

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08426

研究課題名(和文)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

研究代表者

北澤 理子(KITAZWA, 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞最終分化には、前駆細胞上の受容体RANK(receptor activator of NF- κ B)と骨芽細胞が供給するRANK ligand (RANKL)との結合が必須である。私どもは、受容体RANKの新規Rsplicing variant (vRANK)を見い出した。RAW細胞への強制発現では、破骨細胞抑制効果を示した。vRANKの全身的強制発現の遺伝子改変マウスでは死亡率が高かった。組織特異的強制発現として単球系LysM-Cre+/vRANKでは、培養系の破骨細胞形成が15%減少し、10～23週令ではMicro-CT解析で骨量増加傾向を認め、vRANKの増骨効果が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Receptor activator of NF- κ B (RANK) is a member of the TNF receptor family expressed in osteoclast precursors, and RANK-RANK ligand signaling is essential for osteoclastogenesis. We have identified a novel alternative splicing variant of RANK gene (vRANK) encoding the short molecule. When overexpressed in vitro, vRANK in RAW264.7 cells decreased the formation of osteoclasts. When systemically overexpressed in vivo, the CAGcre+/vRANK mouse showed high fatality. When selectively overexpressed among the monocyte-macrophage lineage, the LysMcre+/vRANK mouse showed decreased osteoclastogenesis in ex vivo culture of spleen cells, and increased bone mass measured by micro CT. These results suggest that vRANK is a novel bioactive peptide that might reduce the number of osteoclasts

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 遺伝子改変動物

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治療では、破骨細胞の制御が重要となっている。破骨細胞の最終分化には、破骨細胞分化因子 RANKL と、前駆細胞の受容体 RANK との結合が不可欠である。私どもは、受容体 RANK の転写制御について研究を進め、新規 splicing variant である vRANK を見だし、その機能を解析する研究を行ってきた。

2. 研究の目的

(1) マウス RANK 遺伝子プロモータ領域のメチル化制御の解析

RANK 遺伝子の転写翻訳開始部位近傍の CpG メチル化が、遺伝子発現制御と破骨細胞形成に及ぼす影響を検討する。

(2) 受容体 RANK の新規変異体 vRANK の機能解析

ヒト、マウスの RANK は 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。vRANK の機能を解析するために、培養細胞における in vitro の作用と、vRANK を強制発現する遺伝子改変動物を作製して in vivo での破骨細胞形成や骨量へ効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス RANK 遺伝子プロモータ領域のメチル化制御の解析

マウス前破骨細胞 RAW 細胞は受容体 RANK を発現し、可溶性 RANKL の添加で成熟破骨細胞に分化する。RAW 細胞の長期培養継代を行い、RANK 遺伝子プロモータ領域の CpG メチル化の集積を確認し、破骨細胞形質遺伝子発現や破骨細胞形成の変化を検討した。

(2) 受容体 RANK の新規変異体 vRANK の機能解析

マウス RAW 細胞において、サイトカイン、ホルモン等の vRANK 発現に対する効果を検討した。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。さらに、組織特異的発現する遺伝子改変動物 2 系統を作製し、vRANK の破骨細胞特異的発現、マクロファージ系列特異的発現が、破骨細胞形成やマウス個体の骨量に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) マウス RANK 遺伝子プロモータ領域のメチル化制御の解析

マウス前駆破骨細胞株 RAW264 の Passage18 (P18) と P40 について、受容体 RANK mRNA 発現と、s-RANKL 添加時の

破骨細胞形成数を比較検討した。RAW 細胞では、継代数依存的に RANK 発現低下を示し、s-RANKL 添加時の破骨細胞形成数や破骨細胞分化形質の TRACP, CTSK の発現低下を認めた。RANK 遺伝子プロモータには TATA-box はなく、4 つの Sp1 site の下流に近接した 4 箇所の転写開始部位があり、その周辺に CpG が集積している。RANK プロモータ領域の CpG メチル化状態について解析すると P40 優位な高率のメチル化を検出した。さらに高継代数の RAW 細胞へのメチル化抑制剤 5-azacitidine 処理では、RANK 発現の回復とともに、破骨細胞形成や TRACP 発現の回復を示した。RAW 細胞の CpG メチル化による受容体 RANK 発現低下が、破骨細胞形成の減少に寄与することを確認した。

(2) 受容体 RANK の新規変異体 vRANK の機能解析

RAW 細胞に対する新規変異型 vRANK の強制発現では、vRANK は受容体としては機能せず、破骨細胞形成への抑制効果を示した。vRANK の遺伝子改変マウスのうち、全身的な強制発現の CAGcre+/vRANK では離乳前死亡が高率で、少数の生存個体は気管支肺炎と心不全を来し、全身栄養状態不良による骨減少を示した。破骨細胞特異的な vRANK 強制発現である RANK-Cre+/vRANK では、破骨細胞数や骨量に変化はなかった。単球マクロファージ系からの強制発現 LysM-Cre+/vRANK では、脾細胞 1 次培養系の破骨細胞形成が 15%減少し、10-23 週令の young adult 個体の Micro-CT 解析で骨量増加傾向を認めた。vRANK は in vivo で破骨細胞形成を軽度抑制し、若干骨量を増加させる作用を示した。

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 11 件)

1) Nishi Y, Kitazawa R, Haraguchi R, Ouhci A, Ueda Y, Kameoka Y, Yamamoto K, Todo Y, Miyaoka H, Kitazawa S. Primary type3 (non-ABC, non-GCB) subtype of extranodal diffuse large B-cell lymphoma of the thyroid bearing no MYD88 mutation by Padlock probe hybridization. Case Reports in Oncology, 査読有 10 (2), 508-514, 2017.

2) Haraguchi R, Kitazawa R, Murashima A, Yamada G, Kitazawa S. Developmental Contribution of Wnt-signal-responsive Cells to Mouse Reproductive Tract Formation. Acta Histochemica et Cytochemica 査読有 50 (4), 127-133, 2017.

3) 北澤理子、北澤莊平. 妊娠授乳関連骨粗鬆症. 病理と臨床, 査読なし 今月の話題, 870-871, vol. 9, 2017

4) Haraguchi R, Kitazawa R, Mori K, Tachibana R, Kiyonari H, Imai Y, Abe T, Kitazawa S. sFRP4-dependent Wnt signal modulation is critical for bone remodeling during postnatal development and age-related bone loss. Scientific Repots, 査読有 2016 Apr 27;6:25198. doi: 10.1038/srep25198.

5) Ariyasu K, Kitazawa R, Haraguchi R, Ueda Y, Kawanami Y, Nishi Y, Kameoka Y, Mizuno Y, Kitazawa S. Inflammatory Fibroid Polyps of Large Bowel with PDGFRA Mutation. J Cell Sci Ther, 査読有 7: 234. doi:10.4172/2157-7013.1000234, 2016.

6) Kawanami Y, Kitazawa R, Haraguchi R, Ueda Y, Nishi Y, Ariyasu K, Mizuno Y, Kitazawa S. Hepatic Sinusoidal Obstruction Syndrome without Preceding Medical Events. Case Reports in Clinical Medicine, 査読有 Vol.05 No.03(2016), Article ID:64674, 4 pages 10.4236/crcm.2016.53019, 2016.

7) 水野洋輔、北澤理子. CPC 解説(第 80 回) 急速な経過をたどった重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の一部検例. 病理と臨床, 査読なし 34 巻 3 号 Page297-301, 2016.

8) Haraguchi R, Kitazawa R, Kitazawa S. Epigenetic regulation of Tbx18 gene expression during endochondral bone formation. Cell and Tissue research, 査読有 359(2):503-512, 2015.

9) Kinomura M, Shimada N, Nishikawa M, Omori K, Jo T, Ueda Y, Notohara K, Kitazawa R, Kitazawa S, Fukushima M, Asano K. Parathyroid hormone-related peptide-producing multiple myeloma and renal impairment: A case report, Internal Medicine, 査読有 54(23): 3029-3033, 2015.

10) Kameoka Y, Kitazawa R, Ariyasu K, Tachibana R, Mizuno Y, Haraguchi R, Kitazawa S. Reactivation of CDX2 in gastric cancer as mark for gene silencing memory. Acta Histochem Cytochem, 査読有 48(4): 115-124, 2015.

11) 北澤莊平、北澤理子. 骨巨細胞腫の原因遺伝子と抗RANKL抗体を用いた治療法の開発, 病理と臨床 今月の話題 査読なし

[学会発表](計 19 件)

1) 北澤理子、原口竜摩、水野洋輔、北澤莊平. 破骨細胞分化因子受容体 RANK の新規変異体 vRANK の解析. 第 106 回日本病理学会総会 2017.4.27-29 東京

2) 原口竜摩、北澤理子、北澤莊平. 体腔上皮に由来する Wnt/ β -カテニンシグナルの子宮発生における役割. 第 106 回日本病理学会総会 2017.4.27-29 東京

3) 森礼子、北澤理子、木内理奈、水野洋輔、原口竜摩、北澤莊平. 骨巨細胞腫ホルマリン固定パラフィン包埋検体を抗原とするモノクローナル抗体 2H1 の樹立と認識抗原の解析. 第 106 回日本病理学会総会 2017.4.27-29 東京

4) 木内理奈、北澤理子、森礼子、水野洋輔、原口竜摩、北澤莊平. 骨巨細胞腫ホルマリン固定パラフィン包埋検体を抗原とするモノクローナル抗体 1G7 の樹立と認識抗原の解析. 第 106 回日本病理学会総会 2017.4.27-29 東京

5) 村田夕紀、北澤莊平、原口竜摩、北澤理子. マウス前破骨細胞株 RAW 細胞における受容体 RANK 遺伝子発現調節領域のメチル化と破骨細胞分化能の解析. 第 106 回日本病理学会総会 2017.4.27-29 東京

6) 北澤理子、原口竜摩、小林泰浩、北澤莊平. 破骨細胞分化因子受容体 RANK の新規変異体 vRANK の機能解析. 第 35 回日本骨代謝学会学術総会 2017.7.27-29 福岡

7) 片山英司、明賀さつき、今井美奈、北澤理子、北澤莊平、頭蓋骨に発生した骨巨細胞腫の細胞組織学的検討. 第 58 回日本組織細胞化学会総会 2017.9.23-24 愛媛

8) Kitazawa R, Haraguchi R, Kitazawa S. Function of novel splicing variant of receptor activator of NF- κ B (vRANK). ASBMR2016 Atlanta, Georgia USA. 9.16-19, 2016.

9) Haraguchi R, Kitazawa R, Kitazawa S. Functional role of hedgehog signaling in osteoclast lineage. ASBMR2016 Atlanta, Georgia USA. 9.16-19, 2016.

10) 北澤理子、原口竜摩、北澤莊平. 破骨細胞分化因子受容体 RANK の新規変異体 vRANK の解析(Identification and analysis of function of a novel splicing variant of receptor activation of NF- κ B). 第 105 回日

本病理学会総会 2016.5.12-14 仙台

11) 北澤理子、原口竜摩、水野洋輔、上田康雄、小林泰浩、北澤荘平. 破骨細胞分化因子受容体 RANK の新規変異体 vRANK の機能解析. 第 34 回日本骨代謝学会学術総会 2016.7.20-23 大阪

12) 原口竜摩、北澤理子、今井祐紀、北澤荘平. 破骨細胞系列におけるヘッジホッグシグナル伝達系の機能解析. 第 34 回日本骨代謝学会学術総会 2016.7.20-23 大阪

13) Kitazawa R, Haraguchi R, Kitazawa S. Function of novel splicing variant of receptor activator of NF- κ B. ASBMR2015 Seattle, WA, USA. 9.9-12, 2015.

14) Haraguchi R, Kitazawa R, Kitazawa S. The role of Wnt signal modulator, sFRP4, in bone formation and metabolism. ASBMR2015 Seattle, WA, USA. 9.9-12, 2015.

15) 北澤理子、原口竜摩、水野洋輔、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 104 回日本病理学会総会 2015.4.30-5.2 名古屋.

16) 原口竜摩、北澤理子、北澤荘平. 長管骨伸長プロセスにおけるヘッジホッグシグナル経路の役割. 第 104 回日本病理学会総会 2015.4.30-5.2 名古屋

17) 北澤理子、原口竜摩、水野洋輔、小林泰浩、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 33 回日本骨代謝学会学術総会 2015.7.23-25 東京.

18) 原口竜摩、北澤理子、今井祐紀、北澤荘平. Wnt シグナル調節因子 sFRP-4 の骨形成・骨代謝プロセスにおける役割. 第 33 回日本骨代謝学会学術総会 2015.7.23-25 東京.

19) 原口竜摩、北澤理子、北澤荘平. シンボジウム:細胞の分裂・分化、細胞系譜と組織形成 ヘッジホッグシグナルを介する成長板を起点とした長管骨発生プロセスの理解. 第 56 回日本組織細胞化学会総会 2015.10-3-4 大阪

〔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

原口 竜摩 (Haraguchi, Ryuma)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 00423690

水野 洋輔 (Mizuno, Yosuke)
愛媛大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 90748021

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし