

研究テーマ

破骨細胞の表面抗原を標的とした新規抗体療法の分子基盤の確立

【緒言】生活の質に直結する運動機能の保持は、人間らしい生活を営むために重要な要素である。急速に進行しつつある高齢化社会においては、骨粗鬆症や関節症などの運動器疾患に対する治療法確立が急務であるにもかかわらず、運動器という個別生命機能の形成・維持・老化を制御する遺伝子ネットワークの複雑性がその解明を妨げている。運動機能は、骨・軟骨・滑膜から構成される関節が神経・筋肉によって駆動されることで実現される。骨格系の基軸となる骨組織の恒常性は、骨形成細胞である骨芽細胞および骨吸収細胞である破骨細胞による絶妙なバランスによって得られている。このバランスの不調和が骨粗鬆症や関節リウマチにおける骨量減少、癌の骨転移に伴う骨破壊の病態基盤となる 1-3)。破骨細胞は生体において極めて稀な性格を有する細胞であり、前駆細胞から単核破骨細胞へ、更には多核細胞に融合していく。この分化・成熟および機能発現機構は極めて複雑である 1-3)。近年、破骨細胞分化因子 RANKL によって特異的に誘導される NFATc1 がマスター転写因子として同定された。NFATc1 が標的とする遺伝子は実に多彩なことが予測され、その活性化・不活性化標的遺伝子の同定および解析が、この細胞を理解し制御していく上で重要な役割を果たすと考えられている 4)。

当該研究において破骨細胞マスター転写因子 NFATc1 が制御している標的遺伝子の全貌を明らかにするため、NFATc1 欠損細胞を用いてゲノムワイドにスクリーニングを展開し、NFATc1 制御性表面抗原遺伝子を同定することで、破骨細胞の異常活性および機能不全で誘発される代謝性、自己免疫性骨疾患ならびに骨転移のメカニズム解明を目的とする。

【方法】NFATc1 が破骨細胞特異的に欠損するコンディショナル欠損マウス(CKO)を作成し、破骨細胞分化因子 RANKL によって特異的に誘導される遺伝子のトランスクリプトーム解析を行った。制御遺伝子の機能を解明するため、破骨細胞培養系におけるレトロウイルスを用いた shRNA の遺伝子ノックダウン法を構築した。さらに同定された新規 NFATc1 制御遺伝子のコンディショナル欠損マウスの作成による個体レベルでの機能解析を行う。

【結果】NFATc1 欠損マウスは、心臓弁の形成不全により胎生致死である。この欠点を補い生体レベルでの NFATc1 の役割を明らかにするため、破骨細胞特異的な NFATc1 コンディショナル欠損マウス(CKO)を作成した。NFATc1CKO マウスは、顕著な骨量増加による骨髓腔の消失、歯牙放出不全、脾臓肥大など、重篤な大理石骨病に見られる病態を呈した。この病因は、破骨細胞分化形成が障害されることによると考えられる(図 1a)。RANKL による破骨細胞分化系のトランスクリプトーム解析から、従来、NFATc1 制御遺伝子として報告されている遺伝子(Oscar, Calcr, Itgb3)の挙動を確認したところ、これらの遺伝子は、RANKL により誘導されるが、NFATc1 欠損破骨細胞では、その発現上昇が消失することが見出された(図 1b,c)。

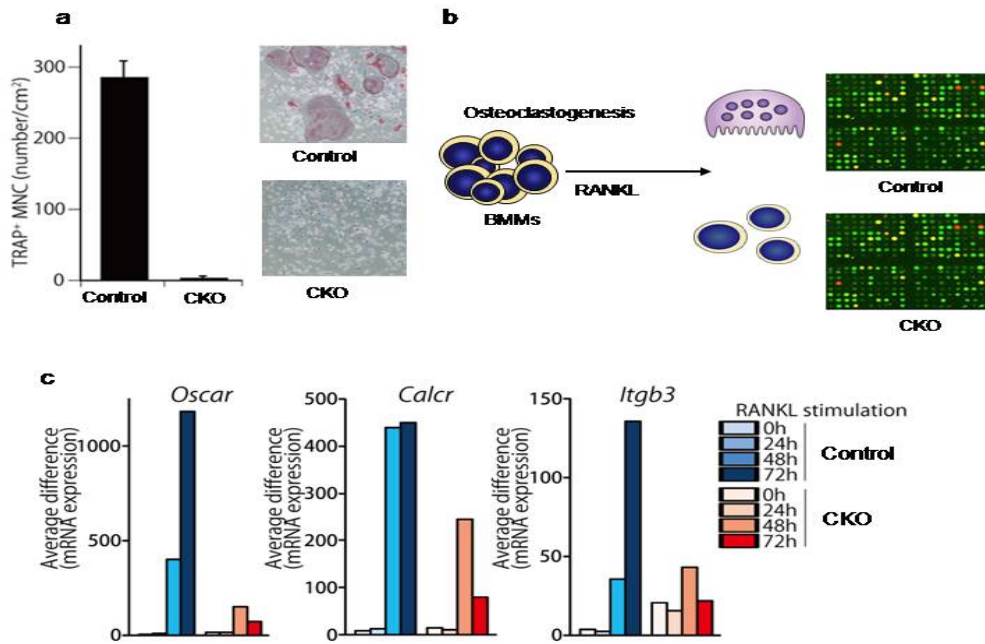


図1 破骨細胞マスター転写因子 NFATc1 の制御遺伝子の網羅解析

a) NFATc1 欠損細胞における破骨細胞分化の抑制 b) NFATc1 欠損細胞を用いたゲノムワイドスクリーニング c) NFATc1 欠損細胞における NFATc1 制御遺伝子の発現上昇の消失

これらの結果を踏まえ、NFATc1 制御遺伝子の機能を明らかにするため、破骨細胞分化培養系におけるレトロウイルス shRNA の遺伝子ノックダウン法を確立した(図 2a)。本法の前駆破骨細胞への感染効率率は、80%以上と従来の siRNA 法のそれを大幅に上回る良好な結果を得た(図 2b)。さらに NFATc1 のノックダウンを実施したところ、図 2c に見られるようにほぼ完全に NFATc1 発現を抑制することに成功した。破骨細胞形成実験では、NFATc1 が消失すると破骨細胞の分化誘導はなされないことが確認された(図 2d)。

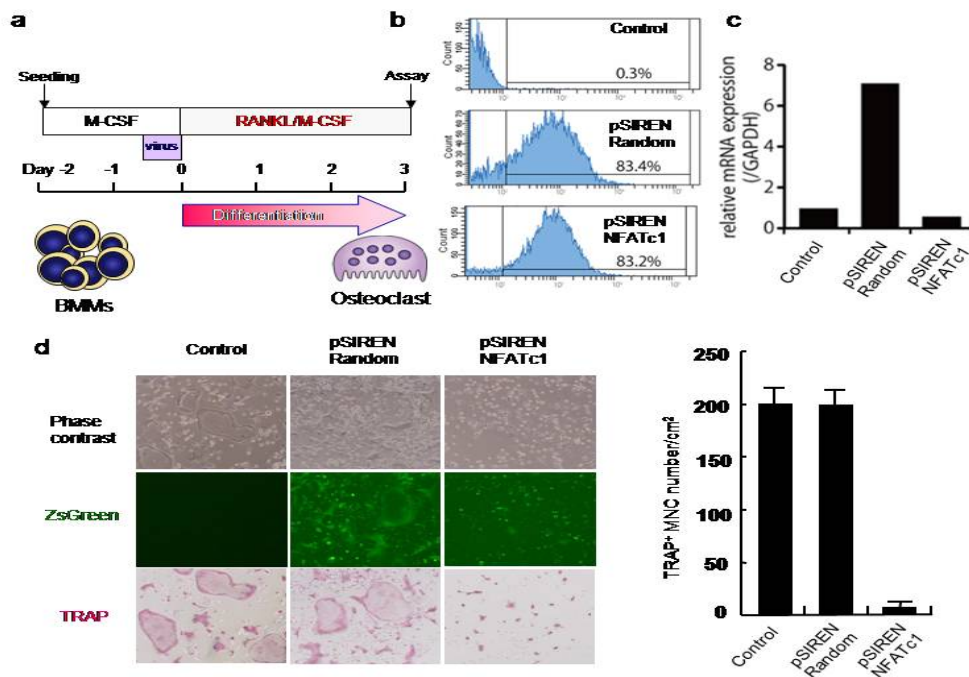


図2 破骨細胞における遺伝子ノックダウン法の構築

- a) 破骨細胞における shRNA 法のタイムコース b)破骨細胞における shRNA ベクターの感染効率
c) 破骨細胞における shRNA の遺伝子ノックダウン効率 d) 破骨細胞における NFATc1 ノックダウンによる破骨細胞分化抑制

【考察】破骨細胞分化因子 RANKL の同定後、マスター転写因子 NFATc1 へ至る経路は、多くの報告がなされてきた(5-7)。しかし、NFATc1 が制御する破骨細胞分化を司る制御遺伝子の同定は、いまだ不明な点が多い。当該研究では、NFATc1 が破骨細胞分化に必須であることを生体レベルで明らかにし、CKO マウスから得られた網羅解析情報より、NFATc1 が制御する遺伝子のプロファイリングに成功した。さらに破骨細胞培養系における遺伝子ノックダウン法を構築したことから、破骨細胞分化に伴う NFATc1 の標的遺伝子を機能的に選定する足掛かりになることが期待される。現在、抗 NFATc1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法によって NFATc1 が結合するプロモーター領域をもちいたタイリングアレイにて直接的に NFATc1 が制御する標的遺伝子も同定している(ChIP-on-chip 解析)。今後、当該研究の成果を基盤とし、さらなる解析によって得られる NFATc1 制御性表面抗原遺伝子のコンディショナル欠損マウスを作製し、生体レベルでの機能解析を試みる予定である。得られる結果は、革新的な新規抗体療法開発の分子基盤の確立に貢献すると期待される。

Reference

- 1) Nakashima T, Takayanagi T: osteoclasts and the immune system. *J Bone and Mineral Metab* **27**,519-29 (2009)
- 1) Nakashima. T. Takayanagi, T. : The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **473**, 166-171, 2008
- 2) 中島友紀、高柳広 : 骨免疫学の最先端. *Mebio* **25**, 24-35, 2008
- 3) Takayanagi, H. : Osteoimmunology : shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* **7**, 292-304, 2007
- 4) Wada, T., Nakashima, T., Oliveira-dos-Santos, A. J., Gasser, J., Hara, H., Schett, G. Penninger, J. M. : The molecular scaffold Gab2 is a crucial component of RANK signaling and osteoclastogenesis. *Nat Med.* **11**, 394-399, 2005
- 5) * Jones, H. D., * Nakashima, T., Sanchez, O., Koziarzki, I., Komarova, S. V., Sarosi, I., Morony, S., Rubin, E., Sarao, R., Hojilla, C. V., Komnenovic, V., Kong, Y.Y., Schreiber, M., Dixon, F. J., Sims, S. M., Khokha, R., Wada, T. Penninger, J. M. : Chemotactic regulation of epithelial tumor cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature.* **440**, 692-696, 2006
* These authors contribute equally to this work
- 6) Sato, K., Suematsu, A., Nakashima, T., Takemoto-Kimura, S., Aoki, K., Morishita, Y., Asahara, H., Ohya, K., Yamaguchi, A., Takai, T., Kodama, T., Chatila, T. A., Bito, H. Takayanagi, H. : Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway. *Nat Med* **12**,1410-1416, 2006