

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592256

研究課題名(和文) RANKLによる破骨細胞分化に関わる遺伝子Msi2の作用に関する研究

研究課題名(英文) Msi2 modulates RANKL-induced osteoclastogenesis

## 研究代表者

門野 夕峰 (Kadono, Yuho)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70401065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの骨髄細胞を採取しRANKL刺激を行い破骨細胞に分化させる系において、Msi2のmRNAおよびタンパクの量が増加することを定量的RT-PCRおよび免疫ブロットングにより確認した。Msi2ノックアウトマウスの細胞で骨髄細胞をRANKL刺激したところ、破骨細胞分化は抑制される傾向にあった。マイクロCTによる骨量測定では、ノックアウトマウスと対照群の有意差は生じなかったが、卵巣摘出をした際の骨量変化は異なることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We generated osteoclasts in vitro by stimulating BMMs with RANKL and M-CSF and performed quantitative RT-PCR and immunoblotting to evaluate Msi2 expression during osteoclastogenesis. Msi2 gene and protein expression were upregulated by RANKL stimulation. Cells collected from Msi2-deleted mice formed fewer osteoclasts by RANKL stimulation than wild type. Micro-CT analysis revealed that there is no significant difference in bone volume between wild type mice and Msi2-deleted mice. However, difference of bone volume between sham and ovariectomized Msi2-deleted mice was higher than wild type mice.

研究分野：骨代謝

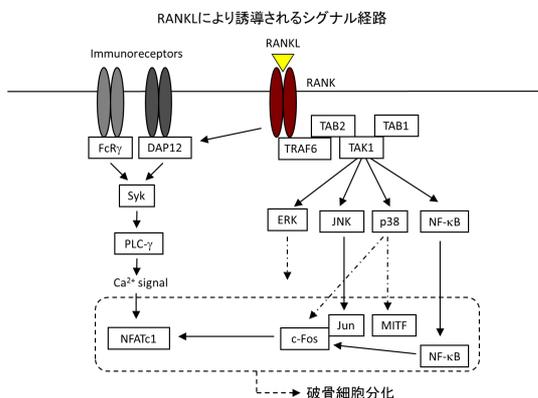
キーワード：破骨細胞 分化 RANKL

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、少子高齢社会を迎え、いかに健康寿命を長くしていくかということが課題となっている。骨関節疾患は介護が必要となる主な原因の1つとなっており、加齢や閉経後の骨粗鬆症を背景とした骨脆弱性骨折などが問題となってきている。

(2) 骨の恒常性は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスにより成り立っている。骨吸収が相対的に骨形成より亢進すると、骨粗鬆症や、関節リウマチ等の炎症性疾患や腫瘍による骨破壊、骨量低下を生じる。

(3) 破骨細胞に関連する遺伝子やサイトカインを標的とした研究や治療が推し進められてきており、実際に破骨細胞を分化させる作用を持つ遺伝子やサイトカインが少しずつ同定されてきている。それらの中には疾患の治療の標的として臨床試験が行われているものもあり、注目を集めている。1998年に破骨細胞分化因子 RANKL が同定され、破骨細胞への分化誘導においては炎症性サイトカイン TNF のスーパーファミリー分子である RANKL とその受容体である RANK を介するシグナルが中心的役割を果たしていることが判明した。具体的には、破骨細胞は、造血幹細胞から分化した単球/マクロファージ系前駆細胞から、生存因子である M-CSF の存在下に、RANKL により制御され分化することが明らかになってきた。破骨細胞分化において重要な働きをする遺伝子もいくつか解明されつつあり、特に *Nfatc1* は転写因子として中心的な役割を果たすことが報告されている (Takayanagi H., Nat Rev Immunol 7, 292-304, 2007)。しかし、いまだ未解明な遺伝子も多く、それらの相互作用についてもはっきり分かっていない部分が多い。



(4) 近年クロマチン修飾の変化に代表されるエピジェネティックな発現制御機構が様々な細胞の分化過程を制御していることが明らかになってきた (Reik W, Nature 447 425-432, 2007)。特に、細胞が未分化な段階では H3-K4 と H3-K27 のトリメチル化の両方の修飾により発現が抑制されているが、細胞分化に伴い H3-K27 のみが脱メチル化されることで H3-K4 の修飾のみが残存し、発現が誘導される遺伝子は細胞分化に重要であると考えられている (Bernstein et al., Cell 125, 315-326, 2006)。embryonic stem cell をはじめとした様々な細胞で、このヒストン修飾の変化は細胞の分化過程において必要な遺伝子を誤りなく発現させる制御機構として働くと報告されている。破骨細胞分化において中心的な役割を果たすことが広く知られている遺伝子である *Nfatc1* においても、破骨前駆細胞においては H3K4 および H3K27 の両方がトリメチル化されており、破骨細胞分化にともない H3K27 のトリメチル化が外れ、H3K4 のトリメチル化のみが残存するという報告もなされており (Yasui T, et al., J Bone Miner Res 26, 2665-71, 2011)、同様のヒストン修飾変化をとともなう遺伝子が破骨細胞分化に関与している可能性は非常に高いと考えられる。

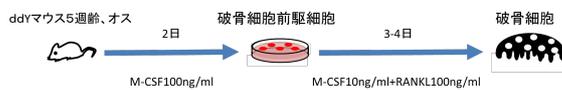
(5) *Msi2* は広範な組織で発現する RNA 結合性蛋白であり、*Numb* の転写を抑制することにより Notch pathway の抑制を解除しシグナルを亢進させると考えられている。また、血液や神経幹細胞の複製や分化の際に *Msi1* とともに働き、急性骨髄性白血病や慢性骨髄性白血病の急性転化に関わっているという報告がある (Moore MA, Nat Med. 16: 903-8, 2010)。破骨細胞に関する報告はなされていないが、RANKL 刺激によるヒストン修飾の変化と発現の誘導、Notch pathway の制御に関わっていること、破骨細胞の起源である血液幹細胞の分化の制御に関わっていることなどから、破骨細胞分化において重要な役割を果たしている可能性は非常に高いと考えられる。

2. 研究の目的

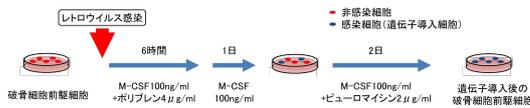
(1) 破骨細胞分化において、RANKL 刺激を契機としてヒストン修飾の変化を介して発現が誘導される *Msi2* の破骨細胞分化、機能への関与と役割を解析し、破骨細胞分化メカニズムの一端を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウスの骨髄細胞に M-CSF および RANKL 刺激を行うことによる破骨細胞分化系を用いて、*Msi2* の発現量及び局在の変化を Real-time PCR 及び免疫プロットング、免疫染色で解析する。これらにより破骨細胞分化の過程において *Msi2* が発現していること及びその細胞内局在を確認する。



(2) (1)と同様の破骨細胞分化系において、破骨前駆細胞にレトロウイルスを用いて Msi2 に対する shRNA の導入を行う。それを RANKL 刺激して分化させた破骨細胞を TRAP 染色し、その数と形態を解析し、Msi2 の発現低下による破骨細胞分化への影響を評価する。



(3) (2)の shRNA の系において、継時的に Real-time PCR を行い、Msi2 の発現が実際に抑制されているかを確認する。また、既知の破骨細胞分化および機能関連遺伝子の発現が対照群と比較し、どのように変化しているかを解析する。

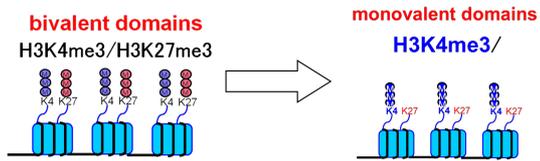
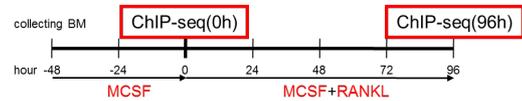
(4) Msi2 ノックアウトマウスを入手し、マイクロ CT 及び骨形態計測により、骨および破骨細胞、骨芽細胞の in vivo での評価を行う。

(5) Msi2 ノックアウトマウスから骨髓細胞を採取し、M-CSF および RANKL にて破骨細胞に分化させる。TRAP 染色および Pit formation assay を行い、破骨細胞の分化および機能の評価を行う。

(6) Msi2 は RNA 結合タンパクであるため、その結合する RNA に対する解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) マウス骨髓細胞に M-CSF および RANKL 刺激して破骨細胞を分化させる系において、RANKL 刺激前と分化後のサンプルを用いて、ChIP シークエンスを行った。破骨細胞分化において非常に重要な転写因子である Nfatc1 は破骨前駆細胞で H3K4 および H3K27 が共にトリメチル化されており、一方で、破骨細胞では H3K4 のみトリメチル化されており、H3K27 のトリメチル化は外れており、過去の報告と同様の結果であった。同様に、Msi2 においても、RANKL 刺激前に H3-K4 および H3-K27 の両方の修飾がなされており、破骨細胞分化後には H3-K4 の修飾は残存し、H3-K27 の修飾が外れていることが明らかとなった。この結果から、Msi2 のヒストン修飾が破骨細胞分化にともない準備状態から活性型に変化していると考えられた。



(2) マウス骨髓細胞を M-CSF および RANKL により破骨細胞に分化させる系において、RANKL 刺激前から分化まで継時的に検体を採取し、Real-time PCR を行ったところ、Msi2 は RANKL 刺激後著明に発現が増加していることが確認された。また、同様の系で免疫プロットングを行ったところ、Msi2 のタンパク量も破骨細胞分化にともない増加していることが明らかとなった。また、同じファミリーに属する Msi1 は、破骨前駆細胞、破骨細胞ともにほとんど発現していなかった。

(3) Msi2 に対する shRNA を破骨前駆細胞に導入し、Msi2 の発現抑制を行った。RANKL 刺激による破骨細胞分化は対照群に対して抑制されていた。Real-time PCR により、Msi2 が一定程度抑制されていることを確認した。

(4) Msi2 ノックアウトマウスを入手した。Msi2 ノックアウトマウスは野生種に比較して体重が軽く、脾臓重量が少なかった。一部の破骨細胞数または機能の低下による大理石骨病では歯牙の欠損がみられるが、Msi2 ノックアウトマウスでは歯牙は欠損していなかった。

(5) Msi2 ノックアウトマウスから採取した骨髓細胞に M-CSF と RANKL を加え、破骨細胞に分化させた。破骨細胞は分化したが、対照群に比較し、その数は少なかった。Realtime PCR にてノックアウトマウスの破骨細胞において Msi2 の発現が抑制されていること、Msi1 の著明な発現上昇が生じていないことを確認した。Pit formation assay については現在行っている。

(6) 12 週齢の Msi2 ノックアウトマウスの大腿骨を採取し、マイクロ CT による骨量の評価を行った。また、脛骨を採取し骨形態計測を行った。対照群と比較して骨量が多い傾向にあったが、有意な差は生じていなかった。

(7) Msi2 ノックアウトマウスの卵巣摘出実験を行ったところ、偽手術に対する骨量の低下割合が野生種に比較して減少していた。

(8) Msi2 は RNA 結合タンパクであるため、結合する RNA に対する解析を現在行っている。

研究者番号：

これらの結果をまとめて論文執筆中である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

門野 夕峰 (KADONO, Yuho)

東京大学医学部附属病院 講師

研究者番号：70401065

##### (2) 研究分担者

安井 哲郎 (YASUI, Tetsuro)

東京大学医学部附属病院 講師

研究者番号：30583108

大島 寧 (OSHIMA, Yasushi)

東京大学医学部附属病院 講師

研究者番号：50570016

##### (3) 連携研究者

( )