

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号： 14501
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2009～2011
 課題番号： 21590419
 研究課題名（和文） 骨髄単球細胞の分化過程における破骨細胞分化因子受容体(RANK)の発現制御
 研究課題名（英文） Regulatory Mechanism of RANK Gene Expression during Osteoclastic Differentiation of Bone Marrow Macrophage/Monocyte Lineage
 研究代表者
 北澤 理子 (KITAZAWA RIKO)
 神戸大学・大学院医学研究科・特命准教授
 研究者番号： 00273780

研究成果の概要（和文）：

本研究計画は、骨髄単核細胞から破骨細胞への分化のメカニズムを解明する目的で、破骨細胞分化因子の受容体RANKの発現制御について解析を行った。破骨細胞分化には、RANKL-RANK結合が必須であるが、adaptor分子TRAFのリン酸化を経て転写因子PU.1, MITF, NFATc1, AP-1はカテプシンKやTRACPなどの破骨細胞形質遺伝子の発現を誘導する。本研究計画ではPU.1, MITFに加えて、NFATc1やc-Fosが受容体RANK自体の発現に必要であることを明らかにした。さらに、RANKLはNFATc1を介して受容体RANKを正に制御するのみならず、前破骨細胞RAWへのRANKL投与により、RANKのsplicing variant(vRANK)が生じることを示した。vRANKは破骨細胞の分化や生存(抗アポトーシスシグナル)に対して拮抗的な作用を有することから、破骨細胞を抑制する治療戦略に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Receptor activator of NF-kappaB (RANK) expressed on osteoclasts and their precursors is a receptor for RANK Ligand (RANKL). RANKL-RANK interaction induces genes essential for the differentiation of osteoclasts through the binding of NFATc1 to target gene promoters. We have cloned a 6-kb fragment containing the 5'-flanking region of the mouse RANK gene and have analyzed the binding elements such as PU.1 (-480), and MITF (-100). Here, we showed the regulatory mechanism of RANK gene transcription through the NFAT (-370) and CRE/AP-1 binding sites (-240). Furthermore, we have identified a novel alternative splicing variant of mouse RANK gene that contains a new intervening exon between exon 1 and exon 2 of mouse full-length RANK mRNA, and shown that variant RANK is a novel osteoclast suppressor that reduces the number of RANKL-induced mature osteoclasts mainly by negating the anti-apoptotic effect of RANKL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

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、骨髄単球系細胞に由来する多核巨細胞で、骨吸収に特化した細胞である。破骨細胞の最終分化には、骨芽細胞が供給する膜結合型サイトカイン RANKL と、破骨細胞前駆細胞上の受容体 RANK の結合が不可欠である。RANKL-RANK 結合以降の細胞内シグナルや、RANKL 発現制御については、多くの研究成果が報告されてきたが、受容体 RANK の発現制御に関する研究は乏しく、骨粗鬆症や癌の骨転移などの骨溶解病変の治療戦略を検討する上で、受容体 RANK の発現制御は重要である。私どもは、マウス RANK 遺伝子プロモータ領域をクローニングして K 解析を行い、血球分化に関わる転写因子 PU.1 や MITF が RANK 転写に関与することを報告し、引き続き、重要な応答配列に着目して研究を行った。

2. 研究の目的

- (1) マウス RANK 遺伝子プロモータ領域の NFAT 結合配列の解析
- (2) マウス RANK 遺伝子プロモータ領域の CRE/AP-1 結合配列の解析
- (3) RANK splicing variant の解析

3. 研究の方法

- (1) マウス RANK 遺伝子プロモータ領域の NFAT 結合配列(-370)の解析
受容体 RANK 発現に対する RANKL の効果を検討するために、マウス骨髄系細胞 M1, primary culture 骨髄細胞, 前破骨細胞株 RAW264 に RANKL を投与して real time PCR で RANK 発現を解析し、カルシニューリン阻害剤 FK506 前処理の効果を検討した。NFATc1 発現ベクターや NFATc1 siRNA を導入して、RAW 細胞の RANK mRNA 発現に対する効果を調べた。マウス RANK 遺伝子プロモータ領域の 3 カ所の NFAT 結合候補配列の oligo probe を作成して gel shift assay を行った。各候補配列に変異を導入した promoter construct を用いて、転写活性を比較検討した。
- (2) マウス RANK 遺伝子プロモータ領域の CRE/AP-1 結合配列(-240)の解析
受容体 RANK 発現に関する PKA, PKC シグナルの関与を調べるために、RAW 細胞を Forskolin, H89, PMA, Calphostin C で処理して、RANK mRNA 発現を realtime PCR で解析した。c-Fos の関与を調べるために、発現ベクターや siRNA の導入実験を行った。RANK 遺伝子プロモータ領域の(-240)付近の配列を含む oligo probe を作成して gel shift assay を行うとともに、PMA 処理、無処理の RAW 細胞に対し (-240)を包含する primer を設定して抗 c-Fos 抗体を用いた ChIP assay を行った。さらに(-240)に変異を導入した promoter construct

を作成して、転写活性を検討した。

(3) RANK splicing variant の解析

マウス前破骨細胞株 RAW264 細胞を RANKL 処理すると、full length の RANK mRNA 発現が亢進するが、この時同時に発現する短い splicing variant (vRANK) をクローニングし、塩基配列を解析した。各種サイトカインや増殖因子の vRANK 発現に対する効果を検討した。vRANK の発現局在を調べるために、Tag を付けた vRANK 発現ベクターを RAW 細胞に導入して免疫組織染色を行うとともに、培養上清、培養細胞の細胞質分画と核分画について Western blot で検討した。vRANK の機能的意義を解析するために、vRANK を RAW 細胞に導入して、RANKL 添加時の破骨細胞形成や TRACP など破骨細胞分化形質の発現を評価するとともに、vRANK 強制発現の apoptosis に対する効果を検討した。

4. 研究成果

(1) マウス RANK 遺伝子プロモータ領域の NFAT 結合配列の解析

マウス骨髄細胞、前破骨細胞 RAW264 細胞に対する RANKL 処理は、RANK mRNA 発現を促進するが、その促進効果は、カルシニューリン阻害剤 FK506 で抑制され、NFATc1 siRNA にも相殺された。このことから、RANKL は NFATc1 を介して受容体 RANK 発現を促進する positive feedback 機構の存在が示唆された。マウス RANK 遺伝子プロモータ領域の 3 カ所の NFAT 結合候補配列に関して、EMSA assay と変異を導入したプロモータコンストラクトの transfection study を行い、3 カ所のうち最下流の(-370)部位が機能的な NFAT 結合配列であることを明らかにした。

(2) マウス RANK 遺伝子プロモータ領域の CRE/AP-1 結合配列の解析

マウス前破骨細胞 RAW264 の RANK 発現に対して、PKA agonist の Forskolin の効果はないが、PKC agonist の PMA 処理にて発現促進を示し、PKC 阻害剤にて拮抗されることから、RANK 発現には PKC 経路が関与することが示唆された。c-fos siRNA による c-fos の knock down は RANK mRNA を抑制し、c-fos 強制発現により RANK mRNA が増加することから、c-fos が RANK 転写を正に制御することを示した。RANK 遺伝子プロモータ領域(-240)付近の配列について、EMSA で有意な蛋白 DNA 結合を認め、抗 c-fos 抗体で blockshift を示すことから、同部位には AP-1 転写因子として c-fos が結合することが示唆された。CREB 関連の抗転写因子抗体では、結合を示唆する所見はなかった。ChIP assay で PMA 処理した RAW cell における結合を確認するとともに、

RANK プロモータコンストラクトにおける AP-1 結合部位の変異導入実験を施行して、(-240)が機能的な AP-1 結合配列であることを示した。

(3) RANK splicing variant の解析

マウス前破骨細胞 RAW264 を RANKL 処理して、RANK exon 1 の後に 170bp の intron が挿入された新規 splicing variant を分離した。変異型 RANK では exon2 に stop codon が生じ、短い翻訳蛋白は RANK 受容体として機能せず、in vitro で破骨細胞分化への抑制効果を示した。RANKL は NFATc1 を介して受容体 RANK を正に制御するのみならず、前破骨細胞 RAW への RANKL 投与により、RANK の splicing variant(vRANK)が生じることを示した(業績 4)。vRANK は破骨細胞の分化や生存(抗アポトーシスシグナル)に対して拮抗的な作用を有することから、破骨細胞を抑制する治療戦略に繋がる可能性が示唆された。

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 17 件) (総計 21 件)

- ① 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**, in press, 2012, 査読有り
- ② 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**, in press, 2012, 査読有り
- ③ Wang Y, Liul 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**, 50, 409-419, 2012, 査読有り
- ④ Mukai S, Kitazawa R, Ishii J, Kondo T, Hakozaiki A, Hosiuchi K, Kiyoshi M, Kitazawa S. Identification and analysis of function of a novel splicing variant of mouse receptor activator of NF-kappaB. **Mol Cell Biochem** 350, 29-38, 2011, 査読有り
- ⑤ Epigenetic Alteration by DNA Promoter Hypermethylation of Genes Related to Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Signaling in Cancer (review). Sann Sanda Khin, Kitazawa R, Kondo T, Idei Y, Fujimoto M, Haraguchi R, Mori K, Kitazawa S. **Cancers**, 3, 982-993, 2011, 査読有り
- ⑥ Hisa I, Inoue Y, Hendy GN, Canaff L, Kitazawa R, Kitazawa S, Komori T, Sugimoto T, Seino S, Kaji H. Parathyroid hormone-responsive Smad3-related factor, Tmem119, promotes osteoblast differentiation and interacts with the bone morphogenetic protein-Runx2 pathway. **J Biol Chem**, 286, 9787-9796, 2011, 査読有り
- ⑦ Takahashi M, Okimura Y, Iguchi G, Nishizawa H, Kitazawa R, Fujimoto W, Miki T, Minami K, Takahashi K, Zolotaryov FN, Hong KS, Kiyonari H, Oshima N, Aizawa S, Kaji H, Kitazawa S, Kasuga M, Chihara K, Seino S, Takahashi Y. Chemerin regulates b-cell function in mice. **Scientific Reports**, 1, Article number: 123 doi:10.1038/srep00123, 2011, 査読有り
- ⑧ Goto S, Fujii H, Kono K, Nakai K, Hamada H, Yamato H, Shinohara M, Kitazawa R, Kitazawa S, Nishi S, Fukagawa M. Carvedilol ameliorates low-turnover bone disease in nonobese type 2 diabetes. **Am J Nephrol** 34, 281-290, 2011, 査読有り
- ⑨ Wang Y, Liul 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. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 induces bone loss at unloading by promoting Osteoclastogenesis. **Bone**, 50, 409-419, 2012, 査読有り
- ⑩ Komaba H, Goto S, Fujii H, Hamada Y, Kobayashi A, Shibuya K, Tominaga Y, Otsuki N, Nibu K, Kitazawa R, Fukagawa M. Depressed expression of Klotho and FGFR1 in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients. **Kidney Int** 77, 232-238, 2010, 査読有り.
- ⑪ Fujii H, Kono K, Nakai K, Goto S, Komaba H, Hamada Y, Shinohara M, Kitazawa R, Kitazawa S, Fukagawa M. Oxidative and nitrosative stress and progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. **Am J Nephrol** 31, 342-352, 2010, 査読有り.
- ⑫ Oka M, Edamatsu H, Kunisada M, Dien S, Kitazawa R, Kataoka T, Nishigori C. Enhancement of ultraviolet B-induced skin

tumor development in *phospholipase C* □□ knockout mice is associated with decreased apoptosis. **Carcinogenesis** 31, 1897-1902, 2010, 査読有り.

⑬ Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Kone K, Goto S, Komaba H, Fujii H, Yamamoto Y, Yamamoto H, Usami M, Fukagawa M. The effect of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) on bone metabolism under physiological and diabetic conditions. **Endocr**, 38, 369-376, 2010, 査読有り

⑭ Sann Sanda Khin, Kitazawa R, Win N, Than TA, Mori K, Kondo T, Kitazawa S. BAMB1 gene is epigenetically silenced in a subset of high-grade bladder cancer, **Int J Cancer**, 125, 328-338, 2009, 査読有り

⑮ Kanazawa I, Yamauchi M, Yano S, Imanishi Y, Kitazawa R, Nariai Y, Araki A, Kobayashi K, Inaba M, Maruyama R, Yamaguchi T, Sugimoto T. Osteosarcoma in a pregnant patient with McCune-Albright syndrome. **Bone**, 45, 603-609, 2009, 査読有り

⑯ Hamada Y, Fujii H, Kitazawa R, Yodoi J, Kitazawa S, Fukagawa M. Thioredoxin-1 overexpression in transgenic mice attenuates streptozotocin-induced diabetic osteopenia. **Bone**, 44, 936-941, 2009, 査読有り

⑰ Fujii H, Nishijima F, Goto S, Sugano M, Yamato H, Kitazawa R, Kitazawa S, Fukagawa M. Oral charcoal adsorbent (AST-120) prevents progression of cardiac damage in chronic kidney disease through suppression of oxidative stress. **Nephrol Dial Transplant**, 24, 2089-2095, 2009, 査読有り

〔学会発表〕 (計 6 件) (総計 34 件)

① Kitazawa R, Kinto S, Ishii J, Kondo T, Mori K, Kitazawa S. Analysis of Regulatory Mechanism of Mouse RANK Gene Expression through AP-1 Response Element. ASBMR 2011 Annual Meeting, 2010. 9. (San Diego, USA)

② Kitazawa R, Ishii J, Mukai S, Kondo T, Mori M, Mori K, Kitazawa S. RANKL upregulates mouse RANK gene transcription through the NFAT binding site of RANK gene promoter. 第 10 回世界骨粗鬆症学会, 2010.5.5-8 (フィレンツェ、イタリア)

③ Mori K, Kitazawa R, Kondo T, Mukai S, Mori M, Kitazawa S. Derepression of mouse SFRP-4 gene expression by oxidative stress: A plausible mechanism leading to low-turnover osteoporosis

in diabetes and senescence. 第 10 回世界骨粗鬆症学会, 2010.5.5-8 (フィレンツェ、イタリア)

④ Mukai S, Kitazawa R, Ishii J, Kondo T, Hakozaki A, Horiuchi K, Mori K, Kitazawa S. Identification and functional analysis of a novel splicing variant of mouse RANK. 第 14 回国際内分泌学会, 2010.3.26-30 (京都)

⑤ Kitazawa R, Ishii J, Mukai S, Kondo T, Mori K, Kitazawa S. RANKL upregulates mouse RANK gene transcription through the NFAT binding site of its gene promoter. ASBMR 31st Annual Meeting, 2009. 9. (Denver, USA)

⑥ Mori K, Kitazawa R, Fukagawa M, Hamada Y, Kondo T, Kitazawa S. Oxidative DNA damage to methylated CpG located at five bases upstream of TATA-box restores suppressed sFRP-4 gene expression: proposal of a unique mechanism towards diabetic osteoporosis. ASBMR 31st Annual Meeting, 2009. 9. (Denver, USA)

〔図書〕 (計 3 件)

① 北澤 荘平、森 清、近藤 武史、北澤 理子 / 病理と臨床 29 巻臨時増刊号, 「病理診断に役立つ分子生物学」 第 1 部-4 DNA シークエンス, 文光堂, 東京, 16-20, 2011

② 北澤 荘平、森 清、近藤 武史、北澤 理子. 組織細胞化学 2010 - 組織細胞化学イメージングの基礎と最前線: 生体内分子局在と機能を探る - 日本組織細胞化学会編集 エピジェネティクスと病理組織学的変化, 2010

③ Kitazawa S, Mori K, Kondo T, Fujimoto M, Kitazawa R. DNA Methylation Research Trends, Epigenetic roles of CpG methylation at non-CpG-islands revealed by morphology-oriented epigenetic research (Editor; Kobayashi TB), pp43-pp66, Nova

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/patho2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北澤 理子 (KITAZAWA RIKO)

神戸大学・大学院医学研究科・特命准教授

研究者番号: 00273780