

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861745

研究課題名(和文) 骨髄ストローマ細胞に発現するTAF12による破骨細胞形成機構の解明

研究課題名(英文) The role of TAF12 in bone marrow stromal cells on osteoclastogenesis

研究代表者

寺町 順平 (TERAMACHI, Jumpei)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：20515986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：TNF- α やIL-6等によりストローマ細胞のTAF12の発現が誘導された。TAF12の高発現により1,25-(OH)2D3 (1,25-D) 刺激の高感受性が認められ、低濃度の1,25-DによりRANKLの発現が誘導され破骨細胞形成が顕著に誘導されたが、TAF12siRNAによりそれらが解除され、RANKLの発現および破骨細胞形成も高濃度においてのみ誘導された。TAF12とATF7が機能パートナー因子として作用していることが示唆された。以上より、病的骨髄微小環境においてストローマ細胞に高発現するTAF12は低濃度の1,25-DによりRANKLの発現を誘導し、骨吸収を促進していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously found that transcription initiation factor TFIID subunit 12 (TAF12), a coactivator of the vitamin D receptor is increased in the osteoclast precursors or bone marrow stromal cells. However the role of increased TAF12 on osteoclastogenesis is unclear. Therefore, we aimed to clarify the role of TAF12 in bone marrow stromal cell support of osteoclast formation and function. TNF- α and IL-6 upregulates the expression of TAF12. Increased TAF12 expression induces hyper-sensitivity to 1,25-(OH)2D3. RANKL expression and osteoclast formation were induced at very low levels of 1,25-(OH)2D3. In immunoprecipitation assay, TAF12 and ATF7 physically interact in stromal cells. Knockdown of TAF12 in IL-6-induced TAF12 expressing stromal cell decreased hyper-sensitivity to 1,25-(OH)2D3; as well as RANKL expression and osteoclast formation. These results show that TAF12 contributes to the hypersensitivity of bone marrow stromal cells to 1,25-(OH)2D3 in inflammatory bone disease.

研究分野：口腔組織学

キーワード：骨髄ストローマ細胞 TAF12 活性化ビタミンD3 RANKL 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う骨粗鬆症などによる骨量の低下や歯周病による歯槽骨の吸収などは生活に支障をきたし、高齢者の日常生活の質を低下させる。このような骨病変は、破骨細胞による骨吸収の亢進が原因で骨量が減少するためである。破骨細胞は造血幹細胞由来であり、その分化や活性化には骨髄微小環境(特に骨髄ストローマ細胞)が重要な役割を担っている。特にストローマ細胞および骨細胞が産生する RANKL は破骨細胞の増殖・分化・活性化を促進している。RANKL の発現は炎症性サイトカインや $1,25-(OH)_2D_3$ により誘導されることが知られている。また、歯周病や関節リウマチのような炎症性骨破壊疾患や癌の骨浸潤など病的環境下では、病変部に高濃度のサイトカインの侵襲による骨髄微小環境の変化がストローマ細胞にエピジェネティックな作用を誘導し、さらに破骨細胞形成を亢進させる可能性が報告されている。申請者は骨 Paget 's 病や多発性骨髄腫の破骨細胞前駆細胞やストローマ細胞で、ビタミン D 受容体のコアクチベータである TAF12 が強発現していることを発見した。TAF12 は TFIIID 転写複合体の構成タンパク質のひとつであり、様々な TAF や activating transcription factor (ATF) ファミリーなどの機能パートナー因子と結合し、ビタミン D 受容体による転写を促進する新規コアクチベータである。さらに骨 Paget 's 病患者の破骨細胞前駆細胞では TAF12 の高発現によりビタミン D 受容体の応答性を増幅させることがわかっているが、ストローマ細胞における TAF12 の役割は不明である。すなわち、ストローマ細胞での RANKL 産生における TAF12 の役割を解明することは、病的な骨髄微小環境下の破骨細胞形成機構を明らかにする上で重要なことであると考えられる。

2. 研究の目的

TAF12 を強発現しているストローマ細胞の RANKL 発現機構を細胞生物学的に解析し、病的状態における $1,25-(OH)_2D_3$ のストローマ細胞を介した破骨細胞形成機構を解明する。さらに、ビタミン D 受容体とそのコアクチベータの結合阻害剤を用い、ストローマ細胞を標的とした破骨細胞形成への影響を細胞生物学的に解析する。具体的には以下の研究を行う

- (1) TAF12 を高発現しているストローマ細胞と正常ストローマ細胞の $1,25-(OH)_2D_3$ の感受性の差を検討する。
- (2) TAF12 高発現ストローマ細胞と正常ストローマ細胞における TAF12 の機能パートナー因子の発現を検索し、その因子の細胞内伝達経路を比較検討する。
- (3) ビタミン D 受容体とそのコアクチベータの結合阻害剤 $1,25-(OH)_2D_3$ -26,23-lactone による骨髄ストローマ細胞の RANKL 産生抑制と破骨細胞形成について調べる。

3. 研究の方法

骨髄ストローマ細胞の分離

骨髄ストローマ細胞は 4 ~ 6 週齢の C57BL/6 マウス(雄)の大腿骨・脛骨より全骨髄を採取し、 α MEM10%FBS で培養を行った。週に 2 回培地交換し 3 週間培養することで、非接着性細胞を十分に取り除き骨髄ストローマ細胞として使用した。

破骨細胞形成

破骨細胞形成はマウス骨髄から単離した非接着性細胞を 10 ng/ml の M-CSF で 3 日間処理後、上記ストローマ細胞と共培養し、3 日間培養した。培養後、破骨細胞形成を TRAP 染色にて評価した。

骨吸収アッセイ

上記骨髄ストローマ細胞と破骨前駆細胞をハイドロキシアパタイトコートしたプレート上で共培養した。7 日間培養後、6% 次亜塩素酸ナトリウムで接着細胞を剥離し、von kossa 染色で吸収窩を可視化した。吸収窩の数を計測し、面積は NIH ImageJ System により計測した。

免疫沈降

骨髄ストローマ細胞を RIPA バッファーで可溶化し、500 μ g の lysate を 20 μ l のプロテイン A/G アガロースビーズで pre-wash した。抗 TAF12 抗体、および抗 ATF7 抗体を添加後、4 オーバーナイトで反応させたあと、プロテイン A/G アガロースを 20 μ l 添加し、4、2 時間反応させた。最後にこのサンプルを 1X サンプルバッファーに溶解し、遠心分離でビーズを除き上清を回収した。

4. 研究成果

ストローマ細胞での TAF12 の発現は TNF- α や IL-6 のような炎症性サイトカインにより誘導され、さらにそれらのサイトカインにより RANKL も誘導された。特に IL-6 が顕著に TAF12 の発現を誘導したため、TAF12 の発現誘導は IL-6 を用いて行うことにした。TAF12 高発現による $1,25-(OH)_2D_3$ の感受性を検討するためにストローマ細胞に IL-6 を 3 日間処理し、 $1,25-(OH)_2D_3$ を濃度依存的 (10^{-12} ~ 10^{-8} M) に作用させ、VDR および CYP24A1 の発現をウエスタンブロッティング法にて解析したところ、IL-6 未処理群では 10^{-8} M の $1,25-(OH)_2D_3$ で VDR および CYP24A1 の発現が誘導されたが、IL-6 前処理により 10^{-10} M でも VDR および CYP24A1 の発現が誘導され、TAF12 高発現が $1,25-(OH)_2D_3$ の高感受性を示唆する結果が得られた。さらに RANKL の発現をウエスタンブロッティング法で検討したところ IL-6 未処理群では 10^{-8} M の $1,25-(OH)_2D_3$ で RANKL の発現が誘導されたが、IL-6 前処理により 10^{-10} M でも RANKL

の発現が誘導された。さらにこの発現誘導された RANKL が機能的に破骨細胞形成誘導を起こすか検討するために、上記ストローマ細胞とマウス破骨細胞前駆細胞と共存培養を行い、破骨細胞の形成を TRAP 染色にて確認したところ、IL-6 前処理したストローマ細胞ではを共培養すると 10^{-10} M の $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ で破骨細胞形成が誘導されたが、TAF12 はその機能パートナーである ATF7 と共合することで、ビタミン D 受容体の分解を遅延させ転写を促進する。一方 TAF4 は TAF12 と ATF7 との共合を抑制している。そこで、IL-6 で TAF12 の発現を誘導したストローマ細胞の ATF7 および TAF4 の発現をウエスタンブロットング法にて解析したところ、IL-6 により TAF12 が高発現すると ATF7 の発現も上昇したが、TAF4 の発現は変化無かった。TAF12 と ATF7 の共合を確かめるため、TAF12 および ATF7 特異的抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、抗 TAF12 抗体により ATF7 の共沈を確認した。一方、抗 TAF12 抗体により ATF7 の共沈を確認できたことから、TAF12 と ATF7 は複合体を形成しており、機能パートナー因子として作用していることが示唆された。

TAF12 ノックダウンにより $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の高感受性が解除されるかを検討するために、IL-6 で TAF12 の発現を誘導したストローマ細胞に TAF12-siRNA を導入し、 $10^{-12}\sim 10^{-8}$ M の $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ を作用させ、CYP24A1 および RANKL の発現をウエスタンブロットング法にて解析を行ったところ TAF12 の高発現による低濃度の $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ により誘導される CYP24A1、VDR および RANKL の発現は TAF12-siRNA の導入により抑制され、高濃度 (10^{-8} M) の $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ でそれらの発現が認められた。さらに上記ストローマ細胞とマウス破骨細胞前駆細胞を共存培養し、siRNA により破骨細胞分化促進が解除されるか否かを TRAP 染色を行なったところ TAF12 の高発現による低濃度の $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ により誘導される破骨細胞形成は TAF12-siRNA の導入により高濃度 (10^{-8} M) の $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ でそれらの破骨細胞形成が認められ、その数も少なかった。さらに破骨細胞の骨吸収能を検討するために、マウス破骨細胞前駆細胞から分化させた成熟破骨細胞を準備し、これを上記 siRNA を導入したストローマ細胞と象牙質切片上で共存培養したところ、TAF12-siRNA はコントロールに比べて骨吸収窩の数および面積が減少した。以上の結果から、病的骨髄微小環境において IL-6 などの炎症性サイトカインがストローマ細胞の TAF12 の発現を誘導し、さらに生理学的濃度での $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ により RANKL の発現が誘導され、破骨細胞形成を促進しその機能を活性化していることが分かった。したがって、病的状態における TAF12 を標的とする骨破壊制御への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 8 件)

1. Shinohara H, Teramachi J, Okamura H, Yang D, Nagata T, Haneji T. Double stranded RNA-dependent protein kinase is necessary for TNF- α -induced osteoclast formation in vitro and in vivo. *Journal of Cellular Biochemistry*. In press 2015 査読あり
2. Okamura H, Yang D, Yoshida K, Teramachi J, Haneji T. Reduction of PP2A C α stimulates adipogenesis by regulating the Wnt/GSK-3 β / β -catenin pathway and PPAR γ expression. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1843: 2376-2384, 2014 査読あり
3. Hiasa M, Teramachi J, Oda A, Amachi R, Harada T, Nakamura S, Miki H, Fujii S, Kagawa K, Watanabe K, Endo I, Kuroda Y, Yoneda T, Tsuji D, Nakao M, Tanaka E, Hamada K, Sano S, Itoh K, Matsumoto T, Abe M. Pim-2 kinase is an important target of treatment for tumor progression and bone loss in myeloma. *Leukemia*. 29: 207-217. 2014 査読あり
4. Guo J, Yang D, Okamura H, Teramachi J, Ochiai K, Qiu L, Haneji T. Calcium hydroxide suppresses *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide- induced bone destruction. *J Dent Res*. 93(5):508-513. 2014 査読あり
5. Teramachi J, Zhou H, Subler MA, Kitagawa Y, Galson DL, Dempster DW, Windle JJ, Kurihara N, Roodman GD. Increased IL-6 expression in osteoclasts is necessary but not sufficient for the development of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res*. 29(6):1456-1465. 2014 査読あり
6. Haneji T, Hirashima K, Teramachi J, Morimoto H. Okadaic acid activates the PKR pathway and induces apoptosis through PKR stimulation in MG63 osteoblast-like cells. *Int J Oncol*. 42(6):1904-1910. 2013 査読あり
7. Teramachi J, Hiruma Y, Ishizuka S, Ishizuka H, Brown JP, Michou L, Cao H, Galson DL, Subler MA, Zhou H, Dempster DW, Windle JJ, Roodman GD, Kurihara N. Role of ATF7-TAF12 interactions in the vitamin D response hypersensitivity of osteoclast

precursors in Paget's disease. J Bone Miner Res. 28(6):1489-1500. 2013 査読あり

8. Teramachi J, Kukita A, Qu P, Wada N, Li YJ, Nakamura S, Kukita T. Adenosine blocks aminopterin-induced suppression of osteoclast differentiation. J Bone Miner Metab. 31(1):64-70. 2013 査読あり

〔学会発表〕(計 26 件)

国内学会

1. Teramachi J, Morimoto H, Okamura H, Haneji T. Critical role of PKR in TNF- α -induced osteoclastogenesis. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2015 年 3 月 22 日 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
2. 寺町順平 Pim-2 を標的とした骨髄腫骨病変の新規治療法の開発 第 17 回癌と骨病変研究会 2014 年 11 月 14 日 千代田放送会館(東京都・千代田区)(招待講演)
3. Teramachi J, Hiasa M, Oda A, Harada T, Amachi R, Kagawa K, Miki H, Nakamura S, Fujii S, Endo I, Matsumoto T, Abe M. Therapeutic impact of Pim inhibition on myeloma bone disease: blockade of NF- κ B-mediated suppression of osteoblastogenesis and stimulation of osteoclastogenesis. 第 76 回日本血液学会 2014 年 10 月 31 日 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
4. 寺町順平、篠原宏貴、稲垣裕司、楊諦、岡村裕彦、永田俊彦、羽地達次 PKR による炎症性骨破壊制御 日本解剖学会第 69 回中国・四国支部学術集会 2014 年 10 月 25 日 広島大学広仁会館(広島県・広島市)
5. 岡村裕彦、楊諦、羽地達次、寺町順平 プロテインホスファターゼ PP2A C α は、脂肪細胞分化に關与する 日本解剖学会 第 69 回中国・四国支部学術集会 2014 年 10 月 25 日 広島大学広仁会館(広島県・広島市)
6. 岡村裕彦、寺町順平、羽地達次 脂肪細胞分化におけるプロテインホスファターゼ PP2A C α の役割 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2014 年 9 月 26 日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
7. 寺町順平、岡村裕彦、羽地達次 PKR は歯周病における LPS および TNF- α による破骨細胞形成促進の重要な因子である 第 56 回歯科基礎医学会 2014 年 9 月 26 日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

8. 寺町順平、稲垣裕司、岡村裕彦、永田俊彦、羽地達次 PKR は歯周病変における破骨細胞形成及び骨吸収を制御する 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 2014 年 7 月 24 日 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
9. 寺町順平、日浅雅博、小田明日香、天知良太、中村信元、遠藤逸朗、松本俊夫、安倍正博 Pim-2 キナーゼは TNF- α による骨芽細胞分化抑制および破骨細胞形成促進の必須媒介因子である:Pim 阻害薬の骨髄腫骨病変改善効果 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 2014 年 7 月 24 日 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
10. 岡村裕彦、寺町順平、羽地達次 骨形成・骨芽細胞分化におけるプロテインホスファターゼ PP2A C α の役割 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 2014 年 7 月 24 日 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
11. 篠原宏貴、寺町順平、稲垣裕司、木戸淳一、羽地達次、永田俊彦 PKR 阻害による TNF- α 誘導性骨吸収の抑制 第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会 2014 年 6 月 19 日 びわ湖ホール(滋賀県・大津市)
12. 篠原宏貴、寺町順平、稲垣裕司、木戸淳一、永田俊彦、羽地達次 TNF- α 誘導性破骨細胞形成における PKR の役割 第 57 回春季歯周病学会学術大会 2014 年 5 月 23 日 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)
13. 寺町順平、篠原宏貴、稲垣裕司、森本景之、永田俊彦、羽地達次 歯周病微小環境での破骨細胞形成における PKR の役割 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2014 年 3 月 27 日 自治医科大学(栃木県・下野市)
14. 寺町順平、篠原宏貴、稲垣裕司、永田俊彦、羽地達次 歯周病変における破骨細胞形成における二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼの役割 日本解剖学会第 68 回中国・四国支部学術集会 2013 年 10 月 19 日 鳥取大学(鳥取県・米子市)
15. 平島寛司、寺町順平、羽地達次 TNF- α 誘導破骨細胞分化における PKR の役割 日本解剖学会 第 68 回中国・四国支部学術集会 2013 年 10 月 19 日 鳥取大学(鳥取県・米子市)
16. 森本景之、寺町順平、羽地達次 破骨細胞の分化を調節する免疫関連分子とその検出法 第 55 回歯科基礎医学会総

会 2013年9月20日 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

17. 寺町順平、森本景之、羽地達次 PKRは炎症性骨破壊において重要な役割を果たしている 第55回歯科基礎医学会 2013年9月22日 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)
18. 寺町順平 PKRは炎症性骨破壊において重要な役割を果たしている 第54回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2013年9月27日 航空会館(東京都・港区)(招待講演)
19. 篠原 宏貴、寺町 順平、稲垣 裕司、木戸 淳一、永田 俊彦、羽地 達次 歯周病変における破骨細胞形成に二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼが関与する 第56回秋季歯周病学会学術大会 2013年9月21日 前橋市民文化会館(栃木県・前橋市)
20. 寺町順平、平島寛司、羽地達次 歯周病変における破骨細胞形成にPKRが関与する 第32回分子病理学研究会 2013年7月20日 竹林院群芳園(奈良県・吉野町)

国際学会

21. Teramachi J, Hiasa M, Oda A, Amachi R, Harada T, Nakamura S, Kagawa K, Miki H, Fujii S, Watanabe K, Endo I, Matsumoto T, Abe M. Critical role of Pim-2 in NF- κ B-mediated suppression of osteoblastogenesis and stimulation of osteoclastogenesis: Therapeutic impact of Pim inhibition on myeloma bone disease. ASBMR 2014 Annual Meeting 2014年9月12日 アメリカ合衆国 テキサス州ヒューストン
22. Kitagawa Y, Teramachi J, Windle JJ, Chirgwin JM, Roodman GD, Kurihara N. Increased Expression of TAF12 in the Bone Microenvironment in Multiple Myeloma Enhances Tumor Cell Growth and Osteoclast Formation. ASBMR 2014 Annual Meeting 2014年9月12日 アメリカ合衆国 テキサス州ヒューストン
23. Silbermann R, Teramachi J, Mohammad K, Zhao W, Zhou D, Yang P, Eiseman JL, Xie XQ, Roodman GD, Kurihara N. A Novel Sequestosome-1 / p62 ZZ Domain Inhibitor Blocks TNF α Induced Suppression of OBL Differentiation in MM. ASBMR 2014 Annual Meeting 2014年9月12日 アメリカ合衆国 テキサス州ヒューストン

24. Teramachi J, Kitagawa Y, Windle JJ, Michou L, Brown JP, Kurihara N, Roodman GD. MVNP Expression in Osteoblast Induces IGF1 to Increase EphrinB2/EphB4 and Osteoblast Differentiation. ASBMR 2014 Annual Meeting 2014年9月14日 アメリカ合衆国 テキサス州ヒューストン
25. Kurihara N, Teramachi J, Kitagawa Y, Chirgwin JM, Roodman GD. Increased Expression of TAF12 in Myeloma Cells and the Bone Microenvironment Enhances Tumor Cell Growth and Osteoclast Formation. ASBMR 2013 Annual Meeting 2013年10月7日 アメリカ合衆国 メリーランド州ボルチモア
26. Kurihara N, Teramachi J, Kitagawa Y, Windle JJ, Roodman GD. IGF1 Contributes to the Increased Bone Formation Induced by Measles Virus Nucleocapsid Protein Expressed by Osteoclasts in Paget's Bone Disease. ASBMR 2013 Annual Meeting 2013年10月4日 アメリカ合衆国 メリーランド州ボルチモア

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.tokushima-u.ac.jp/dent/research/seitai/eating/histology/>

6. 研究組織

- (1)研究代表者
寺町 順平 (TERAMACHI, Jumpei)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号: 20515986