

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791411

研究課題名(和文)

破骨細胞分化における抑制性シグナル因子の機能解析

研究課題名(英文)

Role of inhibitory signal factors in osteoclastogenesis

研究代表者

日方 智宏 (HIKATA TOMOHIRO)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：20348684

研究成果の概要(和文)：

破骨細胞は骨吸収を担う生体唯一の細胞であり、その分化や機能不全は骨恒常性破綻に直結することからその制御は重要である。破骨細胞分化は分化を促進する因子と抑制する因子との絶妙なバランスの上に規定されているが、その制御機構については未だ不明なことが多い。本研究では、シグナル分子である PIAS1 が破骨細胞分化において抑制的な機能を有することを見出した。

研究成果の概要(英文)：

Osteoclasts are unique bone-resorbing cells, and that loss of osteoclast differentiation or function results in defect of bone homeostasis. Thus regulation of osteoclastogenesis is crucial to maintain bone homeostasis. Osteoclast differentiation is regulated in a delicate balance between positive and negative regulators, however, the precise mechanism is still unclear. In this study, we characterized the inhibitory roles of PIAS1 in osteoclast differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

骨代謝における基礎研究は、近年、著しく発展してきているものの、依然として、整形外科領域における閉経後骨粗鬆症や炎症性骨破壊(関節リウマチ、転移性骨腫瘍、自己免疫性関節炎など)に対する治療は、確立されておらず、現在、発展途上の段階にあり、十分な成果を上げているとは言い難い。PIAS(Protein inhibitor of activated STAT)は STAT の活性を負に背御する分子として同定された分子であるが、その破骨細胞や骨代謝への作用については不明である。

2. 研究の目的

PIAS 分子の破骨細胞分化・活性に及ぼす影響、機能を明らかとし、骨粗鬆症や炎症性骨破壊(関節リウマチ、転移性骨腫瘍、自己免疫性関節炎など)に対する新規治療法の確立の一助になることを目的とする。PIAS 分子は、インターフェロンや TNF α などのサイトカインシグナルを抑制する因子として機能すると同時に、E3-SUMO(small ubiquitin-like modifier)ライゲースとして基質たんぱく質を SUMO 化することでタンパク質翻訳後修飾を担うことも知られている。その他にも、様々な転写因子と相互作用して、転写共役因

子として機能したり、局在変化を起こしたりする。その機能は複雑で、骨代謝領域における解析は皆無に等しい。我々は、特に破骨細胞に着目し、PIAS 分子の機能を解析することとした。

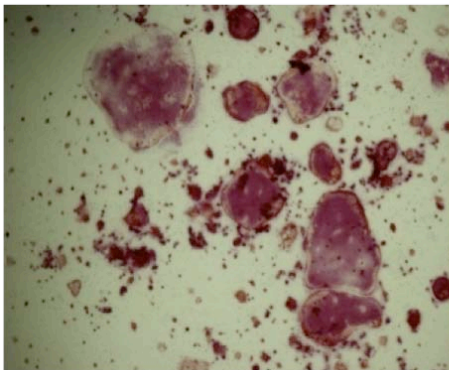
3. 研究の方法

PIAS1 のロス・オブ・ファンクション実験のために siRNA を用いた遺伝子ノックダウン実験を、またゲイン・オブ・ファンクション実験では発現ベクターによる遺伝子導入実験を行う。マウス骨髄より M-CSF (macrophage colony stimulating factor) にて誘導した破骨細胞前駆細胞である BMFs (bone marrow macrophages) に siRNA あるいは発現ベクターを導入し、RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) と M-CSF にて破骨細胞の分化を誘導する。破骨細胞分化は TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) 染色と NFATc1 (nuclear factor of activated T cells 1) などの破骨細胞特異的な分子の発現をリアルタイム PCR にて解析する。

4. 研究成果

破骨細胞分化において RANKL 刺激により PIAS1 の発現が誘導されることはリアルタイム PCR にて確認した。siRNA-PIAS1 の導入による PIAS1 の発現抑制、ならびに PIAS1 発現

control



siRNA-PIAS1

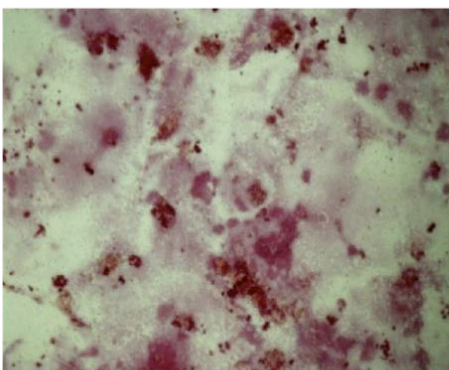


図1 PIAS1ノックダウンによる破骨細胞形成促進ベクター導入による発現誘導についても同

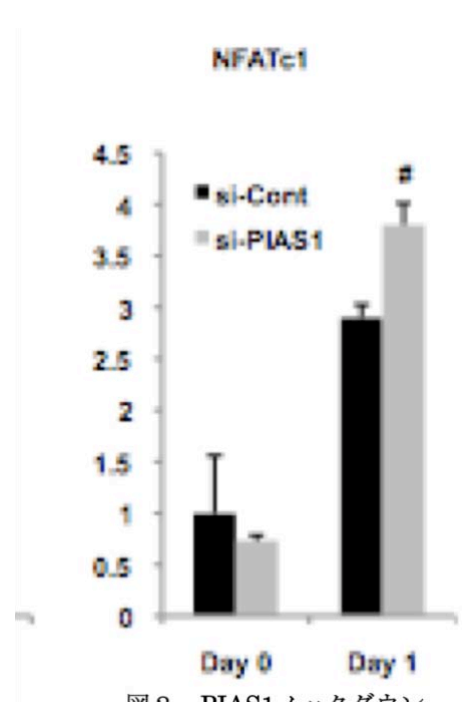
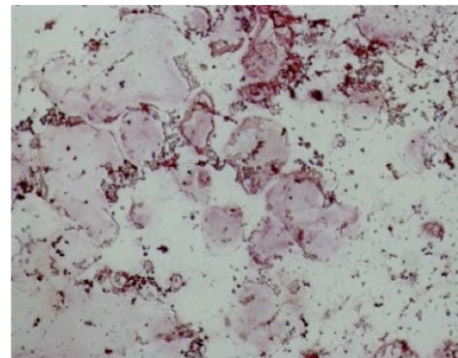


図2 PIAS1ノックダウンによるNFATc1の発現上昇

様にリアルタイム PCR に確認することが出来た。

まず、siRNA による PIAS1 のロス・オブ・ファンクション実験では、破骨細胞の分化亢進を認めた (図 1)。TRAP 陽性の多核細胞の出現数がコントロール siRNA 導入群に比べて有意に亢進し、NFATc1 などの破骨細胞特異的

mock



PIAS1

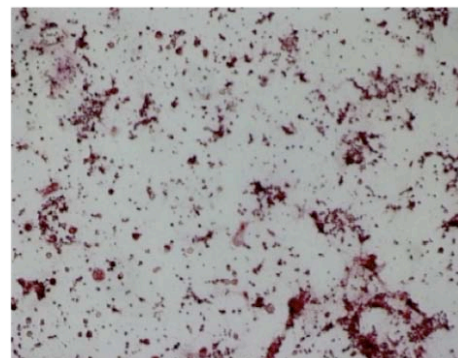


図3 PIAS1過剰発現による破骨細胞形成抑制

分子群の発現も有意に高かった (図2)。以上の結果から、PIAS1 は破骨細胞分化に対し抑制的な機能を有することが示唆された。

そこで、逆に発現ベクターの導入によるゲイン・オブ・ファンクション実験を行うこととした。予想通り、PIAS1 を過剰に発現させた BMMs では、破骨細胞の分化が有意に抑制されていた (図3)。TRAP 陽性の多核細胞の出現数がコントロールベクター導入群に比べて有意に抑制され、NFATc1 などの破骨細胞特異的分子群の発現も有意に低かった (図4)。以上の結果から、PIAS1 は破骨細胞分化に対し抑制的な機能を有することが確認された。

また、他の PIAS ファミリー分子が破骨細胞に発現していないかを検証したところ、PIAS3 が発現していることを見出した。そこで、PIAS1 と同様に siRNA-PIAS3 を導入して PIAS3 をノックダウンし、破骨細胞分化能について解析を行った。siRNA-PIAS3 を導入した際に PIAS3 の発現が抑制されることは確認した。興味深いことに、PIAS3 のノックダウンによっても破骨細胞形成の著しい増強を認めた (図5)。このことは PIAS1 と PIAS3 がともに破骨細胞に発現し、互いに協調的あるいは相補的に破骨細胞分化に対してネガティブに機能していることが示唆された。

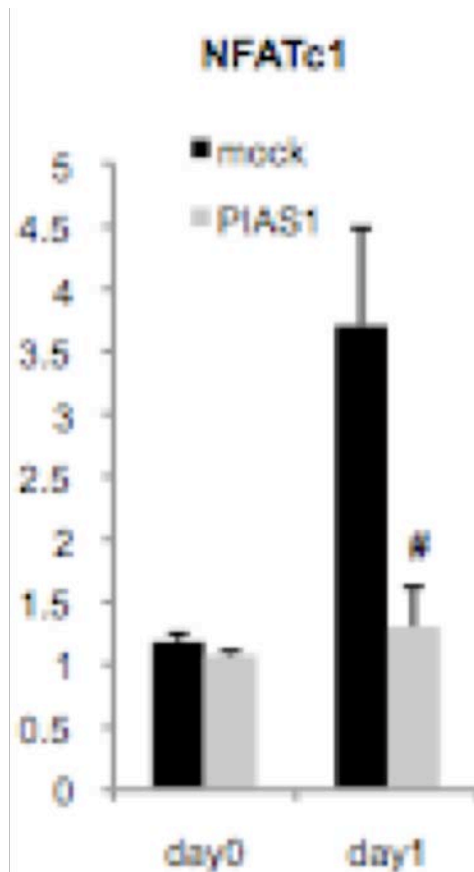
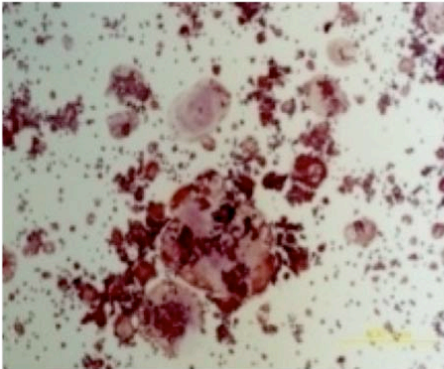


図4 PIAS3過剰発現によるNFATc1の発現抑制

control



siRNA-PIAS3

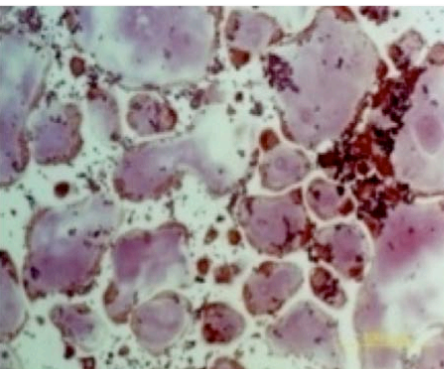


図5 PIAS3ノックダウンによる破骨細胞形成促進

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4件)

(1) Hakozaiki A, Yoda M, Tohmonda T, Furukawa M, Hikata T, Uchikawa S, Takaishi H, Matsumoto M, Chiba K, Horiuchi K, Toyama Y. Receptor activator of NF-kappaB (RANK) ligand induces ectodomain shedding of RANK in murine RAW264.7 macrophages. 査読有、2010. J Immunol. 184, 2442-2448.

(2) Yokoyama S, Ito Y, Ueno-Kudoh H, Shimizu H, Uchibe K, Albin S, Mitsuoka K, Miyaki S, Kiso M, Nagai A, Hikata T, Osada T, Fukuda N, Yamashita S, Harada D, Mezzano V, Kasai M, Puri PL, Hayashizaki Y, Okado H,

Hashimoto M, Asahara H. A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58. 査読有、2009. Dev Cell. 17, 836-848.

(3)Furukawa M, Takaishi H, Takito J, Yoda M, Sakai S, Hikata T, Hakozaiki A, Uchikawa S, Matsumoto M, Chiba K, Kimura T, Okada Y, Matsuo K, Yoshida H, Toyama Y. IL-27 abrogates receptor activator of NF-kappa B ligand-mediated osteoclastogenesis of human granulocyte-macrophage colony-forming unit cells through STAT1-dependent inhibition of c-Fos. 査読有、2009. J Immunol. 183, 2397-2406.

(4)Hikata T, Takaishi H, Takito J, Hakozaiki A, Furukawa M, Uchikawa S, Kimura T, Okada Y, Matsumoto M, Yoshimura A, Nishimura R, Reddy SV, Asahara H, Toyama Y. PIAS3 negatively regulates RANKL-mediated osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblasts. 査読有、2009. Blood. 113, 2202-2212.

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

日方 智宏 (HIKATA TOMOHIRO)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：20348684

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし