

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592806

研究課題名(和文) shRNAライブラリーを用いた新たな破骨細胞分化制御因子の探索と調節機構の解析

研究課題名(英文) Screening for regulatory proteins of osteoclastogenesis with lentiviral shRNA library

研究代表者

久木田 明子 (Kukita, Akiko)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：30153266

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)：shRNAレンチウイルスライブラリーを用いて、破骨細胞の分化に必須な調節因子のスクリーニングを行うために、カタレプシンKプロモーター制御下でVenusを発現するレポーター細胞RAW-ctsk-Venus1を作成した。レポーター細胞からRANKLで誘導されるVenus陽性細胞の中でVenus発現が低い集団は細胞表面のRANKの発現が低下していた。レポーター細胞にshRNAライブラリーを感染させVenus発現が低下する細胞集団に多く含まれるshRNAの解析を行った結果、MAP3KとVav3などのシグナル因子や破骨細胞の分化制御に関わると考えられる新たな転写因子が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We performed the screening for proteins which have essential roles in osteoclast differentiation and function by using shRNA lentivirus library that target signaling pathway in mouse. First, we prepared a reporter cell line RAW-ctsk-Venus1 which induce the expression of fluorescent protein Venus under the control of cathepsin K promoter. RANKL dose dependently induced Venus expression in RAW-ctsk-Venus1. Surface expression of population of Venus-positive cells was analyzed. RANK expression of Venus low-positive cells was lower than that of Venus high-positive cells. RAW-ctsk-Venus 1 cells were infected by shRNA lentivirus library and stimulated with RANKL. The fraction of Venus low-positive cells affected by infection were collected by cell sorter. Analyzing of enriched population of shRNA in Venus low-positive cells revealed that several candidates for regulators of osteoclastogenesis including some signaling molecules Map3k and Vav3.

研究分野：医歯薬学

キーワード：破骨細胞分化 shRNAライブラリー スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は、破骨細胞分化因子 RANKL により分化が誘導され、生理的な骨代謝や病的な骨破壊において重要な役割を持っている細胞である。RANKL で発現が変化する遺伝子の網羅的な解析は多く行われており、破骨細胞分化に必須な NFATc1、分化を抑制する IRF8 などの転写因子が、RANK の下流で破骨細胞の分化を制御することが明らかにされている。しかしながら、破骨細胞分化を亢進する特異的な制御蛋白質についてはまだ情報が不足している。これは、Microarray を用いた従来の解析では発現が低い破骨細胞分化に必須な遺伝子をスクリーニングすることが困難であることによると考えられる。

siRNA は容易に遺伝子をノックダウンすることのできる方法として、多くの研究において用いられている。近年、すべての遺伝子をカバーするゲノムワイドやプール型の siRNA ライブラリーが作成され、siRNA ライブラリーを細胞に導入し、白血病細胞の薬剤の感受性に関わる遺伝子、ES 細胞自己複製に必須な遺伝子など細胞の増殖、分化などの機能の阻害を指標にしてそれに関わる遺伝子をスクリーニングすることが可能となった。細胞に siRNA を発現する方法としては、遺伝子がゲノム DNA に組み込まれ安定に発現できる shRNA レンチウイルスが用いられており、また、shRNA ライブラリーを大学などの機関が無償で利用できるオープンソースプロジェクトも開始され、shRNA の配列を次世代 DNA シークエンサーを用いて解析する手法を用いて、より正確な候補遺伝子の特定が可能となっている。そこで、shRNA ライブラリーを用いて siRNA による分化の抑制を指標に、破骨細胞の分化に必須な新たな調節因子をスクリーニングすることをことが可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、バーコード配列付のプール型 shRNA レンチウイルスライブラリーを用いて shRNA による分化の抑制を指標に、破骨細胞の分化に必須な新たな調節因子をス

クリーニングすることを目的とした。RNAi スクリーニングにおいては、効果的なスクリーニング方法が重要となるが、筆者らがトランスジェニックマウス作成に用いたカテプシン K プロモーターや NFATc1 応答配列を用いて破骨細胞分化誘導により GFP を発現するレポーター細胞を作成し FACS で解析、分取することにより、siRNA により破骨細胞の分化が抑制された細胞集団を濃縮し、破骨細胞の分化に必須な蛋白質を直接明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プラスミド構築

蛍光タンパク質 Venus, Crimson をカテプシン K プロモーター (-1676 から -48bp) 制御下で発現するプラスミドを作成した。Venus 遺伝子は pCS2-Venus (Dr. Mitawaki, RIKEN から供与いただいた) から調製した。また、NFAT 応答配列を 3 個タンデムにつないだ DNA を Venus 及び Crimson の上流に結合させたプラスミドも同様に構築した。

(2) レポーター細胞の作成

マウスマクロファージ細胞株 RAW-D (RAW264 細胞のサブクローン) を用いた。RAW-D 細胞を 1) のプラスミドで Gene pulser Xcell を用いて transfection した。Transfection 24 時間後に G418 を添加して 3 週間培養を行い発現安定株を作成した。得られたクローンの Venus 及び Crimson 発現を蛍光顕微鏡で観察し、RANKL 非存在下では発現が低く RANKL で最も高く発現が誘導されるクローンを選択した。蛍光強度は、蛍光光度計、共焦点レーザー顕微鏡及びフローサイトメーターを用いて測定した。

(3) shRNA ライブラリーの作成及びウイルスベクター構築

shRNA レンチウイルスライブラリーは、Cellecta 社より Decipher shRNA library (Open Source RNAi Screening Project) の Mouse Module 1 (Signaling Pathway Target) を取得して用いた。293T 細胞に psPAX2, pMD2.G とともに transfection し、培養上清を濃縮しレンチウイルスライブラリーを調製した。shRNA template oligonucleotide を

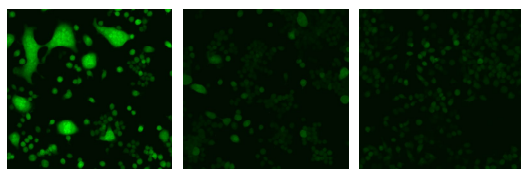
デザインし、レンチウイルスベクターの shRNA 部位に挿入して、EGFP (negative control として)、NFAT, Fos (positive control として)shRNA レンチウイルスベクターを作成した。

4. 研究成果

(1)レポーター細胞の作成と分化誘導の解析

破骨細胞において特異的に発現するカテプシン K のプロモーター及び NFATc1 応答配列を、Venus や Crimson などの蛍光蛋白質の遺伝子上流に結合させたプラスミドを用いて作成した発現安定株のクローンの蛍光タンパク質の誘導能を解析した。NFAT 応答配列に比較し、カテプシン K プロモーターのほうが RANKL 添加によって蛍光タンパク質の発現を顕著に誘導した。Venus 及び Crimson 発現は同様に誘導された。Venus を最も高く誘導するクローン、RAW-ctsk-Venus1 をスクリーニングに用いることにした。このレポーター細胞は、TNF α や LPS, IL-1 によって Venus 蛍光強度はやや上昇したが、RANKL によって最も強く誘導された(図)。

RANKL(30ng/ml) TNF- α (30ng/ml) LPS (100ng/ml)



(2)レポーター細胞の Venus 発現細胞の解析

RAW-ctsk-Venus 細胞に RANKL を添加し Venus 陽性細胞の集団を Flow cytometry を用いて解析した。その結果、RANKL の濃度に依存して Venus 陽性細胞の集団が現れた。Positive control として c-Fos 及び NFAT shRNA レンチウイルスを感染させ発現を抑制した場合、RANKL によって誘導される Venus 陽性細胞の強度が減少した。さらに Venus 陽性細胞の中で発現が強い集団 (Venus high) は RANK 表面の発現が高く分化が亢進していると考えられ、発現が低い集団 (Venus low) は RANK 表面の発現低下が見られ破骨細胞の分化の程度が低い集団であると考えられた。

(3) shRNA ライブラリー感染と Venus 陽性細胞

細胞の解析

RAW-ctsk-Venus1 細胞 6×10^6 個に shRNA library を $Moi=0.2 \sim 1$ で感染させ 24 時間後、puromycin で 3 日間感染細胞を選択した。細胞を剥がし、RANKL を添加し破骨細胞の分化を誘導した。まず、コントロール EGFPshRNA ウイルスを感染したレポーター細胞の Venus 陽性細胞の分布を調べたところ、約 85%の細胞が Venus 陽性であった。次に shRNA ライブラリーを感染したところ、同様に 85%の Venus 陽性細胞の集団が見られたが、Venus 発現の低い集団 (Venus low) がコントロールと比較して 1%から 5~10%と上昇しており、shRNA ライブラリー感染により遺伝子の発現が抑制され破骨細胞の分化が阻害された細胞集団であると考えられた。そこで、RANKL 添加後約 48 時間後、FACSaria を用い sorting を行い、Venus 陽性細胞集団全体 P5 と Venus low 集団の細胞 P4 それぞれ約 2×10^6 個を集めた。

(4)Venus を抑制する shRNA の解析

細胞よりゲノムを抽出し、PCR を行い、次世代シーケンス解析によりバーコード配列、すなわち shRNA の解析を行なった。コントロールにと shRNA の存在比を比較し、Venus の発現を低下させる shRNA の解析を行なった。その結果 P5 と比較し P4 には 100 倍以上濃縮されている shRNA が 168 遺伝子、10 以上濃縮されている遺伝子が 369 遺伝子明らかになった。その中には、破骨細胞では報告されていない転写因子が 5 つと破骨細胞での機能が報告されている MAP3K と Vav3 を含むシグナル因子や膜受容体、破骨細胞の骨吸収に関わる MMP9, gelso lin などの分泌因子が含まれていた。さらに、T 細胞の分化や活性化に関わる因子が多く含まれていた。一方、破骨細胞分化で働くことが報告されている Fos, Jun, Nfatc1 の shRNA は P5 と比較し P4 で 2 倍から 4 倍程度の濃縮が見られた。P4 で多く見られた遺伝子の破骨細胞分化における発現と shRNA ノックダウンの作用を調べた結果、いくつかの遺伝子では RANKL で発現が誘導されノックダウンにより分化が抑制された。

以上のことから、Venus レポーター細胞と shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングにより、破骨細胞分化制御に関わる新たな候補遺伝子を明らかにすることが出来た。現在これらの分子の詳細な機能の解析を行なっている。このレポーター細胞の分化の解析は容易で高感度であることから、shRNA ライブラリーを用いた実験のみならず、破骨細胞の分化や骨吸収を阻害する物質のスクリーニング等にも応用できると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

久木田明子

1. Generation mechanism of RANKL⁺ effector memory B cells: its relevance to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Ota Y., Niino H., Ota S., Ueki N., Tsuzuki H., Nakayama T., Mishima K., Higashioka K., Jabbarzadeh-Tabrizi S., Mitoma H., Akahoshi M., Arinobu Y., Kukita A., Yamada H., Tsukamoto H., Akashi K. *Arthritis Res. Ther.* 18(1)2016 (査読有)
2. Membrane Nanotube Formation in Osteoclastogenesis. Kukita T., Takahashi A., Zhang J-Q., Kukita A. *Methods. Mol. Biol.* 1313 p193-202 2015(査読有)
3. Regulation of osteoclastogenesis through Tim-3: possible involvement of the Tim-3/galectin-9 system in the modulation of inflammatory bone destruction. Moriyama K., Kukita A., Li Y-J., Uehara U., Zhang J-Q, Takahashi I., Kukita T. *Lab. Invest.* 94(11)1200-11.2014 (査読有)
4. Mesenchymal Stem Cells Markedly Suppress Inflammatory Bone Destruction in Rats with Adjuvant-Induced Arthritis. Takano T., Li Y-J., Kukita A., Yamaza T., Ayukawa Y., Nomiyama H., Koyano K., Kukita T. *Lab Invest.* 94(3)p286-96 2014 (査読有)
5. Multifunctional properties of RANKL/RANK in cell differentiation, proliferation and metastasis. Kukita A., Kukita T. *Future Oncol.* 9(11):1609-22. 2013 (査読有)
6. Tunneling nanotube formation is essential for the regulation of osteoclastogenesis. Takahashi A., Kukita A., Li Y-J., Zhang JQ, Nomiyama H., Yamaza T., Ayuyama Y., Koyano K., Kukita T. *J. Cell Biochem.* 114(6):1238-47 2013 (査読有)
7. Adenosine blocks aminopterin-induced suppression of osteoclast differentiation. Teramachi J., Kukita A., Qu P-F., Wada N., Li Y-J., Kukita T. *J. Bone Miner. Metab.* 31(1)64-70 2013 (査読有)
8. Nordihydroguaiaretic acid inhibition of NFATc1 suppresses osteoclastogenesis and arthritis bone destruction in rats. Li Y-J., Kukita A., Watanabe T., Takano., Qu P-F., Sanematsu K., Ninomiya Y., Kukita T. *Lab. Invest.* (12):1777-87. 2012 (査読有)
9. Characterization and identification of subpopulations of mononuclearpreosteoclasts induced by TNF- α in combination with TGF- β in rats. Matsubara R., Kukita T., Ichig Y., Takigawa I., Qu P-F., Funakubo N., Miyamoto H., Nonaka K., Kukita A. *PLoS One* 2012 (査読有)
10. Infection of RANKL-primed RAW-D macrophages with *Porphyromonas gingivalis* promotes osteoclastogenesis in a TNF- α -independent manner. Kukita A., Ichig Y., Takigawa I., Watanabe T., Kukita T., Miyamoto H. *PLoS One* 7(10):2012 (査読有)
11. The human apoptosis inhibitor NAIP induces pyroptosis in macrophages infected with *Legionella pneumophila*. Katagiri N, Shobuike T, Chang B, Kukita A., Miyamoto H. *Microbes Infect.* (13):1123-32.2012 (査読有)

12. Stage-specific functions of LRF in the transcriptional control of osteoclast development. Tsuji K., Negishi-Koga T., Sumiya E., Kukita A., Kato S., Maeda T., Pandolfi P-P., Moriyama K., Takayanagi H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(7):2561-6. 2012 (査読有)
13. 破骨細胞の分化と機能を制御する転写因子の役割 久木田明子、菖蒲池健夫、久木田敏夫 **化学と生物**、解説 50 (7) 488-497 2012 (査読無)
- 久木田敏夫
14. Interferon-gamma improves impaired dentinogenic and immunosuppressive functions of irreversible pulpitis-derived human dental pulp stem cells. Sonoda S, Yamaza H, Ma L, Tanaka Y, Tomoda E, Aijima R, Nonaka K, Kukita T., Shi S, Nishimura F, Yamaza T. *Sci Rep*. 2016 (査読有)
15. Involvement of CXCL14 in osteolytic bone metastasis from lung cancer. Takiguchi S, Korenaga N, Inoue K, Sugi E, Kataoka Y, Matsusue K, Futagami K, Li YJ, Kukita T., Teramoto N, Iguchi H. *Int J Oncol*. (4):1316-24 2014 (査読有)
16. Immune therapeutic potential of stem cells from human supernumerary teeth. Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Ma L, Hoshino Y, Nonaka K, Terada Y, Kukita T., Shi S, Yamaza T. *J Dent Res*. 2013 Jul;92(7):609-15. (査読有)

[学会発表](計 18件)

国内学会

1. POZ-ZF 転写制御因子 LRF/OCZF の破骨細胞の分化と機能における役割 久木田明子、徐祥赫、菖蒲池健夫、武智香織、古賀貴子、白木誠、蒲原麻菜、久木田敏夫、高柳広第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会合同大会(ワークショップ)(神戸) 2015年12月1-4日
2. OCZF (Zbtb7a) タンパク質の破骨細胞分化における発現誘導とその機能の解析 久木田明子、徐祥赫、久木田敏夫 第

- 57回歯科基礎医学会(新潟)2015年9月11-13日
3. Galectin9による破骨細胞分化制御メカニズムの解明:NFATc1の発現を抑制する転写因子 MafB 及び IRF-8 の関与 久木由香里、上原範久、久木田明子、久木田敏夫 第33回日本骨代謝学会(東京)2015年7月23-25日
 4. Novel Role of Nedd4 adaptor protein, Pmepa1 in the differentiation and function of osteoclasts. Xianghe X., Funakubo N., Shiraki M., Kukita T., Kukita A. 第33回日本骨代謝学会(東京)2015年7月23-25日
 5. 関節リウマチの骨破壊に寄与する RANKL 発現エフェクターB細胞の機能解析 廣崎友里、新納宏昭、大田俊一郎、植木尚子、中山剛志、三嶋浩司、猪口翔一郎、高木綾子、中川仁、中野翔太、押領司大助、綾野雅宏、上田彰、久本仁美、田中淳、三苫弘喜、赤星光輝、有信洋二郎、山田久方、久木田明子、塚本浩、赤司浩一 第59回日本リウマチ学会総会(名古屋)2015年4月23-25日
 6. 網羅的遺伝子発現解析による破骨細胞分化に関わる遺伝子の同定及びその発現機能解析 舟久保立、久木田敏夫、徐祥赫、中村誠司、久木田明子 第56回歯科基礎医学会(福岡)2014年9月
 7. 細胞外マトリックス分子ラミニン332による破骨細胞分化制御とJNKシグナルの関与 上原範久、久木田明子、保田尚孝、久木田敏夫、第32回日本骨代謝学会(大阪)2014年7月24日
 8. 破骨細胞の分化を測定できる蛍光レポーター細胞株の作成と破骨細胞分化解析への応用 久木田明子、徐祥赫、白木誠、菖蒲池健夫、久木田敏夫 第13回西日本骨・関節関連疾患懇話会(福岡)2014年7月5日
 9. 炎症抑制因子ガレクチン9の膜表面受容体 Tim-3 を介した破骨細胞形成制御 森山加奈子、久木田明子、上原範久、張旌旗、高橋一郎、久木田敏夫 第55回歯科基礎医学会(岡山)2013年9月
 10. RANKLにより Venus を発現誘導するマクロファージレポーター細胞株の作成と破骨細胞分化の解析 久木田明子、久木田

- 敏夫 第 55 回歯科基礎医学会 (岡山) 2013 年 9 月
11. 網羅的遺伝子発現解析による破骨細胞の分化と融合に関わる遺伝子の探索 舟久保立、久木田敏夫、松原麗、石丸和也、中村誠司、久木田明子 第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡) 2012 年 12 月 11-14 日
 12. ガレクチン 9 による破骨細胞分化制御 成松加奈子、李銀姫、久木田明子、屈鵬飛、渡邊敏之、高橋一郎、久木田敏夫 第 54 回歯科基礎医学会総会 (郡山) 2012 年 9 月 14-16 日
 13. デオキシアデノシンはメソトレキセートによる破骨細胞分化阻害及び炎症性骨破壊抑制を解除する 屈鵬飛、久木田明子、李銀姫、渡邊敏之、成松加奈子、久木田敏夫 第 54 回歯科基礎医学会総会 (郡山) 2012 年 9 月 14-16 日
 14. 細菌感染によって誘導されるマクロファージからの破骨細胞分化促進作用に TNF α は必要か? 久木田明子、市木佑佳、瀧川一平、渡邊敏之、久木田敏夫 第 30 回日本骨代謝学会 (東京) 2012 年 7 月 19-21 日
 15. ノルジヒドログアイナレチン酸(NDGA)による人肺癌骨転移制御 李銀姫、渡邊敏之、高橋明、久木田明子、瀧口総一、井口東朗、久木田敏夫 第 30 回日本骨代謝学会 (東京) 2012 年 7 月 19-21 日

国際学会

16. Establishment of mouse macrophage reporter cell lines which express fluorescent properties under the control of cathepsin K promoter and analysis of osteoclast differentiation Kukita A., Funakubo N., Shobuike N., Kukita T. **Joint meeting of the international Bone and Mineral Research and the Japanese Society for Bone and Mineral Research** May 28-June 1 2013 (Kobe)
17. Identification and functional analysis of osteoclast-specific genes differentially expressed in mononuclear preosteoclasts and multinuclear osteoclasts. Funakubo

- N., Kukita T., Nakamura S., Kukita A. **Joint meeting of the international Bone and Mineral Research and the Japanese Society for Bone and Mineral Research** May 28-June 1 2013 (Kobe)
18. A possible regulation of osteoclast differentiation by galectin-9. Moriyama K., Kukita A., Li Y-J., Qu P-F., Takahashi I., Kukita T. **Joint meeting of the international Bone and Mineral Research and the Japanese Society for Bone and Mineral Research** May 28-June 1 2013 (Kobe)

〔図書〕 (計 1 件)

1. Involvement of deoxyadenosine and adenosine deaminase in the Methotrexate-induced suppression of inflammatory bone destruction. Qu P-F., Kukita A. Li Y-J., Moriyama K., Lei L., Kukita T. In "Adenosine Receptors: Pharmacology, Functions and Therapeutic Aspects" Ed. Kasandra Warrick, NOVA hardcover edited collection. NOVA Science Publisher, N.Y. USA p143 164 2015

〔産業財産権〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久木田 明子 (Kukita Akiko)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号: 30153266

(2) 研究分担者

久木田 敏夫 (Kukita Toshio)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号: 70150464

(3) 連携研究者

西岡 憲一 (Kenichi Nishioka)
佐賀大学・医学部・講師
研究者番号: 80370120

久原 哲 (Satoru Kuhara)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 00153320