

機関番号：32701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580330

研究課題名 (和文) 破骨細胞分化に及ぼす TGF- β ファミリーと Mitf の役割研究課題名 (英文) Role of the TGF- β family and Mitf during osteoclastogenesis

研究代表者

村上 賢 (MURAKAMI MASARU)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：80271360

研究成果の概要 (和文)：多様な生物活性をもつ TGF- β ファミリーと細胞特異的転写因子である Mitf に注目し、破骨細胞分化過程における分子機序の一端を明らかにすることを目的とした。RANKL 刺激による破骨細胞分化過程において、Mitf-E アイソフォームの発現が重要であった。この分化過程における TGF- β ファミリーの添加では、Mitf-E と各種分化マーカー遺伝子の顕著な発現増加がみられ、多核化、巨大化した破骨細胞が認められた。TGF- β ファミリーによる破骨細胞分化誘導刺激は、発現増加した Mitf-E を介して部分的に制御されているのかもしれない。

研究成果の概要 (英文)：We explored the role of TGF- β family that regulates a broad range of biological processes and Mitf that is a tissue-specific transcription factor, in the process of RANKL-induced osteoclast formation. This study indicates that Mitf-E plays a crucial role in osteoclastogenesis, and that the TGF- β family positively regulates the expression of Mitf-E as well as osteoclast marker genes. Stimulatory activity of the TGF- β family on osteoclastogenesis may be partly elicited through up-regulation of Mitf-E.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生化学・分子生物学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学; 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：TGF- β ファミリー、Mitf、遺伝子発現制御、破骨細胞分化、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物が繰り広げる生命現象は、大変複雑だが、ほとんど全ての細胞内で働いている情報伝達経路は、MAP kinase 経路、Protein kinase A 経路、Smad 経路、JAK/STAT 経路をはじめとした 10-20 種類程度に限られている。これは、未だ発見されていない情報伝達経路が数多く残されていることを意味しているのではなく、限定された細胞内情報伝達経路が時空間的制御のもと、繰り返し利用される

ことを通して、様々な機能を発揮すると考えられている。つまり、細胞の種類に関わらない普遍的な情報伝達経路の多彩な機能こそが、多細胞生物固有の営みを可能にしていると考えられる。一方で、細胞にはその細胞特異的に発現し、特有の機能を発揮する因子も存在する。代表者らは、普遍的な情報伝達機構は、細胞特異的な情報伝達機構と相互に関連しあって細胞特異的な機能を惹起するという作業仮説のもと研究を推進している。

動物の様々な生命現象を制御する重要なサイトカインである TGF- β ファミリーは、細胞内に普遍的に存在する情報伝達因子 Smad を介して様々な細胞を分化成熟させる。代表者らは、生命現象の主要な普遍的情報伝達経路の一つである、この Smad 経路 (TGF- β ファミリー経路) に注目し、詳細な解析を行ってきた。さらに、破骨細胞、色素細胞、マスト細胞など限定された細胞において特異的に発現し、細胞分化にかかわる転写因子である Microphthalmia-associated transcription factor (Mitf) に注目し、色素細胞やマスト細胞における Mitf isoform の転写活性、ならびに Mitf isoform と Smad 経路の関係について検討してきた。その結果、各 Mitf isoform が異なる転写活性を示すこと、Mitf と Smad は機能的・物理的に相互作用し、その関係は、isoform ならびに標的遺伝子特異的であることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

これまで知られている TGF- β ファミリーならびに Mitf の主要な役割は、細胞の分化制御に関するものである。したがって、上述の細胞の種類に関わらない普遍的情報伝達経路と細胞特異的因子は細胞分化の過程において最も強く相互作用すると考えられる。しかしながら、代表者らがこれまでに調べてきた細胞は、既に完全に分化しているか、あるいはほとんど最終分化を迎えた細胞であり、真の生物学的意味における両者の関係については、依然として不明である。免疫担当細胞であるマスト細胞の前駆細胞を用いてその成熟における TGF- β ファミリーと Mitf の役割を検討してきた。本研究では、これらの因子を発現し、形態的にも機能的にも分化段階を明確に捉えることができる破骨細胞分化に注目して、TGF- β ファミリー (普遍的因子 Smad) と細胞特異的転写因子 Mitf の相互作用、細胞内情報伝達の分子機序の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

RAW264 細胞などマクロファージ系培養細胞株を用いて、RANKL 処理による破骨細胞様細胞への分化誘導において Mitf の遺伝子発現や応答遺伝子発現制御機構を調べるとともに、分化過程における TGF- β ファミリー (代表的 ligand である TGF- β 、アクチビン、BMP) 刺激の影響を形態学的、機能的 (骨吸収能など) 及び細胞内の分子変化を遺伝子発現とタンパク質レベルで解析した。

細胞培養技術、クローニング技術、発現系ベクターの構築、real-time PCR 定量解析、DNA シークエンス法、レポーターアッセイ、siRNA による遺伝子ノックダウン法、Western blot 法などの手法を利用した。

4. 研究成果

破骨細胞様細胞への分化過程において、各 Mitf アイソフォーム遺伝子に特異的な RT-PCR 解析を行ったところ、Mitf-E アイソフォームの特徴的な発現があることがわかった (図 1)。

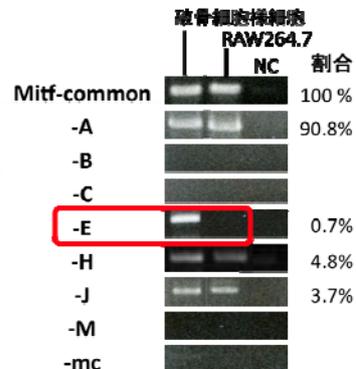


図 1. RAW264.7 細胞における破骨細胞分化過程における Mitf-E の特異的発現

RANKL による破骨細胞分化誘導において、TGF- β ファミリー刺激を行うと、Trap 染色による形態学的観察では、BMP とは異なり、TGF- β やアクチビン刺激によって、より顕著な多核の融合した巨大な破骨細胞様細胞が認められた (図 2)。

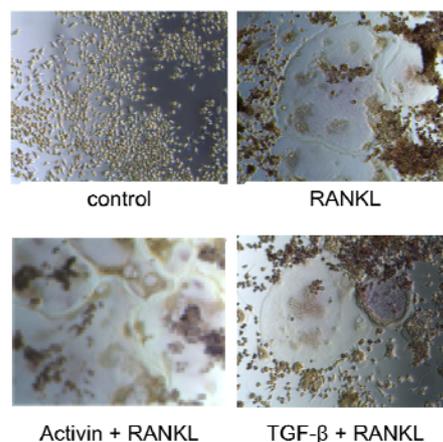


図 2 TGF- β ファミリー刺激による破骨細胞の巨大化

また、各種破骨細胞分化マーカー遺伝子と Mitf-E mRNA の定量的 real-time RT-PCR 解析では、アクチビン刺激時に Acp5、Ctsk、Oscar などの遺伝子並びに Mitf-E がより多く発現していた (図 3)。さらに、細胞融合に関連すると考えられる Itgb3 遺伝子の発現も有意に増加した。これらと同様の現象は、マウス骨髄由来細胞を用いた、破骨細胞様細胞へ再現性よく分化させる初代培養系でもみられた。Mitf-E の役割を調べるために、RANKL 刺激による破骨細胞分化誘導において siRNA による

Mitf-E ノックダウンを行うと、各種破骨細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現量が低下しているだけでなく、破骨細胞様細胞の形成数が有意に減少するなど形態学的な分化抑制も確認した。アクチビンによる破骨細胞分化誘導刺激は、発現増加した Mitf-E を介して部分的に制御されているのかもしれない。

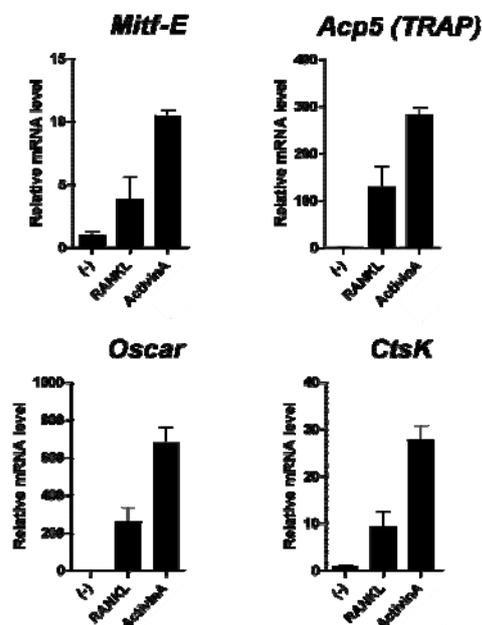


図3 RANKL 誘導破骨細胞分化における Activin 刺激による Mitf-E と各種破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現

各種破骨細胞分化マーカー遺伝子のプロモーター領域を含むレポータープラスミドを構築し、HepG2 細胞を用いたレポーターアッセイを試みたが、Mitf アイソフォームによる発現応答の有意な相違は認められなかった。RAW264.7 細胞で恒常的に Mitf-E を発現する安定株を作製し、破骨様細胞誘導実験を行ったが、形態や分化マーカー遺伝子発現に特に大きな変化はみられなかった。各種細胞内シグナル伝達因子 (Smad, ERK など) のリン酸化を調べたが、有意な変化は見つけられなかった。

昨年、他グループによって破骨細胞分化における Mitf-E の重要性が報告されたが、TGF- β ファミリーとの相互作用について調べた例はなく、本研究は意義がある。Smad と Mitf の相互作用およびこれらの応答遺伝子の発現制御機序について今後さらに詳細な解析を行う。その他、本研究遂行過程で、RAW264 細胞の TGF- β の刺激は、通常の細胞内情報伝達経路である AR-Smad のリン酸化の他に、BR-Smad のリン酸化も予期せず起こることがわかった。この点について、今後 TGF- β の多様な生物活性を説明する派生研究への展開も図る。

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 4 件)

- ① Furutani Y., Umemoto T., Murakami M., Matsui T. and Funaba M. Role of endogenous TGF- β family in myogenic differentiation of C2C12 cells. *J. Cell. Biochem.* 112(2): 614-624. 2011.
- ② Murakami M., Suzuki M., Nishino Y. and Funaba M. Regulatory expression of genes related to metastasis by TGF- β and activin A in B16 murine melanoma cells. *Mol. Biol. Rep.* 37: 1279-1286. 2010.
- ③ Furutani Y., Murakami M. and Funaba M. Differential responses to oxidative stress and calcium influx on expression of the transforming growth factor- β family in myoblasts and myotubes. *Cell Biochem. Funct.* 27(8): 578-582. 2009.
- ④ Murakami M., Kawachi H., Ogawa N., Nishino Y. and Funaba M. Receptor expression modulates the specificity of transforming growth factor- β signaling pathways. *Genes Cells* 14(4): 469-482. 2009.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 梅本岳尚, 村上 賢, 舟場正幸, 松井 徹. 筋分化における内因性 BMP4 の役割. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会. 神戸市. 2010 年 12 月
- ② 浅井久美子, 舟場正幸, 村上 賢. RANKL 刺激による破骨細胞分化過程における Mitf-E と Activin の役割. 第 83 回日本生化学会大会 合同大会. 神戸市. 2010 年 12 月
- ③ 大石 亮, 舟場正幸, 村上 賢. Mitf は C2C12 細胞の筋分化において細胞融合を促進する. 第 83 回日本生化学会大会 合同大会. 神戸市. 2010 年 12 月
- ④ 大石 亮, 舟場正幸, 村上 賢. Expression of Mitf isoforms in mouse skeletal muscle and during myogenesis. 第 32 回日本分子生物学会. 横浜市. 2009 年 12 月
- ⑤ 古谷勇馬, 村上 賢, 舟場正幸, 松井 徹. The role of TGF- β family in myogenic differentiation in C2C12 cells. 第 32 回日本分子生物学会. 横浜市. 2009 年 12 月
- ⑥ 大石 亮, 舟場正幸, 村上 賢. マウス臓器における Tgf- β ファミリー受容体の発現. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会. 神戸. 2008 年 12 月
- ⑦ 村上 賢, 小川健司, 舟場正幸. TGF- β による BMP-regulated Smad のリン酸化と BMP

による TGF- β /activin-regulated Smad のリン酸化. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会. 神戸. 2008 年 12 月

⑧ Funaba M., Murakami M. and Ogawa K. Modulation of signal specificity of the TGF- β family related to the receptor expression. 48th The American Society for Cell Biology Annual Meeting. 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 賢 (MURAKAMI MASARU)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：80271360

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

舟場 正幸 (FUNABA MASAYUKI)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：40238655

西野 佳以 (NISHINO YOSHII)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号：00271544