

氏名	きた がわ いしだ のり ひろ 北川(石田)教 弘
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	論 理 博 第 1471 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	破骨細胞分化過程における転写因子 NFAT2 の機能解析

論文調査委員	(主 査) 教 授 岡 穆 宏 教 授 平 野 丈 夫 教 授 森 和 俊
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

破骨細胞は骨組織においてのみ存在する多核巨細胞であり、唯一の骨吸収細胞である。破骨細胞分化過程は、CFU-GM系血球細胞に由来する前駆細胞が骨芽細胞の細胞表面に提示される破骨細胞分化誘導因子(RANKL)を認識することにより開始され、破骨細胞系への方向付け、単核破骨細胞への分化、細胞融合による多核化、の3ステップにより進行する。遺伝子組換えマウスを用いた研究や *in vitro* 破骨細胞分化誘導系を用いた実験結果から、破骨細胞の分化過程やその骨吸収機構に参与する遺伝子が見出されている。また RANKL 下流のシグナル伝達系の解析も進んできた。しかし細胞融合活性や骨吸収機構の分子メカニズムは未だ不明な点が多く、またこれら機能の獲得に至るまでの分化過程のプログラムは全く分かっていない状況である。

本研究ではマウスマクロファージ細胞株 RAW264 を遺伝子組換え RANKL で刺激する *in vitro* 破骨細胞分化誘導系を用いて、分化過程における発現変動遺伝子を DNA チップ解析で網羅的に解析し、分化過程を制御する新規因子の探索を行った。その結果、破骨細胞分化過程を通じて635プローブセットが発現変動することを見出した。また RAW264 を高密度に播種した条件では破骨細胞の分化が起こらないことを利用して分化密度播種条件下と高密度播種条件下による RANKL 刺激後の遺伝子発現プロファイルと比較したところ、高密度条件下では RANKL による発現誘導が見られない遺伝子として転写因子 NFAT2 を含む4遺伝子を同定した。NFAT2 は RANKL 刺激24時間後には顕著に発現誘導され、また高密度条件下ではその発現誘導は抑制された。NFAT2 の細胞内局在を検討したところ、RANKL 刺激24時間後には主に細胞質に存在したが、48時間後には核内に移行していた。NFAT2 の核内移行にはカルシニューリンによる脱リン酸化が必要なことが既に明らかにされているが、カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリン A を添加した場合には単核破骨細胞は観察されたが、多核破骨細胞の形成が顕著に阻害された。また NFAT2 発現抑制 RAW264 細胞株においても同様に多核破骨細胞の形成が抑制された。RAW264 の *in vitro* 分化誘導系では RANKL 刺激48時間後に単核破骨細胞へと分化が進行することと考え合わせ、NFAT2 は細胞融合への分化過程に必須な転写因子であると結論した。

単核破骨細胞から多核破骨細胞への分化に関わる遺伝子を同定するために、DNA チップ解析法による NFAT2 の標的遺伝子の探索を行った。真の標的遺伝子を濃縮するために、*in vitro* 分化誘導系を用いて、RANKL 刺激48時間後に発現誘導され、シクロスポリン A によりその発現誘導が抑制されるものを選択した。得られた候補群には、多発性骨髄腫の骨破壊原因因子の一つ、CCL3 ケモカイン、のレセプター CCR1 が含まれていた。破骨細胞分化過程における CCR1 の機能を明らかにするために、リアルタイム PCR 法により、RAW264 およびマウス初代マクロファージの破骨細胞分化過程における CCR1 発現変動プロファイルを解析した。CCR1 は RANKL 刺激48時間後から発現誘導され、シクロスポリン A 処理によりその発現上昇が抑制された。また NFAT2 の発現を抑制すると CCR1 の発現誘導も抑制され、逆に恒常活性化変異 NFAT2 を導入すると高レベルの CCR1 発現誘導が認められた。さらに RNA 干渉法により CCR1 の発現を抑制すると単核破骨細胞の CCL3 に対する走化性が顕著に低下した。以上の結果から、CCR1 は NFAT2 下流で発現誘導され、単核破骨細胞の CCL3 に対する走化性に必須であると結論した。

in vitro 破骨細胞分化誘導系において前駆細胞の播種密度が破骨細胞分化頻度に大きく影響するが、この原因を明らかにするために、分化密度播種条件と高密度播種条件における培養上清を回収し、各上清の分化能に対する影響を調べた。高密度条件から回収した培養上清を RAW264 培養へ添加すると破骨細胞への分化が阻害された。再構成実験から、この回収上清中には非必須アミノ酸の L-セリンが顕著に欠乏していること、そして L-セリンの欠乏が実際、NFAT2 や c-Fos の発現誘導および破骨細胞分化効率を著しく低下させることを明らかにした。また、NFAT2 を破骨前駆細胞であるマウス初代骨髄マクロファージにおいて強制発現すると、培地中 L-セリンの有無は破骨細胞の分化に影響しないことから、L-セリンが破骨細胞分化過程の非常に初期の段階で機能していることが伺える。

以上のように申請論文は、これまで詳細が不明であった破骨細胞分化過程において、転写因子 NFAT2 が鍵制御因子として働き、その標的遺伝子産物であるケモカインレセプター CCR1 が単核破骨細胞の細胞遊走に必須で、多核破骨細胞形成を促進することを明らかにした。また、破骨細胞分化過程には L-セリンが必要で、その分子機構は不明であるが NFAT2 および c-Fos の発現誘導に関わっていることを示した。

なお、主論文の基礎となる論文 2 編は、申請論文の研究成果の一部を共著者ととも公表したものである。

論文審査の結果の要旨

骨および血清カルシウム濃度のホメオスタシスに重要な役割を果たしている破骨細胞は骨組織においてのみ存在する多核巨細胞で、骨吸収機能に関わる主細胞である。1970年代頃より、大理石骨病（破骨細胞欠損）マウスや *in vitro* 血球細胞株の解析が為され、骨芽細胞由来のシグナルによって、CFU-GM (colony forming unit-granulocyte macrophage) 系血球細胞から破骨細胞が分化すること、また近年の遺伝子組換えマウスや破骨細胞への分化誘導可能な細胞株を用いた実験から、破骨細胞の分化過程および骨吸収機構に関与するさまざまな遺伝子が見出されてきた。その結果、前駆細胞で発現する腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーに属する RANK (receptor activating NF- κ B) と骨芽細胞で発現するリガンド RANKL の相互作用が骨芽細胞への分化開始に関わっていることが明らかになったが、その後の単核破骨細胞への分化および細胞融合による多核破骨細胞の形成などに関わる鍵因子の詳細は不明であった。

本申請論文では、RANKL の下流で働くシグナル伝達系を明らかにするために、マウスマクロファージ細胞株 RAW264 を遺伝子組換え RANKL で刺激する *in vitro* 破骨細胞分化誘導系を用いて、分化過程における発現変動遺伝子を DNA チップ解析で網羅的に抽出し、分化過程を制御する鍵転写因子およびその標的遺伝子を同定した。

細胞株 RAW264 を RANKL で刺激すると、48時間後には単核破骨細胞に分化し、96時間後には細胞融合により多核破骨細胞が形成される。この実験系を利用して破骨細胞への分化過程を通じて転写量が変動する635プローブセットを見出した。RAW264 株は高密度で播種した条件では破骨細胞への分化が起らない性質を利用して、分化密度播種条件下と高密度播種条件下による RANKL 刺激後の遺伝子発現プロファイルを比較した。高密度条件下では RANKL による発現誘導が見られない遺伝子として転写因子 NFAT2 を含む 4 遺伝子を同定した。NFAT2 は RANKL 刺激24時間後には顕著に発現誘導され、主に細胞質に存在したが、48時間後には大部分が核内に存在し、この間に移行したことが伺える。NFAT2 の核内への移行にはカルシニューリンによる脱リン酸化が必要なことが既に報告されているが、カルシニューリン阻害剤（シクロスポリン A）を添加すると、単核破骨細胞への分化は観察されたが、多核破骨細胞の形成は顕著に阻害された。また、NFAT2 の発現を抑制した RAW264 由来株においても同様に多核破骨細胞の形成が抑制された。この実験系では RANKL 刺激48時間後に単核破骨細胞へと分化が進行することから、NFAT2 は単核細胞から細胞融合が起こるまでの期間に必須な転写因子であると結論された。なお、NFAT は T 細胞活性化時に Interleukin-2 を発現誘導する転写因子として見出され、5 個の類似遺伝子 (NFAT1~NFAT5) が存在するが、破骨細胞分化過程で発現変動が認められたのは NFAT2 のみである。また、NFAT2 のノックアウトマウスは大動脈弁、肺動脈弁および心室隔壁の形成不全により胚性致死になることが既に報告されているが、NFAT2 が骨代謝に関わっていることは本研究により初めて示されたものである。

次に、どのような遺伝子が単核破骨細胞から多核破骨細胞への分化に関わっているかを明らかにするために、DNA チップ解析法による NFAT2 の標的遺伝子の探索を行い、CCL3 ケモカインのレセプター CCR1 を同定した。破骨細胞分化過程における CCR1 発現は RANKL 刺激48時間後から NFAT2 発現の後を追うように誘導され、シクロスポリン A 処理によ

りその発現上昇が抑制された。NFAT2 の発現を抑制すると CCR1 の発現誘導も抑制され、逆に恒常活性型変異 NFAT2 を導入すると高レベルの CCR1 発現誘導が認められた。すなわち、CCR1 の発現誘導は NFAT2 に依存的で、おそらく直接の標的遺伝子と考えられる。さらに RNA 干渉法により CCR1 の発現を抑制すると、単核破骨細胞の CCL3 に対する走化性が顕著に低下した。これまでの研究により、CCL3 ケモカインは多発性骨髄腫で高発現しており、患者の70%で骨髄液中の CCL3 の増加が認められ、CCL3 の発現を抑制したマウスでは破骨細胞数が減少することが知られていたが、本研究により CCL3 が単核破骨細胞の走化性に関わって多核破骨細胞の形成に寄与していることが明らかとなった。また、RAW264 破骨細胞分化誘導系において前駆細胞の播種密度が破骨細胞分化に大きく影響することが認められたが、その原因が高播種密度による L-セリンの消費によること、さらに NFAT2 および c-Fos の発現誘導が L-セリンの濃度に強く依存することを示し、L-セリンに関わる未知のシグナル伝達系の存在を示唆した。

ここで得られた研究成果は、転写因子 NFAT2 が破骨細胞分化過程の鍵制御因子であることを示すとともに、その標的遺伝子の一つ、CCR1、が単核破骨細胞から多核破骨細胞を形成する細胞融合に必須と考えられる CCL3 ケモカインに対する走化性に関わっていることを実証し、血球細胞から破骨細胞への分化過程を分子レベルで理解する基盤を提供するもので高く評価される。また、L-セリンに関わる未知のシグナル伝達系の存在を示唆したことでさらなる研究の進展が期待される。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心に、これに関連した研究分野について試問を行った結果、合格と認めた。