しゲノム上に結合した後、転写活性を示す。

A

100 ng/ml GST-RANKL



B

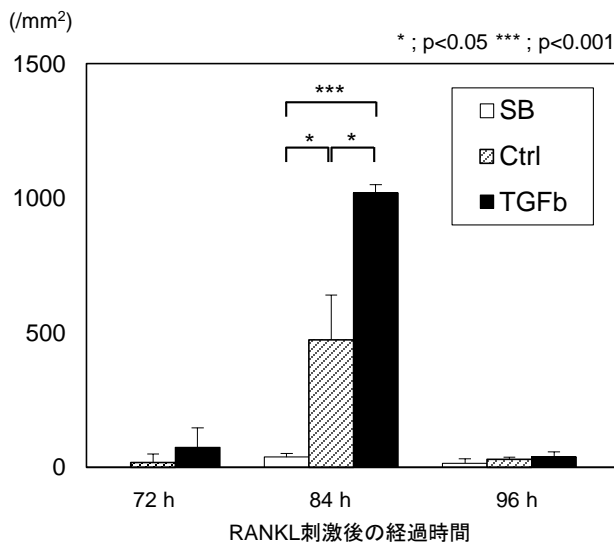


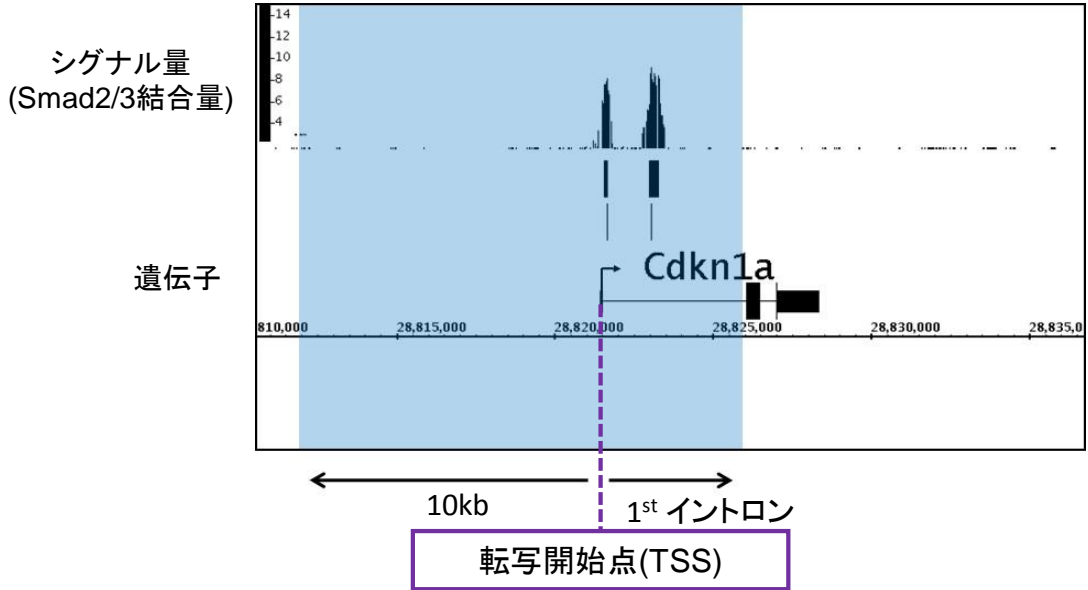
図3 TGF-βのRANKL誘導性破骨細胞分化促進作用

A マウスの骨髄由来細胞に対しGST-RANKL (100 ng/ml) 刺激を加え、72、84、96時間後に細胞を固定しTRAP染色を行った。コントロール群、TGF-β (0.1 ng/ml) 添加群ではRANKL刺激後84時間で破骨細胞が急速に増加し、96時間では大部分の細胞のアポトーシスが見られた。84時間におけるTGF-β添加群での破骨細胞形成はコントロール群よりも増加した。TGF-β受容体阻害剤であるSB431542 (10 μM) を添加した群では破骨細胞形成が殆ど見られなかった。

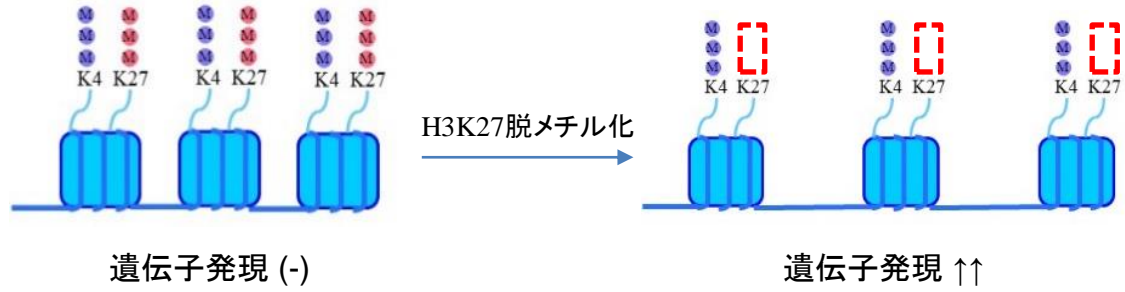
B TRAP陽性多核細胞数の比較。RANKL刺激後84時間におけるTGF-β群での破骨細胞数の増加は、コントロール群、SB添加群に比べて有意に増加していた。* p < 0.05, *** p < 0.001

A

ChIPseq (抗Smad2/3抗体)



B



C

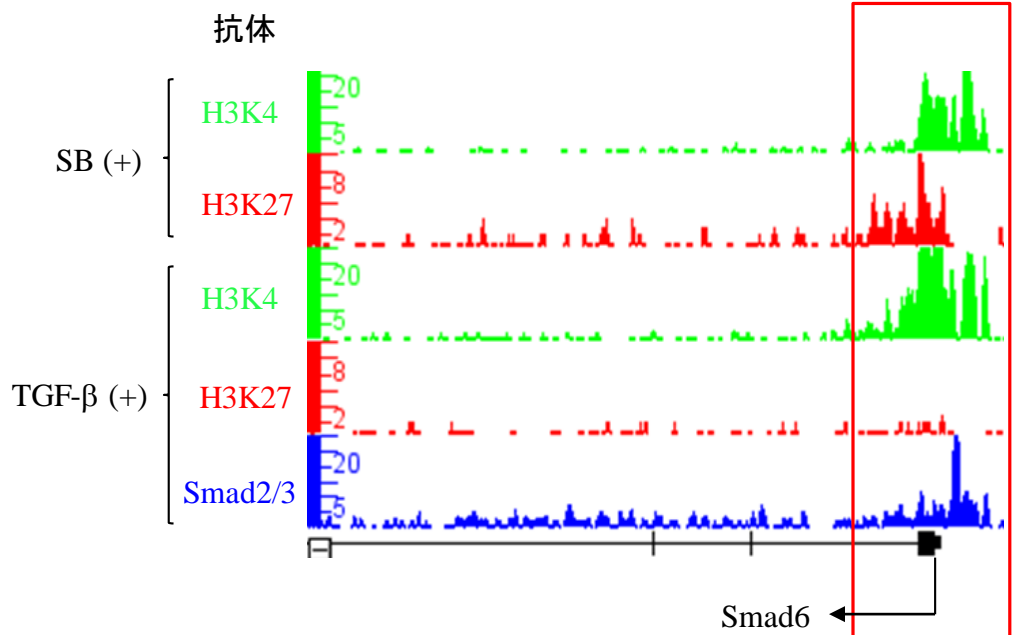


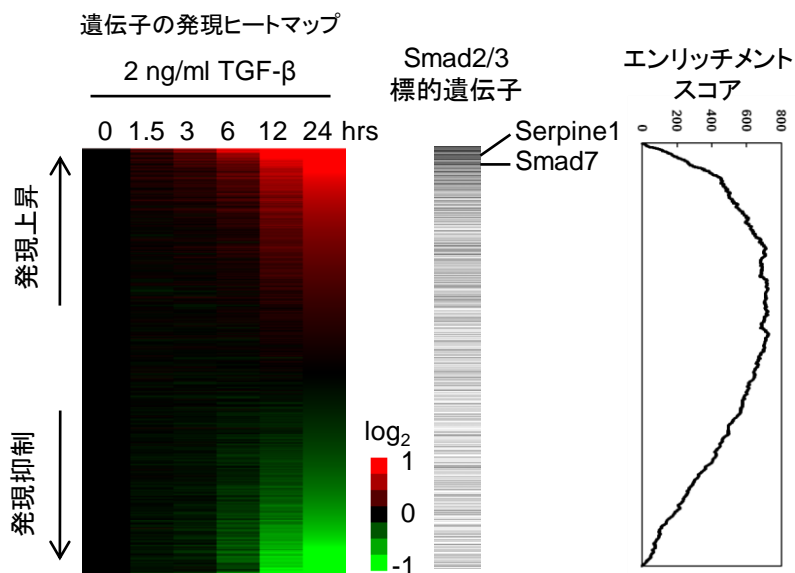
図 4 Smad標的遺伝子とヒストン修飾の解析

A 骨髄マクロファージ細胞をTGF- β (1 ng/ml) を含む培養液で5日間培養し細胞を回収、抗Smad2/3抗体を用いてChIPseqを行った。図は本研究で行った実験データ解析結果の一例。Smad標的遺伝子の抽出には、遺伝子の転写開始点から10kb上流から1st イントロンまでの間に、Smad結合シグナル量が8以上である領域および遺伝子を抽出した。その結果、2,786か所、903遺伝子のSmad標的領域および遺伝子が抽出された。

B ヒストン修飾の変化による遺伝子発現制御機構。ヒストンH3リジンK4me3修飾は遺伝子の発現に関与し、H3K27me3は遺伝子発現の抑制に関わることが知られている。すなわち細胞の分化に関わる遺伝子においては、H3K4とH3K27がともにトリメチル化されている状態 (bivalent status) では遺伝子発現は静止した状態にあり、分化段階ではH3K27のトリメチル化修飾が外れ (monovalent status)、遺伝子発現が誘導される。

C ヒストン修飾の変化の一例 (本研究の実験データより)。Smad6は抑制性Smad分子としてTGF- β 刺激が加わると発現が誘導されることが知られている。図よりそのプロモーター領域にはSmad2/3が結合していることがわかる。またTGF- β 刺激によってヒストン修飾はbivalentな状態からmonovalentな状態へ変化しており、遺伝子発現の状態に変化したことが示されている。

A



B

		全ゲノム		Smad2/3 標的遺伝子		#b/#a
		遺伝子数 (#a)	遺伝子の割合 (%)	遺伝子数 (#b)	遺伝子の割合 (%)	%
Total		8839	100.0	592	100.0	6.7
発現上昇 (2倍以上)	1.5 hrs	80	0.9	34	5.7	42.5
	6 hrs	279	3.2	64	10.8	22.9
	24 hrs	616	7.0	83	14.0	13.5
発現減少 (1/2以下)	1.5 hrs	47	0.5	4	0.7	8.5
	6 hrs	206	2.3	13	2.2	6.3
	24 hrs	684	7.7	29	4.9	4.2

図 5. Smad2/3標的遺伝子の発現プロファイル

A TGF-β刺激後の遺伝子の経時的な発現変化。骨髄マクロファージ細胞をTGF-β (2 ng/ml) で刺激後0、1.5、3、6、12時間後にmRNAを回収した。各サンプルにおいてマイクロアレイ解析を行った。刺激前と比較した発現変化をヒートマップ表示した。発現上昇を赤で、発現抑制を緑で表示している。横線の並びはSmad2/3標的遺伝子を示している。右図はGSEAエンリッチメントスコア (濃縮率) をプロットした。

Smad2/3標的遺伝子は図の上方に多く存在し、TGF-βによって発現は上昇し、エンリッチメントスコアも高かった。

B TGF-β刺激後発現上昇または抑制された遺伝子の割合。TGF-β刺激前 (0時間) の発現量と比較し、発現上昇 (2倍以上) あるいは抑制 (0.5倍以下) の遺伝子の全遺伝子中の割合を算出した。Smad2/3標的遺伝子はTGF-β刺激によって発現する傾向にあることがわかる。

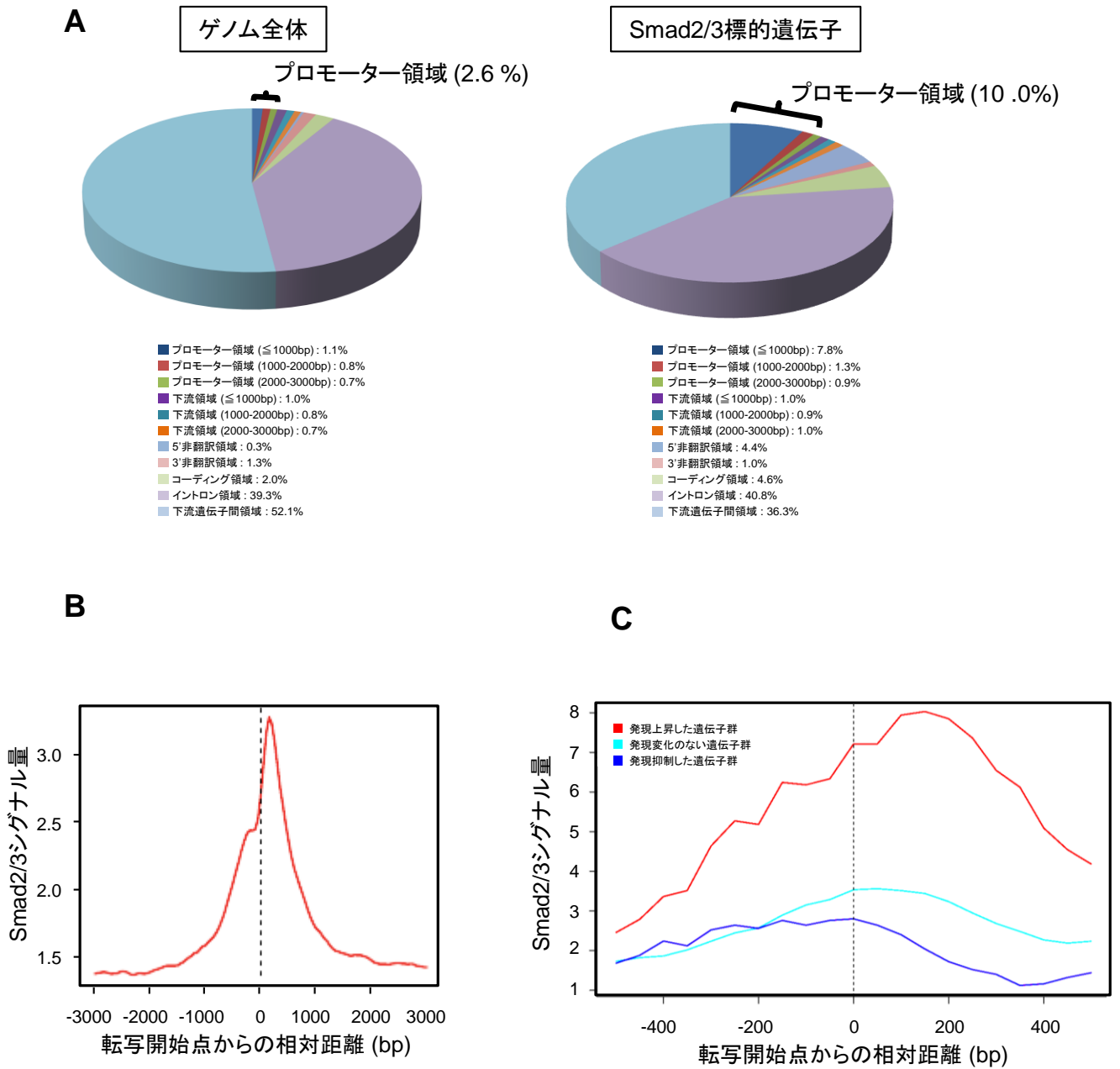


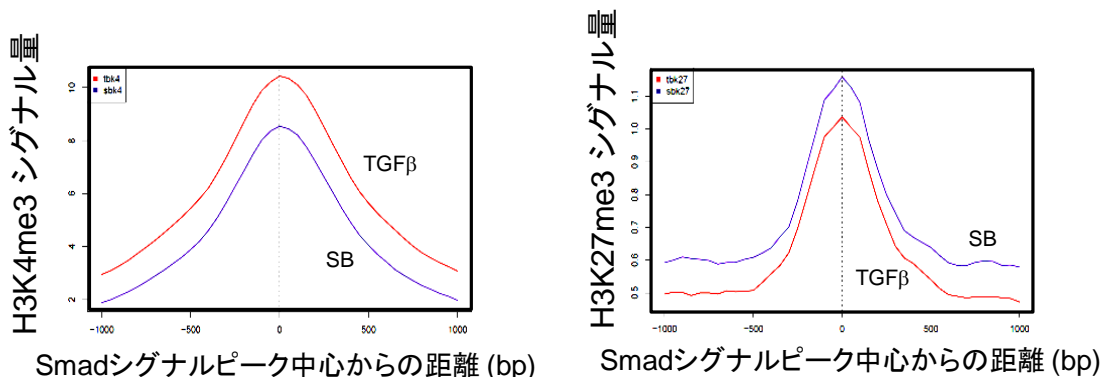
図 6 ゲノム上でのSmad2/3結合領域および転写開始点周囲のSmad2/3シグナル量の解析

A Smad2/3の遺伝子上への結合領域の解析。CEASを用いて解析を行った。Smad2/3はSmad標的遺伝子において、ゲノム全体での結合領域と比較してプロモーター領域に多く結合することがわかる。

B 転写開始点周囲でのSmad2/3シグナル量の解析。Smad2/3は転写開始点付近を中心としてゲノム上に結合した。

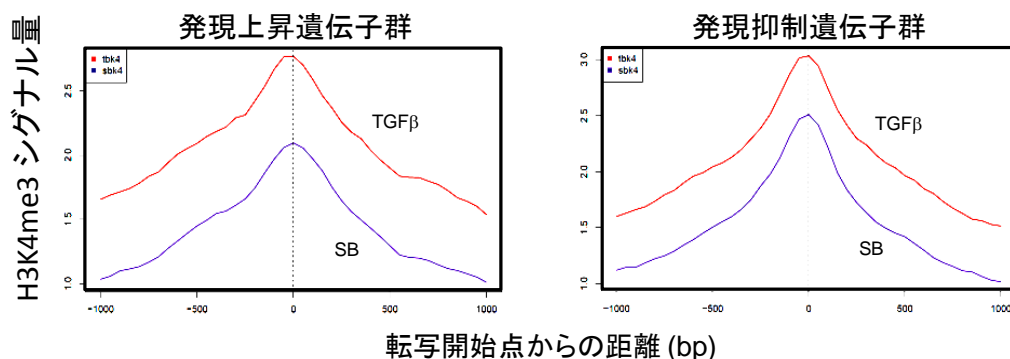
C 遺伝子の発現プロファイル別のSmadシグナル量の比較解析。マイクロアレイ解析によって得られた遺伝子発現量を刺激前の発現量 (0時間) と比較して発現上昇した遺伝子群 (2倍以上)、変化なし、発現抑制した遺伝子群 (0.5倍以下) に分けた。それぞれの遺伝子群について転写開始点周囲でのSmad2/3シグナル量をプロットした。遺伝子発現が上昇した群では、発現が変化しない遺伝子群あるいは発現抑制された遺伝子群と比較して、転写開始点周囲でのSmad2/3シグナル量が多い結果を示した。

A



B

① 転写開始点周囲のH3K4me4シグナル量



② 転写開始点周囲のH3K27me4シグナル量

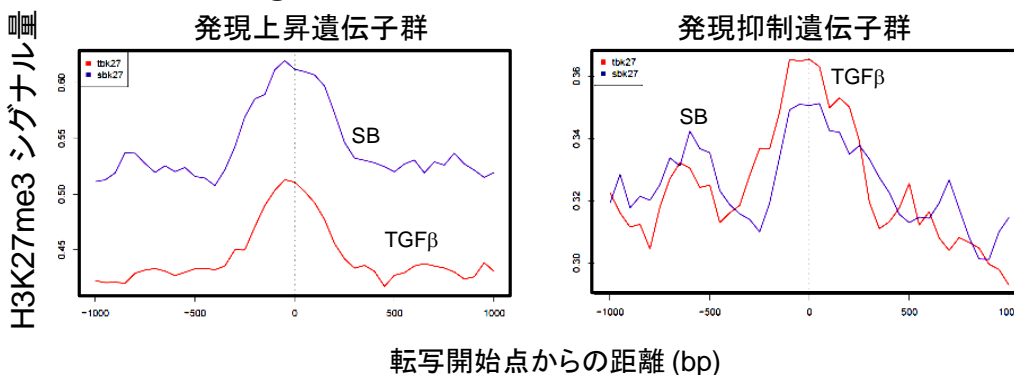


図 7 TGF-β、SB431542刺激によるヒストン修飾の変化の解析

A Smadシグナル中心付近のヒストン修飾の変化。SB431542刺激群と比べてTGF-β刺激群ではH3K4me3シグナル量が高く、H3K27me3シグナルが低い結果を示した。

B 遺伝子発現上昇、抑制遺伝子群における転写開始点付近でのヒストン修飾の解析。マイクロアレイのデータを用いて各刺激前の発現と比較して2倍以上発現が上昇した遺伝子群と0.5倍以下に抑制された遺伝子群に分けて解析を行った。H3K4me3シグナルについては遺伝子発現、抑制群で差は見られなかった。H3K27me3に関しては遺伝子発現上昇群では、TGF-β刺激群はSB421542刺激群に比べて低いシグナルを示した。一方、遺伝子発現抑制群では両者の差は見られなかった。

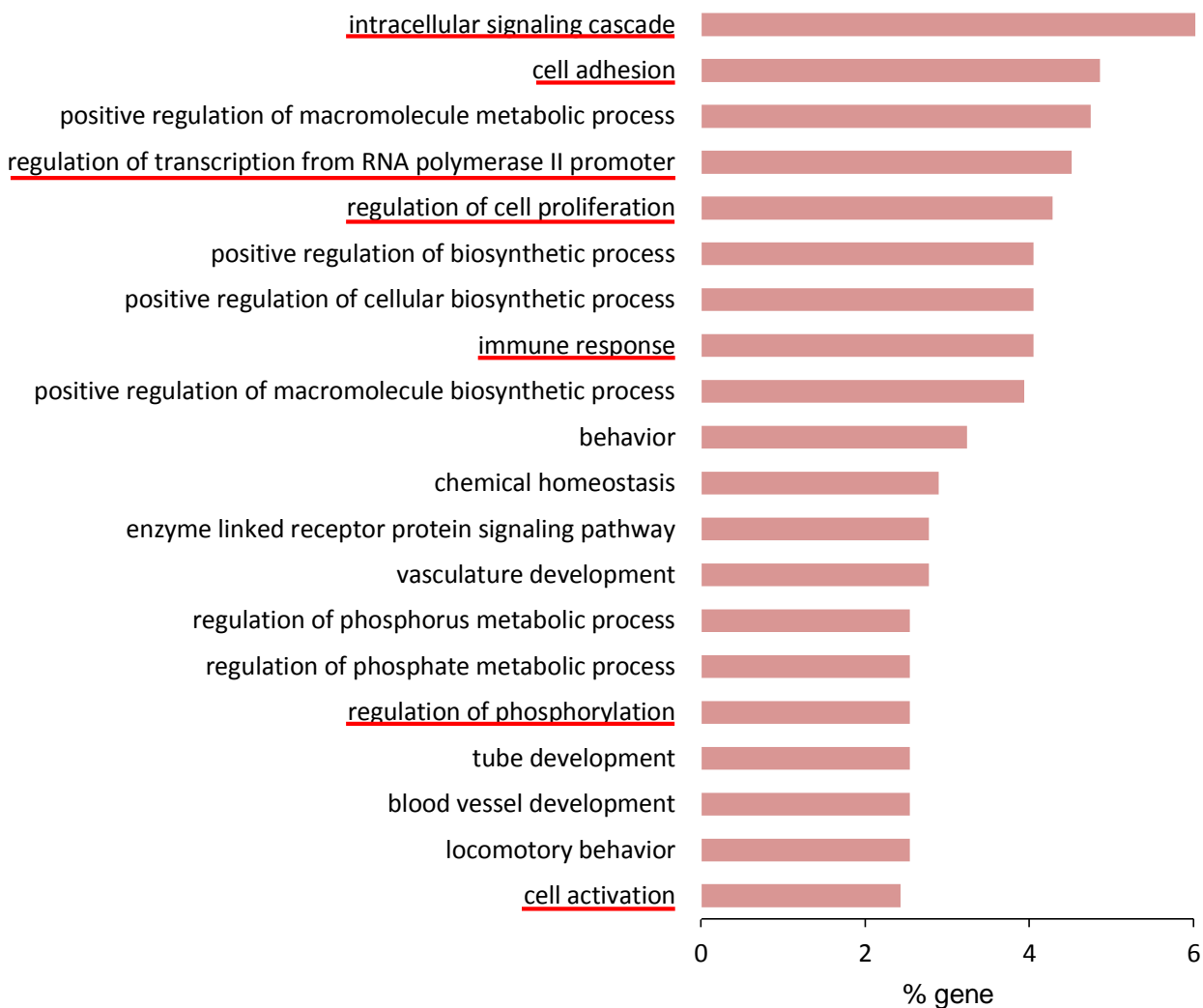
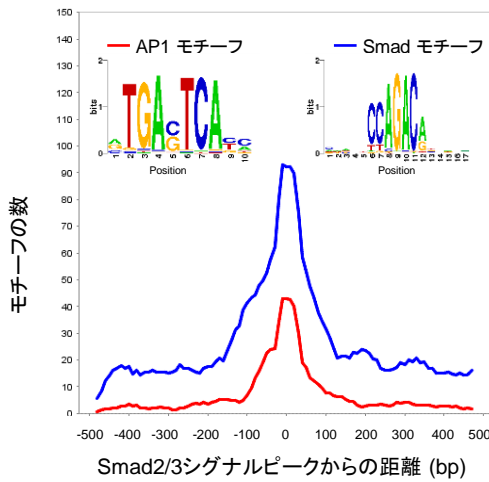


図 8 Smad標的遺伝子のGene ontology解析

Gene ontology解析ツールDAVIDを用いて、Smad標的遺伝子の関連するカテゴリーを解析した。表はBiological processについての解析結果である。有意差があり ($p < 0.05$)、占拠率の高いカテゴリーから順に表示している。

転写や細胞内シグナル、細胞増殖、接着などと関連する遺伝子が含まれていることがわかる。

A



B

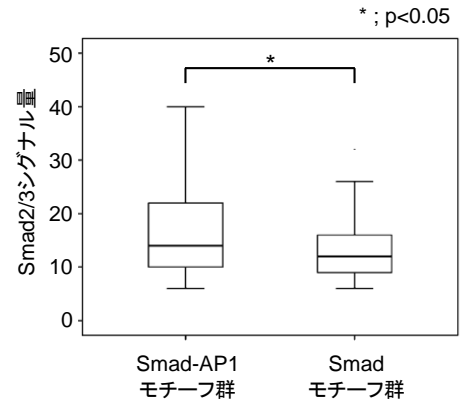


図 9 Smad2/3結合モチーフの同定とSmad2/3シグナル量の解析

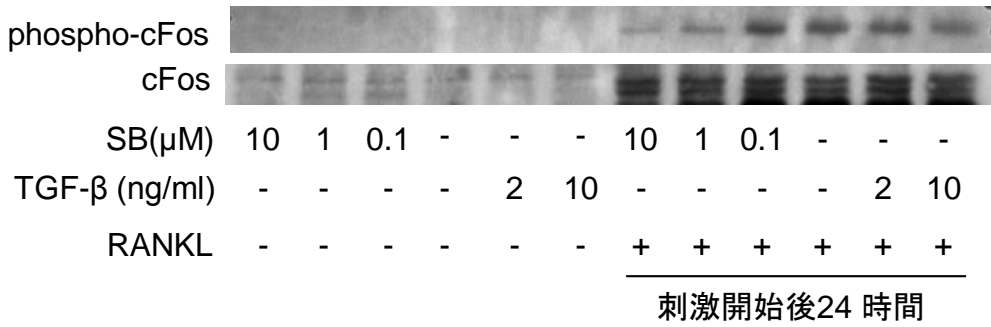
A Smad2/3結合モチーフの解析。Seqposを用いて解析を行った。Smad2/3結合中心から±100 bpの領域に含まれるSmad2/3結合モチーフを調べた結果、AP-1(Fos)が高率に検出された。

グラフではSmad2/3結合中心周囲のSmad (青) 及びAP-1 (赤) のモチーフ数をプロットした。AP-1モチーフ数はSmad2/3結合中心で多かった。

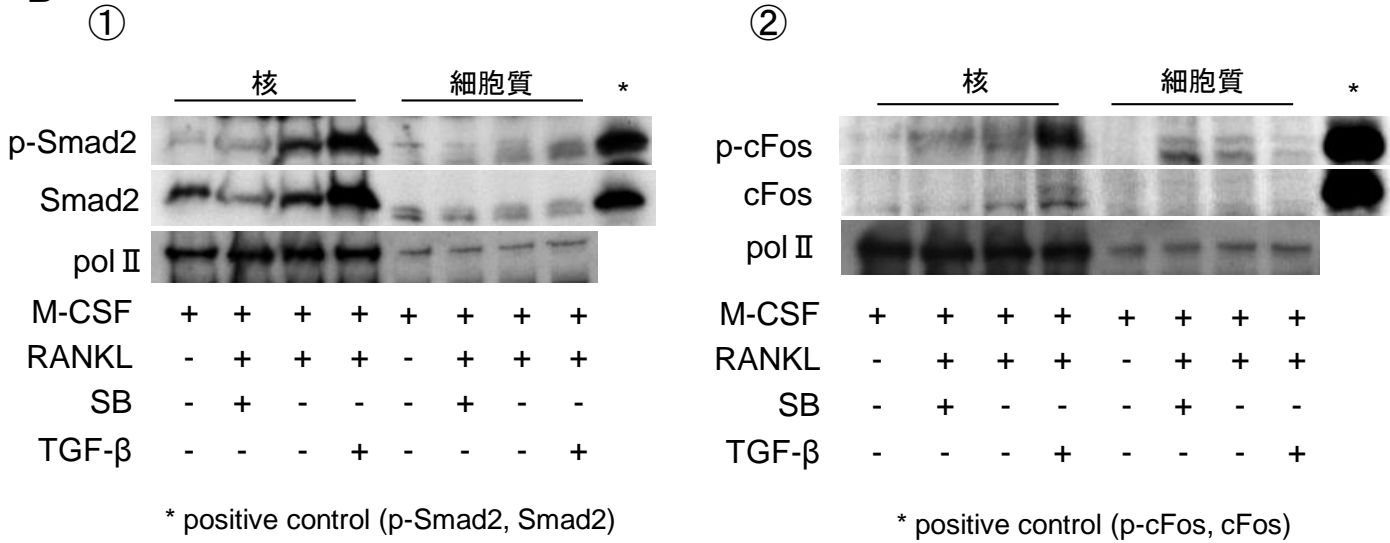
B モチーフを有する遺伝子のSmad2/3結合シグナル量の比較。SmadモチーフとAP-1モチーフを共に遺伝子上に有する遺伝子群 (Smad-AP1モチーフ群) とSmadモチーフのみ有する遺伝子群 (Smadモチーフ群) に分けて、それぞれのSmad結合シグナル量を解析したところ、前者が有意に高かった。* $p < 0.05$

图 10

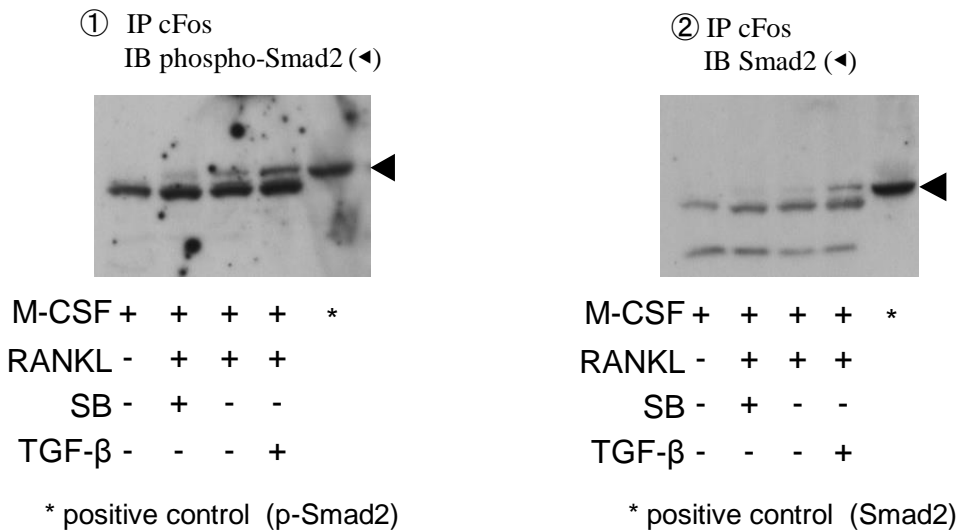
A



B



C



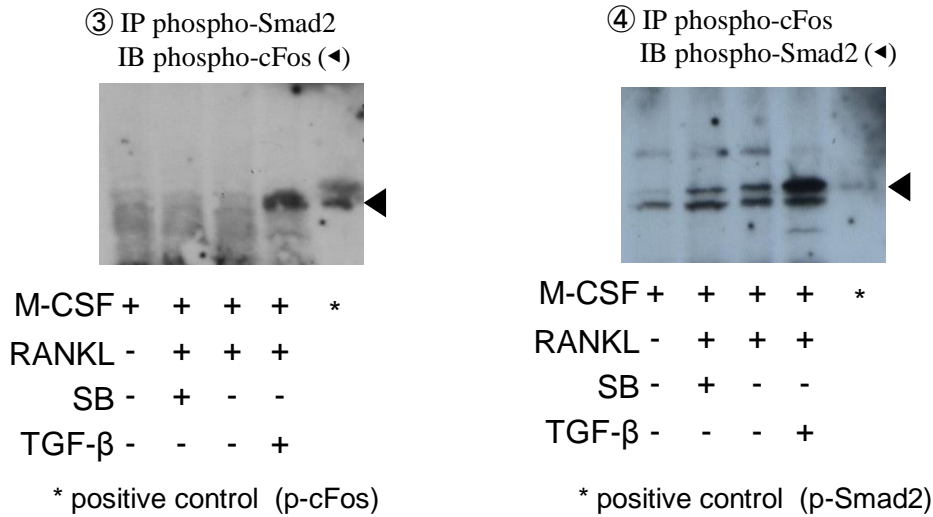


図 10 TGF-β 刺激によるc-Fos発現制御と核・細胞質分画の変化およびc-FosとSmadの結合解析 (ウェスタンブロット、免疫沈降法)

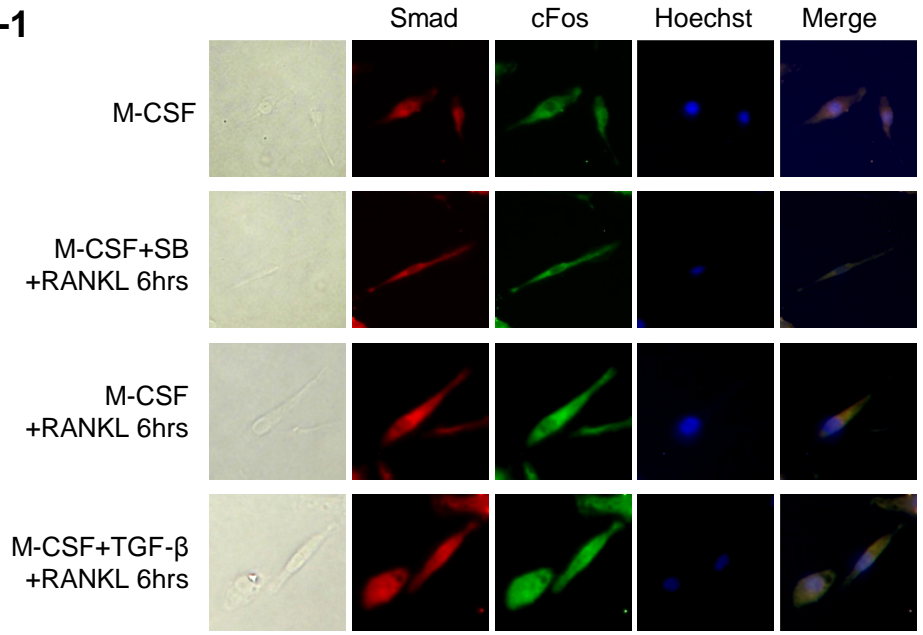
A TGF-β、RANKL刺激と c-Fosタンパク及びリン酸化c-Fosの発現変化。RANKL刺激後24時間でのリン酸化c-Fosの発現は1μM以上のSB431542添加によって低下した。

B 核内および細胞質におけるSmad (①) およびc-Fos (②) タンパクの発現解析。核内へのSmadおよびc-FosはSB431542の存在下では阻害され、TGF-β存在下で強く発現していることがわかる。RANKL、SB431542およびTGF-βによる刺激時間は1時間。

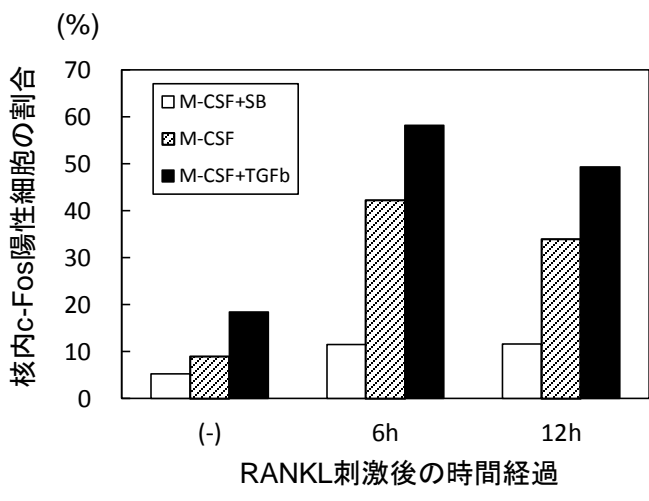
C 免疫沈降法によるSmadとc-Fosの結合解析。① c-Fos (IP)とリン酸化Smad2 (IB)、② c-Fos (IP) とリン酸化Smad2 (IB)、③ リン酸化Smad2 (IP) とリン酸化c-Fos (IB)、④ リン酸化c-Fos (IP) とリン酸化Smad2 (IB) の結合を調べたところ、それぞれの2分子の結合はRANKL刺激後SB431542存在下で阻害され、TGF-β刺激で促進されることがわかった。RANKL、SB431542およびTGF-βによる刺激は2時間。

p-Smad; リン酸化Smad、p-cFos; リン酸化c-Fos、
IP; Immunoprecipitate、IB; Immunoblot

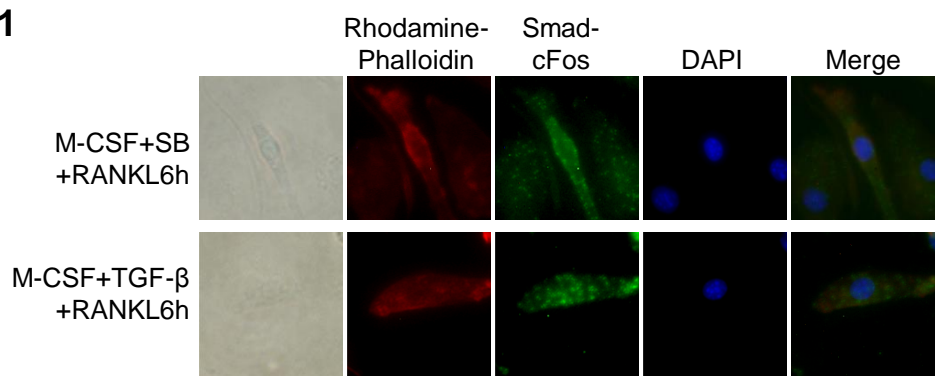
A-1



A-2



B-1



B-2

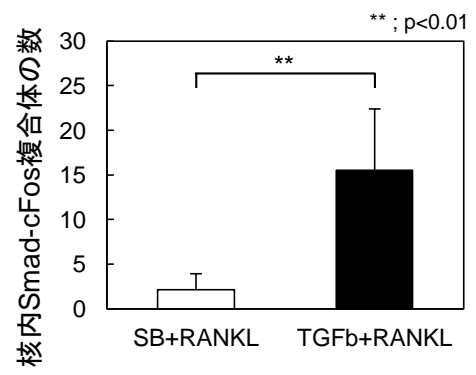


図 11 Smadとc-Fosの共局在性の検証 (細胞免疫染色)

A-1 骨髄マクロファージ細胞をRANKL (100 ng/ml)、TGF- β (2 ng/ml) あるいはSB431542 10 μ Mで刺激した後、細胞を固定し、抗Smad抗体、抗c-Fos抗体を用いて細胞免疫染色を行った。Smadとc-Fosは細胞質優位に染色された。一方TGF- β 添加群では核内の染色がともに強く現れた。

A-2 RANKL刺激後の核内c-Fos陽性細胞の割合の比較。TGF- β 添加群では核内c-Fos陽性細胞の割合が6時間をピークに増加するのに対して、SB431542添加群ではRANKL刺激後核内c-Fos陽性細胞の割合は低いままであった。

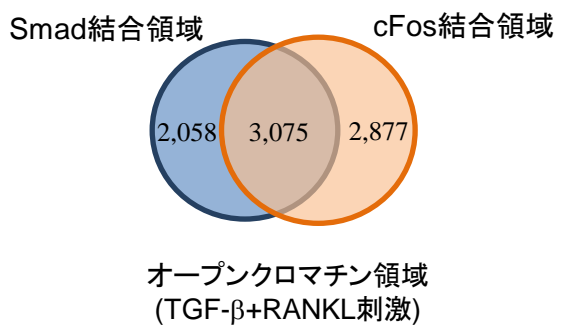
B-1 PLA (proximity ligation assay) 法による2分子の近接性についての検証。PLA法は細胞免疫染色の手法を用いて、2分子が十分近接している時に (< 40 nm) 蛍光スポットを形成するものである。

SBとRANKL添加群においては、核内におけるSmad-cFos複合体(緑色のスポット) は殆ど見られず、核を避けるように細胞質によく見られた。一方、TGF- β とRANKLで刺激した群では核内に複合体を示すスポットの形成が確認された。

B-2 PLA法における核内Smad-cFos複合体を示すスポット数の比較。TGF- β +RANKL群ではSB+RANKL群に比べて有意にスポット数の増加を認めた。 ** p<0.01

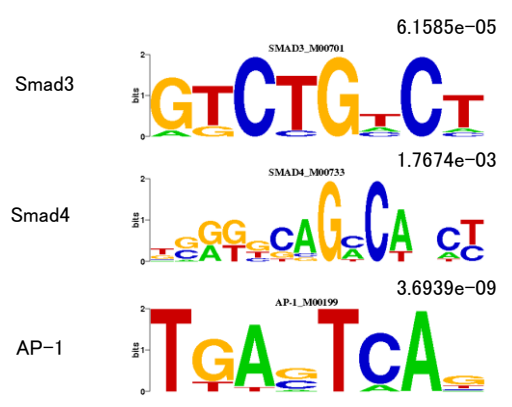
図 12

A

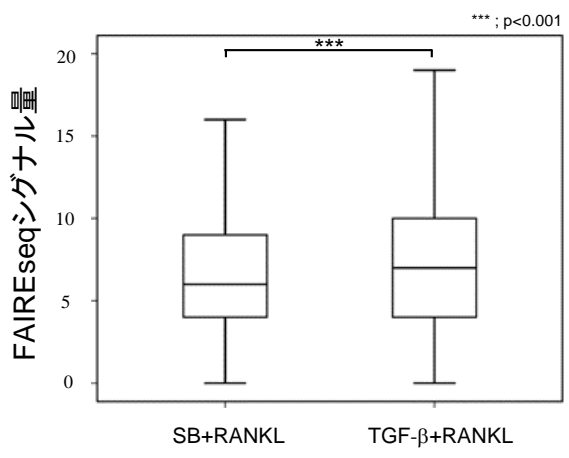


B

オープンクロマチン領域のピーク中心付近のモチーフ (TGF-β+RANKL刺激)



C



D

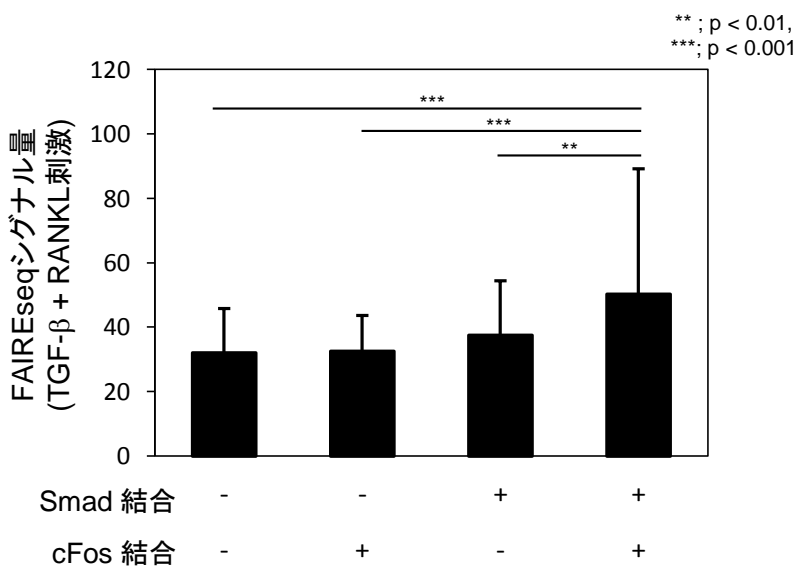


図 12 Smadとc-Fosの結合領域およびシグナル量の解析 (ChIPseq、FAIREseq)

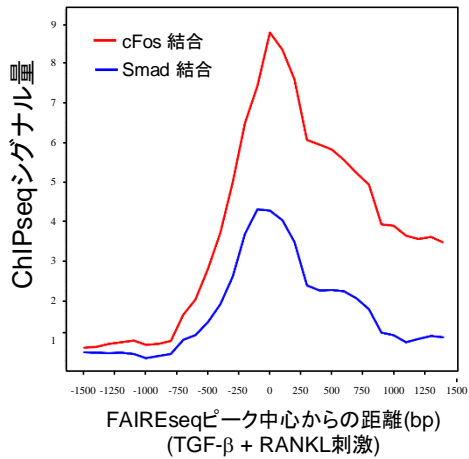
A 骨髄マクロファージ細胞をRANKL (100 ng/ml)、TGF- β (1 ng/ml)、SB431542 (10 μ M)で24時間刺激し細胞を回収、ChIPseqおよびFAIREseqを行った。FAIREseqにおけるオープンクロマチン領域でのSmadおよびc-Fos結合領域を示した。Smadとc-Fosが共在する領域が一定量存在することがわかる。

B FAIREseqシグナルピークを中心周囲に存在するモチーフをTRANSFACを用いて解析した。SmadやAP1のモチーフがオープンクロマチン領域に存在することがわかった。

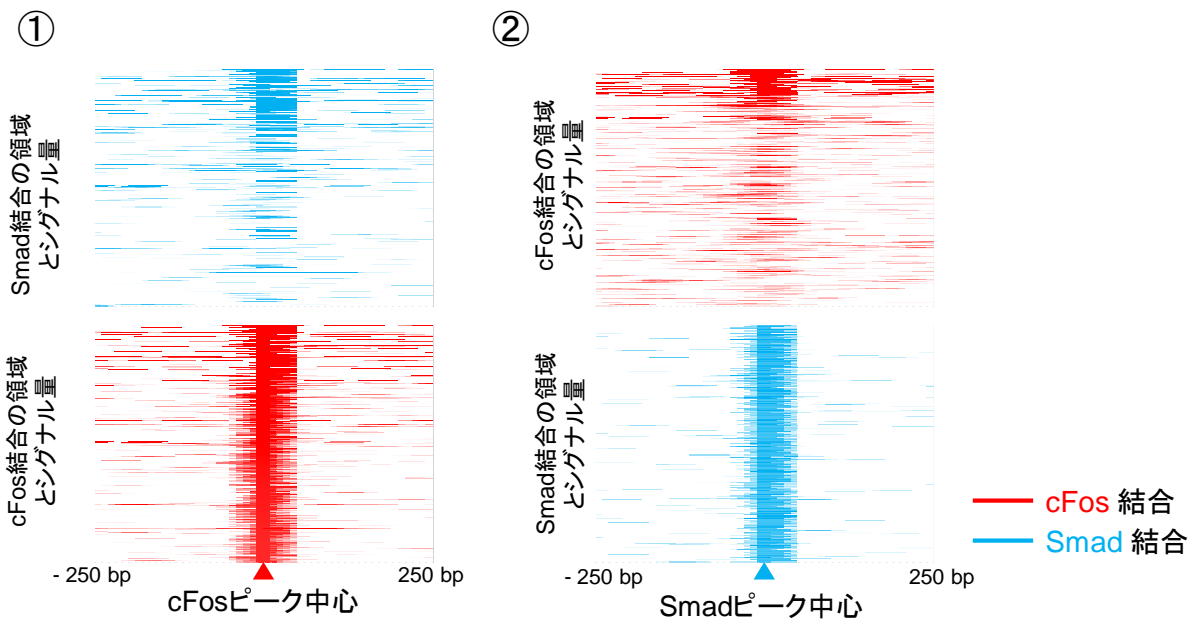
C SB+RANKLおよびTGF- β +RANKL刺激後のサンプルにおけるFAIREseqシグナル量を比較した。TGF- β +RANKL刺激後サンプルではFAIREseqシグナルが有意に高く、クロマチンリモデリングがより起こりやすい状況であることが考えられた。

D Smad、c-Fos結合とFAIREseqシグナル量との関係。Smad、c-Fosの結合がともに存在する領域においては、FAIREseqシグナル量が高いことがわかる。2分子が共局在することがクロマチン構造の変化や転写の調節に寄与する可能性が示唆された。

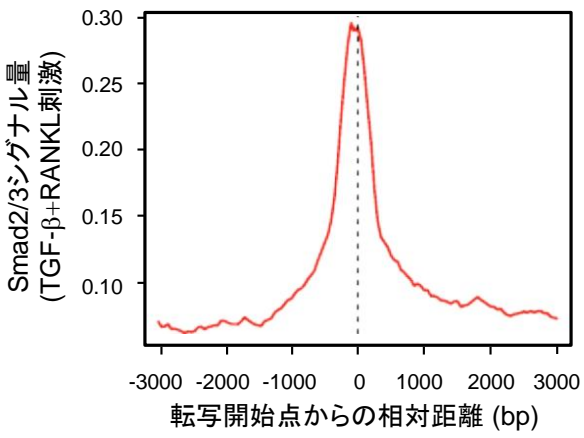
E



F



G



H

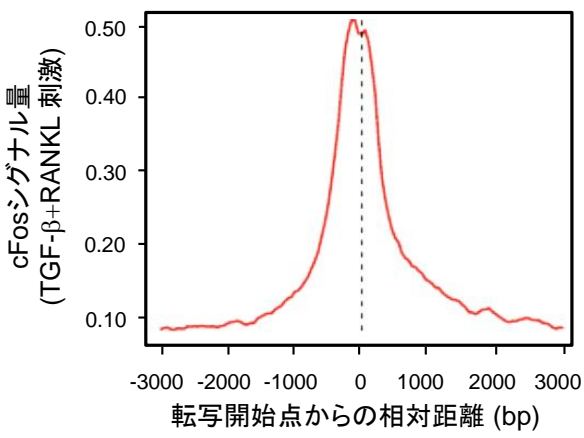


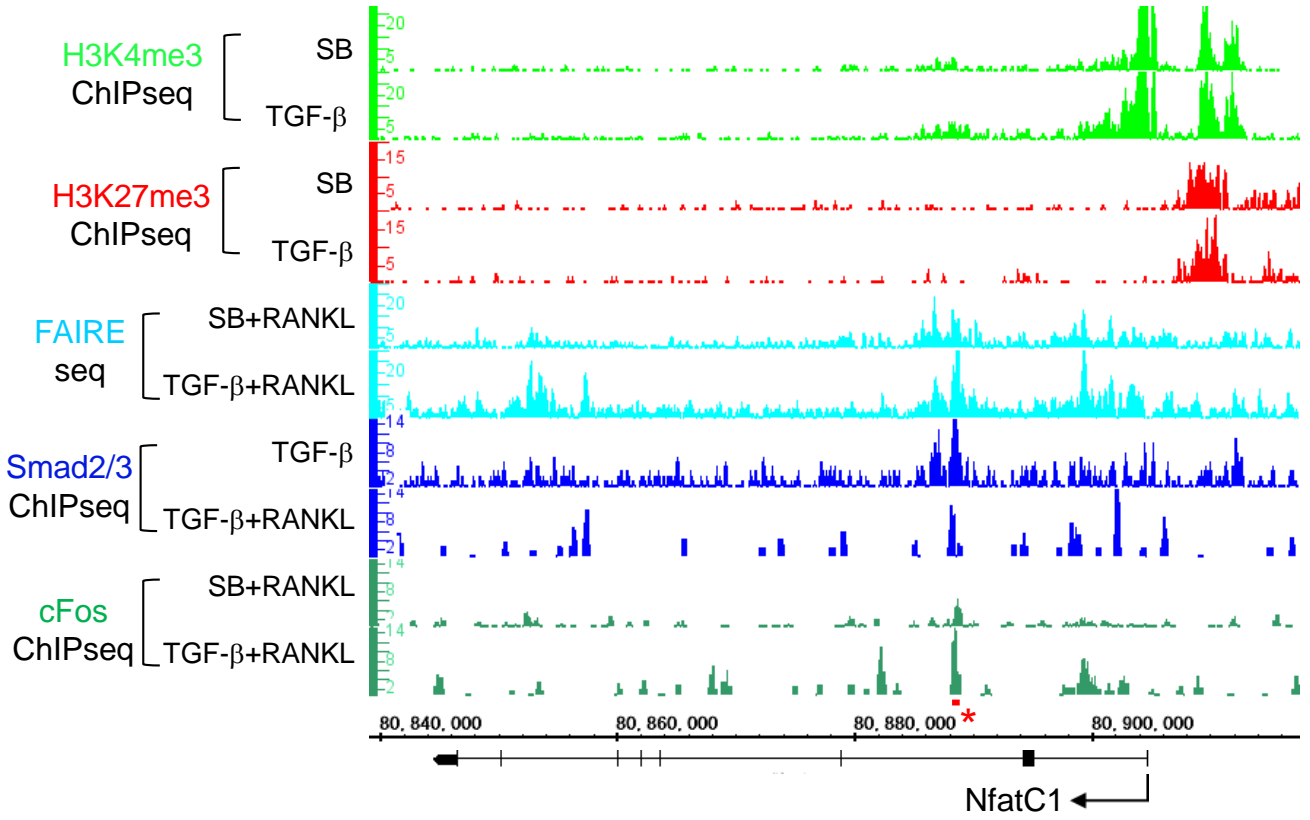
図12 Smadとc-Fosの結合領域およびシグナル量の解析 (ChIPseq、FAIREseq)

E FAIREseqシグナルピーク中心付近のSmadおよびc-Fos結合量の解析。分子が結合しうるオープンクロマチン領域を中心としたSmadとc-Fosの結合量と分布について調べた。FAIREseqシグナルピークを中心としてSmad、c-Fosともにシグナルピークが存在し、2分子の局在が近いことがわかる。

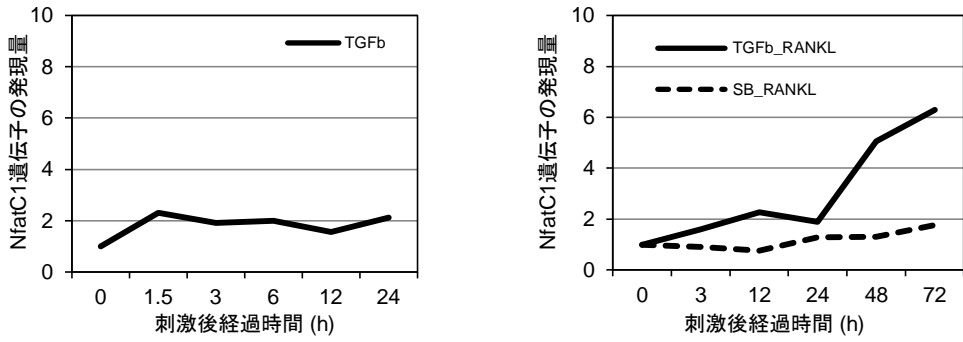
F SmadおよびcFosシグナルピーク中心近傍での2分子の結合量の比較。①c-Fosシグナルピークを中心として±250 bp内のSmadとc-Fosの結合量と分布を示した。c-Fosシグナルピークを中心であるのc-Fosが中心に付近に強くバンドが現れる。Smadもc-Fosシグナルピーク中心に多く結合することがわかる。② 同様に、Smadシグナルピークを中心として±250 bp内のSmadとc-Fosの結合量と分布を示した。c-FosもSmadシグナルピーク中心に多く結合することがわかる。

G、H 転写開始点付近におけるSmadおよびc-Fosの結合量、分布。Smad、c-Fosともに転写開始点周囲に結合することがわかり、転写調節に寄与していることが推察される。

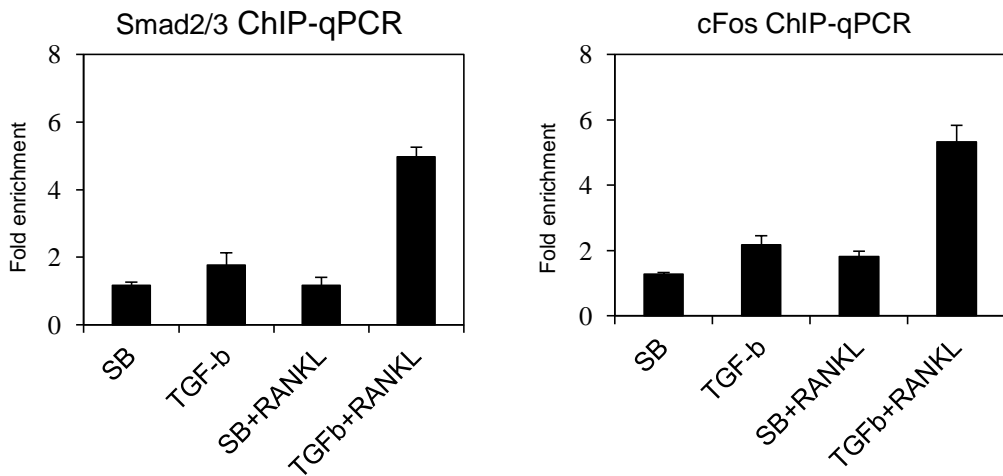
A



B



C



D

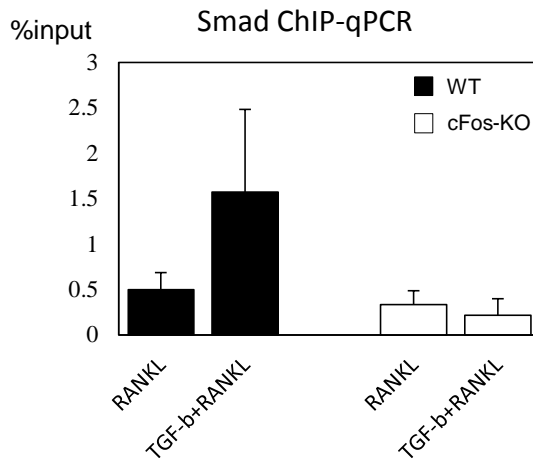


図 13 *NfatC1* 遺伝子上のヒストン修飾の変化、Smad、c-Fos の結合およびオープンクロマチン構造の変化についての解析(ChIPseq、FAIREseq)

A マウス骨髄マクロファージ細胞をTGF- β (1 ng/ml)またはSB431542 (10 μ M)で5日間培養し、細胞を回収した。またRANKL刺激後のサンプルとして刺激後24時間の細胞を採取した。抗H3K4me3抗体、抗H3K27me3抗体、抗Smad2/3抗体、抗c-Fos抗体を用いてChIPseqを、またオープンクロマチン領域の検索にFAIREseqを行った。

B TGF- β 、SB431542、RANKL刺激後の*NfatC1*遺伝子の発現変化。各刺激後の時間経過と*NfatC1*遺伝子のmRNA発現レベルを調べた。TGF- β のみでの刺激では発現変化は見られず、RANKL刺激後に発現上昇が見られ、一方SB431542添加群では発現変化は見られなかった。

C FAIREseqにおけるオープンクロマチン領域 (図11-A, *) でのSmadおよびcFosChIP-qPCRによる解析。

D c-Fosノックアウトマウスの脾臓由来細胞を培養し、TGF- β 、RANKL刺激を行った。FAIREseqにおけるオープンクロマチン領域 (図11-A, *) でのSmadのChIP-qPCRを行った。ノックアウト細胞群ではTGF- β による上昇が見られなかった。

TGF-β+ RANKL+ condition

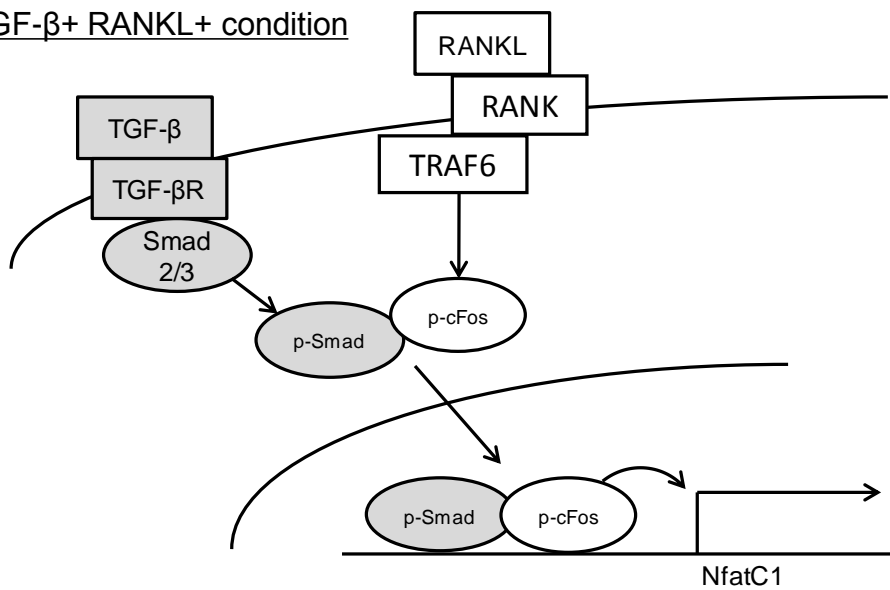


図14 TGF-βとRANKL刺激後の受容体下流シグナル機序の模式図

TGF-βおよびRANKLによってリン酸化されたSmadとcFosは協調して細胞質から核内に移行し、破骨細胞分化のマスター因子である*NfatC1*遺伝子に結合し転写を制御している可能性が示唆された。