

氏名(本籍)	浅井 久美子(愛知県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第 136 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 村 上 賢 (副査) 滝 沢 達 也 佐 原 弘 益 舟 場 正 幸

論 文 内 容 の 要 旨

骨の恒常性は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のリモデリングにより維持されている。このバランスが崩れることにより、破骨細胞の骨吸収過大による骨粗鬆症などの骨疾患がみられ、骨の代謝の維持のために破骨細胞分化の基礎的知見を得ることは重要である。破骨細胞は、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る。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) により、主体的に破骨細胞形成が誘導される。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。これらの分子に加え、本研究室で着目している 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働いている。破骨細胞分化には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、本研究では、その中でも TGF- β の細胞内シグナル伝達因子との関連性も示されている Mitf (Microphthalmia-associated transcription factor : 小眼球症関連転写因子) に着目した。Mitf は破骨細胞、肥満細胞、心筋細胞やメラノーマ細胞等に組織特異的に発現している転写因子で、マウスでは転写開始点が異なる 9 つのアイソフォーム A、B、C、D、E、H、J、M、および mc が知られており、細胞によって発現しているアイソフォームは異なっている。

本研究では、はじめにマウスマクロファージ系株化細胞 RAW264.7 細胞およびマウス骨髄由来初代培養細胞を用いて、破骨細胞分化における Mitf-E の役割を、2 本鎖 RNA 干渉法 (dsRNAi 法) を用いた Mitf mRNA の発現ノックダウン実験や、Mitf-E 発現ベクターを RAW264.7 細胞に導入した

Mitf-E 強制発現株の作製により解析し、破骨細胞分化における Mitf-E の重要性を示した (第 1 章)。次に、RAW264.7 細胞での TGF- β 刺激による RANKL 誘導性破骨細胞分化促進において、Mitf-E の発現が大きく上昇すること、形態的には破骨細胞の面積が増大していることをみつけ、破骨細胞分化関連遺伝子のうち特に細胞融合に関わる遺伝子の発現を調べた (第 2 章)。TGF- β 刺激における Mitf-E の発現促進機序を細胞内シグナル伝達経路から解析した (第 3 章)。イヌにおける破骨細胞分化の基礎的知見はほとんどなく、イヌの骨髄由来初代培養細胞による破骨細胞分化系を確立し、イヌの破骨細胞分化系における TGF- β と Mitf-E の重要性と役割を検討した (第 4 章)。

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

破骨細胞分化における Mitf-E の発現様態を、RAW264.7 細胞を RANKL により、またマウス骨髄由来初代培養細胞を M-CSF と RANKL により破骨細胞に誘導する系を用いて調べた。Mitf-E は RANKL 添加後、破骨細胞に特異的に発現することが確認され、Mitf-E は RANKL 添加後 1~2 日目で発現が上昇し、その後減少することから、破骨細胞分化の初期段階に働いていることが示された。次に、dsRNAi 法による Mitf-E 発現ノックダウン実験を行った結果、破骨細胞の形成数、分化マーカー遺伝子である TRAP、CtsK (カテプシン K) の発現量が減少し、破骨細胞分化が抑制された。一方、RAW264.7 細胞で恒常的に Mitf-E を発現する安定株を作製したが、RANKL 添加なしの培養では破骨細胞への分化は確認できなかった。また Mitf-E 安定発現株 4 株について RANKL 刺激を行なったところ、株により破骨細胞分化の程度にばらつきがみられ、Mitf-E の発現量との相関性はみられなかった。これらのことから、Mitf-E の発現のみでは破骨細胞へは分化せず、他の因子との協調が必要であることが示唆された。本章では、破骨細胞分化において作用する Mitf アイソフォームの中でも Mitf-E が重要であり、Mitf-E は破骨細胞分化に必要なではあるが、単独で破骨細胞分化誘導をする十分な因子ではないことを示した。

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

TGF- β は、骨髄など様々な細胞に存在し、細胞の増殖や分化に関与しているサイトカインである。TGF- β を RAW264.7 細胞の RANKL 誘導性破骨細胞分化系に添加すると、破骨細胞分化が促進されることが知られている。TGF- β 添加では RANKL 刺激のみの対照群に比べて破骨細胞の形成数と面積、骨吸収の面積が増大し、破骨細胞分化マーカー遺伝子 (NFATc1 : Nuclear factor of activated T cells 1、TRAP、CtsK) の発現量も増加し、TGF- β により破骨細胞分化が促進されることを確認した。さらにこの時の Mitf-E の発現を調べたところ、TGF- β 添加により増加していることが明らかとなった。また、TGF- β が破骨細胞の面積を増大させていることに着目して、細胞融合に関わる遺伝子である DC-STAMP (Dendritic cell-specific transmembrane protein)、各種インテグリン—Itgav、Itga2、Itga5、Itgb1、Itgb3、Itgb5—の発現を調べた。いずれの遺伝子発現も TGF- β で促進した。特に TGF- β

刺激時の *Itgav* と *Itgb5* の発現増加パターンは *Mitf-E* の増加パターンと一致しており、TGF- β による破骨細胞分化促進時に、*Mitf-E* が *Itgav*、*Itgb5* の発現に関与している可能性が示された。

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

TGF- β は、細胞膜上に存在するセリン/スレオニンキナーゼ型受容体である II 型受容体と I 型受容体 (ALK5) を介しシグナルを細胞内に伝達する。TGF- β が II 型受容体に結合すると、ALK5 がリン酸化され活性し転写因子である Smad2/3 を活性化することにより標的遺伝子を転写する Smad 経路と、Smad を介さず p38MAPK や JNK に作用し標的遺伝子を転写する非 Smad 経路がある。破骨細胞分化で TGF- β が作用する経路には、Smad 経路単独と非 Smad 経路単独、及び Smad 経路と非 Smad 経路の両方が働く報告があるが、破骨細胞分化において TGF- β が標的遺伝子である *Mitf-E* を転写する経路は不明である。そこで、TGF- β による破骨細胞分化促進時の *Mitf-E* 発現促進の分子機序をレポーターアッセイ法により解析した。*Mitf-E* のプロモーター領域を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、それらを TGF- β に応答する HepG2 細胞に導入して、各因子に対するルシフェラーゼの発光量を測定した。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。次に、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、また *c-Jun* のドミナントネガティブ体である TAM67 の発現ベクターを同様に共発現させても *Mitf-E-Luc* は応答しなかったことから、*c-Jun* による転写を介して *Mitf-E* を発現促進することが示された。このことより、TGF- β による破骨細胞分化促進において、TGF- β は Smad 経路ではなく非 Smad 経路である JNK を活性化し、JNK によって活性化された *c-Jun* によって *Mitf-E* の発現を正に制御している可能性が考えられた。

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

動物種により分化に異なる因子が働いている場合はよくある。イヌはよく実験動物として使用されており、また獣医学臨床分野においても骨腫瘍など破骨細胞の関係する骨疾患も多く見られている。しかし、イヌにおける破骨細胞分化の基礎的所見はほとんどない。そこで、まずイヌの骨髄由来初代培養細胞による破骨細胞分化系の確立を試みた。イヌの大腿骨より採取した骨髄細胞から分離した単球層を、M-CSF と RANKL のそれぞれの濃度の組み合わせを検討し、適切な濃度の存在下で培養することにより、破骨細胞を確実に形成する系を確立した。形成された細胞は TRAP 陽性多核巨細胞で機能的にも骨吸収能を有し、mRNA レベルでも TRAP、NFATc1、CtsK、*Itgb3* の破骨細胞分化関連遺伝子も分化に伴い有意に増加しており、破骨細胞であることが確認できた。次に、*Mitf isoform* の mRNA レベルを調べたところ、*Mitf-E* の発現はマウス同様に破骨細胞分化初期に大きく増加していた。また、全体の mRNA もやや増加傾向が見られたが、マウス RAW264.7 細胞では破骨細胞形成時に増加していた *Mitf-A* は、イヌでは大きく減少していた。次に、TGF- β がイヌ破骨細胞分化に与える影響

を調べたところ、マウスの結果（第 2 章）と異なり、破骨細胞分化を抑制した。破骨細胞数が大幅に減少しており、NFATc1、CtsK、TRAP、Itgb3 の mRNA の発現も低下し、形態的にも遺伝子レベルでも破骨細胞分化が抑制していた。さらにこの時、Mitf-E の発現は破骨細胞分化時より有意に低下しており、Mitf-A は破骨細胞分化形成時の発現レベルよりも上昇していた。以上のことから、イヌ骨髄由来初代培養細胞においても Mitf-E が破骨細胞分化に正の相関があることが示唆されたが、マウス RAW264.7 細胞とは異なり TGF- β は破骨細胞形成を抑制するシグナルに作用したことが考えられた。

以上より、本研究でマウスにおける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が示され、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、さらに細胞融合関連遺伝子の発現を促進することが示唆された。TGF- β による Mitf-E 発現促進の機序には、非 Smad 経路の JNK 経路に含まれる c-Jun が関与していることを示した。イヌ骨髄由来初代培養細胞を用いた破骨細胞分化系を確立し、イヌにおける Mitf-E もマウスと同様に破骨細胞分化における重要な転写因子である可能性を示した。しかし、TGF- β の破骨細胞分化に与える影響は、マウスでは促進、イヌでは抑制となり、種間で異なることを明らかにした。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。

論文審査の結果の要旨

破骨細胞は、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る。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) 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 (Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) が破骨細胞前駆細胞を破骨細胞へと分化させる。これらの分子に加え、本研究室で着目している 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働いている。また、破骨細胞分化には多くの転写因子が作用していることが報告されており、本研究では、組織特異的に発現している転写因子で、9つのアイソフォームをもつ Mitf (Microphthalmia-associated transcription factor : 小眼球症関連転写因子) 中の Mitf-E に着目し研究を実施した。

まず、マウスのマクロファージ系株化細胞 RAW264.7 細胞および骨髄由来初代培養細胞を用いて、2本鎖 RNA 干渉法 (dsRNAi 法) による Mitf 遺伝子の発現ノックダウンや Mitf-E 遺伝子を強制発現した安定株を利用して解析し、破骨細胞分化における Mitf-E の重要性を示した (第 1 章)。次に、RAW264.7 細胞での RANKL 誘導性破骨細胞分化系における TGF- β 刺激は破骨細胞分化を促進することを形態及び遺伝子発現レベルで調べた。Mitf-E の遺伝子発現が大きく上昇することを示した (第 2 章)。TGF- β 刺激における Mitf-E の発現促進機序を細胞内シグナル伝達経路から解析した (第 3 章)。

第4章では、基礎的知見がほとんどないイヌの骨髄由来初代培養細胞による破骨細胞分化系を確立し、イヌの破骨細胞分化系における TGF- β と Mitf-E の重要性と役割を検討した。本論文は、4章で構成されており、各章の成績は以下のように要約できる。

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

破骨細胞分化における Mitf-E の発現様態を、RAW264.7 細胞を RANKL により、またマウス骨髄由来初代培養細胞を M-CSF と RANKL により破骨細胞に誘導する系を用いて調べた。Mitf-E は RANKL 添加後、破骨細胞に特異的に発現することが確認され、Mitf-E は RANKL 添加後 1~2 日目で発現が上昇し、その後減少しており、破骨細胞分化の初期段階に働いていることを示した。

次に、dsRNAi 法による Mitf-E 発現ノックダウン実験を行った結果、破骨細胞の形成数、分化マーカー遺伝子である TRAP、CtsK (カテプシン K) の発現量が減少し、破骨細胞分化が抑制された。一方、RAW264.7 細胞で恒常的に Mitf-E を発現する安定株 (4 株) を作製したが、RANKL 添加なしの培養では破骨細胞への分化は確認できなかった。また RANKL 刺激を行なったところ、破骨細胞分化は認められたものの、Mitf-E の発現量との相関性はみられなかった。これらのことから、Mitf-E の発現のみでは破骨細胞へは分化せず、他の因子との協調が必要であることが示唆された。本章では、Mitf-E は破骨細胞分化に必要ではあるが、単独で破骨細胞分化誘導をする十分な因子ではないことを示した。

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

骨髄など様々な細胞に存在し、細胞の増殖や分化に関与しているサイトカインである TGF- β を RAW264.7 細胞の RANKL 誘導性破骨細胞分化系に添加すると、破骨細胞分化が促進されることを形態学的変化、分化マーカー遺伝子発現増加などから確認した。破骨細胞の形成数と面積、骨吸収の面積が増大し、破骨細胞分化マーカー遺伝子 (NFATc1 : Nuclear factor of activated T cells 1、TRAP、CtsK) の発現量も増加し、さらにこの時の Mitf-E の著しい発現増加があることを明らかにした。TGF- β による破骨細胞の面積の増大には、細胞融合に関わる DC-STAMP や各種インテグリン—Itgav、Itga2、Itga5、Itgb1、Itgb3、Itgb5—の遺伝子発現が増加していることを示した。特に TGF- β 刺激による破骨細胞分化促進時に、転写因子 Mitf-E が Itgav と Itgb5 の遺伝子発現促進に関与している可能性を示した。

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

TGF- β は、細胞膜上の受容体に結合したあと、I 型受容体 (ALK5) を活性化し転写因子である Smad2/3 を活性化することにより標的遺伝子を転写する Smad 経路と、Smad を介さず p38MAPK や JNK に作用し標的遺伝子を転写する非 Smad 経路がある。破骨細胞分化において TGF- β が標的遺伝

子である *Mitf-E* を転写する経路を明らかにするため、*TGF-β* による破骨細胞分化促進時の *Mitf-E* 発現促進の分子機序をレポーターアッセイ法により解析した。*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。次に、非 *Smad* 経路の *JNK* により活性化する *c-Jun* の共発現によって *Mitf-E-Luc* が応答することをみつけ、また *c-Jun* のドミナントネガティブ体である *TAM67* の発現ベクターを同様に共発現させても *Mitf-E-Luc* は応答しないことを示した。これらのことより、*TGF-β* による破骨細胞分化促進において、*TGF-β* は *Smad* 経路というよりは非 *Smad* 経路である *JNK* の活性化、続いて活性化された *c-Jun* によって *Mitf-E* の発現を正に制御している可能性を示した。

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

イヌにおける破骨細胞分化の基礎的所見はほとんどなく、イヌの骨髄由来初代培養細胞による破骨細胞分化系の確立を試みた。イヌの大腿骨より採取した骨髄細胞から分離した単球層を、*M-CSF* と *RANKL* のそれぞれの濃度を検討し、適切な濃度の存在下で培養することにより、破骨細胞を確実に形成する系を確立した。形成された細胞は *TRAP* 陽性多核巨細胞で機能的にも骨吸収能を有し、*mRNA* レベルでも *TRAP*、*NFATc1*、*CtsK*、*Itgb3* の破骨細胞分化関連遺伝子も有意に増加しており、破骨細胞であることを確認した。次に、*Mitf isoform* の *mRNA* レベルを調べたところ、*Mitf-E* の発現はマウスと同様に破骨細胞分化初期に大きく増加していた一方で、マウス *RAW264.7* 細胞では破骨細胞形成時に増加していた *Mitf-A* は、イヌでは大きく減少していた。次に、*TGF-β* がイヌ破骨細胞分化に与える影響を調べたところ、マウスの結果（第2章）と異なり、破骨細胞分化を抑制することを見つけた。即ち、*TGF-β* 刺激により破骨細胞数が大幅に減少し、また *NFATc1*、*CtsK*、*TRAP*、*Itgb3* の *mRNA* の発現（破骨細胞分化関連および細胞融合遺伝子）も低下し、形態的にも遺伝子レベルでも破骨細胞分化が抑制していた。さらにこの時、*Mitf-E* の発現は破骨細胞分化時より有意に低下しており、*Mitf-A* は破骨細胞分化形成時の発現レベルよりも上昇していた。これらのことから、イヌ骨髄由来初代培養細胞においても *Mitf-E* が破骨細胞分化に正の相関があることが示唆されたが、マウス *RAW264.7* 細胞とは異なり *TGF-β* は破骨細胞形成を抑制するシグナルに作用していることを明らかにした。

以上、本研究でマウスにおける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が示され、*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、さらに細胞融合関連遺伝子の発現を促進することを各種分子生物学的手法を用いて明らかにした。*TGF-β* による *Mitf-E* 発現促進の機序には、非 *Smad* 経路の *JNK* 経路に含まれる *c-Jun* が関与していることを初めて示した。イヌ骨髄由来初代培養細胞を用いた破骨細胞分化系を確立し、イヌにおいても *Mitf-E* が破骨細胞分化における重要な転写因子である可能性を示す一方で、*TGF-β* の破骨細胞分化に与える影響は、マウスでは促進、イヌでは抑制となり、種間で異なることを明らかにした。本研究で得られた破骨細胞分化における *Mitf-E* と *TGF-β* の作用機序に関する知見は、基礎生物学上及

び獣医学上意義ある業績として高く評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するのに相応しい研究と判定した。