

破骨細胞分化における TGF- β の影響と
転写因子 Mitf-E の作用機序に関する分子生物学的研究

麻布大学大学院 獣医学研究科
獣医学専攻 分子生物学
DV1002 浅井 久美子

目次

序文	1
第1章 マウス RAW264.7 細胞と骨髄由来初代培養細胞の RANKL 誘導性破骨細胞 分化における Mitf-E の影響	4
第2章 TGF- β 刺激下での破骨細胞分化における Mitf-E と分化関連遺伝子の発現と その影響	12
第3章 TGF- β 刺激時の破骨細胞分化における Mitf-E の発現機序の解明	19
第4章 イヌ骨髄由来初代培養細胞を用いた破骨細胞分化系の確立と、Mitf-E の 発現と TGF- β の影響	23
総括	28
引用文献	32
謝辞	38
図表	39

序文

脊椎動物において、骨組織は、骨格を構成し、身体の支持や保護、運動器官としての役割や、カルシウムなどの貯蔵、また造血系細胞産生の場合など多種多様な機能を持つ生体の維持に欠かすことのできない代謝器官である。骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収のバランスにより維持されており、このバランスが崩れた場合に様々な疾患が見られる。特に近年、ヒトでは破骨細胞の骨吸収の亢進による骨粗鬆症の病態などが多く見られ、破骨細胞の分化抑制に着目した治療法の研究も盛んに行なわれている (Yasuda *et al.*, 2013)。

破骨細胞は、造血幹細胞由来の単球マクロファージ系の前駆細胞の融合により形成される TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase : 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ) 陽性多核巨細胞であり (Boyle *et al.*, 2003 ; Negishi-Koga and Takayanagi, 2009)、骨基質表面に存在し酸と様々な酵素を分泌することにより骨基質を分解し、骨吸収に働いている (Blair, 1998 ; Bar-Shavit, 2007 ; Nakamura *et al.*, 2012)。破骨細胞の分化には、骨芽細胞などの間葉系間質細胞が産生する因子が大きく関与している。特に M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) と RANKL (Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) が、破骨細胞形成の誘導に主体的に働いている。M-CSF は破骨細胞前駆細胞の生存と増殖に関与しており、続いて RANKL が破骨細胞前駆細胞を破骨細胞へと分化させる (Boyle *et al.*, 2003 ; Negishi-Koga and Takayanagi, 2009)。これらの分子に加え、TGF- β (Transforming growth factor-beta) をはじめとする様々なサイトカインが破骨細胞形成に作用している (Fox and Lovibond, 2005 ; Janssens *et al.*, 2005 ; Nakamura *et al.*, 2012)。TGF- β は、骨髄など様々な細胞の分化成熟に関与しているが、破骨細胞分化における詳細なメカニズムは不明である。破骨細胞分化には、マスター制御転写因子として考えられている NFATc1 (Nuclear factor of activated T cells 1) (Ishida *et al.*, 2002 ; Hogan *et al.*, 2003) や破骨細胞前駆細胞で働いている PU.1 をはじめとする多くの転写因子が作用していることが報告されているが、その中でも本研究室で着目し TGF- β との関連性も示唆されている Mitf (Microphthalmia-associated transcription factor : 小眼球症関連転写因子) に着目した。

Mitf は小眼球症の原因遺伝子として同定され、その後の研究により破骨細胞、

メラノーマ細胞、肥満細胞や心筋細胞などで組織特異的に発現している転写因子で、9 種のアイソフォームが存在することが知られている (Hodgkinson *et al.*, 1993 ; Weibaecher *et al.*, 2001 ; Ooishi *et al.*, 2012)。Mitf のノックアウトマウスである *Mitf^{mi}/Mitf^{mi}* マウスでは、大理石骨症や盲目症、上下の顎骨の形成不全などが見られ、それらの疾患との関連が調べられてきた (Hodgkinson *et al.*, 1993 ; Steingrímsson *et al.*, 1994 ; Nii *et al.* 1995 ; Kitamura *et al.*, 2000 ; Yasumoto *et al.* 1998 ; Widlund *et al.* 2003 Weibaecher *et al.*, 2001; Hershey and Fisher, 2004)。Mitf^{mi}/Mitf^{mi} マウスでみられた大理石病は、破骨細胞の形成不全により骨吸収に対し骨芽細胞による骨形成に強く傾くためにおこる。また、Mitf は破骨細胞分化マーカーである TRAP やカテプシン K (CtsK) の転写に促進的に働くことが知られている (Luchin *et al.*, 2000 ; Motyckova *et al.*, 2001 ; Partington *et al.*, 2004)。また、Mitf は細胞融合の制御を介して破骨細胞促進に影響を与えている。DC-STAMP (dendritic cell-specific transmembrane protein) は破骨細胞の細胞間融合に働き Mitf により転写制御されている (Yagi *et al.*, 2005 ; Courtial *et al.*, 2012)。

本研究ではまず基礎的知見として、一般的に破骨細胞分化の研究によく使用されているマウスマクロファージ系 RAW264.7 株化細胞 (RAW264.7 細胞) とマウス骨髄由来初代培養細胞を、RANKL 刺激により破骨細胞に分化させる系を用いて、Mitf のアイソフォームの発現を調べ、Mitf アイソフォームの E (Mitf-E) が特異的に発現していることを確認した。RAW264.7 細胞を用いて 2 本鎖 RNA 干渉法 (dsRNAi 法) による Mitf-E の発現のノックダウン時と、Mitf-E 発現ベクターを導入し Mitf-E を恒常的に発現するクローン株を作製した場合の破骨細胞分化への影響を解析した (第 1 章)。次に、破骨細胞分化に重要なサイトカインであり本研究室においても Mitf との関連性が調べられている TGF- β が Mitf-E に与える影響を調べた。外因性の TGF- β を添加することにより分化促進させると *Mitf-E* の発現が上昇することを発見し、破骨細胞分化関連遺伝子の中でも細胞融合関連遺伝子を中心に詳細に解析し Mitf-E との関連性を検討した (第 2 章)。また、TGF- β による破骨細胞分化促進時における Mitf-E の発現機序を、TGF- β の Smad 経路と non-Smad 経路に着目してレポーターアッセイ法を用いて解析した (第 3 章)。

イヌにおいても、骨肉腫など破骨細胞の機能異常が影響している病態は多く存

在する。しかし、イヌにおける破骨細胞分化の基礎的知見は少なく、マウスやヒトの知見をイヌに当てはめているのが現状である。そのためイヌの *in vitro* の破骨細胞分化系を確立し、破骨細胞分化に対する基礎的データを解析することは今後の獣医療域におけるイヌ骨疾患の治療の研究に有用であると考え、第4章ではイヌ骨髄を用いた破骨細胞分化系を確立し、さらに *Mitf-E* の発現と *TGF- β* が与える影響に関して調べることにした。

第1章 マウス RAW264.7 細胞と骨髄由来初代培養細胞の RANKL 誘導性破骨細胞分化における Mitf-E の影響

1 序論

造血幹細胞より分化する破骨細胞のシグナル伝達系は、間葉系間質細胞や骨芽細胞の産生する M-CSF、RANKL を中心として様々な因子が複雑に関与している。

M-CSF は破骨細胞の分化過程で生存維持因子として作用することが知られている。M-CSF の変異系統であるマウス (*op/op* マウス) では M-CSF 遺伝子の遺伝子挿入変異により機能的な M-CSF を産生することができず、破骨細胞の形成が見られず大理石病の症状を呈する (Arai *et al.*, 1999)。破骨細胞分化モデルとしてマウスマクロファージ系株化細胞 RAW264.7 (RAW264.7 細胞) を RANKL により破骨細胞に分化誘導させる系が多く用いられている。RAW264.7 細胞は破骨細胞前駆細胞であり十分な M-CSF が存在するため、分化には RANKL のみが必要である (Islam *et al.*, 2008)。一方、マウス骨髄初代培養細胞はさらに未分化な状態で M-CSF が十分量存在しないため、RANKL のみでは破骨細胞には誘導されず M-CSF が必要である。

破骨細胞の分化に関連している因子の中でも、本研究室にてよく調べられている Mitf (Microphthalmia-associated transcription factor : 小眼球症関連転写因子) に着目した。Mitf は basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-LZ) ファミリーに属する組織特異的な転写因子であり、転写開始点の異なる 9 つのアイソフォーム A、B、C、D、E、H、J、M、および mc が知られている (図 1) (Yasumoto *et al.*, 1998 ; Kitamura *et al.*, 2000 ; Widlund *et al.*, 2003 ; Ooishi *et al.*, 2012)。Mitf は Mitogen-activated protein kinase (MAPK) である p38 や Extracellular signal-regulated kinase (ERK) によってリン酸化を受け、核内へ移行し他の遺伝子上流プロモーター領域に存在する E-box 配列 (-CANNTG-) に結合することで転写制御を行なう (Mansky *et al.*, 2002 ; Sharma *et al.*, 2007)。

本研究では、RAW264.7 細胞を RANKL により破骨細胞に分化させる系を用いて Mitf のアイソフォーム E (Mitf-E) が分化誘導後特異的に発現することを確認し、さらにマウス骨髄由来初代培養細胞に M-CSF と RANKL を添加し破骨細胞に誘導させる系でも同様に Mitf-E が特異的に発現することを確認した。Mitf-E の発現が破骨

細胞分化に与える影響を詳細に調べることを目的とし、RAW264.7 細胞を RANKL により破骨細胞に誘導させる系を用いて、2 本鎖 RNA 干渉法 (dsRNAi 法) により Mitf-E の発現のノックダウンを行ない、その影響を細胞の形態および遺伝子レベルで解析した。さらに、Mitf-E 発現ベクターを RAW264.7 細胞に導入し、Mitf-E を恒常的に発現するクローン株を作製し、破骨細胞分化に与える影響を調べた。

2 材料と方法

RAW264.7 細胞の培養と破骨細胞分化誘導

マウスマクロファージ系株化細胞 RAW264.7 (RAW264.7 細胞) は、京都大学大学院動物栄養科学研究室 舟場正幸准教授より提供していただいた。非働化した 10% 牛胎子血清 (FBS) と 1% Penicillin-Streptomycin (Penicillin 100 U/ml および Streptomycin 100 µg/ml; Life Technologies) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, D6429; Sigma-Aldrich) を増殖培地とし、6% FBS、1% Penicillin-Streptomycin、1% L-Glutamine (Sigma-Aldrich) を含む minimum essential medium eagle alpha modifications (αMEM, M4526; Sigma-Aldrich) を分化培地として用いた。通常の継代培養には 10 ml の増殖培地が入った 100 mm 組織培養用シャーレ (IWAKI) を使用し、2~3 日に一度、接着している細胞をスクレーパー (SUMILON) によりはがし継代を行なった。分化培養は、RNA の抽出用に 500 µl/well の分化培地が入った 24-well plate (IWAKI) に 2.5×10^4 個の細胞を播種し、形態変化の観察用に 200 µl/well の分化培地が入った 96-well plate (IWAKI) に 4.0×10^3 個の細胞を播種した。播種後 24 時間後に、Recombinant Murine sRANKL (PEPROTECH) を最終濃度 50 ng/ml になるよう添加し、3 日間 37°C 5%CO₂ 下でインキュベートした。

マウス骨髄由来初代培養細胞の培養と破骨細胞分化誘導

7~8 週齢の健常 C57BL/6 マウスの大腿骨より骨髄細胞を無菌的に回収し、Lymphoprep (Axis-Shield) を用いて単球層を分離した。培地は 10% FBS、1% Penicillin-Streptomycin、1% L-Glutamine を含む αMEM を増殖培地、分化培地として使用した。60mm non-treated Dish (IWAKI) に 1.0×10^6 cells / 100ml となるように播種し、Recombinant Murine M-CSF (PEPROTECH) (25 ng/ml) を加えた培地で浮遊培養した。37°C 5%CO₂ 下で 3 日間インキュベート後、RNA の抽出用に 48-well plate に 1.0×10^5 個、形態変化の観察用に 96-well plate に 4.0×10^4 個の細胞を、M-CSF (25ng/ml) と RANKL (50 ng/ml) を含む培地で播種した。3 日目に培地を交換し、4 日間 37°C 5%CO₂ 下でインキュベートした。

TRAP 染色と形態観察

Leukocyte Acid Phosphatase Kit (Sigma-Aldrich) を用い染色後、顕微鏡下で観察

した。染色はキットのプロトコールに従った。ヘマトキシリンによる対比染色を行ない、核3個以上のTRAP陽性多核細胞を破骨細胞としてカウントした。

Mitf アイソフォームの RT-PCR 法

TaKaRa Ex Taq[®] Hotstart Version (タカラバイオ) を使用し、total RNA 5 ng 相当の cDNA を用いて PCR 反応を 35 サイクル行った。増幅産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色にて検出した。使用した primer 配列は表 1 に記載した。アニーリング温度は *Mitf-A*:60°C、*-B*:64°C、*-C*:56°C、*-D*:60°C、*-E*:60°C、*-H*:55°C、*-J*:56°C、*-M*:60°C、*-mc*:55°Cで行った。

RNA の抽出および RT-PCR 法による cDNA の作製

Quick gene 800 (WAKO) と Quick gene RNA tissue kit S (WAKO) を用いてプロトコールに従い total RNA を抽出した。抽出した total RNA の濃度を Multi-Detection Microplate Reader POWERSCAN[®]HT (DS ファーマ) を用いて吸光度より測定した。High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Life Technologies) により cDNA を作製し、2.5 ng / μ l total RNA に相当するように cDNA を滅菌蒸留水で希釈した。

定量的リアルタイム RT-PCR

real-time PCR キット (SYBR[®] Premix Ex-taq[™] II) および Thermal Cycler Dice[®] Real Time System TP800 (タカラバイオ) を用い、5 ng の total RNA に相当する cDNA を鋳型として行なった。各遺伝子の発現レベルは、各遺伝子に対するプライマーを用いた PCR 増幅産物を Bioanalyser 2100 (Agilent) によって絶対量を測定し段階希釈したものを標準溶液とし、標準曲線法を用いて決定した。ハウスキーピング遺伝子として *G3PDH* を補正遺伝子とした。使用したプライマーの配列は表 1 に記載した。

dsRNA トランスフェクション

形態観察用として 96-well plate に 4.0×10^3 個 /well、RNA 抽出用として 24-well plate 2.5×10^4 個 /well の RAW264.7 細胞を播種し、Penicillin-Streptomycin を除いた培地で通常の破骨細胞分化と同様の方法で培養した。播種後 24 時間後に、24-well plate

では 1.5 μ l/well Lipofectamin RNAi MAX (Life technologies) により 20 pmol/well dsRNA (si-GFP、si-Mitf-E) (BONAC corporation) を導入し、その後 8 時間後に RANKL (50ng/ml) を添加することで分化誘導した。96-well plate では 0.4 μ l/well Lipofectamin RNAi MAX (Life technologies) により 12pmol/well dsRNA (si-GFP、si-Mitf-E) を導入した。使用した配列は表 2 に記載した。

Mitf-E 強制発現クローン株の作製

RAW264.7 細胞の Mitf-E 発現ベクター導入によるクローン株の作製は、クローニングリング (IWAKI) を用いた方法で行なった。24-well plate に 2.5×10^4 個 /well の RAW264.7 細胞を播種し、Penicillin-Streptomycin を除いた 10%FBS DMEM で培養した。24 時間後、発現ベクター pcDNA3 に Mitf-E の 5'UTR-CDS 領域を組み込んだプラスミドコンストラクトを 500 ng/well になるよう非血清培地 OPTI-MEM (GIBCO) により希釈し、1.25 μ l/well Lipofectamine LTX (Life technologies) と 0.5 μ l/well Lipofectamine LTX PLUS Lagent (Invitrogen) によりトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後に、24-well plate 1well 分の RAW264.7 細胞を 100mm cell-culture dish (IWAKI) に播種し、Geneticin 最終濃度 400 μ l/ml を添加した培地で培養した。播種後接着した際、1 個になっている細胞をチェックした。培地は 3 日毎に交換し、トランスフェクション 8 日後にチェックした細胞のうち肉眼で確認できる大きさ (直径 2~5mm 程度) まで増殖したコロニーを選択した。培地を除去し PBS(-)で洗浄後、オイルコンパウンドを縁に塗布したクローニングリングを、マークしたコロニーを囲むように載せ固定した。クローニングリング内のコロニーの細胞を回収し、24-well plate に播種し培養増殖し、さらに 6~7 割コンフルエントになった状態で 60mm cell-cultured dish に播種し、クローン株を樹立した。

統計分析

統計分析はスチューデントの t 検定によって行ない、危険率 5%以下を統計学的に有意差有と判定した。

3 結果

RAW264.7 細胞とマウス骨髄初代培養細胞の破骨細胞分化における *Mitf* の発現

RAW264.7 細胞での RANKL 誘導性破骨細胞分化における形態的变化と *Mitf* アイソフォームの発現を調べた。RANKL 未処理と比較すると RANKL 処理後では TRAP 陽性の多核巨細胞が確認された (図 2A、B)。破骨細胞分化のマスター転写因子で RANKL 添加後 1 日目に発現上昇することが知られている NFATc1 (RANKL 添加後 1 日目)、分化マーカー遺伝子である TRAP、CtsK (RANKL 添加後 3 日目) の mRNA の発現も調べ、破骨細胞が誘導、形成されたことを確認した (図 2 C~E)。*Mitf* アイソフォームの発現を調べたところ、RAW264.7 細胞では破骨細胞分化に関わらず *Mitf*-A、-H、-J を発現しており、発現していなかった *Mitf*-E が破骨細胞分化誘導後に特異的に発現することが判明した (図 3)。発現量のコントロールは、 *β actin*, *Hprt1*, *G3PDH* で比較し変動の少なかった *G3PDH* の mRNA を用いた (データには示していない)。

マウス骨髄由来初代培養細胞では、M-CSF (25ng/ml)、RANKL (50ng/ml) により破骨細胞を分化誘導した。RAW264.7 細胞と同様、TRAP 陽性の多核巨細胞が確認された (図 4A、B)。各破骨細胞分化マーカー遺伝子 NFATc1 の mRNA の発現も分化初期の 2 日目に上昇しており、また TRAP、Ctsk (RANKL 添加後 3 日目) も確認され (図 4C~E)、破骨細胞が形成されたことを確認した。

RAW264.7 細胞とマウス骨髄由来初代培養細胞における common-*Mitf* の mRNA の分子量を *G3PDH* の mRNA 分子数で補正し、全 *Mitf* 発現量に対する各 *Mitf* アイソフォームの mRNA 量の割合を比較したところ、RAW264.7 細胞では *Mitf*-A がほとんどを占めていたが (図 5A)、マウス骨髄由来初代培養細胞では *Mitf*-E の割合も高かった (図 5B)。RAW264.7 細胞とマウス骨髄初代培養細胞における RANKL 添加後 1 日目から分化する 3 日目までの *Mitf*-E、*Mit*-A の発現の継時的変化を調べたところ、*Mitf*-E は分化初期に強く発現しており、*Mitf*-A は分化前後においてもあまり変化がみられなかった (図 5 C~F)。

RAW264.7 細胞の *Mitf*-E のノックダウンによる破骨細胞分化への影響

RAW264.7 細胞の破骨細胞分化誘導時における *Mitf*-E の機能を明らかにするため、2 本鎖 RNA 干渉法 (dsRNAi 法) により *Mitf*-E の発現のノックダウンを行なった。

Mitf-E に対する 2 種類の配列でトランスフェクションの条件設定を行ない、ノックダウン効率のよい si-Mitf-E を選択した（データは示していない）。dsRNA 添加後 RANKL による破骨細胞分化誘導し、3 日後の形態を顕微鏡観察したところ、トランスフェクション試薬のみの Mock 群と control 群では破骨細胞が確認されたが、si-Mitf-E 群ではみられた破骨細胞は Mock 群、control 群に比べ小さく、破骨細胞数が減少していた（図 6 A,B）。siRNA 導入し、RANKL 添加後 1 日目の Mitf-E の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で測定したところ、GFP に対する dsRNA を添加した対照群（以下 control 群）に対し si-Mitf-E 添加群（以下 si-Mitf-E 群）で Mitf-E の発現は 45% まで抑制され（図 6C）、また Mitf-A の発現は抑制されていなかったことから、使用した si-Mitf-E は Mitf-E を特異的にノックダウンしたことを確認した。TRAP、CtsK の mRNA 発現も抑制されていた。

RAW264.7 細胞における Mitf-E の強発現の影響

RAW264.7 細胞の破骨細胞分化誘導時における Mitf-E の機能を明らかにするため、RAW264.7 細胞に Mitf-E の発現ベクターを導入し、恒常的に Mitf-E を発現するクローン株を作製した。作製したクローン株のうち、#3、4、6、7 で Mitf-E の発現を確認した（図 7A）。これらの株を分化培地で培養しただけでは破骨細胞には分化せず、TRAP も染色されなかった。RANKL を添加すると、#6 と #7 の株で特に破骨細胞の分化が顕著に見られ、#3、4 では TRAP 染色されるものの多核の巨細胞は小さくわずかであった（図 7B）。

4 考察

Mitf は、Mitf のノックアウトマウスである *Mitf^{mi}/Mitf^{mi}* マウスの骨組織で大理石病の様態を示すなど破骨細胞分化に関与することが知られているが、Mitf アイソフォームの破骨細胞における発現は詳細に知られていない。本研究では、RAW264.7 細胞とマウス骨髄由来初代培養細胞における破骨細胞分化系で Mitf のアイソフォームの中でも Mitf-E が破骨細胞分化の初期に特異的に発現することを明らかにした。細胞に含まれる Mitf-E の割合に対し Mitf-A が大きい割合をしめているが、Mitf-A を抑制しない siRNA を用いて Mitf-E を特異的にノックダウンすることで破骨細胞の分化が抑制されたことから、Mitf-E が Mitf-A よりも破骨細胞分化に重要であることが示された。しかし、Mitf-E を恒常的に発現するクローン株では、Mitf-E の発現のみでは破骨細胞には分化せず RANKL の誘導が必要であったことから、Mitf-E は分化の十分条件ではなく他にも分化誘導に関わる因子が必要であることが示唆された。また、クローン株によっては Mitf-E が発現している状態にも関わらず RANKL を添加しても破骨細胞に分化する細胞が少ない株もあり、これは RAW264.7 細胞がマクロファージ系の多様性のある細胞株であり (Cuetara *et al.*, 2006)、クローン株の樹立において、破骨細胞分化に必須な因子の不均一性が生じているものと考えられた。

本章では、破骨細胞分化において作用する Mitf のアイソフォームの中でも Mitf-E が重要であることを明らかにした。これは本実験遂行中に発表された Lu ら (2010) の結果とも一致している。また、Mitf-E は破骨細胞分化に必須ではあるが、十分条件ではないことが考えられた。

第2章 TGF- β 刺激下での破骨細胞分化における Mitf-E と分化関連遺伝子の発現とその影響

1 序論

第1章で、破骨細胞分化に働く Mitf のアイソフォームの中でも、Mitf-E が RANKL 誘導性破骨細胞分化において重要であることが示されたが、Mitf-E は十分条件ではあるが必須条件ではないことが明らかとなった。

次に、破骨細胞分化における Mitf-E の詳細な機能を調べるため、破骨細胞分化に影響を与えるサイトカインの一つである TGF- β の作用に着目した。TGF- β は、分子量 25kD の二量体構造をもつ多機能な成長因子で、様々な細胞の分化成熟を調節しており、細胞の種類や濃度により増殖抑制作用や促進作用など異なる作用を示すことが知られている (Janssens *et al.*, 2005)。破骨細胞分化においては、TGF- β のシグナル伝達を抑制すると分化が阻害され (Kaneda *et al.*, 2000)、また RAW264.7 細胞に外因性 TGF- β を添加すると RANKL 誘導性破骨細胞分化に常に促進的に作用する報告がある (Koseki *et al.*, 2002; Shui *et al.*, 2002; Chin *et al.*, 2003)。しかしながら詳細なメカニズムは不明な点が多い。

破骨細胞の分化促進の形態的变化として破骨細胞の数と面積の増大が見られる。破骨細胞形成の細胞融合のマスター制御因子としては、DC-STAMP が知られている (Yagi *et al.*, 2006; Oursler 2010)。インテグリンや ADAM8 (a disintegrin and metalloprotease domain 8)、ADAM12 もまた単球マクロファージ系細胞の接着と融合に関連しており (Hughes *et al.*, 1993 ; Abe *et al.*, 1999 ; Choi *et al.*, 2001 ; Brodbeck and Anderson, 2009 ; Oursler, 2010)、RAW264.7 細胞ではインテグリン α V (Itgav) を強制的に発現させると TRAP 陰性多核細胞が形成され、RANKL により TRAP 陽性にかえる報告がある (Chin *et al.*, 2003)。

Mitf も細胞融合に関与する報告があり、その活性は細胞の種類によって異なる。筋芽細胞とそこから発生する筋管細胞における Mitf の発現は、インテグリン α 9 (Itga9) の発現の正の制御を介して筋管細胞への成熟に必要である (Ooishi *et al.*, 2012)。

TGF- β は、メラノーマ細胞において Mitf-M の発現を抑制するとの報告もあるが (Pierrat, *et al.*, 2012)、破骨細胞分化においては TGF- β と Mitf との関連性について

は不明な点が多い。

本章では、RAW264.7 細胞における TGF- β の破骨細胞分化促進時の Mitf-E の発現を調べた。さらに、TGF- β が破骨細胞の面積を増大させることに着目し、破骨細胞分化関連遺伝子の中でも細胞接着と細胞融合関連遺伝子の発現を中心に比較することで Mitf-E との関連性を検討した。さらに、TGF- β 添加時における Mitf-E の発現ノックダウン時の破骨細胞分化の影響を調べることにした。

2 材料と方法

RAW264.7 細胞の培養と破骨細胞分化誘導

RAW264.7 細胞の培養は第1章と同様の方法で行なった。分化培養は、RNAの抽出用に500 μ l/wellの分化培地が入った24-well plate (IWAKI) に 2.5×10^4 個の細胞を播種し、形態変化の観察用に200 μ l/wellの分化培地が入った96-well plate (IWAKI) に 4.0×10^3 個の細胞を播種した。播種後24時間後にTGF- β を最終濃度100 pMになるように添加し、さらに12時間後にRecombinant Murine sRANKLを最終濃度50 ng/mlになるよう添加し、3日間37°C5%CO₂下でインキュベートした。

破骨細胞のTRAP染色、形態観察と細胞数、面積のカウント

TRAP染色、形態観察、細胞数のカウントは第1章と同様の方法で行なった。破骨細胞1個あたりの面積は、撮影した写真より画像解析ソフト“ImageJ” (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) を用いて測定した。

Pit assay による骨吸収能の測定

破骨細胞の機能測定として骨吸収能を96-well Corning Osteo Assay plates (Corning) を用いて確認した。培養方法は形態観察用の96well-plate (IWAKI) と同様に行なった。培養後、プレートのプロトコールに従い細胞を除去し、顕微鏡下で骨吸収窩を観察した。骨吸収窩の面積は、写真を撮影しImageJを用いて測定した。

RNAの抽出およびRT-PCR法によるcDNAの作製、定量リアルタイムRT-PCR

第1章と同様の方法で行なった。破骨細胞分化マーカー遺伝子、細胞融合関連遺伝子の定量リアルタイムRT-PCRに使用したプライマーの配列は表1に記載した。

dsRNA トランスフェクション

第1章と同様の方法でdsRNA トランスフェクションを行なった。トランスフェクション後8時間後にRANKL (50ng/ml) とTGF- β (100pM) を添加した。添加後1日目と3日目に細胞を回収し、第1章と同様の方法でRNAを抽出した。また、3日目にTRAP染色し、形態変化を観察した。

統計分析

統計分析はスチューデントの t 検定によって行ない、危険率 5%以下を統計学的に有意差有と判定した。

3 結果

RAW264.7 細胞の RANKL 誘導破骨細胞分化における TGF- β の影響

RAW264.7 細胞に TGF- β 、RANKL を添加した際の形態変化を観察したところ、RANKL 未添加群では TGF- β 添加の有無に関わらず破骨細胞は形成されなかった。そのため以降の実験では、RANKL 未添加且つ TGF- β のみの添加群はデータに含まないこととした。

TGF- β を添加し RANKL により破骨細胞を分化誘導すると破骨細胞分化が促進され、破骨細胞数も増加していた (図 8A,B)。さらに、RANKL 誘導破骨細胞形成時に TGF- β を添加した際の各破骨細胞の面積を測定し、大きさ毎に分類し全体の細胞数に対する割合をそれぞれ算出したところ、TGF- β の添加により、 $0.5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 以下の小さい破骨細胞の割合は低い傾向にあった一方で、 $1.5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 以上の大きい破骨細胞の割合が有意に増加していることがわかった (図 8C)。また、破骨細胞の機能である骨吸収能を確認するため、pit assay を行なったところ、TGF- β 添加により骨吸収窩の面積は広くなっており機能的にも促進していた (図 8D,E)。各破骨細胞分化マーカー遺伝子の mRNA の発現を調べたところ、NFATc1、TRAP、CtsK の発現も大きく増強していた (図 9)。

TGF- β による RANKL 誘導破骨細胞分化促進における Mitf-E の発現

TGF- β による RANKL 誘導破骨細胞分化促進時における Mitf の発現を調べたところ、Mitf-E の発現が RANKL のみ添加群での発現に比べ約 20 倍に増強された (図 10A)。Mitf-A、Mitf-common も若干発現が上昇していたが、Mitf-E に比べると 2~3 倍程度であった。

TGF- β による RANKL 誘導破骨細胞分化促進における細胞融合遺伝子の発現

TGF- β により大きい破骨細胞割合が増加していることが判明したことから、破骨細胞形成時 (RANKL 誘導 3 日目) の DC-STAMP、Itgav、Itga2、Itga5、Itgb1、Itgb3、Itgb5、ADAM8、ADAM12 の各種細胞融合遺伝子の発現を調べた。結果、ADAM8 以外の遺伝子において TGF- β による発現上昇がみられた (図 11)。特に、Itgav と Itgb5 の TGF- β による発現パターンが、TGF- β による破骨細胞分化促進時のパターンと類似していた。

TGF- β によるRANKL誘導破骨細胞分化促進におけるsiMitf-EによるMitf-Eの発現ノックダウン時の形態変化とMitf-Eの発現へ影響

Mitf-Eに対するsiRNAによりMitf-Eの発現を抑制した上でTGF- β により刺激したが、TGF- β によるTRAP陽性多核細胞の形態変化の促進に対するはっきりとした影響は見られなかった(図12A、B)。Mitf-Eの発現の抑制は5割程度と、第1章における結果とも一致していた。NFATc1の発現はsiMitf-Eによりやや抑制されたが、Mitf-Eとの関連性が示唆されたItgav、Itgb5のmRNAの発現を比較したが、差はみられなかった(図12C~F)。

4 考察

RANKL 誘導性破骨細胞分化において、TGF- β は破骨細胞数、面積を増大し、各種破骨細胞分化マーカー遺伝子を促進し、骨吸収能も増大していた。TGF- β により面積の大きい細胞の増加が見られたことから、破骨細胞の融合に関連して作用していることが考えられた。骨吸収能はその結果によるものと示唆された。TGF- β は Mitf-E の発現も増強し、また Mitf-E の発現上昇と類似した傾向をもつ破骨細胞融合遺伝子として、Itgav と Itgb5 が見られた。Itgav と Itgb5 の発現レベルは、これらの遺伝子と Mitf-E との関連性が示唆された。破骨細胞におけるインテグリンの役割は複雑で、インテグリンによる接着が抑制されると破骨細胞が形成されない報告があり、また活性もインテグリンの種類により異なる (Oursler, 2010)。Mitf は多核細胞の成熟に必要であり (Coutial *et al.*, 2012 ; Ooishi *et al.*, 2012)、TGF- β による Mitf-E の発現の増強は、Itgav と Itgb5 の発現を増強することにより、より大きな破骨細胞の形成に重要であるかもしれない。

TGF- β による RANKL 誘導破骨細胞分化促進に対し、siMitf-E によるノックダウンの影響はほとんど見られなかった。この結果は、Mitf-E の発現に対する siRNA によるノックダウン効率が 50%程度と低く、そのため TGF- β で Mitf-E の発現を増強すると Mitf-E に対する mRNA の抑制が見られなかったと考えられた。マウスにおける Mitf-E 特異的な部分が 147bp のみであり、この部分で 2 種類の siRNA をデザインしたもののどちらも Mitf-E の発現抑制に限界があったことが考えられた。

第3章 TGF- β 刺激時の破骨細胞分化における Mitf-E の発現機序の解明

1 序論

第2章で、TGF- β が破骨細胞の分化促進に働く際に Mitf-E の発現も増強されることを発見した。しかし、破骨細胞分化における Mitf-E の発現機序は不明である。そこで、TGF- β のシグナル伝達に着目した。

細胞外の TGF- β は、細胞膜に存在する二量体である II 型受容体 (T β RII) に結合し、さらに二量体の I 型受容体 (T β RI ; ALK5) と結合して四量体の複合体を形成する。TGF- β が結合した I 型受容体は細部内シグナル伝達因子である Smad2/3 (R-Smad) をリン酸化し、リン酸化された Smad2/3 は Smad4 (Co-Smad) と結合して核内へ移行しする。Smad2/3/4 複合体は、転写因子として特定の DNA 配列(-AGAC-) に結合し他の転写因子と協調して遺伝子の転写を活性化する。このシグナル伝達経路は Smad 経路と呼ばれている。その他に、非 Smad 経路が知られている。非 Smad 経路は、Smad を介さず p38MAPK や JNK をリン酸化する (Derynck and Zhang, 2003 ; Zhang, 2009 ; Mu *et al.*, 2012)。変異体 ALK5 により Smad が活性化しない状態においても TGF- β により p38MAPK 経路が活性化する (Yu *et al.*, 2002)。TGF- β が破骨細胞において働く経路として、Smad 経路または非 Smad 経路、及び Smad 経路と非 Smad 経路の両方が作用することが知られている (Karsdal *et al.*, 2003 ; Fox and Lovibond, 2005 ; Janssens *et al.*, 2005 ; Gingery *et al.*, 2008 ; Yasui *et al.*, 2011)。

また破骨細胞分化において、JNK 経路が働いていることが知られており、c-Fos のノックアウトマウスでは破骨細胞の形成不全がおきる。リン酸化された JNK は c-Fos、や c-Jun をリン酸化し、活性化した c-Fos や c-Jun は二量体である AP-1 複合体を形成して転写因子として働くことが知られている。

そこで、TGF- β が破骨細胞分化を増強する経路において、Mitf-E を直接転写活性化する因子を探索した。

2 材料と方法

導入したベクター

Mitf-E の 2 種類の長さのプロモーター領域 (-537+23、-1449+23) をそれぞれ pGL4 プラスミドのホタルルシフェラーゼ遺伝子 (Luc) の上流に組み込んだプラスミドベクター (Mitf-E-Luc) を作製した。また、発現ベクターである pcDNA に、恒常的に活性化する ALK5TD の配列を組み込んだもの、c-Fos、c-Jun、また c-Jun のドミナントネガティブ体である TAM67 をそれぞれ発現するベクターを作成した。ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (Renilla) のベクターをバックグラウンドとして用いた。

HepG2 細胞の培養と遺伝子導入

レポーターアッセイ法には遺伝子の導入効率がよく応答性が高いヒト肝ガン由来培養細胞株 (HepG2 細胞) を用いた。通常の増殖には 10%FBS、1% Penicillin-Streptomycin を含む DMEM を用い、10 ml の増殖培地が入った 100 mm 組織培養用シャーレを使用した。トランスフェクション時には、24-well plate に 2.5×10^4 個 /well で播種し、約 24 時間後、Opti-MEM に 500 ng/well となるように各種プラスミド DNA を希釈し、1.25 μ l/well Lipofectamine LTX (Life technologies) と 0.5 μ l/well Lipofectamine LTX PLUS Lagent (Life technologies) によりトランスフェクションし、24 時間後にルシフェラーゼの発光量を測定した。発光量の測定には、Dual-Luciferase reporter kit (Promega) を用い、プロトコールに従い Multi-Detection Microplate Reader POWERSCAN[®]HT (DS ファーマ) を用いて発光量を測定した。

RNA の抽出および RT-PCR 法による cDNA の作製と定量的リアルタイム RT-PCR

第 1 章と同様の方法で行なった。c-Fos、c-Jun との primer 配列は、表 1 に示した。

Western blotting 法

RAW264.7 細胞を 6-well plate にプレーティングし、24 時間後に TGF- β 添加後に RANKL を添加し、0、30、60 分後に細胞を回収した。

3 結果

Mitf-E のレポーターの ALK5TD との共発現時の発現量測定

Smad の結合配列は Smad 経路を活性化する ALK5 の活性化型である ALK5TD を発現するベクターを導入し、Mitf-E-Luc と共発現させたが、Mitf-E-Luc は二種の配列とも応答しなかった (図 14)。

RAW264.7 細胞の破骨細胞分化初期における Mitf-E と c-Fos, c-Jun の遺伝子発現

RAW264.7 細胞の RANKL 誘導破骨細胞分化では、Mitf-E は 1 日目に発現が上昇することから、Mitf-E の発現する以前の RANKL 添加から 1 日目までの、Mitf-E の mRNA の発現を確認したところ、RANKL 添加後 20 時間で発現していた (図 15A)。さらに、初期に発現する転写因子として知られている c-Fos、c-Jun の mRNA の発現を同様に調べてみたところ、Mitf-E の発現ピークよりも前に大きく発現上司していることが確認できた (図 15 B,C)。

Mitf-E のレポーターの ALK5TD との共発現時の発現量測定

RAW264.7 細胞での RANKL 添加時の詳細な経時的変化の結果より、Mitf-E の転写に関わる因子の候補として、c-Jun、c-Fos に着目し、Mitf-E の二種類のプロモーターの luc と共発現したところ、c-Jun を発現させたときに Mitf-E-luc が発現することがわかった (図 16)。また、c-Jun のドミナントネガティブ体である TAM67 では Mitf-E-luc は応答しなかったことから、c-Jun の活性化部位が Mitf-E のプロモーター領域に結合して Mitf-E が発現していることがわかった。Mitf-E の二種類のプロモーター領域の両方で Mitf-E-luc が応答したことから、c-Jun は主に -537+23 のプロモーター領域に結合しているが、-537+23 のプロモーターの反応性より -1449+23 の反応性がやや高かった。

RAW264.7 細胞の RANKL 添加時の TGF- β のリン酸化

RAW264.7 細胞に RANKL 添加し、TGF- β の影響をウェスタンブロッティング法にてタンパクレベルで調べたところ、JNK が TGF- β の添加によりリン酸化されていることが明らかとなった (図 17)。

4 考察

Smad 経路を活性化する ALK5 の活性化型を Mitf-E-Luc と共発現させたが、Mitf-E-Luc は応答しなかったことから、Mitf-E は、TGF- β の Smad 経路ではない経路により増強されていることが示唆された。Smad が結合する DNA 配列として知られている AGAC は短くこの配列のみでは十分な結合特異性が得られないとの報告もあり、cofactor としての異なる種類の転写因子の必要性も考えられた。

非 Smad 経路の JNK により活性化する c-Fos、c-Jun を Mitf-E-Luc とそれぞれ共発現させたところ、c-Jun の発現によって Mitf-E-Luc が応答したことから、Mitf-E は JNK 経路の c-Jun により転写活性化されていることを明らかとした。

TGF- β I 型レセプターと TRAF6 との結合を介して TGF- β が JNK や p38 を活性化する経路 (Sorrentino et al., 2008) と、破骨細胞分化でも TRAF6 が活性化されていることが示されており、この経路についても検討する必要がある。

第4章 イヌ骨髄由来初代培養細胞を用いた破骨細胞分化系の確立と、*Mitf-E* の発現と $TGF-\beta$ の影響

1 序論

第1章から第3章でのマウスマクロファージ系株化細胞と骨髄初代培養破骨細胞分化を用いた実験により、破骨細胞分化における *Mitf-E* の発現の重要性が示され、また $TGF-\beta$ による破骨細胞分化形成促進時における細胞融合促進に関連している可能性が考えられた。これらは RAW264.7 細胞とマウス骨髄初代培養細胞における場合で、他の動物種においてはよく知られていない。ヒトにおいては破骨細胞分化には M-CSF、RANKL が破骨細胞分化必須因子であり、 $TGF-\beta$ は破骨細胞分化を促進するという報告がある。

イヌにおける破骨細胞分化における研究はほとんど報告がない。イヌの骨組織において、RANKL と、RANKL のレセプターである RANK の免疫組織化学的局在は確認されており、関節炎の組織では RANK の発現が増大した破骨細胞が増えることによる骨吸収増進により、骨崩壊が見られる報告がある (Spahni *et al.*, 2009)。また、骨肉腫においても RANKL のタンパクレベルでの発現は確認されている (Barger *et al.*, 2007)。骨に関連して発症する疾患の中でも骨肉腫は、腫瘍細胞が類骨あるいは骨は直接産生する悪性非上皮性腫瘍で、二次的損傷として破骨細胞の関与する溶骨性変化を起こす場合が多い。イヌはヒトに比べて罹患しやすく、骨肉腫の組織病態でも破骨細胞の機能亢進による骨融解が見られる場合がある (Morello *et al.*, 2011)。

それぞれの疾患における細かい報告はあるものの、イヌにおける破骨細胞分化の包括的な基礎的知見はほとんど報告がなく、細胞培養における破骨細胞分化系の確立もなされていない。イヌにおける破骨細胞分化の基礎的知見は将来的な治療への研究に役立つと考えられる。

Mitf は、イヌでも発現が確認されており、白斑の表現型との *Mitf* の変異との遺伝的な関連性 (Rothschild *et al.*, 2006) や、アイソフォームの報告はされている。イヌ組織における *Mitf* のアイソフォームは、5'RACE 法によりヒトとの相同性が高い *Mitf-M*、*-H*、*-A* が決定され、またイヌとヒトの配列比較により *Mitf-E*、*-J*、*-D* が報告されている。*Mitf-A*、*-H* の mRNA は成犬の広範囲における組織で発現しているが、

Mitf-D の発現は確認されていない。Mitf-E は、胃や副腎で高発現していることが明らかとなっている (Tsuchida *et al.*, 2008)。しかし、破骨細胞における発現は不明である。

本章では、まずイヌ骨髄初代培養細胞からの破骨細胞分化形成法の確立を試みた。そしてイヌの破骨細胞分化における Mitf アイソフォームの発現と特に Mitf-E の発現、さらに TGF- β の影響について検討し、マウスと比較した。

2 材料と方法

イヌ骨髄由来初代培養細胞の採材と細胞培養

2歳の健常犬ビーグルの大腿骨と上腕骨から、骨髄を麻酔下で無菌的に採取した。採取した骨髄から、Lymphoprep を用いてプロトコールに基づき単球層を分離した。その後 ACK バッファー (0.15M NH₄Cl、1mM KHCO₃、0.1mM Na₂EDTA、1N HCl で pH7.4 に調整) により溶血し、分離した骨髄由来単球細胞を、 1.0×10^6 cells / 100ml となるように Recombinant Human M-CSF (PEPROTECH) を加えた 10%FBS α MEM で3日間浮遊培養し、第1章のマウスの骨髄初代培養細胞の方法と同様に plating し Recombinant Murine RANKL と Recombinant Human M-CSF を添加した。

M-CSF は、マウスとイヌ、ヒトの M-CSF の配列を比較し、イヌの配列と相同性の高かったヒトの M-CSF を使用した。

形態観察

第1章と同様の方法で行なった。

Pit assay による骨吸収能の測定

第2章と同様の方法で行なった。

定量的リアルタイム RT-PCR 法

real-time PCR キット (SYBR[®] Premix Ex-taq[™] II) および Thermal Cycler Dice[®] Real Time System TP800 (タカラバイオ) を用いて行なった。ハウスキーピング遺伝子として *G3PDH* を補正遺伝子とした。使用したプライマーの配列は表3に記載した。

イヌ骨髄由来初代培養細胞の破骨細胞分化系を用いた TGF- β 刺激

確立したイヌ骨髄由来初代培養細胞を用いて TGF- β の影響を調べるため、マウス同様にプレーティング時に TGF- β (100pM) を添加し、3日後に形態変化を調べた。また、経時的に細胞を回収し、RNA を抽出した。

3 結果

最初にイヌ骨髄由来初代培養系の確立を試みた。マウスの方法を参考に大腿骨と上腕骨より骨髄を採取し、単球層に分離した後溶血させ、M-CSFにより3日間のプレインキュベートののち、プレーティングと同時にM-CSF、RANKLを添加した。まず、M-CSF、RANKLの濃度をM-CSFを0, 12.5, 25, 50 ng/ml, RANKLを0, 6.3, 12.5, 25, 50ng/mlと振って形態変化を調べた。M-CSFのみ、RANKLのみではTRAP陽性多核巨細胞は形成されず、M-CSF、RANKLの濃度がそれぞれ高くなるにつれて形成することが明らかとなった。M-CSFにおいてもRANKLにおいても濃度が濃くなると形成されるTRAP陽性多核巨細胞は同程度であった(図18)。この結果より、M-CSF 25ng/ml、RANKL 50ng/mlを以降の実験に用いることとした。この濃度は、マウスにおける破骨細胞分化時と同様の濃度である。

確立したイヌ骨髄由来初代培養系を用いて mRNA の発現を調べた。RANKL 添加後1日目のNFATc1、3日目のTRAP、CtsKの遺伝子発現(図19 A~C)も上昇していることから破骨細胞であることを確認した。また、この系でMitf-Eの発現を継時的に調べたところ、Mitf-Eの発現がRANKL添加によりマウス同様に上昇している一方で、Mitf-Aが抑制されていた(図20 A~C)

また、RAW264.7細胞においては増強に働いていたTGF- β を添加したところ、イヌ骨髄初代培養では破骨細胞分化が形態的にほとんど形成されず、データには示していないが、これは濃度依存的に抑制されていた(図21 A)。Pit assay法にて骨吸収能を調べたところ、かなり抑制されていた(図21 B)。NFATc1、TRAPの発現もTGF- β により抑制された(図21C,D)。

この時、Mitf-Eの発現を継時的に調べたところ、破骨細胞形成時の発現に比べ、TGF- β により大きく抑制されていた

4 考察

イヌの骨髄由来初代培養細胞を用いた破骨細胞分化系を、M-CSF と RANKL により確立することができた。イヌの破骨細胞分化でも M-CSF と RANKL が必須であり、また確実に破骨細胞に分化する濃度が明らかとなった。これはマウスでの初代培養細胞分化系と変わらない濃度であることが判明した。この系で形成された TRAP 陽性多核巨細胞は、遺伝子レベルでも機能的にも破骨細胞であることを確認し、イヌ骨髄由来初代培養の破骨細胞分化系を確立することができた。

さらにこの系を用いて TGF- β を添加し影響を調べたところ、破骨細胞の分化が形態的にも分化マーカー遺伝子レベルにおいても抑制された。これは濃度依存的であり、マウスでは促進に働く濃度であってもイヌでは抑制に働くことが明らかとなった。さらに *Mitf-E* も抑制されていたことから、*Mitf-E* はイヌの破骨細胞分化においても重要な役割を保持していると考えられる。TGF- β は分化初期に発現する *Mitf-E* を抑制していることから、それより初期の段階に抑制に作用していると考えられ、また、TGF- β は骨芽細胞に対しては破骨細胞分化抑制因子の産生促進に働く報告もマウスであることから、それらとの関連性を調べる必要がある。

イヌの *Mitf* の局在は調べられていたもののその詳細な役割は不明な点が多く、本研究において破骨細胞分化系の確立と *Mitf* アイソフォームの重要性が示された。また、破骨細胞の分化における TGF- β の作用において、ヒトやマウスでの所見とイヌでの所見が異なる傾向が見られたことから、マウスのみならず、イヌにおける破骨細胞分化に対する基礎的データを解析することは、今後の獣医療域におけるイヌ骨疾患の治療の研究に有用であることを示した。

総括

破骨細胞の関与による疾患は多く、治療のための研究も盛んに進められている。破骨細胞のは分化過程に働く因子の同定も進められているものの、そのシグナル伝達にはまだ不明な点が多い。Mitf もその一つで、アイソフォームにより特異的な発現を示すことが知られている。本研究で破骨細胞分化において、Mitf isoform のうち Mitf-E が必要条件であり重要な役割を担っていることを明らかとした（第 1 章）。TGF- β が破骨細胞分化を促進する過程で Mitf-E の発現を促進し、骨細胞の面積が増大し細胞融合関連遺伝子も増加していることから Mitf-E が細胞融合に関与している可能性が考えられた（第 2 章）。さらに TGF- β による破骨細胞分化促進時の Mitf-E 発現増強の機序を調べ、TGF- β は非 Smad 経路の JNK をリン酸化し活性化することにより c-Jun が活性化し、Mitf-E の転写に直接関与していることを明らかにした（第 3 章）。

イヌ骨髄由来初代培養細胞を用いた破骨細胞分化系でも M-CSF と RANKL は必須であり、また Mitf-E も破骨細胞分化過程で特に強く発現したことから、マウスとイヌにおける Mitf-E の破骨細胞分化における役割の共通性が示唆された。しかし TGF- β に対する反応性が、マウス RAW264.7 細胞とイヌ骨髄由来破骨細胞分化系とで異なることから、種間で TGF- β に対する反応性が異なる可能性があることを明らかとした（第 4 章）。

本研究により、破骨細胞分化における Mitf-E の重要性と TGF- β の動物種間での影響の違いについて明らかとした。この結果は、骨疾患の治療への基礎的知見となり得ると考えられる。

本論文の一部は以下に公表した。

- [Asai, K.](#), Funaba, M., Murakami, M.

Enhancement of RANKL-induced MITF-E expression and osteoclastogenesis by TGF- β .

Cell Biochemistry & Function. (first published online: 12 Feb, 2014)

General overview

The molecular mechanisms of RANKL-induced *Mitf-E* expression and osteoclastogenesis by TGF- β

Coupling of bone formation with bone resorption is essential for the maintenance of bone homeostasis. Osteoclasts are tartrate-resistant acid phosphatase (Trap)-positive multinucleated cells formed by the fusion of monocyte-macrophage lineage precursor cells and are the principal cells involved in bone resorption. Osteoclast differentiation and activation are mediated by many factors, especially macrophage colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL).

Microphthalmia-associated transcription factor (Mitf) is a basic helix-loop-helix leucine zipper (b-HLH-Zip) transcription factor that is expressed in limited cell types, including osteoclasts, adipocytes, melanocytes, and myoblasts, but its expression during osteoclastogenesis has not been fully elucidated. *Mitf* dominant-negative mutants exhibit osteopetrosis. The *Mitf* locus contains nine isoform-specific promoters, *Mitf-A*, *-B*, *-C*, *-D*, *-E*, *-H*, *-J*, *-M*, and *-mc*. Each *Mitf* isoform contains an isoform-specific first exon that is spliced to exon 1B1b and common exons 2–9. This study describes the role of Mitf-E in osteoclastogenesis with respect to TGF- β , which is involved in osteoclast formation..

Chapter 1

The expression of the *Mitf-E* isoform but not that of the *Mitf-A* isoform was induced in response to differentiation stimulation toward osteoclasts by RANKL in both RAW264.7 cells and primary bone marrow cells. The RANKL-induced formation of Trap-positive

multinucleated cells was inhibited in RAW264.7 cells expressing siRNA targeting *Mitf-E*. These results suggest that transient induction of *Mitf-E* by RANKL is essential for efficient osteoclastogenesis.

Chapter 2

In this chapter, the effects of TGF- β on osteoclastogenesis were examined. TGF- β increased RANKL-induced *Mitf-E* expression and TRAP-positive multinucleated cell formation. In particular, TGF- β potentiated the formation of larger osteoclasts. The expression levels of *NFATc1*, *TRAP*, and *CtsK*, genes related to osteoclast development and activity, were concurrently increased by TGF- β in the presence of RANKL. Furthermore, the expression levels of *DC-STAMP*, *Itgav*, *Itga2*, *Itga5*, *Itgb1*, *Itgb3*, and *Itgb5* genes related to cell adhesion and fusion, were upregulated by co-treatment with TGF- β . In particular, the regulatory expression of *Itgav* and *Itgb5* in response to RANKL with or without TGF- β resembled that of *Mitf-E*. Because *Mitf* is involved in cell fusion in some cell systems, these results imply a role for *Mitf-E* as an enhancer of osteoclastogenesis and that RANKL-induced levels of both *Mitf-E* mRNA and *Mitf*-dependent gene expression are increased by treatment with TGF- β .

Chapter 3

To clarify the molecular mechanisms underlying the regulation of *Mitf-E* expression by TGF- β , luciferase-based reporter assays using *Mitf-E* promoter regions were carried out. The expression of constitutively active ALK5 did not activate *Mitf-E* transcription. In contrast, the expression of c-Jun increased *Mitf-E* transcription activity. The TAM67 expression construct, which is a c-Jun dominant-negative mutant, did not activate *Mitf-E* transcription. Moreover,

TGF- β induced the phosphorylation of JNK. Thus, increased *Mitf-E* transcription by TGF- β may result from activation of the JNK signaling pathway rather than Smad signaling.

Chapter 4

RANKL-induced osteoclastogenesis using dog primary bone marrow cells is described. RANKL induced *Mitf-E* mRNA expression, as shown in Chapter 1 using murine cells, suggesting that *Mitf-E* is also important in dog osteoclastogenesis. However, unlike in mouse RAW264.7 cells, TGF- β inhibited RANKL-induced *Mitf-E* expression and TRAP-positive multinucleated cell formation. The role of TGF- β during osteoclastogenesis in dogs needs to be investigated in future studies.

引用文献

- Abe E, Mocharla H, Yamate T, Taguchi Y, Manolagas SC. Meltrin-a, a fusion protein involved in multinucleated giant cell and osteoclast formation. *Calcif Tissue Int.* 64 (1999) 508-515.
- Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, Miyata T, Anderson DM, Suda T. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med.* 190 (1999) 1741-1754.
- Barger AM, Fan TM, de Lorimier LP, Sprandel IT, O'Dell-Anderson K. Expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) in neoplasms of dogs and cats. *J Vet Intern Med.* 21 (2007) 133-140.
- Bar-Shavit Z. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem.* 102 (2007) 1130-1139.
- Blair HC. How the osteoclast degrades bone. *Bioessays.* 20 (1998) 837-846.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 423 (2003) 337-342.
- Brodbeck WG, Anderson JM. Giant cell formation and function. *Curr Opin Hematol.* 16 (2009) 53-57.
- Chin SL, Johnson SA, Quinn J, Mirosavljevic D, Price JT, Dudley AC, Thomas DM. A role for αV integrin subunit in TGF- β -stimulated osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 307 (2003) 1051-1058.
- Choi SJ, Han JH, Roodman GD. ADAM8: a novel osteoclast stimulating factor. *J Bone Miner Res.* 16 (2001) 814-822.
- Courtial N, Smink JJ, Kuvardina ON, Leutz A, Göthert JR, Lausen J. Tall regulates osteoclast differentiation through suppression of the master regulator of cell fusion DC-STAMP. *FASEB J.* 26 (2012) 523-532.
- Cuetara BL, Crotti TN, O'Donoghue AJ, McHugh KP. Cloning and characterization of osteoclast precursors from the RAW264.7 cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 42

- (2006) 182-188.
- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 425 (2003) 577-584.
- Fox SW, Lovibond AC. Current insights into the role of transforming growth factor- β in bone resorption. *Mol Cell Endocrinol*. 243 (2005) 19-26.
- Funaba M, Ikeda T, Murakami M, Ogawa K, Tsuchida K, Sugino H, Abe M. Transcriptional activation of mouse mast cell protease-7 by activin and transforming growth factor-b is inhibited by microphthalmia-associated transcription factor. *J Biol Chem*. 278 (2003) 52032-52041.
- Gingery A, Bradley EW, Pederson L, Ruan M, Horwood NJ, Oursler MJ. TGF-beta coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NFkB and SMAD pathways to promote osteoclast survival. *Exp Cell Res*. 314 (2008) 2725-2738.
- Hershey CL, Fisher DE. Mitf and Tfe3: members of a b-HLH-ZIP transcription factor family essential for osteoclast development and function. *Bone*. 34 (2004) 689-696.
- Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*. 17 (2003) 2205-2232.
- Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Arnheiter H. Mutation at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-xipper protein. *Cell* 74 (1993) 395-404.
- Hughes DE, Salter DM, Dedhar S, Simpson R. Integrin expression in human bone. *J Bone Miner Res*. 8 (1993) 527-533.
- Ishida N, Hayashi K, Hoshijima M, Ogawa T, Koga S, Miyatake Y, Kumegawa M, Kimura T, Takeya T. Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J Biol Chem*. 277 (2002) 41147-41156.
- Islam S, Hassan F, Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Koide N, Naiki Y, Yoshida T, Yokochi T. Receptor activator of nuclear factor-kB ligand induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells via augmented production of macrophage-colony-stimulating factor. *Microbiol Immunol*. 52 (2008) 585-590.
- Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor-beta1 to the

- bone. *Endocr Rev.* 26 (2005) 743-774.
- Kaneda T, Nojima T, Nakagawa M, Ogasawara A, Kaneko H, Sato T, Mano H, Kumegawa M, Hakeda Y. Endogenous production of TGF-beta is essential for osteoclastogenesis induced by a combination of receptor activator of NF-kappa B ligand and macrophage-colony-stimulating factor. *J Immunol.* 165 (2000) 4254-4263
- Karsdal MA, Hjorth P, Henriksen K, Kirkegaard T, Nielsen KL, Lou H, Delaissé JM, Foged NT. Transforming growth factor-beta controls human osteoclastogenesis through the p38 MAPK and regulation of RANK expression. *J Biol Chem.* 278 (2003) 44975-44987.
- Kitamura Y, Morii E, Jippo T, Ito A, mi-transcription factor as a regulator of mast cell differentiation, *Int. J. Hematol.* 71 (2000) 197-202.
- Koseki T, Gao Y, Okahashi N, Murase Y, Tsujisawa T, Sato T, Yamato K, Nishihara T. Role of TGF-b family in osteoclastogenesis induced by RANKL. *Cell Signal.* 14 (2002) 31-36.
- Lu S, Li M, Lin Y. Mitf induction by RANKL is critical for osteoclastogenesis. *Mol Biol Cell* 21 (2010) 1763-1771.
- Luchin A, Purdom G, Murphy K, Clark MY, Angel N, Cassady AI, Hume DA, Ostrowski MC. The microphthalmia transcription factor regulates expression of the tartrate-resistant acid phosphatase gene during terminal differentiation of osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 15 (2000) 451-460.
- Mansky KC, Sankar U, Han J, Ostrowski MC. Microphthalmia Transcription Factor Is a Target of the p38 MAPK Pathway in Response to Receptor Activator of NF-κB Ligand Signaling. *J Biol Chem.* 277 (2002) 11077-11083.
- Morello E, Martano M, Buracco P. Biology, diagnosis and treatment of canine appendicular osteosarcoma: similarities and differences with human osteosarcoma. *Vet J.* 189 (2011) 268-277.
- Motyckova G, Weilbaecher KN, Horstmann M, Rieman DJ, Fisher DZ, Fisher DE. Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (2001) 5798-5803.

- Murakami M, Ikeda T, Ogawa K, Funaba M. Transcriptional activation of mouse mast cell protease-9 by microphthalmia-associated transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311 (2003) 4-10.
- Mu Y, Gudey SK, Landström M. Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res.* 347 (2012) 11-20.
- Nakamura I, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Suda T. Regulation of osteoclast function. *Mod Rheumatol.* 22 (2012) 167-177.
- Negishi-Koga T, Takayanagi H. Ca^{2+} -NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. *Immunol Rev.* 231 (2009) 241-256.
- Nii A, Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Ward JM. Mild osteopetrosis in the microphthalmia-oak ridge mouse. A model for intermediate autosomal recessive osteopetrosis in humans. *American Journal of Pathology* 147 (1995) 1871-1882.
- Ooishi R, Shirai M, Funaba M, Murakami M. Microphthalmia-associated transcription factor is required for mature myotube formation. *Biochim Biophys Acta.* 1820 (2012) 76-83.
- Oursler MJ. Recent advances in understanding the mechanisms of osteoclast precursor fusion. *J Cell Biochem.* 110 (2010) 1058-1062.
- Partington GA, Fuller K, Chambers TJ, Pondel M. Mitf-PU.1 interactions with the tartrate-resistant acid phosphatase gene promoter during osteoclast differentiation. *Bone.* 34 (2004) 237-245.
- Pierrat MJ, Marsaud V, Mauviel A, Javelaud D. Expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), which is critical for melanoma progression, is inhibited by both transcription factor GLI2 and transforming growth factor- β . *J Biol Chem.* 287 (2012) 17996-8004.
- Rothschild MF, Van Cleave PS, Glenn KL, Carlstrom LP, Ellinwood NM. Association of MITF with white spotting in Beagle crosses and Newfoundland dogs. *Anim Genet.* 37 (2006) 606-607.
- Schmit JM, Pondenis HC, Barger AM, Borst LB, Garrett LD, Wypij JM, Neumann ZL, Fan TM. Cathepsin K expression and activity in canine osteosarcoma. *J Vet Intern Med.* 26 (2012) 126-134.
- Sharma SM, Bronisz A, Hu R, Patel K, Mansky KC, Sif S, Ostrowski MC. MITF and PU.1

- Recruit p38 MAPK and NFATc1 to Target Genes during Osteoclast Differentiation. *J Biol Chem.* 282 (2007) 15921-15929.
- Shui C, Riggs BL, Khosla S. The immunosuppressant rapamycin, alone or with transforming growth factor- β , enhances osteoclast differentiation of RAW264.7 monocyte-macrophage cells in the presence of RANK-ligand. *Calcif Tissue Int.* 71 (2002) 437-446.
- Spahni AI, Schawalder P, Rothen B, Bosshardt DD, Lang N, Stoffel MH. Immunohistochemical localization of RANK, RANKL and OPG in healthy and arthritic canine elbow joints. *Vet Surg.* 38 (2009) 780-786.
- Steingrímsson E, Moore KJ, Lamoreux ML, Ferré-D'Amaré AR, Burley SK, Zimring DC, Skow LC, Hodgkinson CA, Arnheiter H, Copeland NG, Jenkins NA. Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences, *Nat. Genet.* 8 (1994) 256-263.
- Steingrímsson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network, *Annu. Rev. Genet.* 38 (2004) 365-411.
- Yasuda, H. RANKL, a necessary chance for clinical application to osteoporosis and cancer-related bone diseases. *World J Orthop.* 4 (2013) 207-217.
- Weilbaecher KN, Hershey CL, Takemoto CM, Horstmann MA, Hemesath TJ, Tashjian AH, Fisher DE. Age-resolving osteopetrosis: a rat model implicating microphthalmia and the related transcription factor TFE3. *J. Exp. Med.* 187 (1998) 775-785.
- Widlund, H.R., Fisher, D.E., Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 22 (2003) 3035-3041.
- 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. *J Exp Med.* 202 (2005) 345-351.
- Yagi M, Miyamoto T, Toyama Y, Suda T. Role of DC-STAMP in cellular fusion of osteoclasts and macrophage giant cells. *J Bone Miner Metab.* 24 (2006) 355-358.
- 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- β through molecular interaction between Smad3 and Traf6. *J Bone Miner Res.* 26 (2011) 1447-1456.
- Yasumito K, Amae S, Udono T, Fuse N, Takeda K, Shibahara S. A big gene linked to small eyes encodes multiple Mitf isoforms: many promoters make light work. *Pigment Cell Res.* 11 (1998) 329-336.
- Yu L, Hébert MC, Zhang YE. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J.* 21 (2002) 3749-3759.
- Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 19 (2009) 128-39.

謝辞

本論をまとめるにあたり、終始懇切なるご指導とご助言を賜りました麻布大学動物工学研究室 滝沢達也教授、麻布大学基礎生物学研究室 佐原弘益教授、京都大学大学院動物栄養科学研究室 舟場正幸准教授ならびに麻布大学分子生物学研究室 村上賢教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学大学院動物栄養科学研究室 舟場正幸准教授ならびに麻布大学分子生物学研究室 村上賢教授に深く感謝の意を表します。

また、本研究を行うにあたり、多大なるご指導とご協力を頂いた麻布大学分子生物学研究室の先輩、後輩の皆さま方に厚く御礼を申し上げます。最後に、学生生活を支えてくれた両親に深く感謝致します。

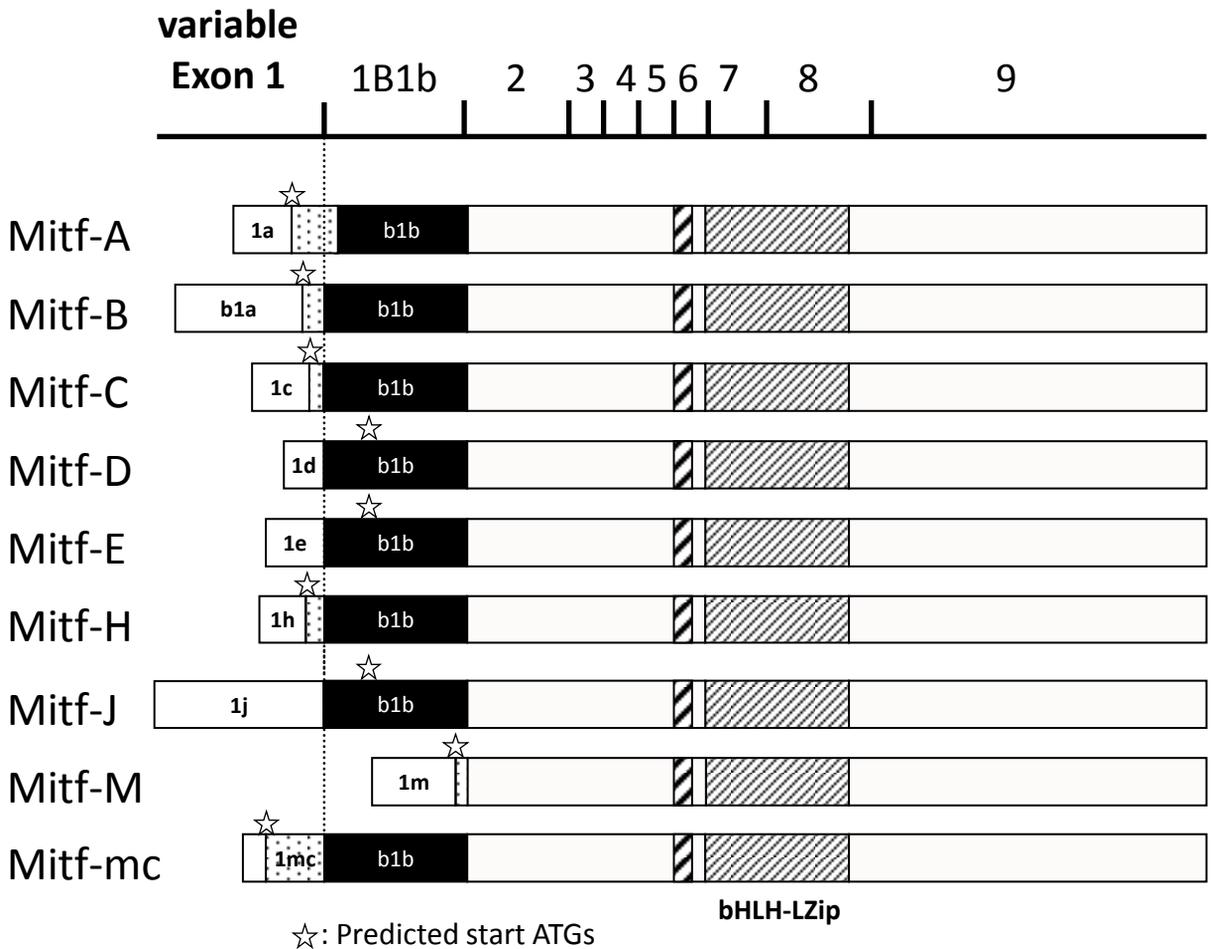
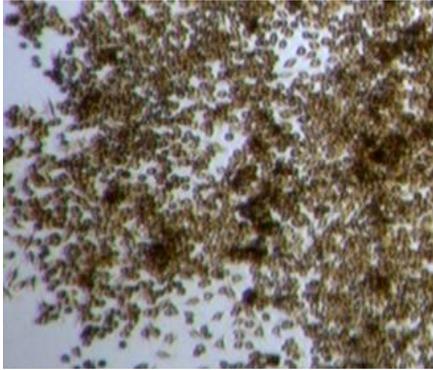


図1 マウスにおける9種の Mitf isoform の構造

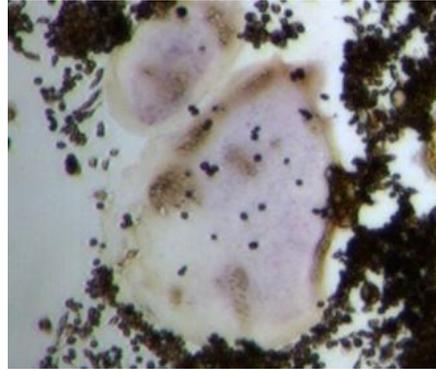
Mitfは、Mitf-A、-B、-C、-D、-E、-H、-J、-M、-mcの9種のアイソフォームを持つ。アイソフォームによりエクソン1の転写開始点が異なり、エクソン2～9は共通配列である。basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-Lzip) 構造を持ち、他の遺伝子の上流プロモーター領域に存在する E-box 配列 (-CANNTG-) に結合することで転写制御を行なう。

A



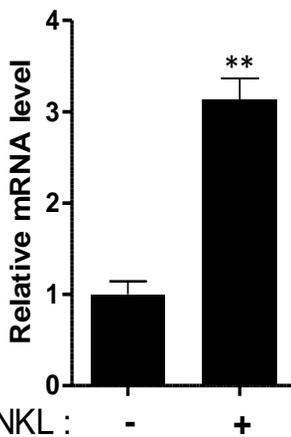
未分化の RAW264.7 細胞

B

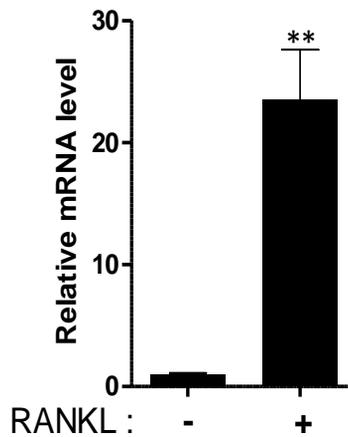
100 μ m

破骨細胞への分化誘導

C

NFATc1

D

TRAP

E

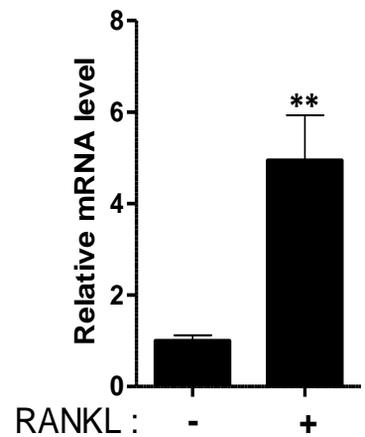
CtsK

図2 RAW264.7 細胞の RANKL 誘導性破骨細胞分化における形態変化と破骨細胞分化

関連遺伝子の発現

(A) 4.0×10^3 個の RAW264.7 細胞を 96-well plate で 4 日間培養し、TRAP 染色を行なった。TRAP 染色陰性で破骨細胞は形成されなかった。(B) 4.0×10^3 個の RAW264.7 細胞を 96-well plate に播種し、24 時間培養後に最終濃度 50 ng/ml になるように RANKL を添加し 3 日間培養後 TRAP 染色を行なった。TRAP 染色陽性の多核巨細胞が確認された。

(C ~ E) 2.5×10^4 個の RAW264.7 細胞を 24-well plate に播種し、24 時間培養後に RANKL を最終濃度 50 ng/ml になるように添加し、RNA を抽出した。破骨細胞分化関連遺伝子である NFATc1 (RANKL 添加後 day 1)、TRAP (day 3)、CtsK (day 3) の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。ハウスキーピング遺伝子として *G3PDH* で補正し、RANKL 未添加の破骨細胞未分化群を 1 として表した。Mean \pm SE、n = 3。図中の** は RANKL (-) に対する群間での t 検定の判定結果を示す。(**: P < 0.01)

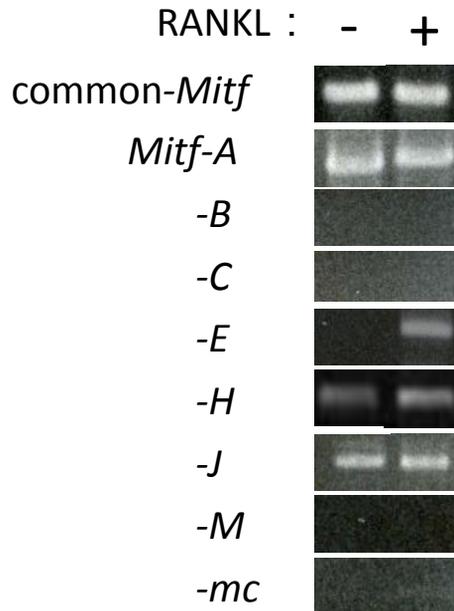


図3 RAW264.7 細胞の RANKL 誘導破骨細胞分化時の *Mitf* アイソフォームの発現

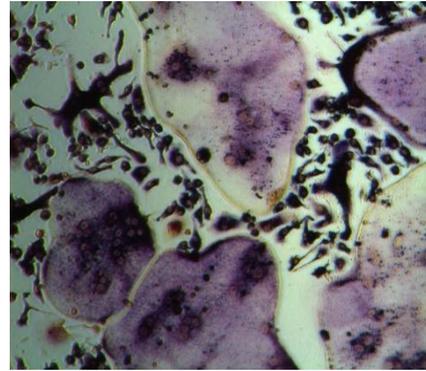
RANKL による破骨細胞分化誘導時と未分化の際の *Mitf* アイソフォームの mRNA 量の発現を RT-PCR 法で調べた。*Mitf* アイソフォームの共通部分を認識するプライマーを common-*Mitf* として設定した。RANKL 添加により、*Mitf-E* の mRNA の発現が確認された。

A



未分化の初代骨髄培養細胞

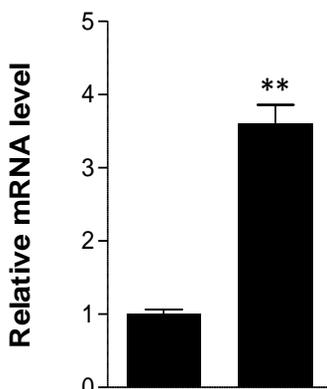
B



100 μm

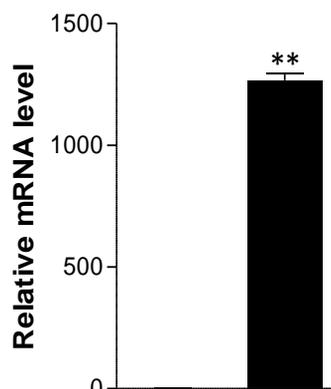
破骨細胞への分化誘導

C

NFATc1

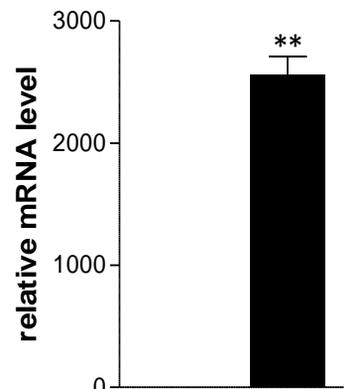
RANKL : - +

D

TRAP

RANKL : - +

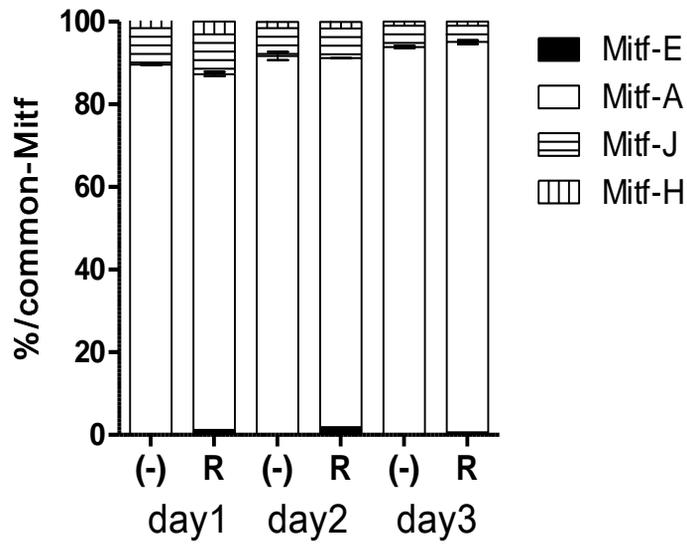
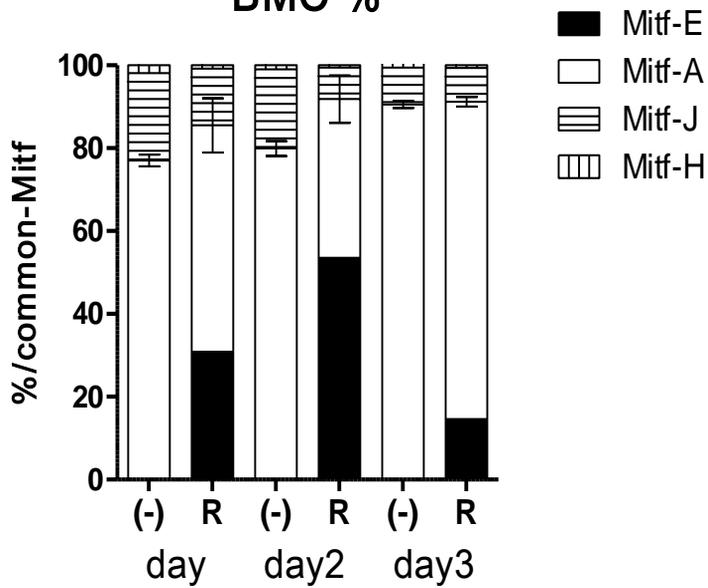
E

CtsK

RANKL : - +

図4 マウス骨髄由来初代培養細胞の M-CSF と RANKL による破骨細胞分化誘導

マウス大腿骨より採取した骨髄から単球を分離し、M-CSF (25 ng/ml) の存在下で3日間浮遊培養した。(A) 浮遊細胞を回収し、 4.0×10^4 個/well で 96-well plate に播種し4日間培養し、TRAP 染色を行なった。TRAP 染色陰性で破骨細胞は形成されなかった。(B) 4.0×10^4 個/well で 96-well plate にM-CSF (25 ng/ml)、RANKL (50 ng/ml) を含む培地に播種し、4日間培養しTRAP 染色を行なった。TRAP 染色陽性の多核巨細胞が確認された。(C~E) 同様に浮遊細胞を 1.0×10^5 個/well で 48-well plate にM-CSF (25 ng/ml) を含む培地で播種し、RNAを抽出した。*NFATc1* (day 1)、*TRAP*、*CtsK* (day 3) の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。ハウスキーピング遺伝子として*G3PDH*で補正し、RANKL未添加の破骨細胞未分化群を1として表した。Mean \pm SE、n = 3。図中の** はRANKL (-) に対する群間での t 検定の判定結果を示す。 (** : P < 0.01)

A**RAW %****B****BMC %**

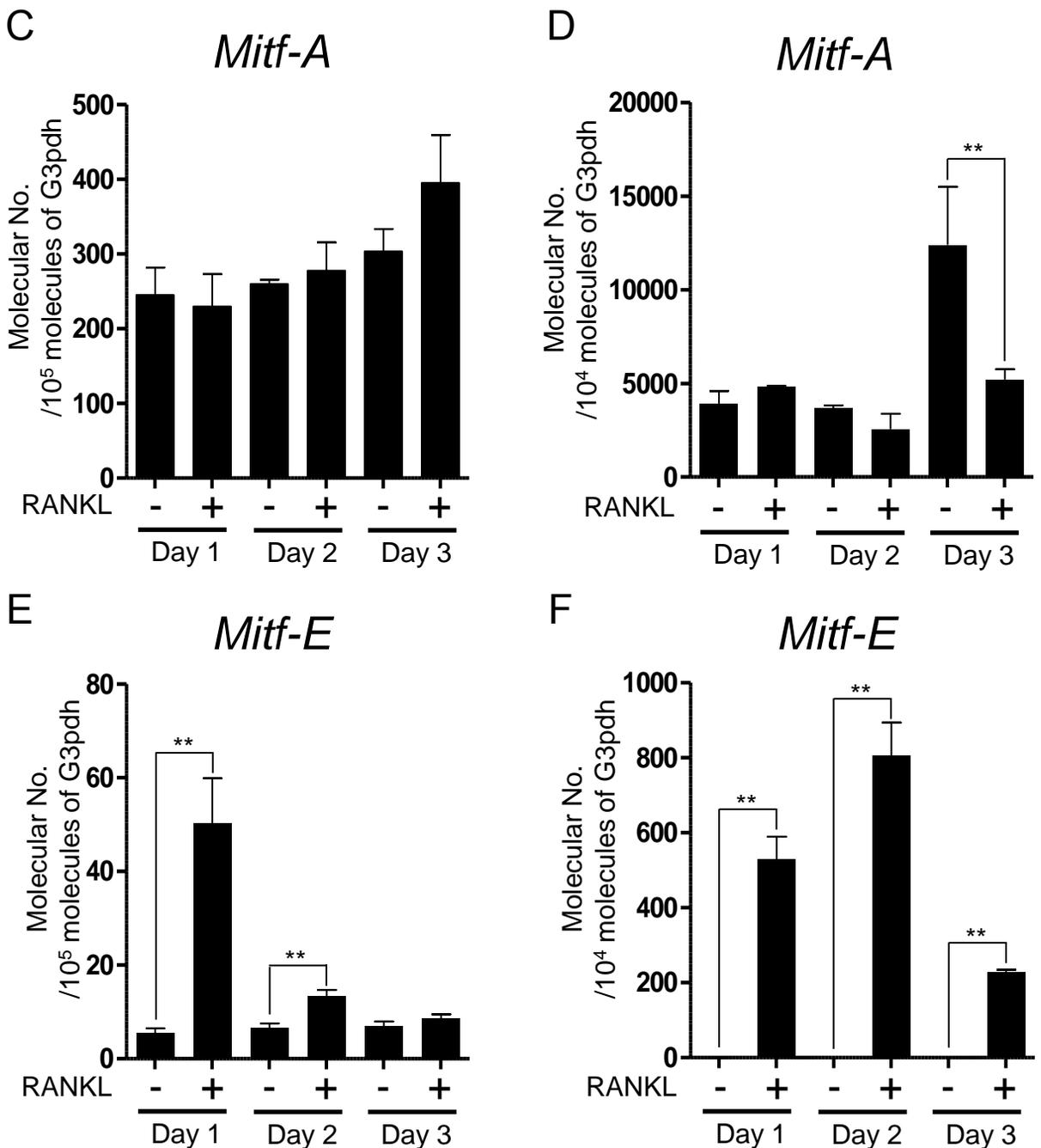


図5 RAW264.7細胞とマウス骨髄由来初代培養細胞における *Mitf* アイソフォームの割合と、*Mitf-A*、*-E* の経時的変化

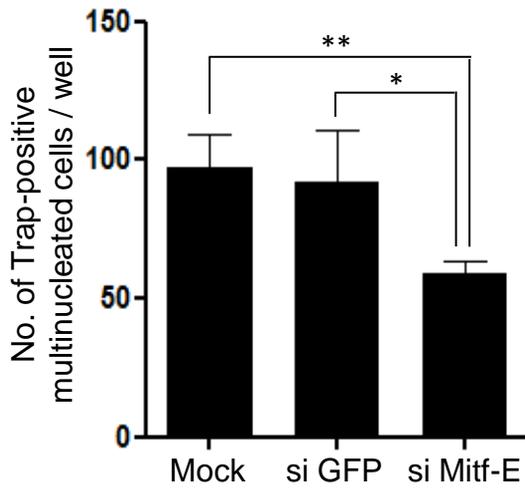
(A) RAW264.7細胞と(B)マウス骨髄由来初代培養細胞における *Mitf* の mRNA 量を定量的リアルタイム RT-PCR 法により測定した。遺伝子発現レベルは各 *Mitf* アイソフォームの mRNA 分子数を *G3PDH* の mRNA 分子数で補正し、全 *Mitf* 発現量に対する各アイソフォームの mRNA 量の割合を経時的に比較した。(C) RAW264.7細胞と(D)マウス骨髄由来初代培養細胞における *Mitf-A* の mRNA 分子数を、(E) RAW264.7細胞と、(F)マウス骨髄由来初代培養細胞における *Mitf-E* の mRNA 分子数をそれぞれ *G3PDH* の mRNA 分子数で補正し、経時的に示した。Mean ± SE、n = 3。図中の** は群間での t 検定の判定結果を示す。

(** : P < 0.01)

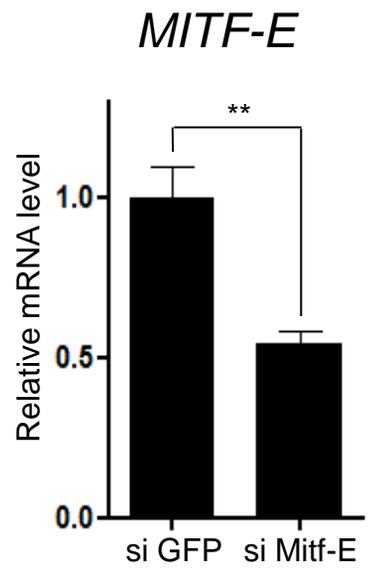
A



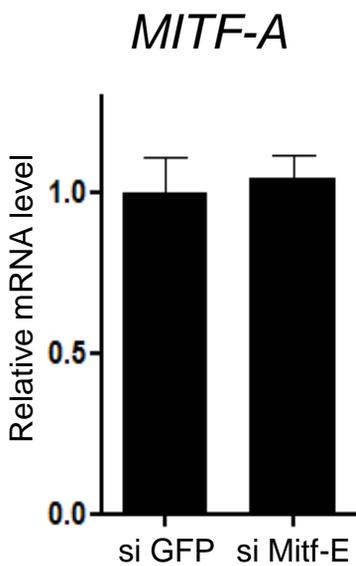
B



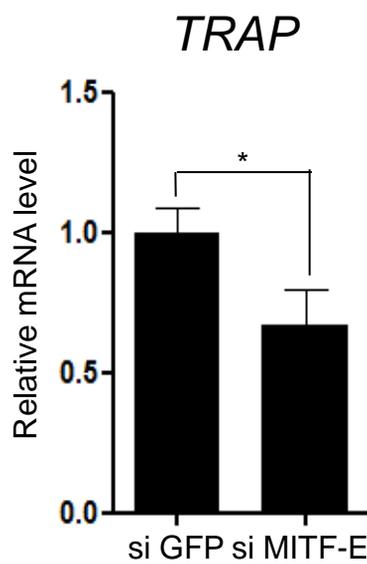
C



D



E



F

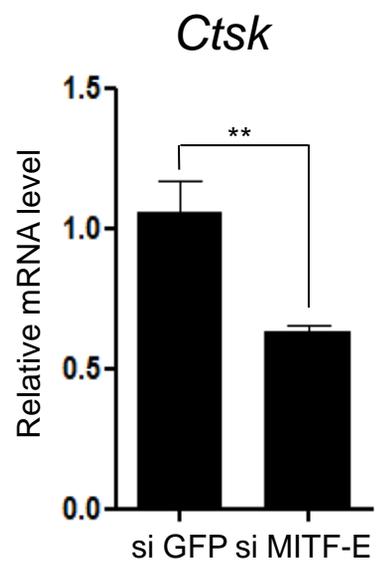


図6 RAW264.7 細胞の si Mitf-E によるノックダウン

(A, B) 96-well plate に 2.5×10^4 個の RAW264.7 細胞を播種し、24時間後に si-GFP (control 群)、si-Mitf-E のトランスフェクションを行ない、その8時間後にRANKLを添加した。トランスフェクション試薬のみの群を Mock 群とした。RANKL 分化誘導後3日目の形態を顕微鏡下で確認した。(B) 3核以上のTRAP 陽性破骨細胞数をカウントした。(C) 24-well plate に 4.0×10^3 個の RAW264.7 細胞を播種し、24時間後に si-GFP および si-Mitf-E のトランスフェクションを行ない、RANKL誘導後1日後のsi-GFP 群およびsi-Mitf-E 群の *Mitf-E* の mRNA 量をリアルタイムRT-PCR 法で測定し、*Mitf-E* の発現が抑制されているか確認した。(D~F) *Mitf-A* (RANKL誘導後1日目)、TRAP (3日目)、*CtsK* (3日目) の mRNA 量をリアルタイムRT-PCR法で測定した。Mean \pm SE、n = 3。図中の*、** は群間での t 検定の判定結果を示す。(*: P < 0.05, **: P < 0.01)

A

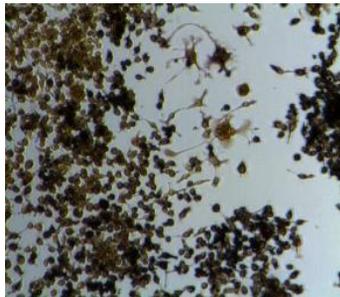
RAW264.7 Mitf-E発現ベクター導入clone株



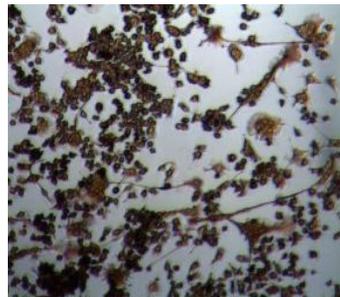
B

Day 3

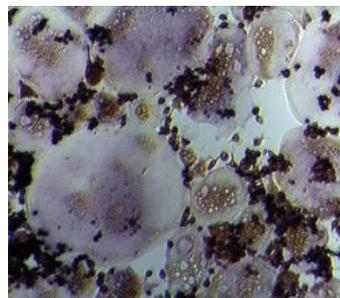
#3



#4



#6



#7

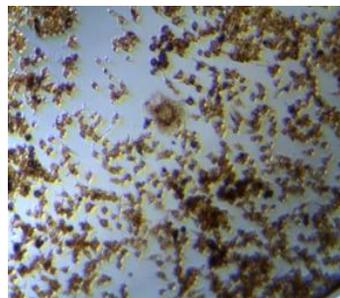
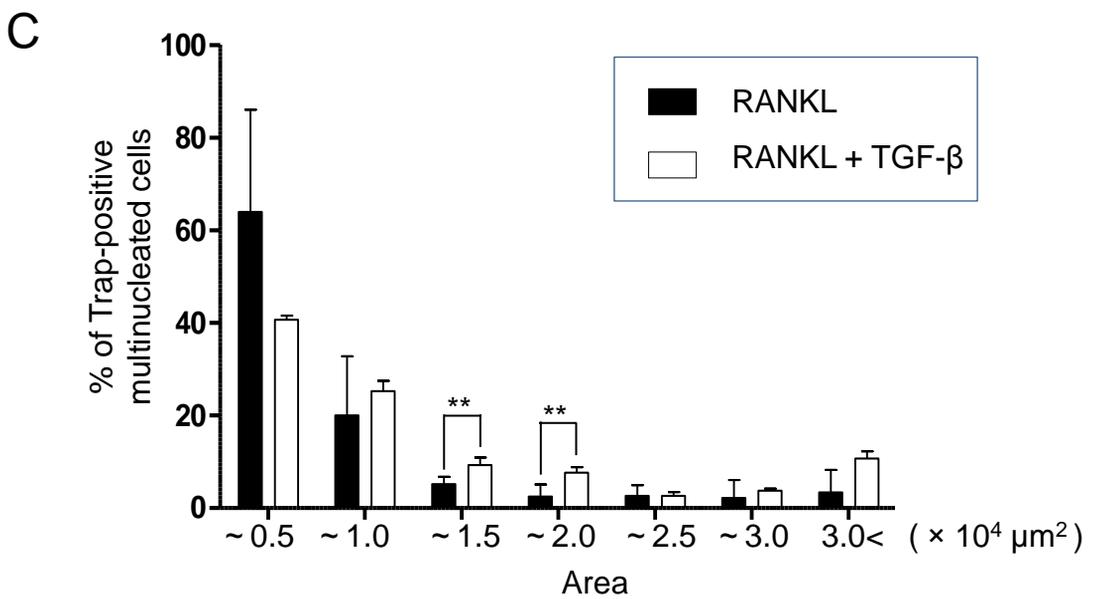
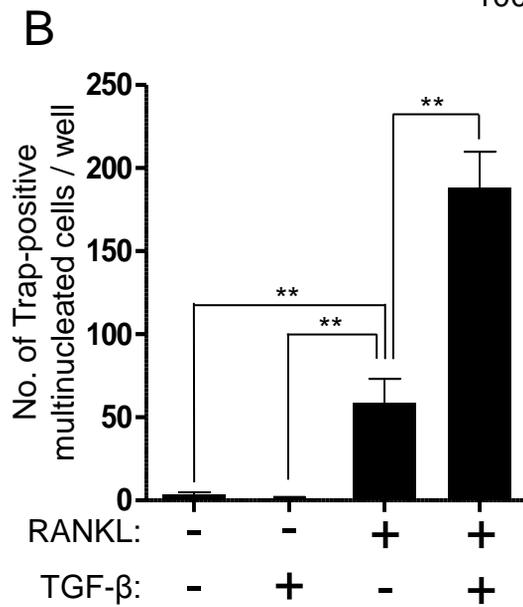
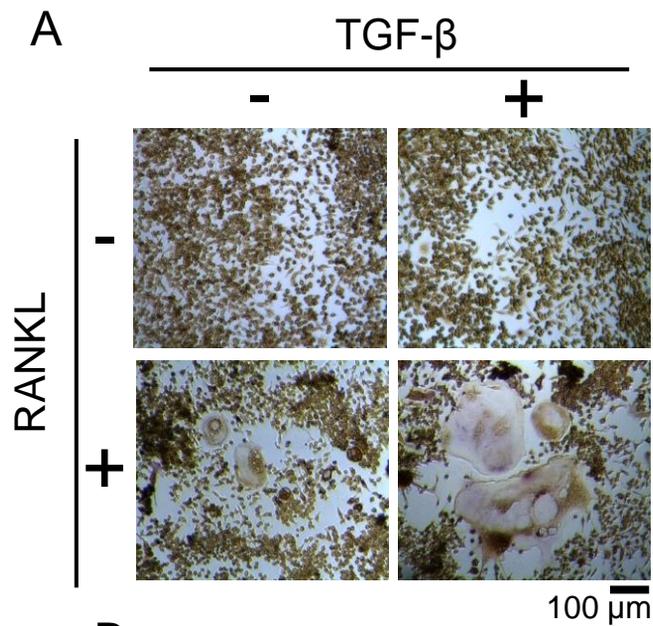


図7 RAW264.7 細胞の Mitf-E を恒常的に発現するクローン株の様態

RAW264.7細胞にMitf-Eの発現ベクターを導入し、Mitf-Eを恒常的に発現するクローン株を作成した。(A) *Mitf-E* のmRNAの発現をRT-PCR法により確認した。RAW264.7にRANKLを添加した1日目のMitf-Eの発現をPCとした。(B) RANKL添加3日後に、形態変化を顕微鏡観察した。



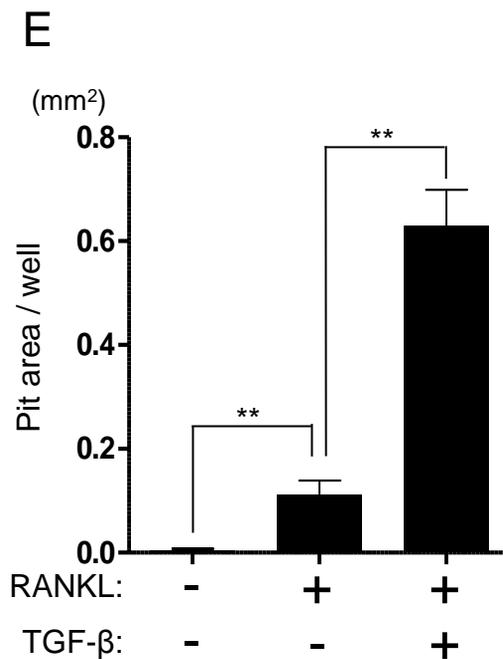
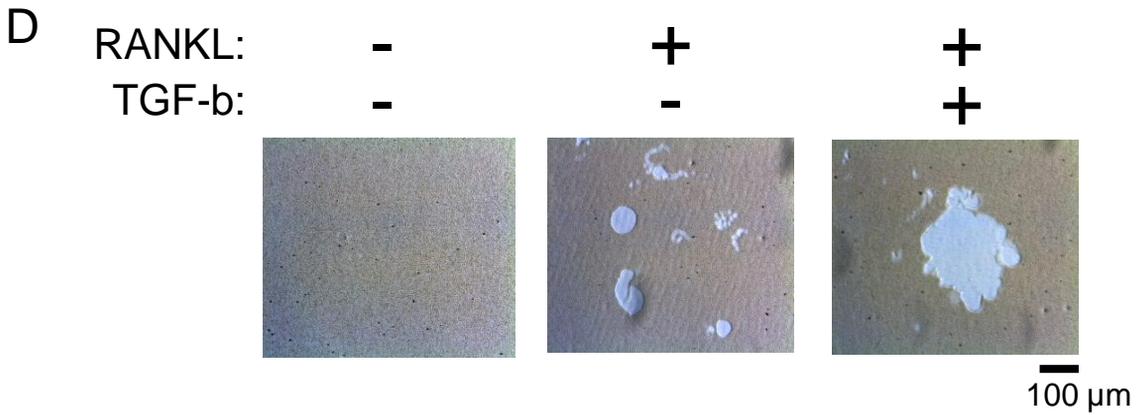


図8 RAW264.7 細胞の RANKL 誘導破骨細胞分化における TGF- β の影響

(A) 4.0×10^3 個の RAW264.7 細胞を 96-well plate で 24 時間培養後、TGF- β (最終濃度 100 pM) 添加群と未添加群を作成し、さらにその 12 時間後に RANKL (50 ng/ml) により破骨細胞分化誘導を行ない、3 日間の培養後顕微鏡下で形態比較した。(B) TRAP 陽性多核巨細胞数 (核 3 個以上) をカウントした。(C) 破骨細胞 1 個あたりの面積を、写真より解析ソフト ImageJ を用いて各条件で 3 well 分測定し、面積毎に個数をわけ、全体の破骨細胞数に対する面積毎の細胞数の割合を算出した。(D) pit assay を行ない、形成された骨吸収窩を比較した。(E) pit assay の骨吸収窩 (白い部分) の面積を、細胞面積と同様に ImageJ により算出した。Mean \pm SE、n = 3。図中の ** は、(A)、(E) では RANKL のみの添加群に対する各群間、(C) では各グループ内の群間での t 検定の判定結果を示す。 (**: P < 0.01)

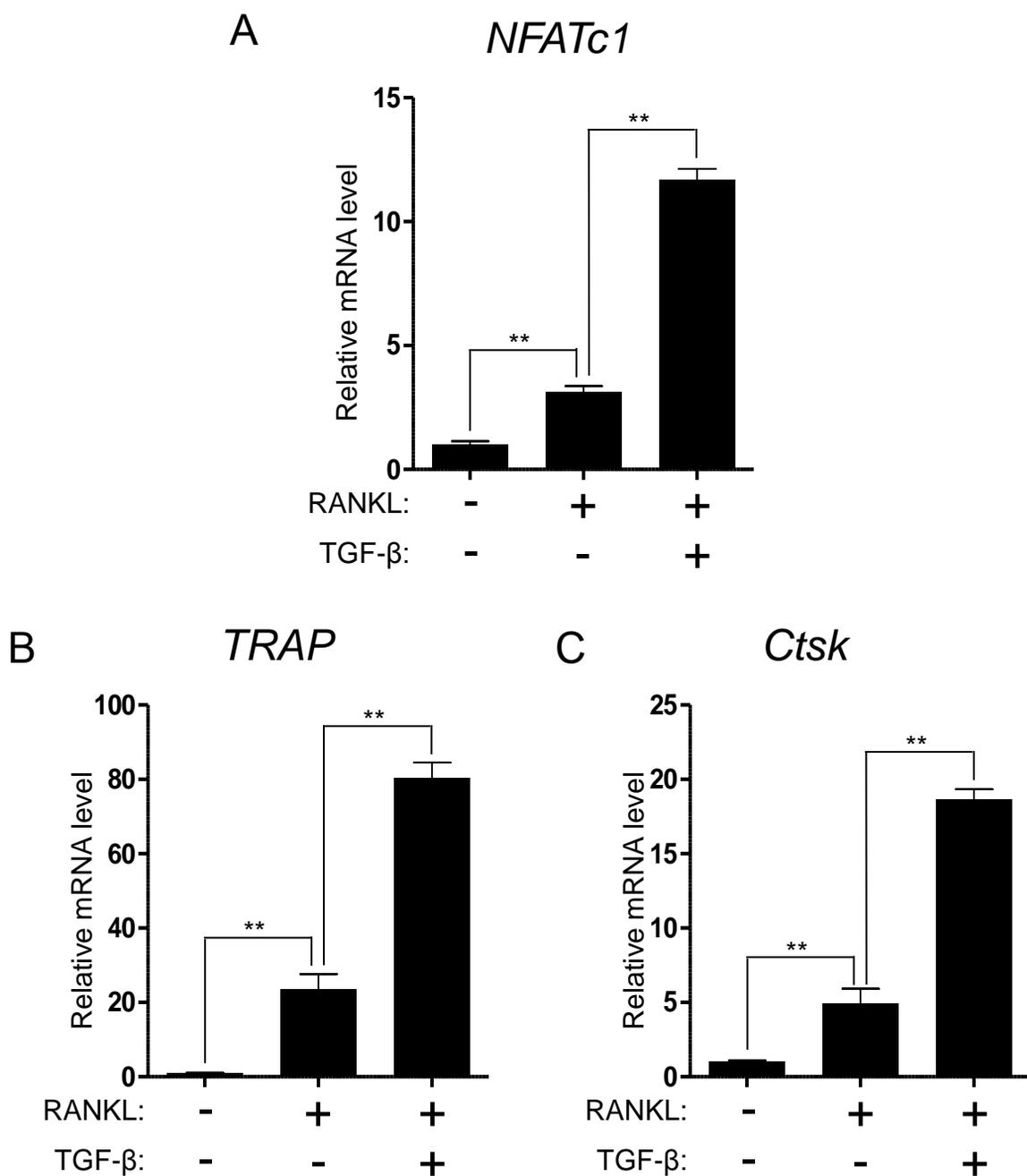


図9 RAW264.7 細胞の TGF-β による RANKL 誘導破骨細胞分化促進時における破骨細胞分化関連遺伝子の発現

2.5×10⁴ 個の RAW264.7 細胞を 24-well plate に播種し、24 時間培養後 TGF-β (100 pM) 添加し 12 時間後に RANKL を最終濃度 50 ng/ml になるように添加し、RNA を抽出した。破骨細胞に分化誘導した時の NFATc1 (RANKL 添加後 day 1)、TRAP (day 3)、CtsK (day 3) の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。ハウスキーピング遺伝子として *G3PDH* で補正し、RANKL、TGF-β 未添加の破骨細胞未分化群を 1 として表した。Mean ± SE、n = 3。図中の** は RANKL のみの群に対する群間での t 検定の判定結果を示す。 (**: P < 0.01)

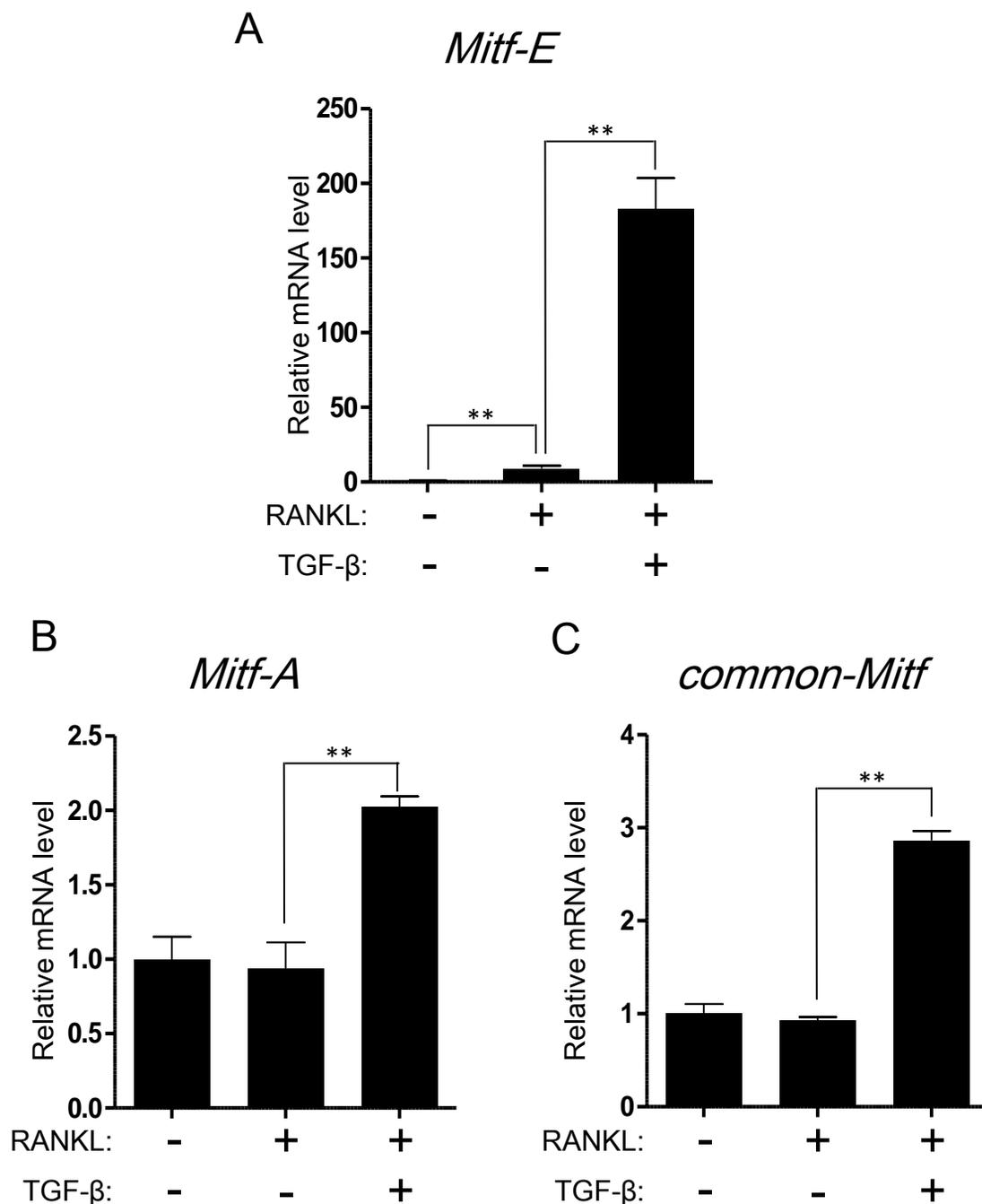


図10 RAW264.7 細胞の TGF-β による RANKL 誘導破骨細胞分化促進時における *Mitf-E*, *Mitf-A*, *common-Mitf* の発現

RANKL添加後1日目の *Mitf-E*、*Mitf-A*、*common-Mitf* の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。ハウスキーピング遺伝子として *G3PDH* で補正し、RANKL、TGF-β 未添加の破骨細胞未分化群を 1 として表した。Mean ± SE、n = 3。図中の** は RANKL のみの群に対する群間での t 検定の判定結果を示す。 (**: P < 0.01)

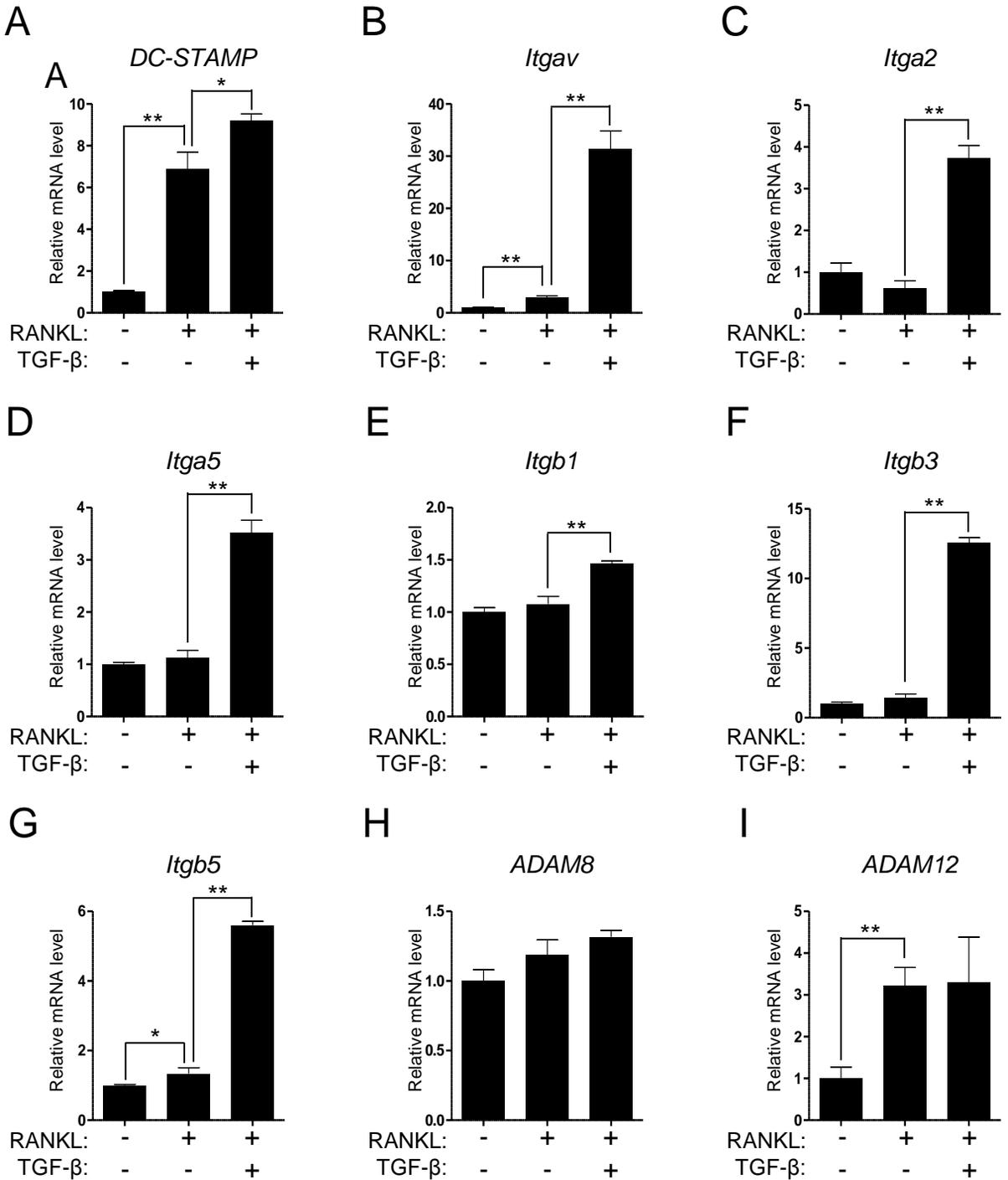
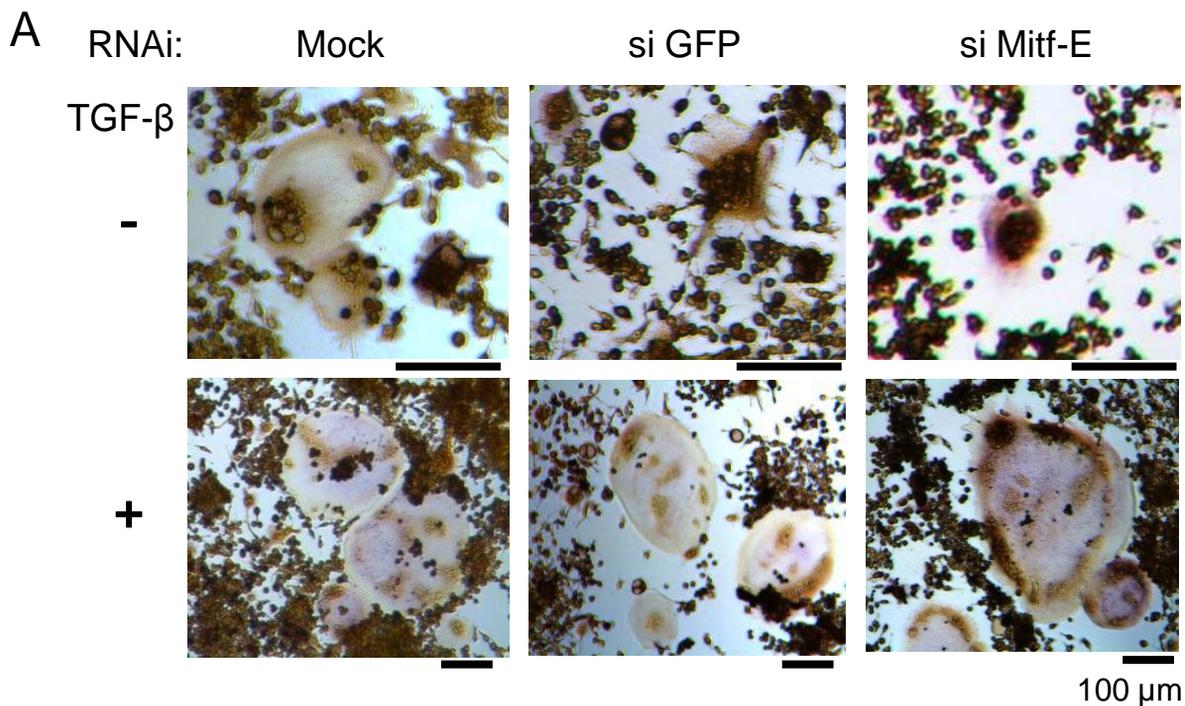


図11 RAW264.7 細胞の TGF-β による RANKL 誘導破骨細胞分化促進時における細胞融合関連遺伝子の発現

RANKL添加後3日目の各種細胞融合関連遺伝子の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。ハウスキーピング遺伝子として *G3PDH* で補正し、RANKL、TGF-β 未添加の破骨細胞未分化群を 1 として表した。Mean ± SE, n = 3。図中の*、**は、RANKLのみの群に対する、群間での t 検定の判定結果を示す。(*: P < 0.05, **: P < 0.01)



B

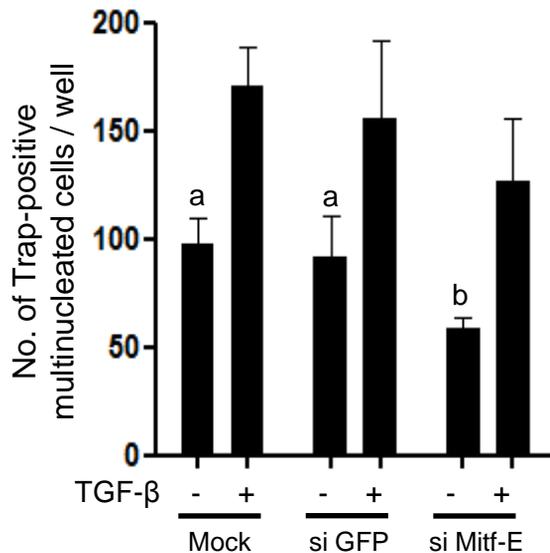
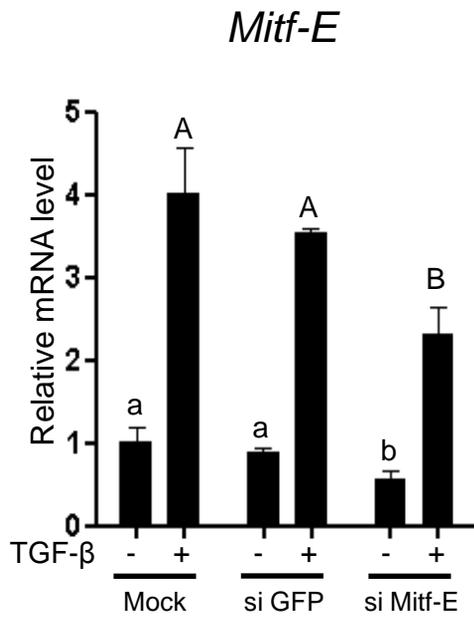


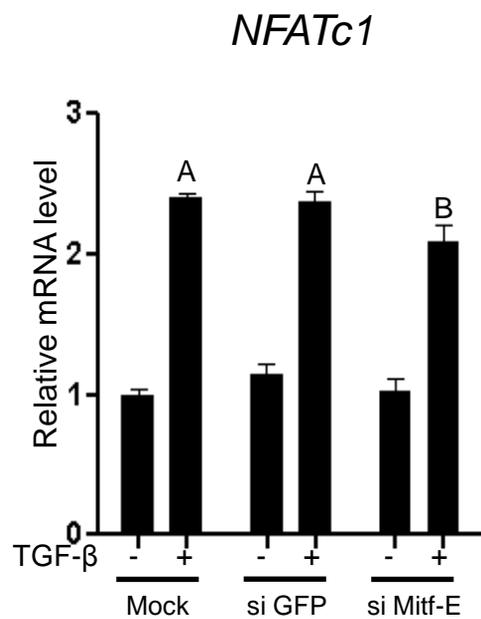
図12 RAW264.7 細胞のsiMitf-Eによるノックダウン時におけるTGF- β による影響

(A) 96-well plate に 4.0×10^3 個の RAW264.7 細胞を播種し、24時間後にトランスフェクション試薬のみ (Mock群)、si-GFP処理およびsi-Mitf-E 処理を行ない、RANKL と TGF- β 添加3日後の Mock 群、si-GFP処理群およびsi-Mitf-E 群の形態を顕微鏡下で比較した。(B) 3核以上のTRAP陽性破骨細胞の数をカウントした。Mean \pm SE, n=3。a, b 間は、それぞれの群間での t 検定の判定結果を示す。a,b: P<0.05)

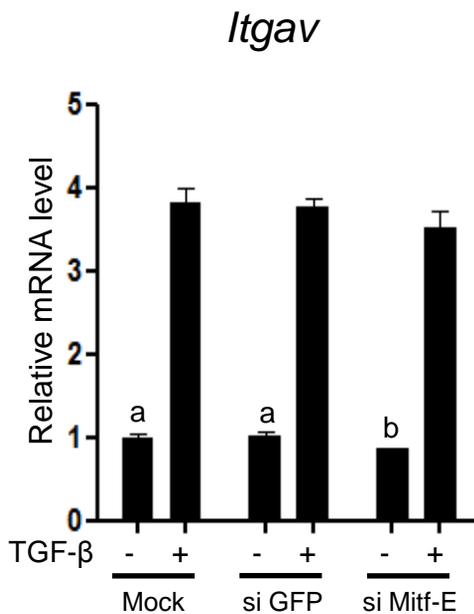
C



D



E



F

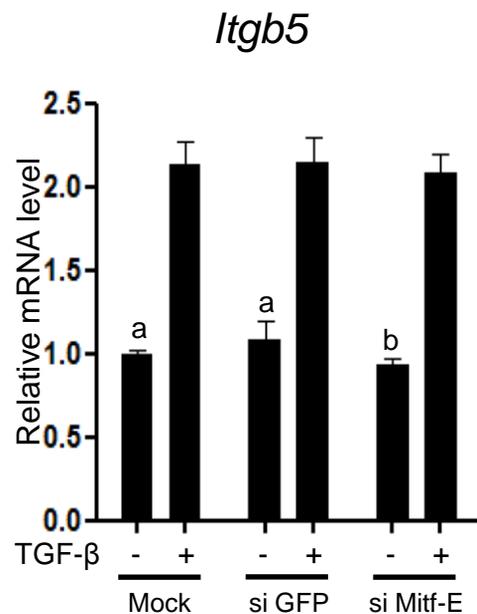
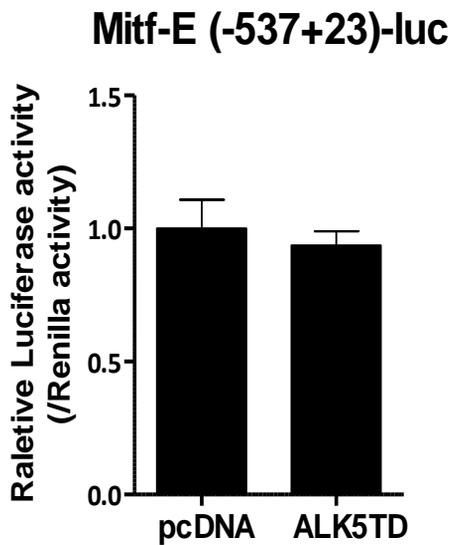


図13 RAW264.7 細胞のsiMitf-Eによるノックダウン時におけるTGF-βによる影響

各種細胞融合関連遺伝子の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。ハウスキーピング遺伝子として *G3PDH* で補正し、Mock 群における TGF-β 未添加の破骨細胞未分化群を 1 として表した。Mean ± SE, n=3。図中の A、B 間、a、b 間は、それぞれの群間での t 検定の判定結果を示す。(A,B: P<0.05; a,b: P<0.05)

A



B

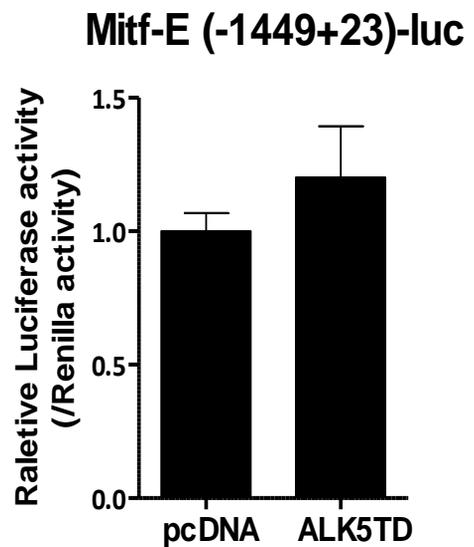


図14 HepG2細胞におけるALK5TDとの共発現時のMitf-E のレポーターの発現量測定

HepG2 細胞に、Mitf-Eの2種類の長さのプロモーター領域 (-537+23、-1449+23) をそれぞれ pGL4プラスミドのホタルルシフェラーゼ遺伝子 (Luc) の上流に組み込んだプラスミドベクター (Mitf-E-Luc) と、ALK5活性化型であるALK5TDをpcDNAに組み込んだ発現ベクターをトランスフェクションし、ルシフェラーゼの発光量を測定した。コントロールとしてRenillaを同時にトランスフェクションした。Mean \pm SE、n = 3。

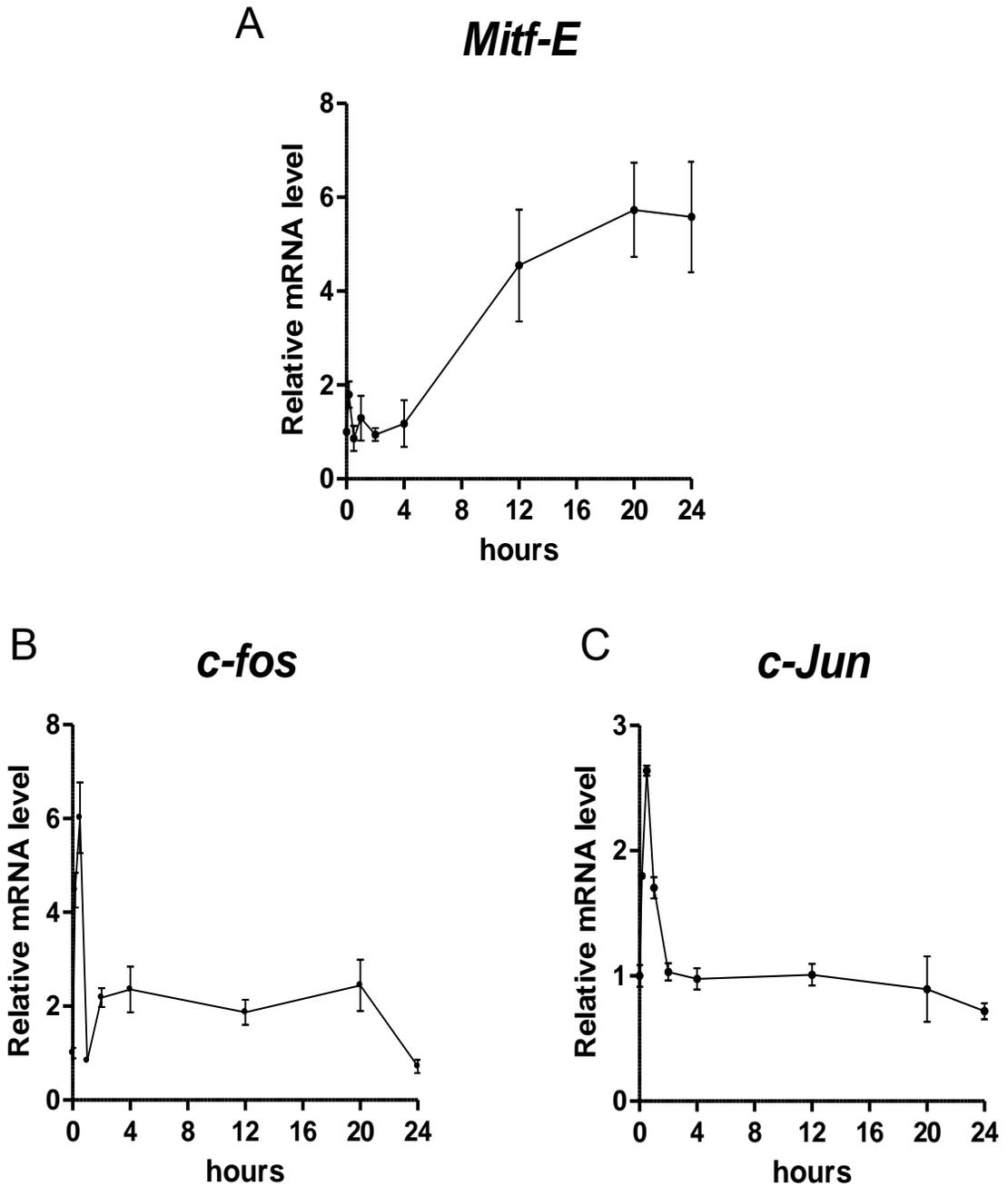
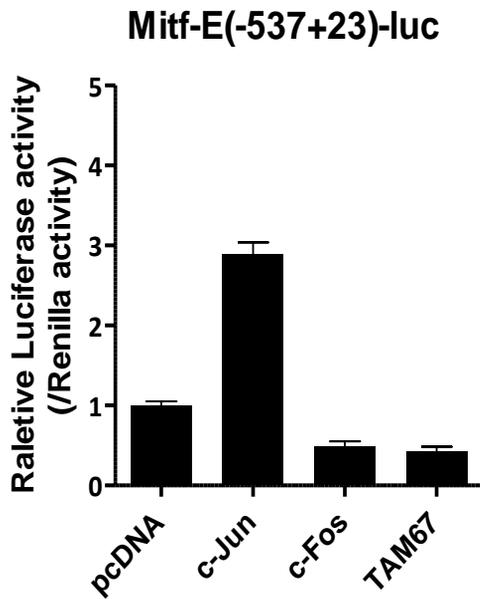


図15 RAW264.7細胞のRANKL誘導破骨細胞分化初期の分化関連遺伝子発現の比較

(A~C) 2.5×10^4 個の RAW264.7 細胞を 24-well plate に播種し、24 時間培養後に RANKL を最終濃度 50 ng/ml になるように添加し、継時的に細胞を回収して RNA を抽出した。*Mitf-E*、*c-Fos*、*c-Jun* の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。ハウスキーピング遺伝子として *G3PDH* で補正し、RANKL 添加時に回収した細胞を 0 時間として、1 として表した。Mean \pm SE、n = 3。

A



B

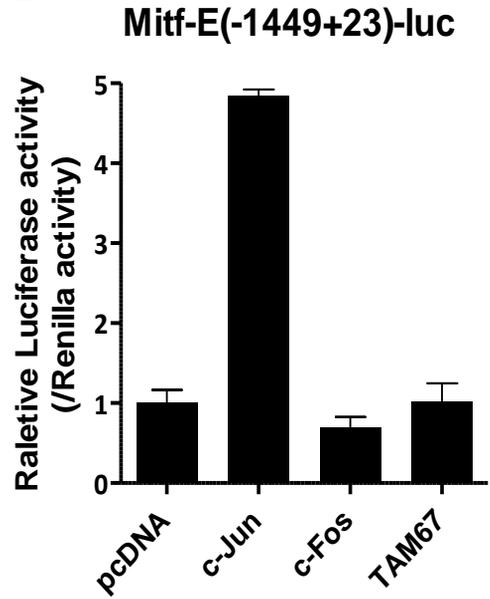


図16 HepG2細胞における c-Jun, c-Fos, TAM67 との共発現時のMitf-E のレポーターの発現量測定

2種類のMitf-E-Lucと、c-Fos、c-Jun、c-Junのドミナントネガティブ体であるTAM67をそれぞれ発現するベクターをpcDNAに組み込んだ発現ベクターと一緒にトランスフェクションし、ルシフェラーゼの発光量を測定した。コントロールとしてRenillaを同時にトランスフェクションした。Mean \pm SE、n = 3。

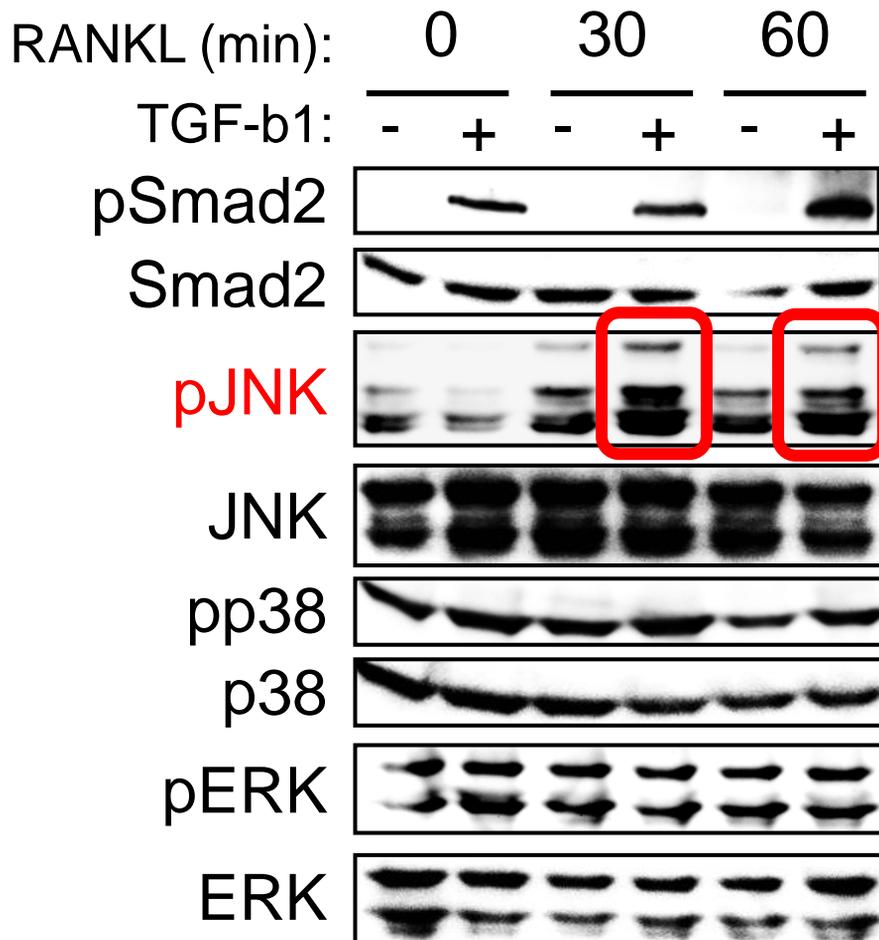


図17 RAW264.7細胞におけるRANKL存在下のTGF- β によるJNKのリン酸化

RAW264.7細胞における、TGF- β とRANKLによるリン酸化の影響をウェスタンブロッティング法で調べた。RANKL添加後30、60分後で、TGF- β 添加によりJNKのリン酸化が増強されていた。

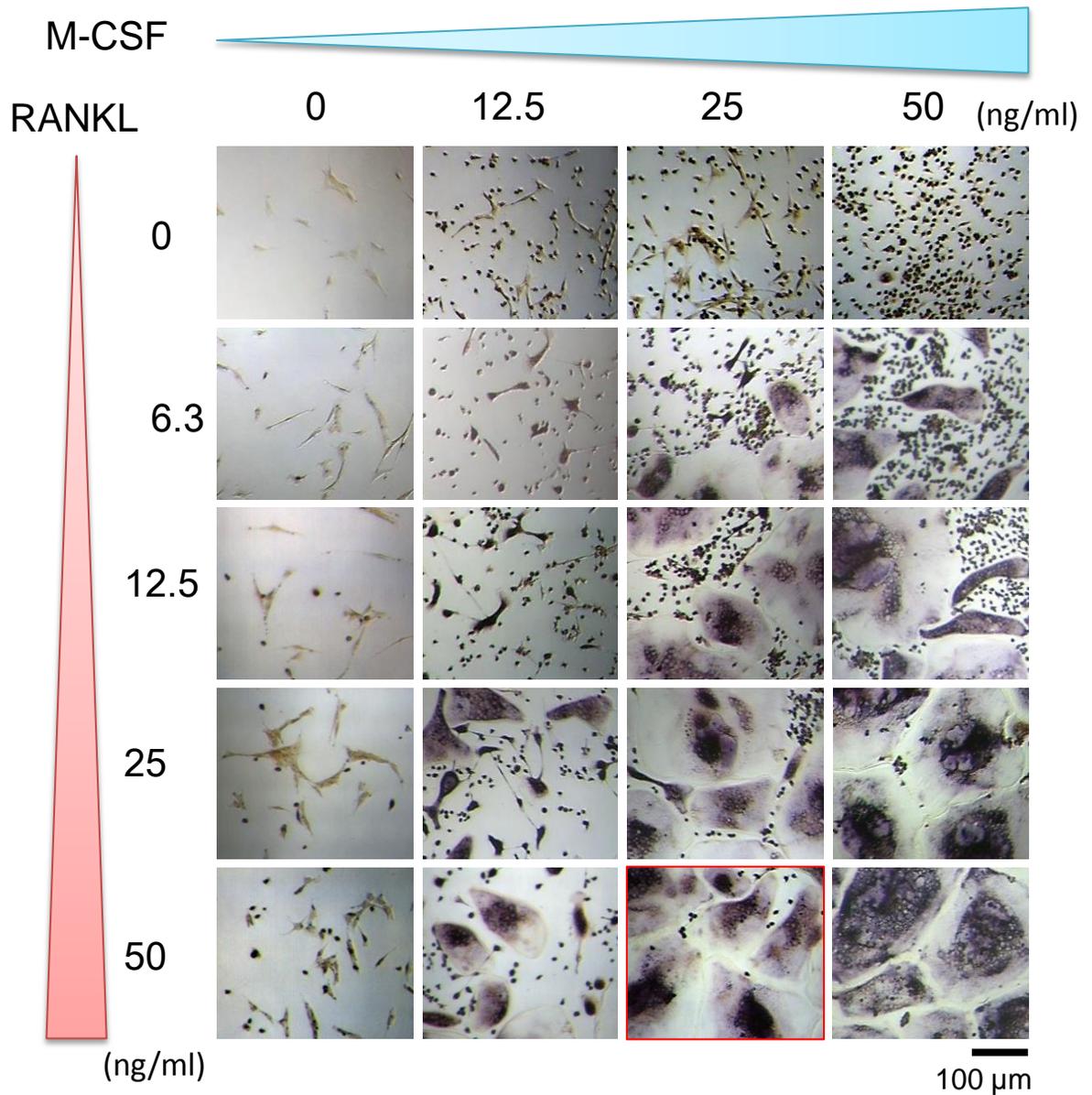


図18 イヌ骨髄由来初代培養細胞の破骨細胞分化におけるRANKLとM-CSFの影響

イヌ大腿骨および上腕骨より採取した骨髄から単球を分離し、溶血後、M-CSF (0, 12.5, 25, 50 ng/ml) の存在下でそれぞれ3日間浮遊培養した。(A) 浮遊細胞を回収し、 4.0×10^4 個/well で96-well plateに播種しM-CSF、RANKLの各濃度で4日間培養し、TRAP染色を行ない顕微鏡下で形態比較した。

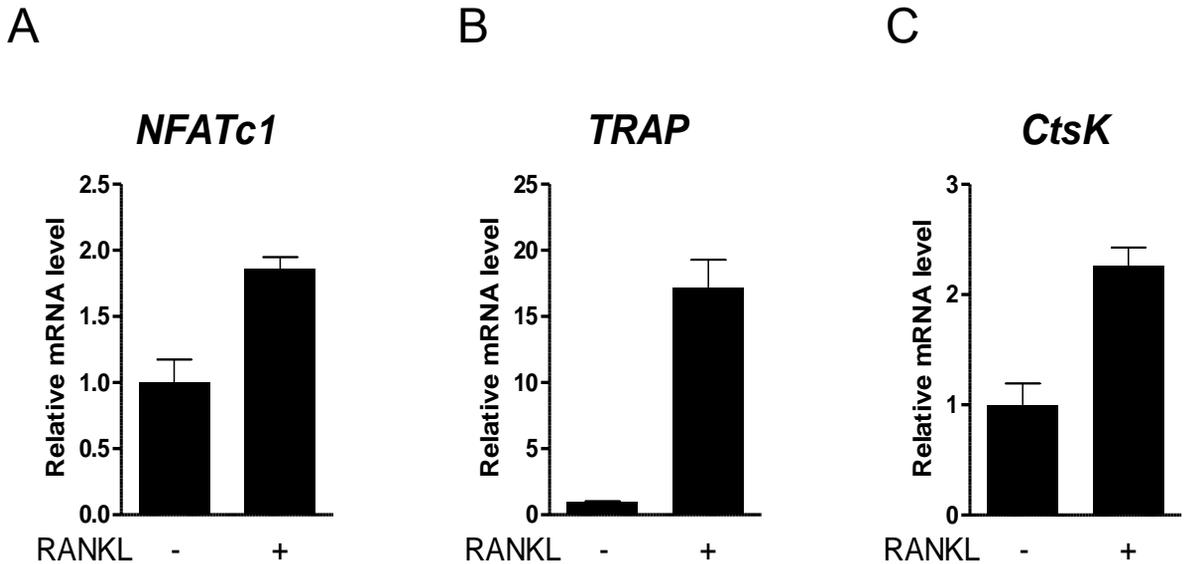


図19 イヌ骨髄由来初代培養細胞の破骨細胞分化における各破骨細胞分化関連遺伝子の発現

イヌ大腿骨および上腕骨より採取した骨髄から単球を分離し、溶血後、M-CSF (25ng/ml) の存在下でそれぞれ3日間浮遊培養した。浮遊細胞を 1.0×10^5 個/wellで48-well plateにM-CSF (25 ng/ml) を含む培地で播種し、RNAを抽出した。RANKL未添群 (control 群) とRANKL添加群で、*NFATc1* (day 1)、*TRAP*、*CtsK* (day 3) のmRNA量をリアルタイムRT-PCR法で測定した。ハウスキーピング遺伝子として*G3PDH*で補正し、control群を1として表した。Mean \pm SE、n = 3。

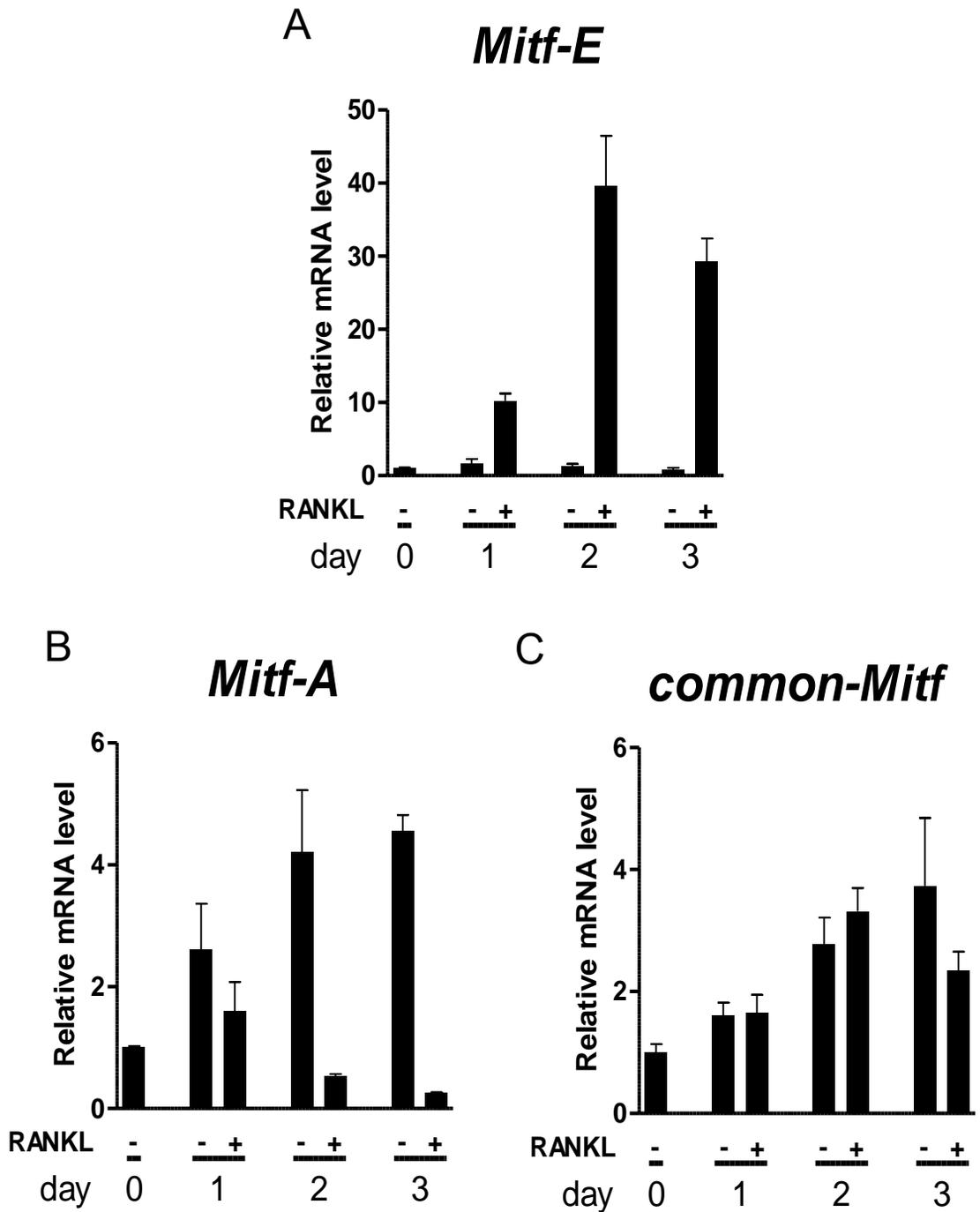
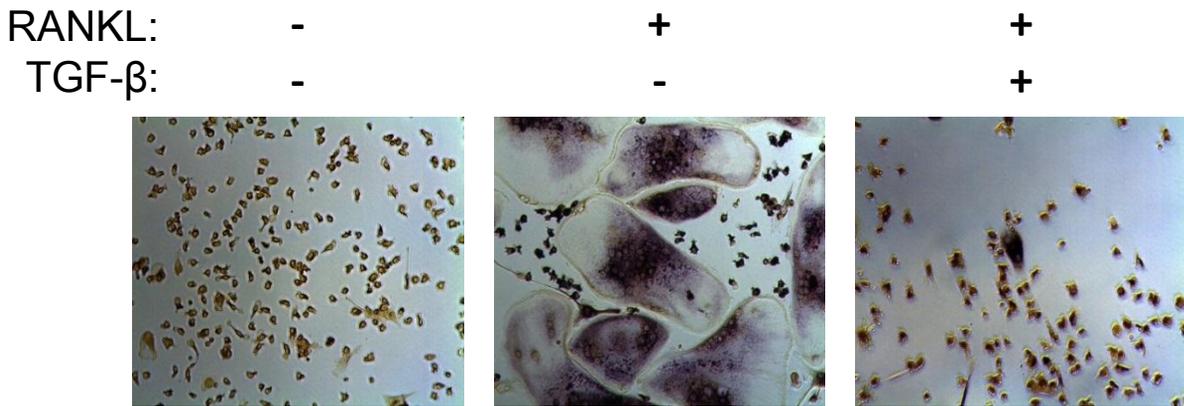


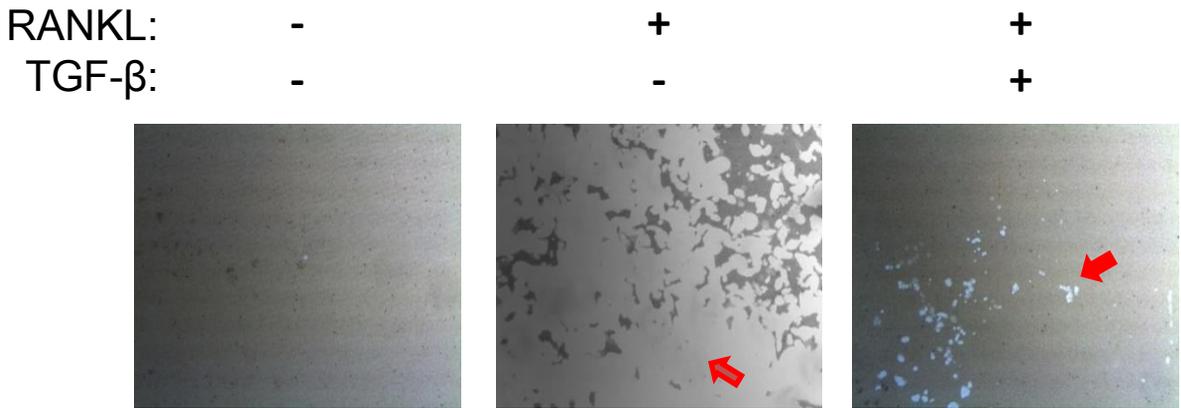
図20 イヌ骨髄由来初代培養細胞の破骨細胞分化におけるMitf-E、Mitf-A、common-Mitfの発現

(A~C) Mitf の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。ハウスキーピング遺伝子として *G3PDH* で補正し、RANKL を添加した day 0 と 1 として表した。Mean \pm SE、n = 3。

A

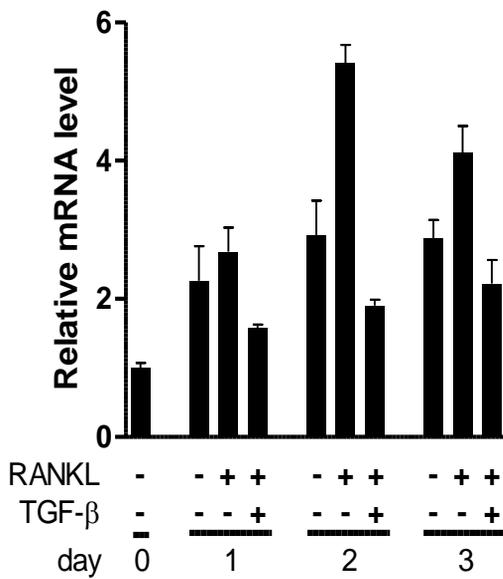


B



C

NFATc1



D

TRAP

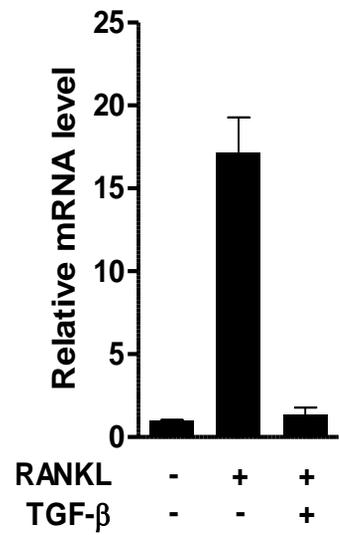


図21 イヌ骨髄由来初代培養細胞の破骨細胞分化におけるTGF-βの影響

(A) イヌ骨髄初代培養細胞におけるTGF-βの影響下の形態的变化と、Pit assayによる骨吸収窩(矢印)を観察した。(B、C) NFATc1、TRAP(day 3)のmRNA量をリアルタイムRT-PCR法で測定した。ハウスキーピング遺伝子として*G3PDH*で補正し、NFATc1はRANKLを添加したday 0を、TRAPはRANKL、TGF-β未添加群を1として表した。Mean ± SE、n = 3。

Mitf-E

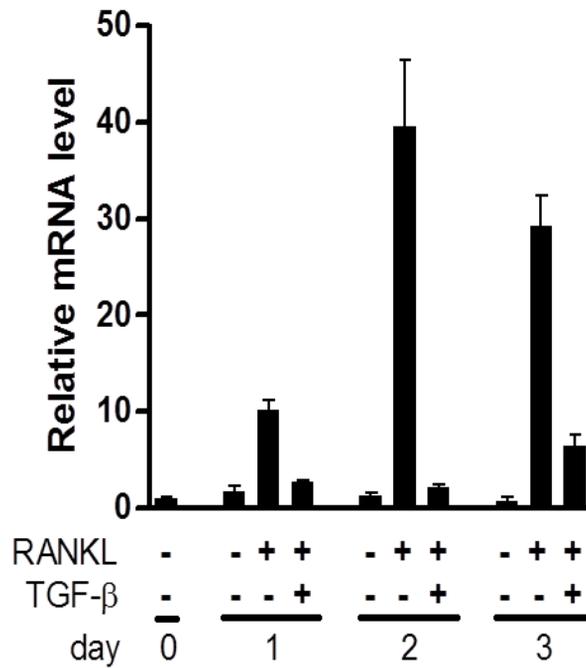


図22 イヌ骨髄由来初代培養細胞の破骨細胞分化におけるTGF-βの影響

Mitf-E の mRNA 量を経時的にリアルタイム RT-PCR 法で測定した。ハウスキーピング遺伝子として *G3PDH* で補正し、RANKL を添加した day 0 を 1 して表した。Mean ± SE、n = 3。

表 1-1 RAW264.7 細胞とマウス骨髄由来初代培養細胞における RT-PCR および定量的リアルタイム RT-PCR に使用したプライマー

	Oligonucleotide		GenBank accession number
	5'-primer	3'-primer	
Mitf:			
Common <i>Mitf</i>	5'-GCCTTGCAAATGGCAAATAC-3'	5'-GCTGGACAGGAGTTGCTGAT-3'	
<i>Mitf-A</i>	5'-GAGGAGTTTCACGAAGAACC-3'	Common Mitf 3'-primer を使用	AB009397
- <i>B</i>	5'-GAGTGCCATGCCGTGCCTTGAT-3'	Common Mitf 3'-primer を使用	AY632573
- <i>C</i>	5'-TTTTCCCACCAGCTGATTCCTCTA-3'	Common Mitf 3'-primer を使用	AY632571
- <i>D</i>	5'-GTTGGGACCTGACAGGCTCTGAATA-3'	Common Mitf 3'-primer を使用	AB061769
- <i>E</i>	5'-CCAGATACACAGACAGTCACAGAG-3'	Common Mitf 3'-primer を使用	AF465624
- <i>H</i>	5'-GAGGAGTTTCACGAAGAACC-3'	Common Mitf 3'-primer を使用	NM_001178049
- <i>J</i>	5'-CCGTGTCTCTGGGCATCTGAAG-3'	Common Mitf 3'-primer を使用	AY632575
- <i>M</i>	5'-ATGCTGGAAATGCTAGAATACAG-3'	5'-CATACCTGGGCACTCACTCTC-3'	NM_008601
- <i>mc</i>	5'-GAGGAGTTTCACGAAGAACC-3'	Common Mitf 3'-primer を使用	AF510652
Osteoclast-related genes:			
<i>NFATc1</i>	5'-TCCAAAGTCATTTTCGTGGA-3'	5'-CTTTGCTTCCATCTCCCAGA-3'	NM_016791
<i>TRAP</i>	5'-GCCAAAGAGATCGCCAGAAC-3'	5'-GAAGTAGAAATTGTCCCCCAGAGA-3'	NM_007388
<i>CtsK</i>	5'-TGGACTGTGTGACTGAGAATTATGG-3'	5'-CCGTTCTGCTGCACGTATTG-3'	NM_007802
<i>c-Fos</i>	5'-CCTGCCCCTTCTCAACGA-3'	5'-TCCACGTTGCTGATGCTCTT-3'	NM_010234
<i>c-Jun</i>	5'-GAAAACCTTGAAAGCGCAAAA-3'	5'-CACCTGTTCCCTGAGCATGTT-3'	NM_010591
Cell fusion-related genes:			
<i>DC-STAMP</i>	5'-CGAAGCTCCTTGAGAAACGA-3'	5'-GGACTGGAAACCAGAAATGAA-3'	AB_109560
<i>Itgav</i>	5'-GGTGTGGATCGAGCTGTCTT-3'	5'-CAAGGCCAGCATTACAGTG 3'	NM_008402

表 1-2 RAW264.7 細胞とマウス骨髄由来初代培養細胞における RT-PCR および定量的リアルタイム RT-PCR に使用したプライマー (続き)

	Oligonucleotide		GenBank accession number
	5'-primer	3'-primer	
Cell fusion-related genes:			
<i>Itga2</i>	5'-ACTTCCGGCATAACGAAAGAAT-3'	5'-TCAGCCAGCAGGTGATGTTA-3'	NM_008396
<i>Itga5</i>	5'-CACCATTCAATTTGACAGCAA -3'	5'-TCCTCTCCCTTGGCACTGTA-3'	NM_010577
<i>Itgb1</i>	5'-ATGCAGGTTGCGGTTTGT-3'	5'-CATCCGTGGAAAACACCAG-3'	NM_010578
<i>Itgb3</i>	5'-GTGGGAGGGCAGTCCTCTA-3'	5'-CAGGATATCAGGACCCTTGG-3'	NM_016780
<i>Itgb5</i>	5'-TGCCACCTGCCAAGATGGCATA-3'	5'-CACGGACACTTCAAAGGATG-3'	NM_010580
<i>ADAM8</i>	5'-AAAGGCTCCGAGACAAATCC-3'	5'-TTGGAGAGCCCCGAGATAG-3'	NM_007403
<i>ADAM12</i>	5'-CAGAGCATCCCAGCCAAG-3'	5'-CAGGCTGAGGATCAGGTCTC-3'	NM_007400
Housekeeping gene:			
<i>G3PDH</i>	5'-CGTGTTCTACCCCAATGT-3'	5'-TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT-3'	NM_008084

表 2 dsRNA 配列

	Oligonucleotide	
	sense	anti-sense
<i>Mitf-E</i>	5'-GGUUACGUAUCUUGUCCACAG-3'	5'-GUGGACAAGAUACGUAACCUC-3'
<i>GFP</i>	5'-GUUCAGCGUGUCCGGCGAGTT-3'	5'-CUCGCCGGACACGCUGAACTT-3'

表3 イヌ骨髄由来初代培養細胞における RT-PCR および定量的リアルタイム RT-PCR に使用したプライマー

	Oligonucleotide		GenBank accession number
	5'-primer	3'-primer	
Mitf:			
<i>Common-Mitf</i>	5'-GATTGATGGATCCTGCTTTGC-3'	5'-GGAGGCAGGCCTTGGTTGCCATA-3'	AY_360373~380
<i>Mitf-A</i>	5'-ACCTATTACGAACTCAAAAGTC-3'	5'-CATACTGGAGGAGCTTATCGG-3'	EF_409962
<i>Mitf-E</i>	5'-GGGGTTAGTAGGTGGATGAGAGG-3'	5'-CATACTGGAGGAGCTTATCGG-3'	EF_409963
Osteoclast-related genes:			
<i>NFATc1</i>	5'-AACTTTCTGCAAGACTCCAAAG-3'	5'-CCAGCTTGGCCTCTGTCTCCCA-3'	XM_541045
<i>TRAP</i>	5'-GACAATTTCTACTTCTCTGGT-3'	5'-GCACGTTGCGGAGGGAAGAT-3'	JN635353
<i>CtsK</i>	5'-TGCAGAAGAACCGGGGCATTGA-3'	5'-CACTTAGCTGCCTTGCCTGTTG-3'	AY_738221
Housekeeping gene:			
<i>G3PDH</i>	5'-ATGATTCTACCCACGGCAAA-3'	5'-ATGGACTTCCCGTTGATGAC-3'	NM_001003142