

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791410

研究課題名(和文)

転写抑制因子による破骨細胞分化制御

研究課題名(英文)

Regulation of osteoclastogenesis by transcriptional repressors

研究代表者

宮内 芳輝 (MIYAUCHI YOSHITERU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90445411

## 研究成果の概要(和文):

破骨細胞分化における転写制御は、主として転写活性化が寄与するものと理解されてきた。研究代表者らは本研究において初めて、二つの転写抑制因子 Bcl6 および Blimp1 が破骨細胞分化に必須であることを見出した。Bcl6 は破骨細胞分化抑制因子として機能しているが、破骨細胞分化を開始させるサイトカイン RANKL のシグナルにより誘導される Blimp1 が Bcl6 を転写レベルで抑制し、破骨細胞分化抑制を解除することで正常な破骨細胞分化が進行していた。

## 研究成果の概要(英文):

Transcriptional regulation in osteoclast differentiation was reportedly involved in activating expression of genes which were responsible for osteoclast formation and functions. We found that two transcription repressors, Bcl6 and Blimp1, were essential for osteoclast differentiation. Our data evidenced that Bcl6 repressed osteoclastogenesis in undifferentiated osteoclast precursors, and Blimp1 promoted osteoclast differentiation through suppressing Bcl6 at the transcriptional level under stimulation by osteoclastogenic cytokine, RANKL. The Blimp1-Bcl6 axis is crucial to regulate osteoclastogenesis.

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者人口の増加に伴い骨粗鬆症患者の急増が社会問題化し、有効な治療法の確立が望まれている。骨粗鬆症における骨量減少では破骨細胞の過剰な活性化が観察され、従ってこうした症状において破骨細胞は治療の有効な標的である。破骨細胞は単球・マクロファージ系列に属し、サイトカイン RANKL の

刺激によってその分化が誘導される。RANKL シグナルは破骨細胞分化のマスター分子である転写因子 *NFATc1* を発現誘導するとともに活性化し、*NFATc1* は AP-1 等の転写因子と協調して破骨細胞機能の発現に必要な分子を発現誘導する。しかし *NFATc1* は破骨細胞のみならず骨芽細胞にもその発現が認められるとともに、骨芽細胞分化の制御を介して

骨形成にも関与することが明らかにされた。事実、NFATc1 の機能を阻害する免疫抑制剤 FK506 を投与したマウスにおいては、破骨細胞分化が抑制されるにもかかわらず、骨形成も阻害されたことから骨量低下を来す結果となった。この結果から破骨細胞制御の標的としての NFATc1 には限界があると考えられ、新たな標的分子を探索する必要が生じている。

## 2. 研究の目的

破骨細胞は *in vivo* において唯一骨吸収を担う細胞であり、吸収と形成を常に繰り返す骨のリモデリングを実行するうえで欠くことのできない細胞である。骨粗鬆症に代表されるように加齢や病態に伴う骨量減少や骨破壊では破骨細胞の過剰な活性化が観察され、こうした症状において破骨細胞は治療の有効な標的である。破骨細胞の適切な制御を可能にするには、その分化および機能発現を実行する分子機構を理解することが必須であるが、その理解は未だ十分とは言い難い。本研究では、転写抑制因子に焦点を当て、新たな破骨細胞分化制御機構を解明することを目的とした。本研究より得られる新規な破骨細胞分化制御因子に関する成果からは、新たな破骨細胞制御の分子基盤が得られ、それに基づく破骨細胞を介した治療法が開発されることが期待された。

## 3. 研究の方法

### (1) 破骨細胞分化により発現抑制される遺伝子の同定

RANKL 刺激の有無を設定した二群の細胞間で、マイクロアレイにより遺伝子発現の比較を行った。得られたデータから転写抑制因子をコードする遺伝子を抽出し、分化誘導により発現抑制される遺伝子を同定した。同定された遺伝子を欠損するマウスを入手または樹立し、*in vivo* および *in vitro* の破骨細胞形成能を解析した。解析は破骨細胞形成については TRAP 染色により、および破骨細胞関連遺伝子群の発現については定量的 PCR により行った。また骨形態計測による骨組織の解析も行った。

### (2) (1) で同定された遺伝子に対する抑制因子の同定

(1) で同定された遺伝子は破骨細胞分化に対して抑制性の分子であり、分化過程では転写レベルで抑制され排除されるものと推測された。この分子のプロモーター解析等により、転写抑制を担う分子の同定を行い、さらに遺伝子欠損マウスの入手または樹立を行った。このマウスの解析も、破骨細胞形成は TRAP 染色により、および破骨細胞関連遺伝子群の発現については定量的 PCR により行った。ま

た骨形態計測による骨組織の解析も行った。

## 4. 研究成果

### (1) 破骨細胞分化により転写抑制される遺伝子の同定

RANKL 刺激により発現抑制される転写抑制因子として *Bcl6* が同定された。定量的 PCR による解析では *Bcl6* は破骨細胞分化の進行とともにその発現が抑制され (図 1)、また抗 *Bcl6* 抗体を用いた免疫染色の結果、破骨細胞前駆細胞では核に強い染色陽性を認め、一方で、破骨細胞では染色性が著しく減弱していることが確認された。またマウスマクロファージ細胞株 Raw264.7 に *Bcl6* を強制発現させたところ、RANKL 刺激による破骨細胞形成を強力に抑制することが確認された。以上のことから *Bcl6* が破骨細胞分化抑制作用を有することが明らかになった。さらに *Bcl6* 欠損 (*Bcl6*<sup>-/-</sup>) マウスを入手し骨組織の解析を行ったところ同胞対照マウスと比較して破骨細胞形成の亢進を認め、併せて骨密度および骨量の低下、さらに血中骨吸収マーカー値の上昇も認められた (図 2)。また *in vitro* での破骨細胞分化実験の結果、このマウス由来細胞では破骨細胞形成可能な RANKL 濃度域の低下および期間の短縮が認められ、破骨細胞分化能の亢進が確認された。以上の結果から、*Bcl6* は生理的な破骨細胞分化抑制因子として機能しており、*Bcl6*<sup>-/-</sup> マウスではこの作用の欠損により骨恒常性が破綻して骨吸収が過剰となることで骨量低下像を示すものと考えられた。

### (2) *Bcl6* を抑制する分子の同定

*Bcl6* の発現抑制には、RANKL 刺激下に機能する転写抑制因子の関与が想定されたため、マイクロアレイ解析により RANKL 刺激下に発現誘導を受ける転写抑制因子の探索を行った。その結果 *B lymphocyte induced maturation protein 1 (Blimp1)* を同定した。RANKL による破骨細胞分化誘導過程において、定量的 PCR およびウエスタンブロットにより、*Blimp1* は mRNA および蛋白質が共に増加することが明らかになった (図 3)。またクロマチン免疫沈降法により、*Blimp1* は *Bcl6* プロモーターに結合することも明らかとなった。次いで *Blimp1* 欠損マウスの骨組織解析が必要となったが、当該マウスは胎生致死であることが既に示されており、骨組織解析は不可能であった。我々は Cre-*loxP* システムによる破骨細胞特異的 *Blimp1* 欠損マウス (cKO マウス) を樹立することにより、この問題の解決を図った。cKO マウスは見かけ上正常に出生したが、同胞対照マウスとの比較により、その骨組織では破骨細胞形成が著減すると共に骨量増加を来していることが判明した (図 4、5)。破骨細胞分化異常は *in vitro*

でも観察され、このとき発現抑制を受けるべき *Bcl6* が、逆に発現亢進していることが判明した。Blimp1-*Bcl6* 軸の破骨細胞分化制御における重要性を検証するために *Bcl6* 欠損 cKO マウス (DKO マウス) の樹立および解析を行った。DKO マウスの骨密度は cKO マウスと比較して減少しており (図 6) 骨量増加は改善されているものと考えられた。また *in vitro* での破骨細胞形成実験の結果、cKO マウス由来細胞ではほとんど破骨細胞形成が認められないのに対し、DKO マウス由来細胞では破骨細胞形成の回復が認められた (図 7)。以上の結果から Blimp1-*Bcl6* 軸が正常な破骨細胞分化制御に重要であることが証明された。

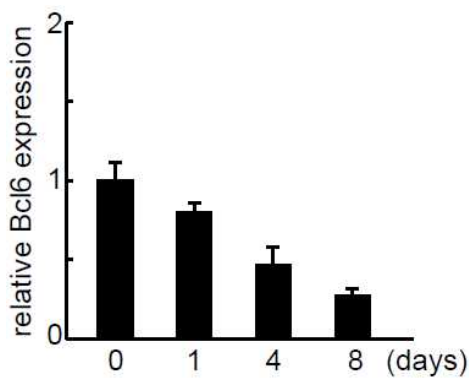


図 1 破骨細胞分化に伴う *Bcl6* 発現

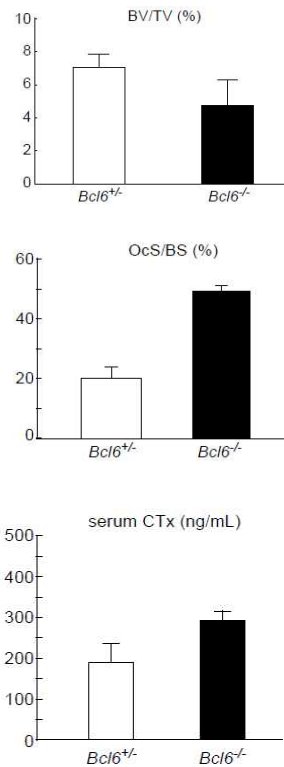
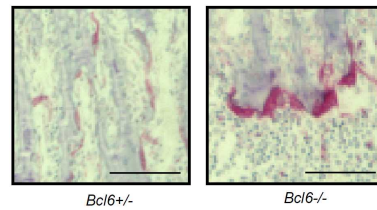


図 2 *Bcl6*<sup>-/-</sup> マウス骨組織の TRAP 染色像、組織量当たりの骨量、骨表面当たりの破骨細胞表面積、および血中骨吸収マーカー定量値

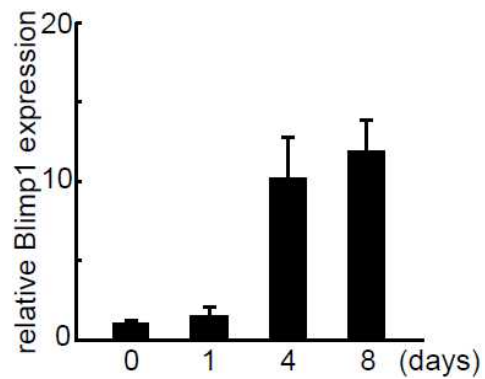


図 3 破骨細胞分化に伴う *Blimp1* 発現

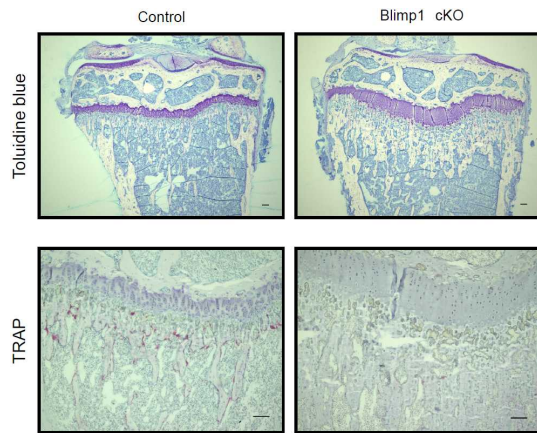


図4 cKO マウス骨組織のトルイジンブルー染色像(上)およびTRAP染色像(下)

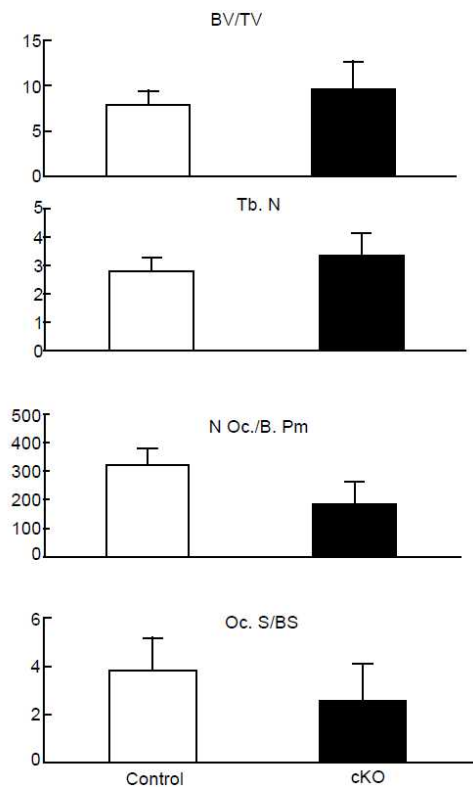


図5 cKO マウス骨組織の組織量当たりの骨量、骨梁数、破骨細胞数、および骨表面当たりの破骨細胞表面

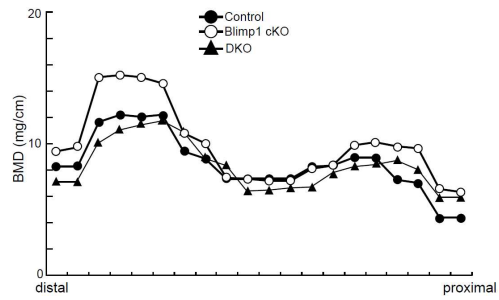


図6 対照マウス、cKO マウス、およびDKOマウスの骨密度比較

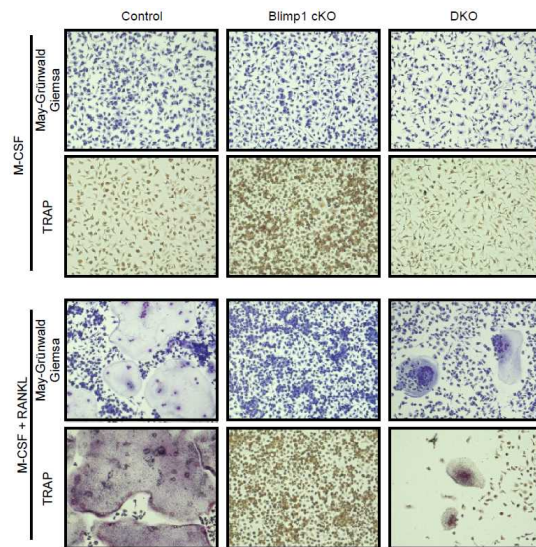


図7 対照マウス、cKO マウス、およびDKOマウス由来細胞の破骨細胞形成実験

### 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1件)

1. 著者名 ; Yoshiteru Miyachi, Ken Ninomiya, Hiroya Miyamoto, Akemi Sakamoto, Ryotaro Iwasaki, Hiroko Hoshi, Kana Miyamoto, Wu Hao, Shigeyuki Yoshida, Hideo Morioka, Kazuhiro Chiba, Shigeaki Kato, Takeshi Tokuhisa, Mitinori Saitou, Yoshiaki Toyama, Toshio Suda, and Takeshi Miyamoto

論文名 ; The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis

掲載誌名 ; Journal of Experimental Medicine, 2010, 207, 751-762 査読有

〔学会発表〕(計3件)

1. 発表者：宮内芳輝

題名：Blimp1 および Bcl6 による破骨細胞分化制御

学会名：第13回骨発生・再生研究会 東京  
2010/11/13

2. 発表者：宮内芳輝、戸山芳昭、宮本健史

題名：Blimp1 および Bcl6 による破骨細胞分化制御

学会名：第28回日本骨代謝学会学術集会 東京  
2010/7/21

3. 発表者：宮内芳輝

題名：Transcriptional regulation of osteoclast differentiation

学会名：第1回 Orthopedic Research Club  
千葉 2009/11/1

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮内 芳輝 (MIYAUCHI YOSHITERU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90445411

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし