

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592255

研究課題名(和文)膜輸送関連タンパク質 Rab38 の骨代謝調節作用に関する研究

研究課題名(英文) Roles of membrane transport protein Rab38 on bone metabolism.

研究代表者

安井 哲郎 (YASUI, Tetsuro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30583108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの骨髄細胞から破骨細胞へ分化させる実験系において、そのヒストン修飾の変化から膜輸送関連タンパク質Rab38を破骨細胞分化関連因子として同定した。siRNAを用いたRab38遺伝子のノックダウン実験では破骨細胞分化の抑制を確認することが出来たが、Rab38ノックアウトマウスを用いたin vivoの実験では、骨組織に明らかな形質の変化を見出すことが出来なかった。Rab38が破骨細胞分化に何らかの形で関連する可能性はあるが、単独欠損では骨代謝に明らかな影響を与えないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We picked up Rab38 gene as an osteoclast differentiating factor by analyzing changes of histone modifications during murine cell differentiation from bone marrow cell to osteoclast. Osteoclast differentiation was suppressed by Rab38 knock down with siRNA in vitro, but phenotype change was not observed in Rab38 knock out mouse in vitro. We concluded that Rab38 does not affect osteoclast differentiation by itself though it may concern in some form or other.

研究分野：骨代謝

キーワード：破骨細胞 Rab38

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は骨吸収能を有する多核細胞であり、酒石酸耐性ホスファターゼ(tartrate-resistant acid phosphatase : TRAP)活性が強く、カルシトニン受容体を持つなどの特性を持つ。破骨細胞は下図の通り造血幹細胞、マクロファージ系細胞から分化するが、そのメカニズムについては長らく解明されてこなかった。1998年に破骨細胞分化因子 RANKL が同定された。破骨細胞への分化誘導においては RANKL とその受容体である RANK を介するシグナルが中心的役割を果たしていることが判明した。

DNA は核内ではヒストンタンパクに巻き付いてヌクレオソームを形成し、さらにこれが折りたたまれたヌクレオチドとして存在している。近年、遺伝子発現の ON/OFF を制御する機構として DNA メチル化やヒストンメチル化、ヒストンアセチル化などのエピジェネティックな機構の重要性が注目されており、細胞の分化制御については特にヒストンのメチル化が重要な役割を果たすことが指摘されている。中でも、未分化な細胞において H3-K4 (ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基) と H3-K27 がともにメチル化されている状態では遺伝子発現が抑制されているが、H3-K27 のメチル化が外れて H3-K4 のメチル化のみが残されることにより遺伝子発現が誘導されるという機構が、embryonic stem cell をはじめとした様々な細胞で示されている。

上記 2 つの知見を踏まえて、申請者らは破骨細胞分化に關与する遺伝子を同定すべく、網羅的遺伝子解析を行った。具体的には、破骨細胞前駆細胞に RANKL を投与して破骨細胞に分化させ、その際に H3-K4 と H3-K27 が共にメチル化されている状態から、H3-K4 のみがメチル化されている状態へと変化する遺伝子を、クロマチン免疫沈降(ChIP)の手法を用いて解析した。その結果、破骨細胞の分化に關与している可能性のある遺伝子として 49 種類の遺伝子が同定された。(未発表データ)さらに、実際に RANKL を投与した際の遺伝子発現の増加量についても検討し、膜輸送タンパク質として知られる Rab38 を対象遺伝子として抽出した。Rab38 は RANKL 投与により破骨細胞内での遺伝子発現が爆発的に増加しており、破骨細胞分化に非常に重要な役割を果たしていると考えられる。また、Rab38 自体の機能解析も、様々な方面から強く期待されている遺伝子である。

Rab38 は低分子量 G タンパク質である Ras superfamily のうち、細胞内輸送を行う Rab family の一員である。Rat 肺 cDNA からクローニングが 2001 年に報告された後、白皮症モデル動物である Chocolate mouse や Fawn-Hooded rat、Tester-Moriyama rat の責任遺伝子であることが示された。その後の研究によりメラニン細胞におけるメラノソ

ームへの細胞内小胞輸送や血小板の密顆粒形成、肺胞 II 型細胞における層板小体形成への関与が報告されているが、破骨細胞においてその発現あるいは働きを検討した報告はいまだかつてない。また、前述の Rab38 変異動物に対する骨組織の検討も報告されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、破骨細胞分化における Rab38 の果たす役割を解明することである。

種々の遺伝子解析手法を用いた破骨細胞の分化過程における Rab38 の時間的空間的発現様式を明らかにし、さらに遺伝子のノックダウン、あるいはノックアウト動物を用いて Rab38 の破骨細胞分化において果たす役割を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 破骨細胞分化過程における Rab38 とエフェクターの時間的空間的発現様式の決定

マウスの長管骨骨髓から細胞を採取し、M-CSF 存在下で 2 日間培養し破骨細胞前駆細胞を得た。この前駆細胞を M-CSF と分化因子 RANKL の存在下でさらに 3-4 日間培養することで破骨細胞へと分化させた。破骨細胞前駆細胞および RANKL 刺激後 1-4 日の mRNA とタンパクを抽出し、Real-time PCR と免疫ブロッティングを行い、Rab38 とエフェクターの遺伝子発現量とタンパク発現量の経時的な変化を確認した。さらに、同じ系で免疫染色を行い、タンパクの局在とその継時的な変化を観察した。

これらにより RANKL 刺激による破骨細胞分化の過程において Rab38 の発現していることを確認し、その量と局在の特性を評価した。

2) 破骨細胞分化過程における Rab38 とエフェクターの担う役割についての検討

1) の破骨細胞分化モデルにおいて、破骨細胞前駆細胞に対し、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った。まずピューロマイシン耐性ベクターである pMX-puro に Rab38 およびそれら mRNA に対して RNA 干渉を行う shRNA をコードする遺伝子を組み込んだベクターを作成し、これを齧歯類用パッケージング細胞 BOSC にトランスフェクションして、この細胞の培養上清をレトロウイルス液として実験に用いた。1) と同様に破骨細胞前駆細胞を得たのち、その細胞にポリプレンの存在下にレトロウイルス液を加え、6 時間培養することによって前駆細胞に対するウイルス感染を成立させた。その後、ピューロマイシンの存在下に 2 日間細胞を培養することによってピューロマイシン耐性ベクターの感染の成立した細胞のみをセレクトし、その後の実験にはここで生存した細胞のみを用いた。これらの細胞に M-CSF、分化因子 RANKL を作用させることにより破骨細胞への分化を誘導した。この分化過程で mRNA およびタンパクを回収した。回収した mRNA

とタンパクについては、まず Rab38 について Real-Time PCR や免疫プロットングを行って、実際に強制発現あるいはノックダウンが行えていることを確認した。その後、分化した細胞について、TRAP 染色を行って破骨細胞の形態や数について検討した。また、既知の RANKL シグナル経路に含まれる遺伝子についてその発現を Real-Time PCR、免疫プロットングを用いて確認した。

3) ノックアウトマウスにおける骨代謝調節
ノックアウトマウスの骨格形成、骨密度、骨組織標本の観察により、in vivo での Rab38 の働きを検討した。

Rab38 遺伝子変異動物として、系統の確立されている Chocolate mouse を The Jackson Laboratory (米国)より購入し、当施設の機器を用いて骨格、骨密度について検討した。また、その骨組織標本を作製し、破骨細胞の細胞数、形態を観察をすることによって in vivo での Rab38 の破骨細胞を含めた骨代謝に果たす役割について確認した。

4. 研究成果

in vitro 実験系として、マウス骨髄から採取した骨髄細胞に M-CSF と RANKL を作用させることにより破骨細胞分化を誘導する系を使用し、RT-qPCR および免疫プロットングにより確かに Rab38 遺伝子およびその発現タンパクが分化につれて増加していることを確認した。また、siRNA、shRNA の手法を用いて Rab38 遺伝子を knock down した骨髄細胞を用いて破骨細胞を分化誘導したところ、破骨細胞と認められる TRAP 染色陽性多核細胞の数はコントロールと比較して減少し、Rab38 の抑制により破骨細胞分化が抑制される可能性が示された。

in vivo 実験系としては、Rab38 point mutation マウス(Chocolate mouse)を米国の Jackson Lab.より購入し、飼育して利用した。購入した Rab38 wt/cht マウスを交配して Rab38 cht/cht マウスを飼育することに成功した。破骨細胞の分化・機能の指標となる骨密度について、Rab38 cht/cht マウスと wild type マウスについて成獣で比較したが、その骨密度に有意差は観察されなかった。また、成獣での体格差も同様に有意差を認めなかった。生後 1 週から 8 週までの成長過程を観察したが、ここでも有意な体格差は検出されなかった。

Rab38 が破骨細胞分化に何らかの形で関連する可能性はあるが、単独欠損では骨代謝に明らかな影響を与えないことが明らかとなった。

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 3 件)

Omata Y, Yasui T, Kadono Y et al.

Genomewide Comprehensive Analysis Reveals Critical Cooperation Between Smad and c-Fos in RANKL-Induced Osteoclastogenesis. J Bone Miner Metab. 2015 May ;30(5):869-77.

Nakamura H, Yasui T et al. Global epigenomic analysis indicates protocadherin-7 activates osteoclastogenesis by promoting cell-cell fusion. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Dec 12;455(3-4):305-11.

Hirose J, Yasui T, Kadono Y et al. Bone resorption is regulated by cell-autonomous negative feedback loop of Stat5-Dusp axis in the osteoclast. J Exp Med. 2014 Jan 13;211(1):153-63.

[学会発表](計 3 件)

伊沢直広、安井哲郎ら 破骨細胞分化における転写因子 NFATc1 の標的遺伝子についての ChIP-seq と RNA-seq を用いた網羅的解析 2013 年 5 月 30 日、日本骨代謝学会、神戸

Izawa N et al. Epigenetic regulation of osteoclastogenesis. 6 Oct 2013, ASBMR, Baltimore, US

Izawa N et al. Genome-wide comprehensive analysis demonstrates that PU.1 cooperates with NFATc1 in osteoclastogenesis. 17 June 2014, International Conference on Osteoimmunology, Kos, Greece

[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

安井 哲郎 (YASUI, Tetsuro)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30583108

(2)研究分担者

大島 寧 (OSHIMA, Yasushi)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50570016

門野 夕峰 (KADONO, Yuhō)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70401065