

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590461

研究課題名(和文)破骨細胞前駆細胞における破骨細胞分化因子受容体(RANK)発現制御機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of Regulatory Mechanism of RANK Gene Expression in Osteoclast Precursor Cells

研究代表者

北澤 理子(KITAZAWA, RIKO)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00273780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織で骨吸収を担う破骨細胞は、骨粗鬆症や癌の骨転移などの疾患で治療標的として重要である。破骨細胞の最終分化には、破骨細胞分化因子RANKLと前駆細胞の受容体RANKとの結合が不可欠である。従って、骨髄単球系細胞から破骨細胞分化への前段階で、受容体RANKを持つことが重要である点に着目して、受容体RANKの遺伝子プロモータを解析して、RANK発現を誘導する転写因子について検討した。一方、通常のRANKは10個のエクソンで構成されるが、私どもは2個のエクソンのみの変異型vRANKを見出し、培養細胞でvRANK発現を解析するとともに、vRANKを強制発現する遺伝子改変マウス作製に着手した。

研究成果の概要(英文)：Osteoclasts are multinucleated giant cells specialized in bone resorption, and are the major therapeutic target in diseases such as Osteoporosis and metastatic bone tumor. Receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) is a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family expressed in osteoclast precursors, and RANK-RANK ligand (RANKL) signaling is a key system for differentiation, during differentiation of bone marrow mono-nucleated cells into osteoclast precursors. We had cloned a 6-kb fragment containing the 5'-flanking region of the RANK gene and have analyzed the binding elements of transcription factors. RANK transcription was positively regulated by c-fos/AP-1. We have identified splicing variant of mouse and human RANK gene (vRANK) that contains an intervening exon between exons 1 and 2 of full-length RANK (fRANK) mRNA. Since this novel exon contains a stop codon, vRANK encodes short truncated amino acids. We have started to generate a vRANK-overexpressed transgenic mouse.

研究分野：病理学

キーワード：破骨細胞 RANK 遺伝子プロモータ 転写因子

### 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。骨粗鬆症や癌の骨転移などの病態では、破骨細胞の制御が重要な治療標的となっている。破骨細胞の最終分化には、破骨細胞分化因子 RANKL が、破骨細胞の前駆細胞上の受容体 RANK に結合することが不可欠である。私どもは、破骨細胞前段階の細胞に受容体 RANK が発現することの重要性に着目して、RANK 遺伝子の発現制御機構について研究を行ってきた。

### 2. 研究の目的

(1) マウス RANK 遺伝子プロモータ領域の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 NFAT 結合候補配列、CRE/API 結合候補配列の機能を検討する。

(2) 受容体 RANK の新規変異体 vRANK の機能解析

RANK はヒト、マウスいずれも 10 個のエクソン、600 余のアミノ酸で構成されるが、mRNA スプライシング段階で、2 個のエクソンからなる変異体 vRANK が産生される。ヒト、マウス培養細胞における vRANK 発現制御機構の解析、vRANK を強制発現する遺伝子改変動物作製を進めた。

### 3. 研究の方法

(1) マウス RANK 遺伝子プロモータ領域の主要な転写因子結合配列の解析

ゲルシフトアッセイを行い、RANK 遺伝子プロモータ領域の NFAT 結合配列、CRE/API 結合配列を同定するとともに、マウス前破骨細胞 RAW 細胞にトランスフェクションを行いプロモータアッセイを施行した。siRNA 導入による転写因子のノックダウンが受容体 RANK と破骨細胞分化形質発現に及ぼす効果を検討した。

(2) 受容体 RANK の新規変異体 vRANK の機能解析

マウス RAW 細胞、ヒト白血病細胞 HL-60 細胞において、サイトカイン、ホルモン等の vRANK 産生に対する効果を調べるとともに、各種キナーゼ阻害剤の抑制効果を検討した。遺伝子改変動物としては vRANK を全身的に強制発現するマウスを作製して、骨組織のみならず、全身主要臓器を検索した。

### 4. 研究成果

(1) マウス RANK 遺伝子プロモータ領域の主要な転写因子結合配列の解析

ゲルシフトアッセイを行い、RANK 遺伝子プロモータ領域の NFAT 結合配列、CRE/API

結合配列を同定するとともに、マウス前破骨細胞 RAW 細胞にトランスフェクションを行いプロモータアッセイを施行した。siRNA 導入による転写因子のノックダウンが受容体 RANK と破骨細胞分化形質発現に及ぼす効果を検討した。

(2) 受容体 RANK の新規変異体 vRANK の機能解析

マウス RAW 細胞、ヒト白血病細胞 HL-60 細胞において、各種サイトカイン、ホルモン等のうち sRANKL に加え、Vitamin D3+PMA 処理による vRANK の誘導効果、ERK 阻害剤の抑制効果が認められた。近年、mRNA スプライシングについて SAM68 が注目されているが、マウス、ヒトいずれも RANK 遺伝子エクソン 1、2 の近傍に SAM68 の結合モチーフが複数箇所存在し、siRNA による SAM68 のノックダウンで vRANK 発現が阻害されることを見出し、SAM68 による vRANK 発現を示唆する知見を得た。

vRANK は培養細胞レベルでは破骨細胞分化に抑制効果を示すので、vRANK 導入個体では骨量が増加する可能性が期待された。しかしながら、vRANK を全身的に強制発現するマウスを作製すると、離乳期までの死亡率が極めて高く、少数の生存個体では、気管支肺炎、心不全を呈し、全身状態の悪化を背景に、骨量減少を呈するという観察結果を得た。

### 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 12 件)

Nakagawa M, Kitazawa R, Kondo T, Ninomiya K, Okita M, Haraguchi R, Kitazawa S. Duodenal gastric heterotopia, sporadic or fundic gland polyp-associated, frequently carries  $\beta$ -catenin mutation. *Virchows Archiv*, 査読有 2014, 465 (3), 253-256.

Mori K, Kitazawa R, Kondo T, Mori M, Hamada Y, Nishita M, Minami Y, Haraguchi R, Takahashi T, Kitazawa S. Diabetic Osteopenia by Decreased  $\beta$ -Catenin Signaling Is Partly Induced by Epigenetic Derepression of sFRP-4 Gene. *PlosOne*, 査読有(2014), 9 (7), e102797.

Watanabe T, Kitazawa R, Mizuno Y, Kuwahara N, Ito C, Sugita A, Haraguchi R, Kitazawa S. BOB.1-positive Classical Hodgkin's Lymphoma carries Hypermethylation of Gene Promoter as Molecular Marker of Gene-silencing Memory Acta *Histochem Cytochem*, 査読

有(2014), 47 (3), 125-131.

Fujiishii K, Kitazawa R, Nagai Y, Watanabe T, Bando K, Kobayashi S, Yakushijin Y, Haraguchi R, Kitazawa S. Acquisition of MYD88 L265P mutation during treatment of diffuse large B-cell lymphoma of parotid gland. *Virchows Archiv*, 査読有 464(1), 121-124, 2014.

北澤 理子. 破骨細胞分化因子(RANKL)の遺伝子発現制御, *愛媛医学*, 査読なし(0286-3677)32巻4号 Page215-219, 2013

Kuwahara N, Kitazawa R, Fujiishi K, Nagai Y, Haraguchi R, Kitazawa S. Gastric adenocarcinoma arising in gastritis cystica profunda presenting with selective loss of KCNE2 expression. *World Journal of Gastroenterology*, 査読有 19(8):1314-1317, 2013.

Makita K, Kitazawa R, Fujiishi K, Nakagawa M, Haraguchi R, Kitazawa S. Cdx2 expression and its promoter methylation during metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in Barrett's esophagus. *World Journal of Gastroenterology*, 査読有 19(4):536-41, 2013.

Nakagawa M, Kitazawa R, Kuwahara N, Yoshida K, Haraguchi R, Kitazawa S. Efficient genetic analysis of microdissected samples by agarose-bead method: Alterations of  $\beta$ -catenin gene in fundic gland polyp and heterotopic gastric mucosa of duodenum. *Acta Histochem Cytochem*, 査読有 46(1), 19-24, 2013.

Wang Y, Liu W, Masuyama R, Fukuyama R, Ito M, Zhang Q, Komori H, Murakami T, Moriishi T, Miyazaki T, Kitazawa R, Yoshida CA, Kawai Y, Izumi S, Komori T Pyruvate dehydrogenase kinase 4 induces bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis. *Bone*, 査読有 2012, 50(1):409-419.

Sakuma T, Nakamoto T, Hemmi H, Kitazawa S, Kitazawa R, Notomi T, Hayata T, Ezura Y, Amagasa T, Noda M. CIZ/NMP4 is expressed in B16 melanoma and forms a positive feedback loop with RANKL to promote migration of the melanoma cells. *J Cell Physiol*, 査読有 2012, 227(7):2807-2812.

Tanaka K, Katagiri T, Komori T, Kitazawa R, Sugimoto T, Seino S, Kaji H Interaction of Tmem119 and the bone morphogenetic protein pathway in the

commitment of myoblastic into osteoblastic cells. *Bone*, 査読有 2012, 51(1):158-67.

Kitazawa S, Kondo T, Mori K, Yokoyama N, Matsuo M, Kitazawa R. A p.D116G mutation in CREB1 leads to novel multiple malformation syndrome resembling CrebA knockout mouse. *Human Mutation*, 査読有 2012, 33(4):651-654.

〔学会発表〕(計 12 件)

Kitazawa R, Haraguchi R, Mizuno Y, Kitazawa S. Identification and analysis of function of a novel splicing variant of receptor activator of NF- $\kappa$ B. *ASBMR* 2014. 9.12-15 (Houston, USA)

北澤 荘平、原口 竜摩、北澤 理子  
「エピジェネティック因子の組織細胞化学」  
DNA メチル化部位検出の形態学への展開. 第 54 回日本組織細胞化学会総会 シンポジウム  
2013.9.27-28 (航空会館、東京)

北澤 理子、向井 智美、永井 由紗、近藤 武史、  
原口 竜摩、北澤 荘平. 破骨細胞分化因子受容体 RANK の新規変異体の解析. 第 102 回日本病理学会総会 2013.6.6-8 (ロイトン札幌・さっぽろ文芸館、札幌)

Tachibana R, Haraguchi R, Kameoka Y, Ariyasu K, Mori K, Kitazawa S, Kitazawa R. Topological Expression of Sfrp4 During Fetal Bone Formation. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, 2013.5.28-6.1 (Kobe, Japan)

Haraguchi R, Kitazawa R, Kitazawa S. Spatiotemporal Expression of Tbx18 During Endochondral Bone Formation. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, 2013.5.28-6.1 (Kobe, Japan)

Kitazawa R, Mukai S, Nagai N, Haraguchi R, Kitazawa S. Identification and Analysis of Function of a Novel Splicing Variant of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, 2013.5.28-6.1 (Kobe, Japan)

北澤 理子、向井 智美、永井 由紗、原口 竜摩、  
北澤 荘平. 破骨細胞分化因子受容体 RANK の  
新規変異体 vRANK の解析. 第 103 回日本病理

学会総会 2013.4.24-26( 広島国際会議場・ANA  
クラウンプラザホテル、広島 )

Kitazawa R, Mukai S, Ishii J, Kondo T,  
Mori K, Haraguch R, Kitazawa S.  
Identification and analysis of function of a  
novel splicing variant of mouse receptor  
activator of NF- $\kappa$ B. ASBMR 2012 10.12-15  
(Minneapolis, USA)

Haraguchi R, Kitazawa R, Yamada G,  
Kitazawa S.  
Spatiotemporal expression of Tbx18 during  
endochondral bone formation  
The 14th International Congress of  
Histochemistry and Cytochemistry, 2012.  
8.26-29, (Kyoto Japan)

Kitazawa R, Kondo T, Haraguchi R,  
Kitazawa S. Detection of RANKL mRNA in  
Osteolytic Bone Lesions.The 14th  
International Congress of Histochemistry  
and Cytochemistry, 2012. 8.26-29, (Kyoto  
Japan)

Kitazawa S, Haraguchi R, Watanabe T,  
Kondo T, Kitazawa R. Detection of DNA  
methylation in pathology section.The 14th  
International Congress of Histochemistry  
and Cytochemistry, Symposium.2012.  
8.26-29 (Kyoto Japan)

北澤理子, 向井智美, 石井淳子, 近藤武史,  
森 清, 原口竜摩, 北澤荘平. 破骨細胞分  
化因子 RANKL による受容体 RANK の発現制御  
機構. 第 30 回日本骨代謝学会総会  
2012.7.19-21( 新宿京王プラザホテル、東京 )

〔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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

北澤 理子 (Kitazawa, Riko)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

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