

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09118

研究課題名(和文)破骨細胞分化における転写因子Nfatc1アイソフォームの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the transcription factor Nfatc1 isoform in osteoclast differentiation

研究代表者

佐藤 浩二郎 (Sato, Kojiro)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：10372434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞分化の過程で転写因子Nfatc1の発現が著明に増加することが知られている。破骨細胞において発現しているNfatc1 isoformは少なくとも3種類あり、増加するのはその内最も短いisoformである。我々はCRISPR/Cas9のシステムを用いて、この短いisoformに特異的なノックアウトマウスを作成した。このマウスは胎性致死であり、胎子の造血幹細胞より破骨細胞を分化させた場合に野生型と異なりTRAP染色陽性多核細胞は分化しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この解析から、Nfatc1のbasalの発現だけではマウスは胎性致死に陥ることが判明した。肝臓における造血が不十分であることが一因であると思われる。また、より原始的な造血幹細胞から、単球系細胞は分化するものの破骨細胞は分化しないことから、Nfatc1のshort isoformの発現誘導が破骨細胞分化に必須であることが示された。今後このisoformの転写標的を同定する必要がある。本研究は破骨細胞や造血幹細胞の制御において有用な知見をもたらしつつある。

研究成果の概要(英文)：It is known that the expression level of a transcription factor Nfatc1 increases drastically in the process of osteoclast differentiation. At least three isoforms are expressed in osteoclasts, among which the shortest isoform increases in osteoclastogenesis. We have made this short isoform-specific knockout (KO) mice using CRISPR/Cas9 system. Homo KO mice are embryonic lethal, and TRAP-positive multi-nucleated cells do not differentiate from hematopoietic stem cells derived from KO fetuses, in contrast to those cells from wild type fetuses.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は原因不明の炎症性多発関節炎であり、発症には自己免疫の関与が想定されている。炎症の主座は関節滑膜にあり、炎症が持続する結果として骨の破壊と関節の変形がもたらされる。骨の破壊において、破骨細胞と呼ばれる単球/マクロファージ系の多核細胞が重要な役割を果たすと考えられている。骨基質を吸収する破骨細胞と骨を形成する骨芽細胞の機能は通常バランスを保っており、正常な骨格系を保つが、破骨細胞の機能が亢進する場合に RA における骨破壊や、骨粗鬆症に見られる骨密度の低下を引き起こす。従って、破骨細胞の分化や機能の亢進のメカニズムを理解することは医学的に重要な課題である。1998年に破骨細胞分化因子としてのサイトカイン RANKL が同定された後、破骨細胞研究は飛躍的に進歩した。in vitro で破骨細胞を分化させることが可能となり、破骨細胞分化のマスターレギュレーター転写因子として nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 1(Nfatc1)が同定された(Takayanagi et al., Dev. Cell 2002)。破骨細胞分化の過程で NFATc1 の発現量は mRNA、タンパクレベルのいずれにおいても著増する。また Nfatc1 の欠損マウスは胎生致死であるがキメラマウスを用いた検討により Nfatc1 欠損細胞は破骨細胞に分化できないことが in vitro, in vivo で証明された(Asagiri et al., J Exp Med. 2005)。Nfatc1 には5種類のアイソフォームが存在することが報告されている。破骨細胞分化の過程で発現が確認できるアイソフォームは3種類であり、更に発現が著増するアイソフォームは1つのみ(以後 short form と呼称)である(図1)。この著増のメカニズムとしては、Serfling らのグループにより、Nfatc1 自体が Nfatc1 の転写を促進するポジティブフィードバックメカニズムが提唱されている(Chuvpilo et al., Immunity 2002)。この報告においては short form が T 細胞のアポトーシスの阻害に働くことが報告されたが、具体的な転写標的は明らかになっていない。同様の自己制御機構は赤血球分化の際の転写因子 GATA-1 でも提唱されており、細胞の分化において重要なメカニズムと考えられる。しかし(1) Nfatc1 short form に本当に他のアイソフォームと異なる転写標的があるかどうかは分かっていない。また(2) ポジティブフィードバックのみでは細胞の生存自体の維持が困難となるため、Nfatc1 の発現量の上限を規定するネガティブフィードバックの仕組みも重要であると想定されるが、その本態は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の主たる目的は前述の未解決な点に対して Nfatc1 short form 特異的ノックアウトマウスを作成することにより破骨細胞分化における同分子特異的転写標的を明らかにすることである。Nfatc1 の short form は利用するプロモーターが他のアイソフォームと異なっており、全く異なる発現制御を受けている。更に、short form は他のアイソフォームと N 末端側のアミノ酸配列が異なるため、リン酸化などの修飾についても違いが出てくることが予想される。このため、アイソフォームというよりも別個の分子と考えた方がよいのかもしれない。

## 3. 研究の方法

### (1) Nfatc1 short isoform 特異的欠損マウスの作成

近年実用化された遺伝子編集技術(CRISPR/Cas9)を用いることにより、従来よりも期間を短縮して遺伝子改変マウスを作出することが可能となっている。

まず Web 上のツール Optimized CRISPR design tool などを利用して guide RNA の候補を選択する。その配列に基づいてベクター(Addgene 社の pX330 を利用)を構築し、マウス受精卵前核に顕微注入する(この過程は外部機関に依頼する予定としている)。このようにして得られた仔マウスの遺伝子をダイレクトシーケンシングし、Nfatc1 遺伝子改変の有無を確認する。変異の波形が十分に高い個体(すなわちキメラ率が高いと考えられる個体)を選んで F1 作製に供する。

### (2) KO マウス破骨細胞の in vitro 解析

ヘテロ変異マウスの交配によりホモ変異マウスを得る。in vitro での骨髄細胞由来の破骨細胞分化を評価する。定量 RT-PCR および Western blotting により short form が実際にノックアウトされていることを確認する。

## 4. 研究成果

ホモ変異マウスは胎性致死であることが判明した。肝臓における血球系細胞が著減していることがその一因と考えられた。実際、ホモ変異を持つ胎仔肝臓からは単球系細胞を in vitro で誘導することができなかった。一方野生型の胎仔肝臓からは単球系細胞のみならず破骨細胞を誘導することも可能であった。より原始的な卵黄嚢・aortagonadomesonephros (AGM) 領域由来の造血幹細胞は単球系の細胞に分化することができたが、やはり破骨細胞には分化しなかった。この

ことから Nfatc1 の short isoform の発現誘導が破骨細胞分化に必須であることが示された。それと同時に、同 isoform の発現が二次造血においても重要な役割を果たすことが示唆された。今後は同 isoform の転写標的を同定することを考えている。具体的にはホモ変異および野生型の胎仔のトランスクリプトーム解析、あるいは野生型マウス骨髄細胞より破骨細胞を分化させる過程で short isoform 特異的な siRNA を用いて同 isoform をノックダウンし、コントロールの細胞とのトランスクリプトーム解析による比較を行う。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Kojiro, Yazawa Hiroaki, Ikuma Daisuke, Maruyama Takashi, Kajiyama Hiroshi, Mimura Toshihide	4. 巻 7
2. 論文標題 Osteomyelitis due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus successfully treated by an oral combination of minocycline and trimethoprim/sulfamethoxazole	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SAGE Open Medical Case Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2050313X19841465	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shima N, Nakamura J, Saito K, Kamata Y, Nagatani K, Nagashima T, Iwamoto M, Akine D, Saito T, Sato K, Minota S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Salmonella enterica Subspecies arizonae Detected from Bilateral Pleural Fluid in a Patient with Systemic Lupus Erythematosus and Malignant Lymphoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.3982-19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato Kojiro, Aizaki Yoshimi, Yoshida Yoshihiro, Mimura Toshihide	4. 巻 4
2. 論文標題 Treatment of psoriatic arthritis complicated by systemic lupus erythematosus with the IL-17 blocker secukinumab and an analysis of the serum cytokine profile	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology Case Reports	6. 最初と最後の頁 181 ~ 185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/24725625.2020.1717741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 佐藤 浩二郎	4. 巻 63
2. 論文標題 翻訳後蛋白修飾と自己抗体 関節リウマチにおける自己抗体3者陽性の意義とは	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 リウマチ科	6. 最初と最後の頁 120, 123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐藤 浩二郎	4. 巻 36
2. 論文標題 関節リウマチ発症の要因 遺伝的要因と環境要因	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Practice	6. 最初と最後の頁 1041, 1044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murosaki Takamasa, Sato Takeo, Nagatani Katsuya, Sato Kojiro, Minota Seiji	4. 巻 23
2. 論文標題 Risk factors correlated with immunosuppressant discontinuation in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1587 ~ 1593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.13980	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokota Kazuhiro, Sato Kojiro, Miyazaki Takashi, Aizaki Yoshimi, Tanaka Shinya, Sekikawa Miyoko, Kozu Noritsune, Kadono Yuho, Oda Hiromi, Mimura Toshihide	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization and Function of Tumor Necrosis Factor and Interleukin 6?Induced Osteoclasts in Rheumatoid Arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aizaki Yoshimi, Yazawa Hiroaki, Sato Kojiro, Mimura Toshihide	4. 巻 -
2. 論文標題 Dual effects of interleukin 10 on natural killer cells and monocytes and the implications for adult-onset Still 's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sato Kojiro
2. 発表標題 Osteoclast differentiation in inflammatory conditions
3. 学会等名 日本免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato Kojiro
2. 発表標題 In the Presence of IL-18, IL-10 but Not IL-6 Induces IFN- Production and the Surface Expression of TRAIL on NK Cells
3. 学会等名 2018 ACR/ARHP Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢澤宏晃、柳澤麻依子、相崎良実、佐藤浩二郎、三村俊英
2. 発表標題 マウス骨芽細胞が高濃度OPGを産生し、可溶性RANKLによる破骨細胞分化を抑制する
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤村 昭夫 編集 佐藤 浩二郎 他著	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 360
3. 書名 類似薬の使い分け第3版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

自治医科大学 アレルギー膠原病学部門  
<https://www.jichi.ac.jp/allergy/about/staff/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------