

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18590372  
 研究課題名（和文） 骨髄微小環境での破骨細胞分化因子受容体（RANK）発現制御と破骨細胞分化の解析  
 研究課題名（英文） Analysis of transcriptional regulation of RANK gene and osteoclastic differentiation in bone marrow microenvironment  
 研究代表者  
 北澤 理子（KITAZAWA RIKO）  
 神戸大学・医学研究科・講師  
 研究者番号：00273780

研究成果の概要： マウス破骨細胞分化因子受容体 RANK の遺伝子プロモータ領域をクローニングして発現制御機構を検討した。RANK 遺伝子の転写開始部位より 1kb 以内には、血球分化に重要な PU.1 (-480)、MITF (-100) 結合配列が存在した。ゲルシフトアッセイにて、結合配列の蛋白 DNA 結合を証明し、変異を導入したプロモータを用いた解析にて、PU.1、MITF は、これらの結合配列に作用して、RANK 転写を促進することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,700,000	0	1,700,000
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：破骨細胞、RANK、RANKL、骨芽細胞、遺伝子プロモータ、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は、骨髄単球系細胞が分化して、多核巨細胞の形態になり、骨吸収に特化した細胞である。破骨細胞分化には、骨芽細胞が供給する膜結合型サイトカイン RANKL と、破骨細胞前駆細胞上の受容体 RANK の結合が不可欠である。RANKL-RANK 結合以降の細胞内シグナルや、RANKL 発現制御については、多くの研究成果が報告されてきたが、受容体 RANK の発現制御に関する研究は乏しく、骨粗鬆症や癌の骨転移などの骨溶解病変の治療戦略を検討する上で、受容体 RANK の発現制御は重要である。

## 2. 研究の目的

(1) マウス骨髄系細胞から前破骨細胞段階までの RANK 発現の解析

primary culture した骨髄細胞、マウス骨髄白血病細胞株 M1、前破骨細胞培養株 RAW264.7 細胞における RANK 発現と M-CSF 等サイトカインの効果を解析する。

(2) マウス RANK 遺伝子プロモータのクローニングと、主要な転写因子結合配列の解析

RANK 遺伝子プロモータ領域に存在する PU.1 結合候補配列、3 カ所の MITF 結合候補配列の機能を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) マウス骨髄系細胞から前破骨細胞段階までの RANK 発現の解析

マウス大腿骨より primary culture した骨髄細胞、マウス骨髄白血病細胞株 M1、前破骨細胞培養株 RAW264.7 細胞より RNA を抽出して、RT-PCR にて RANK mRNA 発現を比較検討した。これらの培養系に M-CSF、RANKL、TGF- $\beta$  などを添加して、RANK 発現に及ぼす効果を RT-PCR で解析した。

(2) マウス RANK 遺伝子プロモータのクロニングと、主要な転写因子結合配列の解析

転写開始部位より 1kb 以内には、血球分化に重要な転写因子である PU.1 および MITF の結合配列が存在する。PU.1 は 1カ所(-480)、MITF は 3カ所の候補配列について、ゲルシフトアッセイを行うとともに、これらの部位に変異を導入したプロモータコンストラクトを作成して、wild type と転写活性を比較検討した。

PU.1 および MITF の発現ベクターの効果、各々の siRNA による遺伝子ノックダウンの効果を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 骨髄細胞培養条件では、M-CSF 処理により、RANK mRNA 発現が促進した。このことは、RANKL が作用する前段階の破骨細胞前駆細胞を誘導に合致した結果であった。

(2) RAW264.7 細胞を用いた検討により、PU.1 および MITF の強制発現は、RANK mRNA 発現を増加させ、RANK プロモータの転写活性も促進した。それぞれの siRNA は、RANK 発現を抑制した。これらの結果から、PU.1 および MITF は RANK 発現を促進することが示唆された。

ゲルシフトアッセイにて、PU.1 結合配列(-480)、3カ所のうち最下流の MITF(-100)結合配列における、蛋白・DNA 結合を明らかにした。これらの部位に変異を導入したプロモータコンストラクトでは、PU.1 および MITF の強制発現ベクターの転写促進効果が相殺されることから、プロモータ上の結合配列を介して、PU.1 と MITF が RANK 転写を促進することを明らかにした。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

1. Kitazawa R, Mori K, Yamaguchi A, Kondo T, Kitazawa S. Modulation of mouse RANKL gene expression by Runx2 and vitamin D3

pathway. J Cell Biochem 105, 1289-1297, 2008. 査読有

2. Ishii J, Kitazawa R, Mori K, McHugh KP, Kondo T, Kitazawa S. Lipopolysaccharide suppresses RANK gene expression by macrophage through the down-regulation of PU.1 and MITF. J Cell Biochem 105, 896-904. 2008.

査読有

3. Kondo T, Kitazawa R, Yamaguchi A, Kitazawa S. Dexamethasone promotes osteoclastogenesis by inhibiting osteoprotegerin through multiple levels. J Cell Biochem 103, 335-345, 2008. 査読有

4. Takahashi M, Takahashi Y, Takahashi K, Zolotaryov FN, Hong KS, Kitazawa R, Iida K, Okimura Y, Kaji H, Kitazawa S, Kasuga M, Chihara K. Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. FEBS Lett, 582, 573-578, 2008. 査読有

5. Takahashi Y, Iida K, Takeno R, Kitazawa R, Kitazawa S, Kitamura H, Fujioka Y, Yamada H, Kanda F, Ohta S, Nishimura K, Fujimoto M, Kondo T, Igucgi G, Takahashi K, Kaji H, Okimura Y, Chihara K. Hepatic failure and enhanced oxidative stress in mitochondrial diabetes. Endocr J 55, 509-514, 2008. 査読有

6. Higo S, Miyata S, Jiang QY, Kitazawa R, Kitazawa S, Kasuga M. Taurin administration after appearance of proteinuria retards progression of diabetic nephropathy in rats. Kobe J Med Sci 54, 35-45, 2008. 査読有

7. Niemhom S, Kitazawa S, Kitazawa R, Maeda S, Leopairat J. Hypermethylation of epithelial-cadherin gene promoter is associated with Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Detect Prev 32, 127-134, 2008. 査読有

8. Fuse M, Yokoi N, Shinohara M, Masuyama T, Kitazawa R, Kitazawa S, Seino S. Identification of a major locus for islet inflammation and fibrosis in the Spontaneously Diabetic Torii rat. Physiological Genomics 35, 96-105, 2008. 査読有

9. Nishino N, Tamori Y, Tateya S, Kawaguchi T, Shibakusa T, Mizunoya W, Inoue K, Kitazawa R, Kitazawa S, Matsuki Y, Hiramatsu R, Masubuchi S, Omachi A, Kimura K, Saito M, Amo T, Ohta S, Yamaguchi T, Osumi T, Cheng J, Fujimoto T, Nakao H, Nakao K, Aiba A, Okamura H, Fushiki T, Kasuga M. FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J Clin Invest* 118, 2808-2821, 2008.

査読有

10. Darwanto A, Kitazawa R, Mori K, Kondo T, Kitazawa S. MeCP2 expression and promoter methylation of cyclin D1 gene are associated with cyclin D1 expression in developing rat epididymal duct. *Acta Histochem Cytochem* 41, 135-142, 2008.

査読有

11. 北澤 荘平, 近藤 武史, 森清, 松田 修一, 北澤 理子. エピジェネティクスと病理. *臨床検査* 52, 665-661, 2008.

査読有

12. 北澤 理子. 話題: メタボリック症候群. *病理と臨床* 26, 518-519, 2008.

査読有

13. Kitazawa R, Kitazawa S. Methylation status of a single CpG locus 3 bases upstream of TATA-box of RANKL gene promoter modulates cell- and tissue-specific RANKL expression and osteoclastogenesis. *Mol Endocrinol* 21, 148-158, 2007.

査読有

14. Takahashi Y, Iida K, Takahashi K, Yoshioka S, Fukuoka H, Takeno R, Imamura M, Nishizawa H, Takahashi M, Seo Y, Hayashi Y, Kondoh T, Okimura Y, Kaji H, Kitazawa R, Kitazawa S, Chihara K. Growth hormone reverses nonalcoholic steatohepatitis in a patient with adult growth hormone deficiency. *Gastroenterology* 132, 938-943, 2007.

査読有

15. Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Fujii H, Kasuga M, Fukagawa M. Histomorphometric analysis of Diabetic Osteopenia in Streptozotocin-induced Diabetic Mice: a Possible Role of Oxidative Stress. *Bone* 40, 1408-1414, 2007.

査読有

16. Hamada Y, Miyata S, Nii-Kono T, Kitazawa R, Kitazawa S, Higo S, Fukunaga

M, Ueyama S, Nakamura H, Yodoi J, Fukagawa M, Kasuga M. Overexpression of thioredoxin 1 in transgenic mice suppresses development of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 22, 1547-1557, 2007.

査読有

17. Kishimoto K, Kitazawa R, Kurosaka M, Maeda S, Kitazawa S. Expression profiles of genes related to osteoclastogenesis in mouse growth plate and articular cartilage. *Histochem Cell Biol* 8, 1-10, 2006.

査読有

18. Kitazawa S, Kitazawa R. In situ detection of specific gene expression during and immediately after transcription at electron microscopic level. *J Structural Biol* 153, 64-72, 2006.

査読有

19. Mori K, Kitazawa R, Kondo T, Yamaguchi A, Maeda S, Kitazawa S. Modulation of mouse RANKL gene expression by Runx2 and PKA pathway. *J Cell Biochem* 98, 1629-1644, 2006.

査読有

20. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116, 1494-1505, 2006.

査読有

21. Naito J, Kaji H, Sowa H, Kitazawa R, Kitazawa S, Tsukada T, Hendy GN, Sugimoto T, Chihara K. Expression and functional analysis of menin in a multiple endocrine neoplasia type I (MEN1) patient with somatic loss of heterozygosity in chromosome 11q13 and unidentified germline mutation of the MEN1 gene. *Endocrine* 29, 485-490, 2006.

査読有

22. Kitazawa S, Takenaka A, Kondo T, Mizoguchi A, Kitazawa R. Protruding disordered loop of gClqR is specifically exposed and related to antiapoptotic property in germ cell lineage. *Histochem Cell Biol* 126, 449-452, 2006.

査読有

23. 北澤 荘平, 北澤 理子, 森清, 近藤 武史. 骨吸収、骨形成の相互作用 5. RANKL、OPGの転

写制御. THE BONE 20, 321-326, 2006.  
査読有

〔学会発表〕(計 43 件)

1. Kitazawa R, Ishii J, Kondo T, Mori K, K. P. McHugh, Kitazawa S. Lipopolysaccharide Suppresses RANK Gene Thought the Down-Regulation of PU.1 and MITF. ASBMR 30th Annual Meeting. 2008. 9. 12-16 (Motreal, Canada)

2. Kitazawa S, S. Sanda Khin, Mori K, Kondo T, Kitazawa R. BAMB1 Gene Is Epigenetically Silenced in a Subset of High-grade Bladder Cancer. ASBMR 30th Annual Meeting. 2008. 9. 12-16 (Motreal, Canada)

3. 北澤理子、石井淳子、森清、近藤武史、北澤荘平. Lipopolysaccharide (LPS)は転写因子PU.1、MITF抑制を介してRANKはつげんを抑制する. 第 26 回日本骨代謝学会総会. 2008. 10. 29-31(大阪)

4. 北澤理子、近藤武史、森清、石井淳子、北澤荘平. 破骨細胞分化の制御機構. 第 97 回日本病理学会総会. 2008. 5. 15-17(金沢)

5. 近藤武史、北澤理子、森清、北澤荘平. マウスBAMB1遺伝子発現調節機構の解析. 第 97 回日本病理学会総会. 2008. 5. 15-17(金沢)

6. 森清、北澤理子、近藤武史、濱田康弘、北澤荘平. 急性期酸化的ストレスを介する骨吸収亢進メカニズムとマウスsFRP-4 遺伝子発現再活性化機構の解析. 第 97 回日本病理学会総会. 2008. 5. 15-17(金沢)

7. Khin Sann Sanda、北澤理子、Aye Than Than、Win Ne、近藤武史、森清、北澤荘平. Epigenetical alteration of BAMB1 gene during bladder cancer progression. 第 97 回日本病理学会総会. 2008. 5. 15-17(金沢)

8. 石井淳子、北澤理子、近藤武史、森清、北澤荘平. マウスRANK 遺伝子プロモーターの解析. 第 97 回日本病理学会総会. 2008. 5. 15-17(金沢)

9. 北澤荘平、北澤理子、森清、近藤武史. 新生mRNAの動態解析 (シンポジウム 2). 第 113 回日本解剖学会. 2008. 3. 27-29 (大分)

10. 北澤理子. 破骨細胞分化を制御する分子機構の解析. 第 53 回日本病理学会秋期特別総会. 2007. 12. 6-7(東京)

11. 濱田康弘、藤井秀毅、北澤理子、北澤荘平、深川雅史. 多様化する骨粗鬆症研究 糖尿病性骨減少症における酸化ストレスの関与 チオレドキシン1トランスジェニックマウスを用いた検討. 第 9 回日本骨粗鬆症学会. 2007. 11. 14-16 (東京)

12. サン サンダキン、北澤理子、近藤武史、森清、タイタンエイ、ネウイン、北澤荘平. 日本とミャンマーにおける膀胱腫瘍進展過程におけるBAMB1遺伝子のエピジェネティクス制御の変化. 第 66 回日本癌学会学術総会. 2007. 10. 3-5 (横浜)

13. 森清、北澤理子、近藤武史、濱田康弘、北澤荘平. 短期間酸化的ストレスによる骨代謝関連遺伝子発現の網羅的解析. 第 66 回日本癌学会学術総会. 2007. 10. 3-5 (横浜)

14. 近藤武史、北澤理子、森清、北澤荘平. マウスBAMB1遺伝子発現調節機構. 第 66 回日本癌学会学術総会. 2007. 10. 3-5 (横浜)

15. Kitazawa R, Mori K, Kondo T, Kitazawa S. Modulation of Mouse RANKL Gene Expression by Runx2 and Vitamin D3. ASBMR 29th Annual Meeting. 2007. 9. 16-19(Honolulu, Hawaii, USA)

16. Ishii J, Kitazawa R, Kondo T, Mori K, McHugh K. P., Kitazawa S. Molecular Cloning and Characterization of Mouse RANK Gene Promoter Region. ASBMR 29th Annual Meeting. 2007. 9. 16-19(Honolulu, Hawaii, USA)

17. Kondo T, Kitazawa R, Mori K, Kitazawa S. Regulation of Mouse BAMB1 Gene Expression. ASBMR 29th Annual Meeting. 2007. 9. 16-19(Honolulu, Hawaii, USA)

18. Mori K, Kitazawa R, Kondo T, Hamada Y, Kitazawa S. Comprehensive Analysis of Bone-related Genes Expression Induced by Acute Oxidative Stress. ASBMR 29th Annual Meeting. 2007. 9. 16-19(Honolulu, Hawaii, USA)

19. Hamada Y, Fujii H, Kitazawa R, Kitazawa S, Fukagawa M. Thioredoxin-1 Overexpression Attenuates Streptozotocin-induced Diabetic Osteopenia in Mice: A Novel Role of Oxidative Stress and Therapeutic Implications. ASBMR 29th Annual Meeting. 2007. 9. 16-19(Honolulu, Hawaii, USA)

20. 北澤理子, 森清、近藤武史、北澤莊平. Runx2 と vitamin D3 による破骨細胞分化因子(RANKL)発現制御. 第25回日本骨代謝学会学術集会. 2007. 7. 19-21(大阪)
21. 石井淳子、北澤理子、近藤武史、森清、北澤莊平. マウス RANK 遺伝子プロモーター領域の解析. 第25回日本骨代謝学会学術集会. 2007. 7. 19-21(大阪)
22. 近藤武史、北澤理子、森清、北澤莊平. マウス BAMB1 遺伝子発現調節機構の解析. 第25回日本骨代謝学会学術集会. 2007. 7. 19-21(大阪)
23. 濱田康弘、藤井秀毅、北澤理子、北澤莊平、深川雅史. 抗酸化物質チオレドキシン1の糖尿病性骨減少に及ぼす影響: チオレドキシン1トランスジェニックマウスを用いた検討. 第25回日本骨代謝学会学術集会. 2007. 7. 19-21(大阪)
24. 森清、北澤理子、近藤武史、濱田康弘、北澤莊平. 急性期酸化的ストレスによる骨代謝関連遺伝子発現の網羅的解析. 第25回日本骨代謝学会学術集会. 2007. 7. 19-21(大阪)
25. 高橋路子、高橋裕、高橋健一、ZolotaryovFyodor N、洪卿秀、飯田啓二、高橋健太郎、竹野亮子、福岡秀規、今中真理、西澤衡、加治秀介、置村康彦、清成寛、大島尚子、相澤慎一、北澤理子、北澤莊平、千原和夫. 新規ケモカイン、メタボカイン1はインスリン感受性と脂質代謝を調節する. 第80回日本内分泌学会学術総会(東京) 2007. 6. 15
26. 石井淳子、北澤理子、近藤武史、北澤莊平. マウス RANK 遺伝子プロモーターの解析. 第96回日本病理学会総会. 2007. 3. 13-15(大阪)
27. 北澤理子、森清、近藤武史、北澤莊平. TATA-box近傍の CpGメチル化による破骨細胞分化因子(RANKL)転写抑制機構. 第96回日本病理学会総会. 2007. 3. 13-15(大阪)
28. 近藤武史、北澤理子、北澤莊平. マウス BAMB1 遺伝子発現調節機構の解析. 第96回日本病理学会総会. 2007. 3. 13-15(大阪)
29. 森清、北澤理子、近藤武史、濱田康弘、北澤莊平. 急性期酸化的ストレス下における骨代謝関連遺伝子発現の網羅的解析. 第96回日本病理学会総会. 2007. 3. 13-15(大阪)
30. 北澤莊平、福西秀信、舟木馨、北澤理子. 子宮平滑筋腫における集束超音波治療(FUS)抵抗性の機序. 第96回日本病理学会総会. 2007. 3. 13-15(大阪)
31. 藤本昌代、北澤理子、近藤武史、森清、北澤莊平. SOD-1 遺伝子異常の証明された家族性筋萎縮性側索硬化症の一例. 第96回日本病理学会総会. 2007. 3. 13-15(大阪)
32. Sann Sanda Khin, 北澤理子、近藤武史、森清、北澤莊平. 日本、ミャンマー両国の膀胱腫瘍発生に関するエピジェネティクス解析. 第96回日本病理学会総会. 2007. 3. 13-15(大阪)
33. 出射由香、松本省司、釜田里江、大西一男、北澤理子、北澤莊平. 肺癌剖検症例における肺内アスベスト小体濃度についての検討. 第96回日本病理学会総会. 2007. 3. 13-15(大阪)
34. 兵頭香織、北澤理子、近藤武史、森清、北澤莊平. 悪性中皮腫剖検例の免疫組織化学による再検討. 第96回日本病理学会総会. 2007. 3. 13-15(大阪)
35. Kondo T, Kitazawa R, Kitazawa S. Regulation of Mouse BAMB1 Gene Expression. IOF + ANZBMS Combined Meeting. 2006. 10. 22-26 (Mirage, Australia)
36. Kitazawa R, Mori K, Kondo T, Kitazawa S. Regulation of Osteoclastogenesis by CpG Methylation of Mouse Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand(RANKL)Gene Promoter Region. ASBMR 28th Annual Meeting. 2006. 9. 15-19 (Philadelphia, Pennsylvania, USA)
37. Kondo T, Kitazawa R, Kitazawa S. Regulation of Mouse BAMB1 Gene Expression. ASBMR 28th Annual Meeting. 2006. 9. 15-19 (Philadelphia, Pennsylvania, USA)
38. Mori K, Kitazawa R, Kondo T, Yamaguchi A, Kitazawa S. Modulation of Mouse RANKL Gene Expression by Runx2 and the PKA Pathway. ASBMR 28th Annual Meeting. 2006. 9. 15-19 (Philadelphia, Pennsylvania, USA)
39. Kitazawa S, Kitazawa R, Fujimoto M, Mori K, Sann Sanda Khin, Ishii J, Kondo T. In Situ of Specific Gene Expression During and Immediately After Transcription at Electron Microscopic Level. The 16th International Microscopy Congress

2006.9.3-8 (Sapporo)

40. 北澤理子, 森清、近藤武史、北澤荘平.  
TATA-box 近傍の CpG メチル化による破骨細胞  
分化因子(RANKL)転写抑制機構. 第24回日本  
骨代謝学会学術集会. 2006.7.6-8 (東京)

41. 近藤武史、北澤理子、北澤荘平. マウス  
BAMBI 遺伝子発現調節機構の解析. 第24回日  
本骨代謝学会学術集会. 2006.7.6-8 (東京)

42. 濱田康弘, 河野(新居)智子, 北澤理子,  
北澤荘平, 深川雅史. ストレプトゾトシン誘  
発糖尿病マウスにおける骨病変は酸化スト  
レス亢進を伴った低回転骨である. 第24回  
日本骨代謝学会学術集会. 2006.7.6-8 (東  
京)

43. Kondo T, Kitazawa R, Kitazawa S.  
Regulation of Mouse Osteoprotegerin Gene  
Expression by Glucocorticoids. 1st  
International Conference on  
Osteoimmunology: Interactions of the  
Immune and Skeletal Systems.  
2006.5.28-6.2 (Crete, Greece)

[図書] (計1件)

1. (Editor; Kobayashi TB). Kitazawa S,  
Mori K, Kondo T, Fujimoto M, Kitazawa R,  
DNA Methylation Research Trends,  
Epigenetic roles of CpG methylation at  
non-CpG-islands revealed by  
morphology-oriented epigenetic research  
pp43-pp66, Nova Science Publishers, New  
York, 2007 276 頁

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北澤 理子 (KITAZAWA RIKO)  
神戸大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 00273780

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし