

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390239

研究課題名(和文) 分子間架橋を応用したNFATc1複合体解析による骨エピジェネティクスの基盤的研究

研究課題名(英文) Elucidation of Bone Epigenetics with NFATc1 Complex Analysis using Cross-linking Method.

研究代表者

龍野 一郎 (TATSUNO, Ichiro)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：80282490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会に伴い骨粗鬆症増加が予測されるが、その治療薬は決して十分ではない。骨リモデリングは骨形成と骨吸収のバランスで制御され骨芽細胞と破骨細胞の機能調節がその本質である。しかしながら、その制御における骨エピジェネティクスの役割は明らかでない。破骨細胞分化のマスターレギュレーターNFATc1に着目し、クロマチンとエピジェネティクスの接点で作用する転写複合体解析を行った。機能的会合分子WHSC1と新規のリン酸化/アセチル化を同定した。さらに、RNA-seq解析でRANKL刺激か下の時間依存的な下流遺伝子の調節機構を見出した。lincRNAも認め、新たな制御機構の存在を切り開いた。

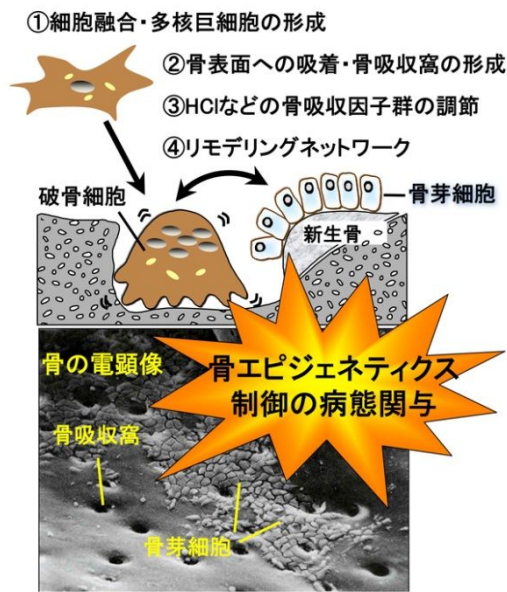
研究成果の概要(英文)：NFATc1 is a key transcription factor that regulates osteoclast differentiation through transactivation of a wide variety of target genes in response to RANKL stimulation. However, a little is known about how NFATc1 regulates and selects functionally distinct target genes differentially during differentiation stage. We performed RNA-sequence analysis and LC-MS/MS analysis and identified the novel NFATc1 binding proteins including WHSC1 and its post-translational modification. RNA-seq revealed that genes related with signal transductions such as TRAF1 and non-coding RNA were induced at early-time point, whereas the induction of NFATc1 and genes associated with osteoclastic functions was observed at maturation stage. Thus, our research suggest that WHSC1 associates with NFATc1 and then regulates RANKL-dependent signaling pathway through modulating certain target genes of NFATc1, possibly linking to the coordination of differentiation and functional regulation of osteoclasts.

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝子 ゲノム 発現制御 エピジェネティクス 発生・分化 骨リモデリング

1. 研究開始当初の背景

図1. 破骨細胞機能発現と骨リモデリング制御



高齢化社会に伴い骨粗鬆症などの骨疾患患者の急激な増加にもかかわらず、その治療薬の選択肢は決して十分とは言えない。その病態の中心に位置する骨リモデリングは骨形成と骨吸収のバランスで制御されているが、その本質は骨芽細胞と破骨細胞の機能調節である。骨エピジェネティクス制御が次世代型創薬ターゲットとして期待される中で、骨芽細胞と破骨細胞のクロマチンレベルでの制御分子機構はほとんど明らかにされていない。我々は RAGE リガンドと AGEs シグナルの骨代謝に対する影響を解析する過程で、RAGE-AGEs シグナルが、骨芽細胞から何らかの分泌因子を介して、破骨細胞の分化調節と機能制御していることを見出した (*JCB, 2009*)。更に我々の研究チームは、転写因子複合体によるクロマチン・エピジェネティクスの機能制御をゲノムワイドで解析する手法を独自に開発してきた (*Cell, 2007*)。本研究では、これらの知見・方法論を破骨細胞分化のマスターレギュレーターである NFATc1 に応用する。NFATc1 (nuclear factor of activated T cells c1) は破骨細胞分化促進因子 RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) により最も強く誘導される転写因子であり (Takayanagi H, et al. 2002 *Dev Cell*)、そのノックアウトマウスは心臓弁膜欠損を主体とする異常により胎性致死である (De la pompa JL, et al. 1998 *Nature*; Ranger AM, et al. 1998 *Nature*)。その骨特異的ノックアウトマウスでは、破骨細胞分化が抑制され Osteopetrosis (大理石病) を来することが知られている (Asagiri M, et al. 2005 *J Exp Med*; Winslow MM, et al. 2006 *Dev Cell*)。これらの事実は、NFATc1 が破骨細胞分化のマスターレギュレーターとして重要な

分子であることを示している。破骨細胞分化のプロセスは大きく分けて、(1)細胞融合・多核巨細胞の形成といった形態変化から、(2)骨表面への吸着・骨吸収窩の形成といった機能発現のためのプラットフォームの形成、さらに、(3)HCl やカテプシン K などの骨吸収因子群の合成・分泌の調節、(4)骨芽-破骨細胞ネットワーク、など、複雑な過程が機能的に結びついて緻密な制御が行われている(図1)。実際に分化の各段階の必要性に応じて、NFATc1 が、TRAP (tartrate-resistance acid phosphatase), calcitonin receptor, cathepsin K, β 3-integrin などの生理作用の異なる多彩な破骨細胞特異的遺伝子を次々に転写活性化するが、これらの多種多様な下流遺伝子群をどのような分子メカニズムで、空間的・時間的な使い分けをしているが十分に解明されていない。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、試薬添加後の骨芽細胞から採取した conditioned medium を用いて、その破骨細胞分化に与える影響を検討する実験系を確立し、RAGE シグナルによる破骨細胞分化における骨芽細胞からの paracrine signaling の重要性を明らかにした。また、骨芽細胞-破骨細胞のクロストーク解析をするための、骨芽細胞/破骨細胞共培養実験系を構築している。また、転写因子複合体によるクロマチン・エピジェネティクスの機能制御をゲノムワイドで解析する手法を開発している。本研究では、これらのシステムを応用・融合し、破骨細胞分化のマスター転写因子 NFATc1 を解析対象として、生化学的な転写複合体解析技術と次世代型シーケンサーによるゲノムワイドのエピジェネティクス・トランスクリプトーム解析を有機的に結びつけることで、骨リモデリング制御の新たな分子機構にアプローチし、骨エピジェネティクスの分子病態解明と創薬基盤の開発を試みることを目的とする。

3. 研究の方法

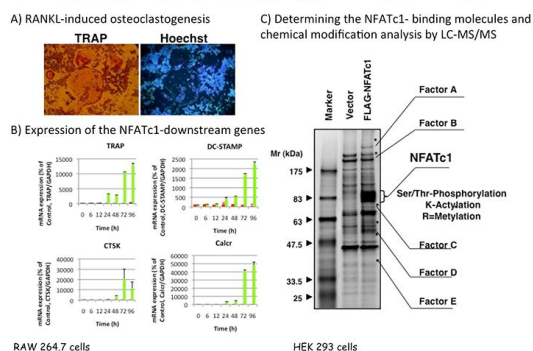
具体的な方法論として、chromatin immunoprecipitation (ChIP) とサイズフラクショネーション・タグアフィニティー精製・mass-spectrometry などのプロテオミクス手法を組み合わせることで、細胞内そのままの状態でもクロスリンクを受けた機能的転写因子複合体を精製し、そこに含まれる会合分子群を同定し、機能解析を試みた。つまり、本研究では、これらの既に確立したシステムを NFATc1 に応用して候補分子群を LC-MS/MS にて同定する。そして、NFATc1 結合分子が実際に前破骨細胞系細胞株 RAW 264.7 細胞に発現しているか、また実際に

RANKL 依存性破骨細胞分化誘導時にその発現が変化するかについて、RT-PCR や Western blot にて発現解析を行った。さらに、NFATc1 自身の化学修飾変化の同定を試みた。また、次世代型シーケンサーを用いた NFATc1 複合体に制御されるゲノムワイドの転写産物解析(linc RNA も含む)を行い、その RANKL 刺激後の掲示的变化を比較検討し、破骨細胞分化を機能的变化の側面から捉える事を試みた。

4. 研究成果

前破骨細胞系細胞株 RAW 264.7 細胞に RANKL 刺激を加え、破骨細胞分化誘導と NFATc1 下流遺伝子群の転写誘導を確認している。また、human(or mouse) NFATc1-FLAG(and/or HA)のレンチウイルス及びレトロウイルス発現システムを構築し、TAP と LC-MS/MS を組み合わせて新規 NFATc1 結合分子(Factor A-E)の同定と NFATc1 自身の翻訳後修飾として、新たなメチル化やアセチル化部位の同定に成功した(図 2)。

図2. 破骨細胞分化遺伝子群の発現解析と新規NFATc1結合分子の同定

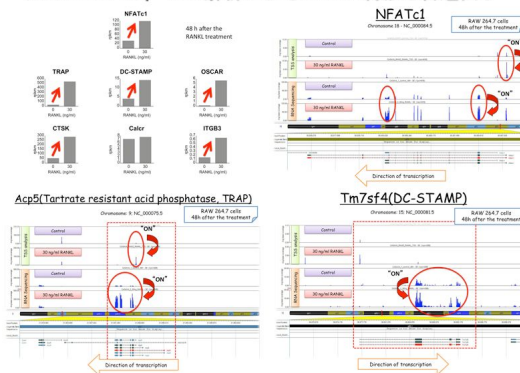


また、NFATc1 の結合分子(クロマチン複合体構成分子)として、新規の候補分子の同定をすることができた。これらの分子の中には、WHSC1 など先天性骨疾患の病因と考えられる因子が含まれており、これらの解析が NFATc1 の新たな機能制御機構を明らかにしたのと考えられた。一方で、破骨細胞分化においては RANKL-RANK シグナルによって、細胞分化・融合・(破骨機能の)活性化といった一連のプロセスが、複雑かつ巧妙に調節されているが、それらの各機能的な下流遺伝子発現がそれぞれどの段階でどのように調節されているかは未だ不明な部分が多い。そこで我々は次世代型シーケンサーを用いて RANKL 刺激における遺伝子発現変化を、ゲノムワイドに解析すると同時に、ChIP-seq でシグナル依存的なエピジェネティクス解析を行う予定である。既に、RAW264.7 に RANKL 刺激後、48 時間の転写産物(RNA-seq/TSS)解析をプレリミナリーに施行した(図 3)。すると、過去の報告に一致し

て RANKL-RANK シグナルを介した NFATc1 シグナルを中心とした遺伝子制御が確認され、TRAP、Calcitonin receptor、Cathepsin K、Integrin β_3 、DC-STAMP などの NFATc1 下流遺伝子は 6 倍以上の転写誘導が認められた(図 3)。一方、興味深いことに最近注目を集めている長鎖非翻訳性 RNA(linc RNA)も多数認められ、破骨細胞分化における新たな機能制御機構の存在が明らかにされた。

これらの一連の結果から得られた知見は、NFATc1 生理機能発現の根底で作用する核内シグナルとクロマチン制御メカニズムの接点で作用する機能的分子であることを示している。従って、更に細胞内シグナル解析押し進めることにより、新たな分子病態の解明と新しいタイプの治療薬開発に結びつくことが期待される。

図3. RNA-seq・TSS解析によるRANKL刺激応答遺伝子



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 14 件)

- 1) Nagayama D, Ishihara N, Bujo H, Shirai K, Tatsuno I (2014) Effects of serotonin on expression of the LDL receptor family member LR11 and 7-ketocholesterol-induced apoptosis in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 446(4):906-10. (査読有)
- 2) Tatsuno I, Terano T, Nakamura M, Suzuki K, Kubota K, Yamaguchi J, Yoshida T, Suzuki S, Tanaka T, Shozu M. Lifestyle and osteoporosis in middle-aged and elderly women: Chiba bone survey. *Endocr J.* (2013) 60(5):643-50. (査読有)
- 3) Hosokawa H, Tanaka T, Kato M, Tohyama H, Hanazawa A, Tamaki Y, Hirahara K, Sakikawa I, Morita A, Nagira M, Suzuki, Y and Nakayama, T.

Gata3/Ruvbl2 complex regulates T helper 2 cell proliferation via repression of Cdkn2c expression. (2013) Proc Natl Acad Sci U S A.110(46): 18626-18631. IF 9.737. (査読有)

doi:10.1073/pnas.1311100110

- 4) Hosokawa H, Tanaka T, Suzuki Y, Iwamura C, Ohkubo S, Endoh K, Kato M, Nakayama T. (2013) Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish T helper 2 (Th2) cell identity. Proc Natl Acad Sci U S A.110 (12): 4691-4696. IF 9.737. (査読有)

〔学会発表〕(計 20 件)

- 1) Nakayama A, Yoshida T, Nagano H, Suzuki Y, Sugano S, Yokote K, Tanaka T. (2015) WHSC1 associates with NFATc1 and regulates RANKL-dependent Osteoclast Differentiation. March 5 2015, The Endocrine society's 97th annual meeting & expo, San Diego Convention Center, USA.
- 2) 吉田知彦、中山哲俊、永野秀和、小出尚史、鈴木穰、菅野純夫、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明. RANKL 依存性破骨細胞分化における網羅的遺伝子発現解析と新規 NFATc1 結合候補分子 WHSC1 の役割 第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014 年 4 月 24 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

龍野 一郎 (TATSUNO, Ichiro)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：80282490

(2) 研究分担者

田中 知明 (TANAKA, Tomoaki)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50447299

(3) 研究分担者

吉田 知彦 (YOSHIDA, Tomohiko)

千葉大学・総合安全衛生管理機構・助教

研究者番号：20422222