

論文の内容の要旨

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

【要旨】

破骨細胞は単球・マクロファージ系細胞から M-CSF、RANKL の作用を受けて多核巨細胞へと分化、成熟する。成熟破骨細胞は酸を分泌して骨吸収し、骨芽細胞とともに骨のリモデリング制御に関わる。破骨細胞は骨粗鬆症や骨折、関節リウマチ、腫瘍などの病態に深く関わりをもつため、その制御メカニズム解明による臨床面への応用の期待とニーズが高まっている。

TGF- β は細胞の分化、増殖、アポトーシス、血管新生などに関わる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 RANKL 誘導性破骨細胞分化に及ぼす作用機序を明らかにするために、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。

TGF- β はユビキタスに発現し多彩な作用を有し、BMP、GDF、アクチビン、インヒビンなどの多くのサブファミリー分子が存在する。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。TGF- β のシグナル伝達は I、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。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。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。R-Smad は Smad4 と量体を形成して核内に移行後転写活性を示し、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 型受容体に働いて 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 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。また 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 が欠失した Smad2 では DNA への結合能を有しているという報告もある。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であると考えられる。近年ヒストン修飾の変化によって遺伝子の発現が制御されているという報告が出された。ヒストン 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。ヒストン修飾の変化を調べることで発現が誘導される遺伝子群の特性を調べるのが可能となる。

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。しかしながら Smad シグナルのゲノム上への応答や Smad の共役因子などの RANK/RANKL シグナル系に及ぼす作用については不明であった。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いて Smad やその転写共役因子によって制御される破骨細胞分化におけるエピジェネティックな修飾変化を調べ、網羅的な遺伝子解析手法により Smad シグナルの RANKL 誘導性破骨細胞分化に及ぼす作用メカニズムを解明することを目的とした。

マウスの下肢骨より骨髓細胞を採取し M-CSF、TGF- β 、RANKL を含有した培養液で培養すると、コントロールと比べて破骨細胞が早期より多く形成され、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上昇した群で 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。このように Smad は標的遺伝子のプロモーター領域に結合することにより転写調節を行っているものと考えられた。

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った。破骨細胞分化シグナルに関与する 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。また 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性を示した。さらに PLA (proximity ligation assay) と呼ばれる 2 分子の近接性を調べる細胞免疫染色によって、TGF- β と RANKL の刺激時には核内で 2 分子の共局在を示す蛍光スポットが多数出現したことから協調して 2 分子が核内に移行していることが示唆された。

そこでRANKL刺激後の状態におけるSmadとc-FosのChIPseqを行ったところ、Smadとc-Fosが共に結合する領域が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は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、また実際にFAIREseqの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。こうしたことからSmadとc-Fosはゲノム全体において協調してクロマチンリモデリングに作用し、標的遺伝子の転写を制御している可能性が示唆された。

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。このことは *NfatC1* 遺伝子の発現がTGF- β 刺激によって殆ど変化しないという mRNA の解析結果と合致していた。RANKL 刺激後の FAIREseq のシグナル量はTGF- β 刺激で増加しており、そのオープンクロマチン領域には 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。反対に 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、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。これらの実験結果から Smad と c-Fos は相互にゲノム上への結合を制御していることが示された。

以上をまとめると、本研究では、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、タンパクを用いた免疫沈降法による解析、細胞免疫染色などによって 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、ゲノム上への結合を相互に制御していることが示唆された。これらの分子の相互作用が *NfatC1* 遺伝子の転写調節に関わり、破骨細胞分化を制御していると考えられた。