

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 2 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：1 7 1 0 2

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：2 3 6 5 9 8 6 0

研究課題名（和文）WT1 ナチュラルアンチセンス RNA の発現と破骨細胞分化制御：
骨破壊制御の新戦略研究課題名（英文）Expression of WT1 natural ant-sense NA and osteoclastogenesis:
A novel strategy for the regulation of bone destruction

研究代表者

久木田 敏夫（KUKITA TOSHIO）

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：7 0 1 5 0 4 6 4

研究成果の概要（和文）:

WT1 は小児腎癌 Wilms' 腫瘍に於ける癌抑制遺伝子の産物として発見された Zinc finger 型転写因子であり、マクロファージ分化能を有することが分かっているが、破骨細胞分化における働きは不明であった。新生仔下顎骨のパラフィン切片を用いた RNA *in situ* hybridization 法により、破骨細胞が WT1 アンチセンス RNA を高発現することを見出した。ノーザンブロット法及びアンチセンス特異的 rtPCR 法を用いることにより新生仔下顎骨で WT1 アンチセンス RNA が豊富に発現していることを確認した。RAW-D 細胞を用いた破骨細胞分化系における WT1 蛋白質の発現を経時的に解析したところ、未分化な段階で発現される WT1 の発現が破骨細胞分化に伴って著しく抑制されることが分かった。更に WT1-アンチセンス RNA 発現ベクターを RAW-D 細胞に導入し WT1 の発現をノックダウンすると破骨細胞の形成が顕著に促進されることが分かった。これらの結果より WT1 蛋白質が破骨細胞分化の発現を制御する機能を持つことが示唆され、分化に伴う WT1 の発現抑止に特異的アンチセンス RNA の発現が関与する可能性が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）:

WT1, found as the gene product of infant kidney tumor (Wilms' tumor), is a zinc-finger transcription factor and known to have ability to induce macrophage differentiation, however, little is known on the involvement of WT1 gene expression in osteoclastogenesis. RNA *in situ* hybridization studies using mandibule of new born rats revealed that osteoclasts expressed abundant WT1 anti-sense RNAs. Northern blotting analysis and anti-sense-specific rtPCR confirmed the actual expression of WT1 anti-sense RNA in mandibule of new born rats. Time course studies concerning the expression of WT1 protein in *in vitro* osteoclastogenesis using RAW-D cells showed that WT1 expression observed at undifferentiated stages markedly suppressed if cells were stimulated to differentiate to osteoclasts. When endogenous WT1 expression was knocked down by transfecting anti-sense WT1 expressing vector into RAW- cells, marked stimulation of osteoclastogenesis was observed. These results strongly suggest that WT1 protein has a regulatory role in the regulation of osteoclast differentiation. This research also revealed a possible involvement of WT1 anti-sense RNA in the regulation of osteoclastogenesis.

交付決定額

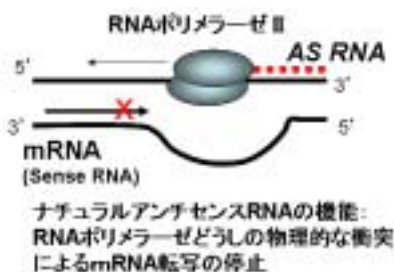
（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：歯学
キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）

1. 研究開始当初の背景

近年、制御性 RNA による遺伝子発現制御という新たな遺伝子発現制御機構が存在することが分かってきた。制御性 RNA のひとつであるアンチセンス RNA (ナチュラル・アンチセンス RNA) はバクテリアや植物において形質発現の制御に関わっていることが知られていたが、哺乳動物でアンチセンス RNA が発現されていることは予想されていなかった。2003 年に Rotman ら (*Nature Biotech.*) がヒトゲノムのデータベースを解析し、少なくとも 1600 個以上のヒト遺伝子の相補 DNA 配列がアンチセンス RNA を作っていることを示した。その後、免疫学の分野でイムノグロブリンの超可変領域を産み出すメカニズムとしてアンチセンス RNA が用いられていることや、アルツハイマー病発症の鍵を握る酵素である セクレターゼがアンチセンス RNA により制御されていることなどが報告された。また、メチル化等の遺伝子修飾による発現調節 (エピジェネティクス) においてもアンチセンス RNA が重要な役割を演じていることも分かってきており、ナチュラル・アンチセンス RNA による遺伝子発現制御が脚光を浴びるようになっていた。



ところで、Wilms 小児腎腫瘍の原因である Wilms' tumor 1 (WT1) (癌抑制遺伝子の産物) は Zinc フィンガー型の転写因子をコードして

おり、マクロファージを含む造血系細胞の増殖と分化において重要な働きを担っていることが知られている (Alberta et al. *Blood* 2003)。申請者はマクロファージ系の細胞である破骨細胞について WT1 の関与を検討する過程で、「活発に骨吸収を営む破骨細胞が WT1 のアンチセンス RNA を高発現する」というプレリミナリーな所見を得ていた。

2. 研究の目的

近年、制御性 RNA であるナチュラル・アンチセンス RNA がヒトを含む哺乳動物でも広く発現されており、生体防御等において重要な制御的役割を演ずることが明らかにされてきた。申請者は骨吸収担当細胞である破骨細胞が癌抑制遺伝子の産物であり Zinc フィンガー型の転写因子である Wilms' Tumor 1 (WT1) のアンチセンス RNA を高発現していることを示唆する所見を得た。本研究では WT1 アンチセンス RNA の破骨細胞分化に於ける機能を解明するとともに炎症性骨破壊の場での発現を解析し、WT1 アンチセンス RNA の発現を制御することにより骨破壊を抑制することを目的とした。

アンチセンス RNA により骨を構成する細胞が制御されることは報告されておらず、本研究は「アンチセンス RNA による骨代謝制御」という新研究領域の開拓に繋がるパイオニア的な研究である。

3. 研究の方法

破骨細胞分化に伴う転写因子 WT1 の発現を検討する。更に分化に伴う WT1 アンチセンス RNA の発現をノーザンブロット法により解析した。破骨細胞での高発現が認められる WT1 アンチセンス RNA の構造を解析し、ナチュラル・アンチセンス RNA がカバーする遺伝子領域について解析を試みた。アンチセンス RNA の機能を検定する為にアンチセンス RNA を発現ベクターに組み込んだコンストラクトを作成し、マウス破骨細胞の前駆細胞株である RAW-D 細胞に導入し、破骨細胞分化への影響を検討した。関節炎ラットやマウスに於ける炎症性骨破壊部位での WT1 アンチセンス RNA の発現を解析し、特異的 siRNA による骨破壊制御を試みた。

4. 研究成果

WT1 の破骨細胞分化における役割を解析する目的で骨組織に於ける遺伝子発現を特異的 RNA プローブを用いた *in situ* hybridization 法により詳細に検討したところ、新生仔ラット下顎骨に存在する成熟破骨細胞が WT1 アンチセンス RNA を高発現することを見出した。成熟破骨細胞での WT1 mRNA の発現は非常に低かった。成熟破骨細胞での WT1 mRNA の発現は非常に低かった。ノーザンブロット法等を用いて新生仔下顎骨で WT1-アンチセンス RNA が豊富に発現されていることを証明した。前破骨細胞株 RAW-D 細胞を用いた破骨細胞分化系を用いて WT1 蛋白質の発現を経時的に解析したところ、未分化な段階で発現される WT1 の発現が破骨細胞分化に伴って著しく抑制された。WT1 蛋白質は未分化状態の維持に必要であるが、破

骨細胞分化状態の維持には不利益に働くことが示唆された。WT1-アンチセンス RNA 発現ベクターを RAW-D 細胞に導入すると WT1 の発現がロックダウンされ、破骨細胞分化が顕著に亢進された。これらの結果より WT1 蛋白質が破骨細胞分化を抑制する機能を持つことと、WT1 アンチセンス RNA により WT1 の発現調節が行われることが明らかとなった。マクロファージと破骨細胞の「分化振分け」や「破骨細胞分化状態の維持」において WT1 アンチセンス RNA が重要な役割を演じてい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3件)

Infection of RANKL-primed RAW-D macrophages with *Porphyromonas gingivalis* promotes osteoclastogenesis in a TNF- α -independent manner. Kukita A., Ichigi Y., Takigawa I., Watanabe T., Kukita T., Miyamoto H. *PLoS ONE* (in press)

The Transcription Factor FBI-1/OCZF/LRF Is Expressed in Osteoclasts and Regulates RANKL-Induced Osteoclast Formation In Vitro and In Vivo. Kukita A., Kukita T., Nagata K., Teramachi J., Li Y-J., Yoshida H., Miyamoto H., Gay S., Pessler F., Shobuike T. *Arth Rheumatism* 63(9):2744-2754, 2011

Adenosine abolishes MTX-induced suppression of osteoclastogenesis and inflammatory bone destruction in adjuvant-induced arthritis. Teramachi J.,

Kukita A., Li Y-J., Ushijima Y., Ohkuma Y., Wada N., Watanabe T., Nakamura S., Kukita T.. *Lab. Invest.* 91:719-731, 2011.

〔学会発表〕(計9件)

李銀姫、久木田明子、久木田敏夫. WT1 アンチセンス RNA の成熟破骨細胞に於ける高発現と分化制御機能 第117回 日本解剖学会 2012年3月(山梨)

高野登志夫、李銀姫、久木田明子、山座孝義、高橋明、鮎川保則、古谷野潔、久木田敏夫 間葉系幹細胞による炎症性骨破壊制御 第53回歯科基礎医学会、2011年9月(岐阜)

高橋良、久木田明子、李銀姫、鮎川保則、古谷野潔、久木田敏夫 膜ナノチューブによる前破骨細胞融合制御 第53回歯科基礎医学会、2011年9月(岐阜)

牧野友祐、山座孝義、山座治義、馬蘭、益田啓太郎、園田総一郎、城戸瑞穂、野中和明、寺田善博、久木田敏夫 ヒト過剰歯由来幹細胞の免疫細胞療法効果について 第53回歯科基礎医学会、2011年9月(岐阜)

山座孝義、牧野友祐、山座治義、馬蘭、園田総一郎、益田啓太郎、野中和明、寺田善博、久木田敏夫 乳歯凍結保存法がヒト乳歯由来幹細胞の免疫調節能に与える影響について 第53回歯科基礎医学会、2011年9月(岐阜)

Toshio Takano, Yin-ji Li, Akiko Kukita,

Takayoshi Yamaza, Yasunori Ayukawa, Kiyoshi Koyano, Toshio Kukita. Mesenchyme stem cells markedly suppressed inflammatory bone destruction in rats with adjuvant-induced arthritis. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Annual Meeting 2011 9月 (SanDiego, USA)

Akira Takahashi, Akiko Kukita, Yin-ji Li, Hisayuki Nomiyama, Yasunori Ayukawa, Kiyoshi Koyano, Toshio Kukita. Involvement and regulatory role of membrane nanotubes in fusion of osteoclast precursors: A possible migration and penetration of DC-STAMP protein into osteoclast precursors through intercellular bridges. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Annual Meeting 2011 9月 (SanDiego, USA)

李銀姫、久木田明子、屈鵬飛、高野登志夫、實松敬介、二ノ宮祐三、久木田敏夫 Nordihydroguaiaretic Acid は破骨細胞分化とラットアジュバント関節炎における骨破壊を抑制する。第29回日本骨代謝学会、2011年7月(大阪)

高野登志夫、李銀姫、久木田明子、山座孝義、鮎川保典、小谷野潔、久木田敏夫 間葉系幹細胞による骨破壊制御：アジュバント関節炎ラットを用いた解析。第29回日本骨代謝学会、2011年7月(大阪)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：
〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久木田 敏夫 (Kukita Toshio)

研究者番号：70150464

(2) 研究分担者

久木田 明子 (Kukita Akiko)

研究者番号：30153266

(3) 連携研究者

()

研究者番号：