

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580437

研究課題名(和文) 組織特異的転写因子 Mitf が破骨細胞分化ならびに機能において果たす役割とその機構

研究課題名(英文) Role of Mitf, a tissue-specific transcription factor, in osteoclastogenesis and osteoclast function, and molecular mechanisms underlying Mitf-mediated 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスならびにイヌ骨髄細胞、およびマウスRAW264.7細胞をRANKL処理すると破骨細胞に分化する。破骨細胞分化過程においてMitf isoformの発現を調べたところ、いずれの細胞においてもRANKL処理24時間以内にMitf-E発現は誘導された。Mitf-E siRNA処理した後、RANKL処理しても、破骨細胞の形成は有意に減少した。また、マウス細胞にRANKL処理の際にTGF- $\beta$ を共処理すると、破骨細胞形成がさらに亢進した一方、イヌ細胞の場合、破骨細胞形成は抑制された。

研究成果の概要(英文)：Treatment with RANKL induces osteoclastogenesis in murine and canine bone marrow cells as well as murine RAW264.7 cells. Analyses of Mitf isoform expression indicated that Mitf-E gene was induced within 24 hours after RANKL treatment in all examined cells. Knockdown of Mitf-E by its siRNA transfection inhibited RANKL-induced osteoclastogenesis. In mouse cells, co-treatment with TGF- $\beta$  enhanced RANKL-induced osteoclastogenesis, whereas TGF- $\beta$  inhibited canine osteoclastogenesis induced by RANKL.

研究分野：分子生物学

キーワード：破骨細胞分化 転写因子 Mitf

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床獣医学ならびに予防獣医学の目覚ましい発展は、伴侶動物の長寿化も可能にした。その結果、伴侶動物もまた、ヒトと同様の加齢に伴う疾病に悩まされることになっている。骨組織を構成する細胞の分化・機能制御の詳細な理解は、これらの骨疾患の根本的解決につながるので長年地道な研究が行われてきた。骨粗鬆症は、破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を上回ることに起因することから、破骨細胞の起源、運命決定、分化に関わる知見は比較的蓄積されている。

(2) 骨粗鬆症は、とくに閉経後の女性で多発するので、従来、エストロゲン(E2)やカルシウム代謝関連ホルモンである上皮小体ホルモン(PTH)、活性型ビタミンD(VD)、ならびにカルシトニン(CT)の役割を中心に、また、M-CSF、RANKL、OPG、IL-6やTGF- $\beta$ といったサイトカインが破骨細胞の分化や機能に及ぼす影響についての研究も併せて進められてきた。

(3) つまり、内分泌ならびに局所因子による破骨細胞形成に関する知見は充実しているものの、破骨細胞形成機構に関する根本的な理解からは遠いのが現状である。例えば、TGF- $\beta$ にはRANKLによる破骨細胞形成能を高める能力があるものの、同じくRANKL、TGF- $\beta$ 応答細胞である樹状細胞にこれらの因子を反応させても破骨細胞は形成されない。

(4) Mitf は basic helix-loop-helix leucine zipper 型の転写因子で、色素細胞、破骨細胞、マスト細胞、心筋細胞、骨格筋細胞などに限定された発現パターンを示す。Mitf 遺伝子の変異マウス解析から、Mitf は破骨細胞形成に必要な因子であることが明らかにされているものの、詳細な作用機序についての多くは不明である。Mitf には転写開始点の異なる多数の isoform があり、幾つかの論文において、マスト細胞における isoform 依存的な転写活性が示されている。

(5) 申請者は、全身性に作用する内分泌、ならびに体中至るところで産生される局所因子が組織特異的な作用を示すのは、『汎用的な情報伝達経路と限定的な情報伝達経路のクロストークによって引き起こされる』との作業仮説の下、研究している。つまり、この作業仮説は、MAP キナーゼ経路、Protein kinase A 経路ならびに Smad 経路といった普遍的な情報伝達経路は Mitf 経路のような組織特異的な情報伝達経路と機能的・物理的に相互作用し、組織特異的な作用を惹起することも換言できる。

(6) 申請者らは、数年前にマウス骨髄細胞から RANKL を用いて破骨細胞に分化させた際に RANKL 刺激 24 時間以内に Mitf の isoform の一つである Mitf-E の遺伝子発現が誘導されることを観察した。同様の現象は破骨細胞分化モデルとして頻用されている RAW264.7 細胞でも観察された。しかしながら、Mitf-E の発現が破骨細胞分化に及ぼす影響に関して不明な点は多い。

(7) 多くの生物現象は、マウスやモデル生物における詳細な解析が先行し、伴侶動物や産業動物での解析はその後実施される。破骨細胞形成に関する研究も同様で、伴侶動物の破骨細胞形成に関する知見は絶無である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の3点を解明することである。

- (1) 破骨細胞形成における Mitf の役割と発現制御：内分泌ならびにサイトカインとの相互作用
- (2) Mitf が破骨細胞の機能に及ぼす影響
- (3) イヌの破骨細胞形成過程で発現する Mitf isoform ならびにその役割

## 3. 研究の方法

(1) RANKL ならびに M-CSF 存在下で破骨細胞前駆細胞は破骨細胞に分化する。RAW264.7 細胞は、十分量の M-CSF を産生するので、RANKL を投与するだけで破骨細胞に分化する。この系を用いて、破骨細胞分化に伴って発現する Mitf isoform の発現変化を RT-qPCR 法にて検討する。

(2) 一方、マウス骨髄に存在する破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させるためには RANKL だけでなく、M-CSF も投与する必要がある。マウス骨髄に存在する破骨細胞前駆細胞が破骨細胞に分化する際に発現する Mitf isoform の発現変化を RT-qPCR 法にて検討する。

(3) RANKL 刺激前後において Mitf-E 特異的な siRNA を遺伝子導入し、Mitf-E の発現を抑制する。破骨細胞分化は、破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(Trap)陽性多核細胞の出現を指標に評価する。また、破骨細胞のマーカー遺伝子である、Trap ならびに Ctsk の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法により評価する。

(4) 局所因子の一つである TGF- $\beta$ の破骨細胞誘導能を検討する。具体的には、RANKL 存在下における、TGF- $\beta$ 処理が、Trap 多核細胞

の出現ならびに破骨細胞関連遺伝子の発現に及ぼす影響を検討する。

(5) イヌ骨髄に含まれる破骨細胞前駆細胞の存在を明らかにするため、イヌ骨髄細胞を M-CSF ならびに RANKL 処理し、Trap 陽性多核細胞の形成を検討する。

(6) イヌ骨髄由来細胞から破骨細胞が形成される過程における Mitf isoform の発現を検討する。

(7) イヌ破骨細胞形成における TGF- $\beta$  の役割を検討する。

#### 4. 研究成果

(1) マウス骨髄細胞、RAW264.7 細胞のいずれにおいても RANKL 処理 24 時間以内に Mitf-E 発現は有意に増加した。一方、同じ Mitf isoform である Mitf-A 発現は RANKL 処理により増加しなかった (マウス骨髄細胞においては、むしろ RANKL 処理 3 日目において Mitf-A 発現は減少した)。

(2) RAW264.7 細胞を Mitf-E siRNA 処理し、RANKL 処理すると、Trap 陽性多核細胞の形成は有意に減少した。また、Trap ならびに Ctsk といった破骨細胞のマーカー遺伝子の発現も減少した。

(3) RAW264.7 細胞を RANKL 処理する際に TGF- $\beta$  で処理すると、Trap 陽性多核細胞の形成が促進したばかりでなく、より大きな破骨細胞の形成が促進された。

(4) このときの Mitf-E 発現を調べたところ、RANKL 単独処理の場合に比べて、TGF- $\beta$  と共添加した場合の方が高発現することが明らかになった。

(5) また、破骨細胞分化に関わる転写因子 NFATc1 の遺伝子発現も TGF- $\beta$  処理により亢進すること、Trap や Ctsk といった破骨細胞のマーカー遺伝子発現も TGF- $\beta$  処理により亢進することが明らかになった。

(6) さらに、細胞間接触ならびに細胞融合に関わる遺伝子群の発現を調べたところ、RANKL ならびに TGF- $\beta$  処理に伴う Itgav と Itgb5 発現変化と Mitf-E 発現変化は近似していたことから、Mitf-E によってこれらの遺伝子発現が変化することにより破骨細胞前駆細胞の融合が促進され、破骨細胞形成が促進される可能性が示唆された。

(7) イヌ骨髄細胞を M-CSF ならびに RANKL 処理すると、マウス骨髄細胞と同様、Trap 陽

性多核細胞に分化し、破骨細胞マーカー遺伝子である Trap, Ctsk 発現が増加した。しかしながら、イヌ破骨細胞形成に必要な M-CSF ならびに RANKL 濃度は、マウス破骨細胞形成に必要な M-CSF, RANKL 濃度よりも低かった。

(8) イヌ骨髄に存在する破骨細胞前駆細胞が破骨細胞に分化する際にも Mitf-E 発現は誘導された。Mitf-A 発現は破骨細胞分化に伴って急激に減少した。

(9) マウス破骨細胞形成の場合とは異なり、イヌ破骨細胞形成過程において TGF- $\beta$  は負の役割を果たしていた。

(10) 以上の結果、破骨細胞形成において Mitf-E 発現は必要な過程であること、マウス破骨細胞形成において、TGF- $\beta$  は Mitf-E 発現を通して破骨細胞形成を亢進するのに対して、イヌ破骨細胞形成を抑制することから、TGF- $\beta$  の役割に関しては動物種間で異なることが明らかになった。

#### 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 2 件)

Asai K, Funaba M, Murakami M. Enhancement of RANKL-induced MITF-E expression and osteoclastogenesis by TGF- $\beta$ . Cell Biochem Funct. 2014 32(5):401-9. (査読有) doi: 10.1002/cbf.3028.

Murakami M, Shirai M, Ooishi R, Tsuburaya A, Asai K, Hashimoto O, Ogawa K, Nishino Y, Funaba M. Expression of activin receptor-like kinase 7 in adipose tissues. Biochem Genet. 2013 Apr;51(3-4):202-10. (査読有) doi: 10.1007/s10528-012-9555-8.

[学会発表](計 3 件)

片川優子・舟場正幸・村上 賢. BMP による Smad8 発現調節メカニズムの解析. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 2014.9.10. 北海道大学 (北海道・札幌市)

浅井久美子・舟場正幸・村上 賢. TGF- $\beta$  による RANKL 誘導性 Mitf-E の発現と破骨細胞分化への影響. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013.12.3. 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

Katakawa Y, Horiguchi M, Funaba M, Murakami M. Regulatory expression of Smad8 by BMP. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013.12.4. 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 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 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
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

村上 賢 (MURAKAMI Masaru)  
麻布大学・獣医学部・教授  
研究者番号：80271360

### (2)連携研究者

舟場 正幸 (FUNABA Masayuki)  
京都大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：40238655