

## Thesis

# Pax6によるNFATc1を介した破骨細胞分化を制御する 新たな転写調節機構

埼玉医科大学内科学 内分泌・糖尿病内科部門

(指導：片山 茂裕 教授)

甲川 昌和

骨の機能は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成により厳密に制御され恒常性が維持されている。しかし骨吸収の亢進が起こるとそのバランスが崩壊して骨量が減少し、骨粗鬆症や関節リウマチのような病態をきたす。そのため骨吸収の中心的な役割を果たす破骨細胞の機能を解明することがこれらの問題を解決する重要な役割と考えられる。

これまでNFATc1を中心とした転写因子群の協調的な働きは、破骨細胞マーカー遺伝子の効率的な発現誘導をもたらす破骨細胞のダイナミックな骨吸収に寄与することが明らかになっている。一方転写因子であるPaxファミリーはさまざまな細胞分化に重要な働きをすることで知られていたが、今回初めて破骨細胞内で発現することが明らかとなった。RANKLによる破骨細胞誘導においてmRNAの発現解析の結果、Pax6が骨髄マクロファージ細胞に発現していてRANKL刺激後その発現が変動することが分かった。また破骨細胞のマーカー遺伝子であるTRAP遺伝子のプロモーター上の1853塩基の配列を調べPax6のDNA結合配列に類似した領域が存在することを見出した。そのDNAプローブを作製し破骨細胞抽出液を使ったゲルシフトアッセイによりDNA結合活性を調べたところPax6が特異的に結合していることがわかり、TRAP遺伝子がPax6の標的となることが示された。さらに破骨細胞の分化過程でPax6のDNA結合活性が変化することも明らかになった。次にTRAP遺伝子のプロモーター領域を使ったレポータージーンアッセイにより、NFATc1により増強されるTRAP遺伝子のプロモーター活性をPax6は量依存的に抑制することが示された。またPaxファミリーと結合し転写抑制に関わる共役因子として知られるコリプレッサーTleファミリーのなかで、Tle6が破骨細胞内で強く発現することを見出し、Pax6と協調しTRAP遺伝子のプロモーター活性を抑制することおよびNFATc1と直接結合することを明らかにした。さらにレトロウイルスを用いてPax6を破骨細胞内へ強制発現した結果、TRAP陽性の多核の融合巨細胞数がコントロールに比べ有意に減少した。このことはPax6が破骨細胞の分化抑制に寄与することを強く示している。

以上、本研究で我々はPax6が破骨細胞で発現することを初めて見出し、NFATc1による転写活性を抑制して破骨細胞の分化を調節する新たな制御因子であることを示した。

**Keywords:** Pax6, NFATc1, Tle6, TRAP遺伝子, 骨粗鬆症, 骨吸収

## 緒言

骨は生体支持と運動をつかさどる骨格筋の中心であるとともに、カルシウム濃度調節機能を併せ持つ組織である。その機能は破骨細胞による骨吸収<sup>1)</sup>と骨芽細胞による骨形成<sup>2)</sup>により厳密に制御され恒常性を維持している。しかし閉経や炎症などで破骨細胞による

骨吸収の亢進が起こるとこのバランスが崩壊して骨量が減少し、骨粗鬆症や関節リウマチのような病態をきたす。高齢化社会の進展に伴い骨密度低下が引き起こす運動機能障害をもつ患者の数は増加の一途をたどり社会的問題になりつつある。従って骨代謝研究は臨床的及び社会的な観点から新たな治療戦略を検討する上で注目されており、病的な骨破壊の成因となる破骨細胞の分化調節機構を明らかにすることがこれらの問

題を解決する重要な役割を果たすと考えられる。

破骨細胞は、単球/マクロファージ系前駆細胞由来の細胞で、破骨細胞分化因子である Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) と macrophage colony stimulation factor (M-CSF) の存在下に tartrate-acid phosphatase (TRAP) 陽性の多核細胞に分化する<sup>1,3)</sup>。RANKLは破骨細胞前駆細胞上で受容体 RANK に結合し細胞内にシグナルを伝達をする。RANKには TNF receptor-associated factor (TRAF) 6が結合し、シグナル伝達の中心的な働きを担い<sup>4,5)</sup>、その下流では p38MAPK, extracellular signal-regulated kinase (ERK), Jun-N-terminal kinase (JNK), TAK1, Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) などのリン酸化酵素であるキナーゼが活性化され、様々な転写因子を活性化する<sup>6-10)</sup>ことが知られている。破骨細胞分化に必要な転写因子としては、大理石病を呈するノックアウトマウスや変異遺伝子の解析により c-Fos<sup>11)</sup>, nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)<sup>12)</sup>, PU.1<sup>13)</sup>, microphthalmia-associated transcription factor (Mtf)<sup>14)</sup>などが同定されている。さらに nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1)<sup>15)</sup>は破骨細胞分化を制御するマスター転写因子として知られている。NFATc1のノックアウトマウスは胎生致死であるが、NFATc1 遺伝子欠損ES細胞を使ってRANKL刺激による破骨細胞分化が完全に障害され、過剰発現によりRANKL刺激なしで破骨細胞に分化する。そのことから破骨細胞の分化に必要な且つ十分なマスター転写因子であることがわかった<sup>15)</sup>。これらの転写因子群は破骨細胞の分化・機能に重要なマーカー遺伝子 TRAP<sup>16)</sup>, カテプシンK<sup>17)</sup>, OSCAR<sup>18)</sup>の転写を活性化して破骨細胞分化を調節している。著者らはこれまでに p38 MAPKが破骨細胞のマスター転写因子である NFATc1の上流で作用しNFATc1の発現や局在を変化させることによりマーカー遺伝子発現を制御し破骨細胞分化を多段階で調節していることを明らかにした<sup>19)</sup>。このように破骨細胞のRANKL刺激による細胞内シグナル伝達では多くのキナーゼや転写因子が協動的に働き破骨細胞の分化を制御している。

骨代謝のバランスの平衡性の維持には、骨吸収の亢進を防ぐため破骨細胞の分化を調節するような抑制機構が存在する。例えば間葉系細胞から分泌されるサイトカインのOsteoprotegerin (OPG)はRANKLのデコイレセプターとして働きRANKLの機能を抑制する<sup>20,21)</sup>。さらに最近になり Interferon (IFN)- $\gamma$ <sup>22)</sup>と IFN- $\beta$ <sup>23)</sup>は破骨細胞の分化抑制に重要なサイトカインとして報告された。炎症時の病的な骨吸収の際にはT細胞がIFN- $\gamma$ を産生してTRAF6を分解することにより破骨細胞の分化を抑制し、また生理的リモデリングの際にはRANKL刺激で破骨細胞から分泌されたIFN- $\beta$ の発現がc-Fosの発現を抑制する。Id (inhibitors of differentiation / DNA binding)はMtfと結合するこ

とによりマーカー遺伝子 OSCARプロモーターへの結合を阻害し破骨細胞分化を抑制している<sup>24)</sup>。このような破骨細胞の分化抑制因子の機能はまだ不明な点が多く、詳細な調整機構を解明することは新たな骨粗鬆治療薬の開発に繋がることが期待される。

Pax 遺伝子ファミリーはpaired box DNA結合ドメインを有する転写因子で、胚細胞における組織形成・細胞分化を調節することが知られており、構造により4サブグループに分かれる9種類が同定されている<sup>25)</sup>。これまでのPaxファミリー遺伝子欠損マウスの解析では骨量の減少、歯や顎の欠損などが示され、Pax 遺伝子の骨代謝への関与が示唆されたが、そのメカニズムはまだ明らかにされていない。そこで我々はPaxファミリー遺伝子の骨代謝に対する影響、特に破骨細胞の分化を抑制する分子機構を調べるために、破骨細胞内の遺伝子発現を調べたところ、Pax6が骨髄マクロファージ細胞と破骨細胞に発現することを見出した。

本研究において我々はPax6がRANKL刺激で破骨細胞内の発現変化が誘導され、破骨細胞のマーカー遺伝子であるTRAP 遺伝子の発現を制御していることを示し、Pax6が破骨細胞分化を制御する新しい調節因子であることを報告する。

## 実験材料および方法

### 材料

ヒトリコンビナント RANKLはPeprtech EC Ltd. (London, UK)より購入し、リコンビナントヒトM-CSF (Macrophage colony-stimulating factor)は森永乳業 (Tokyo, Japan)より提供を受けた。抗Pax6ポリクローナル抗体はCHEMICON International, Inc. (Temecula, CA)より、抗NFATc1モノクローナル抗体、抗PU.1ポリクローナル抗体はSanta Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)より購入した。抗M2モノクローナル抗体はSigma (St Louis, MO)より購入した。抗Tle6ポリクローナル抗体はDr. Look (Harvard Medical School)より供与された。Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction KitはInvitrogen (Carlsbad, CA)より購入した。

### 細胞培養

骨髄細胞は12~16週令C5B/B6Nマウスの大腿骨、脛骨の骨髄腔からAlpha-modified MEM, Sigman (St Louis, MO)培地を使って採取した。Lysing buffer (17 mM Tris, pH7.65, 0.75% NH<sub>4</sub>Cl)を使って赤血球を破壊した後、24ウェルプレートの各ウェルに1.5 x 10<sup>6</sup>個播種し、10%非動化ウシ胎児血清含Alpha-modified MEM培地に、50  $\mu$ g/mlペニシリン-ストレプトマイシン、40 ng/ml M-CSFを添加し、37°C、10% CO<sub>2</sub>環境下で3日間培養した。非接着細胞をPBSで洗浄・除去したあと、40 ng/ml M-CSF、100 ng/ml RANKL存在下にさらに5~7日間培養を続けた。培地は3日おき

に入れ替えた。その後、細胞を採取し、RT-PCRやイムノブロッティングに使用した。

HEK293細胞は10%非動化ウシ胎児血清含ダルベッコ改変イーグル培地, Life Technologies Ltd. (Paisley, UK)に50 µg/mlペニシリン-ストレプトマイシンを添加して培養した。

### Reverse Transcription-PCR

Total RNAを前述の培養細胞から採取し, Superscript II reverse transcriptase, 1 mM dNTP, 500 ng oligo (dT) primer (Invitrogen)を使用し, 逆転写にてcDNAを合成した。合成cDNAを使ったRT-PCRは次のプライマーを使用した。Pax6, 5'-CAGTCACAGCGGAGTGAATC-3'(sense), 5'-CGCTTCAGCTGAAGTCGCAT-3'(antisense); TLE6, 5'-CAGTCACAGCGGAGTGAATC-3'(sense), 5'-CGCTTCAGCTGAAGTCGCAT-3'(antisense)。反応はそれぞれ, 95°C 1分の後, 95°C 0.5分, 58°C 0.5分, 72°C 0.5分を37サイクル, 95°C 0.5分, 60°C 1分, 72°C 1分を30サイクルを行った。各mRNA発現量はβ-actinのmRNA発現量をコントロールとした。

### 免疫沈降反応とイムノブロッティング

培養細胞を剥離し, 溶解緩衝液(20 mM Tris-HCL, pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF)で溶解し5秒間5回超音波で破碎した後, 全細胞溶解液を4°C, 10,000 x g, 15分間遠心後, 上清を免疫沈降反応とイムノブロットに供した。全細胞抽出液(30 µg)は, SDSサンプル緩衝液に溶解後, SDS-ポリアクリルアミドゲルに電気泳動し, ニトロセルロース膜に転写後, 各々の抗体を用いてイムノブロットし, ECL detection kit (Amersham Bioscience)にて検出した。

### プラスミド

pcDNA3 NFATc1プラスミドはDr. M.A. Brown (University of Emory, School of Medicine)より, pRC-CMV Pax6プラスミドはDr. Zhou (University of Arkansas), p Tle6プラスミドはDr. Look (Harvard Medical School), pcDNA3 PU.1プラスミドはDr. H. Sighn (Harvard Medical School)より提供された。pMX-puroベクター, pMX GFPプラスミドは北村俊雄教授(東京大学医科学研究所)から供与された。

### 遺伝子導入及びレポータージーンアッセイ

一過性遺伝子導入実験は, HEK293細胞を遺伝子導入前日に24ウェルプレートに2.5×10<sup>5</sup>個播種し, 合計3 µgのプラスミドをリン酸カルシウム法にて細胞内に遺伝子導入を行った。導入48時間後, PBSにて細胞を洗浄後, プレートより剥離, 採取しレポーター溶解液, Promega (Madison, WI)にて細胞抽出液を採取した。レポーター活性はルシフェラーゼアッセイシステム (Promega)のプロトコールに従い測定した。測定

は各3回試行し平均値をとり, β-galactosidase 活性にて補正をした。

### ゲルシフトアッセイ

オリゴヌクレオチドプローブはT4ポリヌクレオチドキナーゼを使い[γ-<sup>32</sup>P]ATPで標識した。DNA結合アッセイは, 全細胞抽出液30 µgと<sup>32</sup>Pで標識したオリゴヌクレオチドを30°C, 30分間反応させた。競合アッセイでは, 10倍量のラベルしていないオリゴヌクレオチドを全細胞抽出液に添加し4°C, 30分反応させ, スーパシフトアッセイも各抗体を全細胞抽出液に添加し4°C, 30分反応させた後に, 標識したオリゴヌクレオチドと30°C, 30分間反応させた。反応後のサンプルは4%ポリアクリルアミドで電気泳動したあと, ゲルを真空ポンプにて乾燥後オートラジオグラフィーで解析した。

### レトロウイルスを用いた遺伝子導入

作製したPax6レトロウイルスベクターはパッケージセルラインのPlat E細胞(北村教授より供与)にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入した。48時間培養後にウイルス上清を採取後0.45 µmのシリンジフィルターで濾過し, 8 µl/mlポリブレンを付加した培地を, 培養骨髄マクロファージの培地と交換し, 12時間培養して感染により遺伝子導入した。上清を取り除いた後, 40 ng/ml M-CSF, 100 ng/ml RANKL存在化にさらに5日間培養をした。

### 破骨細胞分化アッセイ

破骨細胞形成はTRAP陽性細胞数を計測した。接着細胞は10%ホルムアルデヒドで3分間固定した後, 風乾し0.01% naphthol AS-MX phosphate (Sigma), 50 mM sodium tartrate 含の酢酸緩衝液(0.1M sodium acetate, pH5.0)で室温30分間おいて染色した。染色液を除去しPBSで洗浄し風乾した後, 3核以上のTRAP陽性細胞を計測した。

## 結果

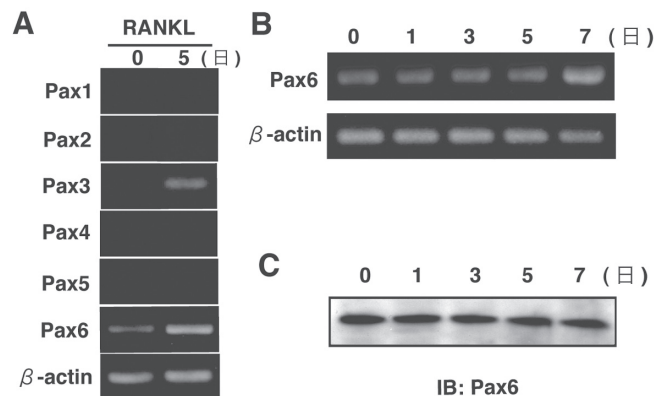
### 骨髄マクロファージ細胞, 破骨細胞におけるPax6の発現

Paxファミリー遺伝子がRANKL刺激における破骨細胞の分化過程において発現があるか否か確認するために, 破骨細胞内のPaxファミリー遺伝子のmRNAとタンパク質の発現を調べた。骨髄マクロファージ細胞をRANKLで刺激し破骨細胞を誘導し, Pax1, 2, 3, 4, 5, 6のmRNAの発現を調べると, Pax3とPax6のみ発現の増加がみられた(Fig. 1A)。mRNAの発現量が多いPax6に注目し, さらに経時的に調べたところPax6のmRNAは1日目で一端減少するがその後7日目において増加することが見出された(Fig. 1B)。Pax6のタンパク質発現量には大きな変化はみられなかった(Fig. 1C)。これらの結果から破骨細胞内にはPax6が発現しており, RANKL刺激によりそのmRNA発現量が変化することが明らかとなった。

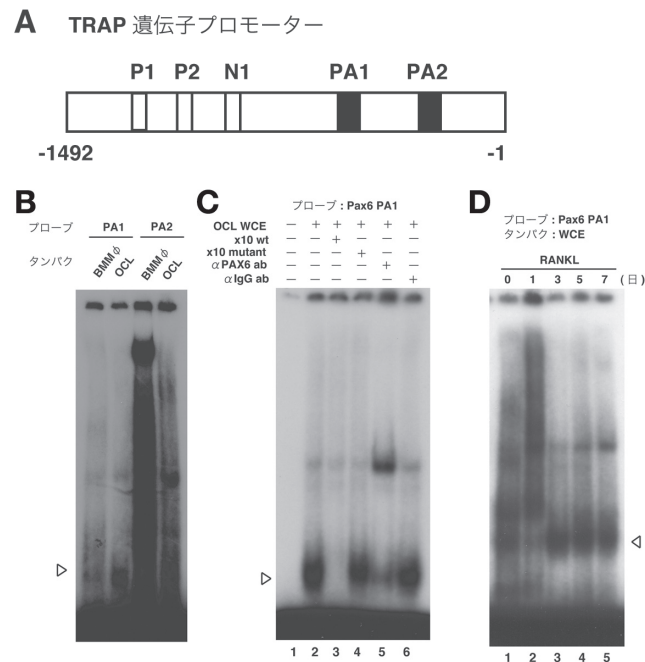
### Pax6のTRAP遺伝子発現への影響

TRAP 遺伝子は重要な破骨細胞のマーカー遺伝子として知られており、これまでマウスのプロモーター解析ではNFATc1, PU.1やMitfの結合サイトを含む重要なシスエレメントを有することがわかっている<sup>26, 27</sup>。そこでPax6が破骨細胞のマーカー遺伝子の発現に影響を与えるか調べるために、TRAP 遺伝子がPax6の標的となるか否かを検討した。まずPax6の結合配列(5'-TTCACGC T<sub>A</sub> T<sub>C</sub>/G A<sub>A</sub>/T<sub>C</sub>/G T<sub>G</sub>/T A<sub>C</sub> A<sub>A</sub>/T<sub>C</sub>/G-3')がTRAP 遺伝子のプロモーター領域に存在するか否かを調べたところ、われわれは2カ所に類似する配列を見だしPA1とPA2サイトと名付けた。それぞれのサイトは転写開始点から-634から-649 (PA1; 5'-TTCACGGCTCAGCTCG-3')と-116から-101 (PA2; 5'-AGGCATGCACCGTGAG-3')に位置していた (Fig.2A)。そこでTRAP 遺伝子がPax6の標的因子である可能性を調べるためにPA1, PA2領域の2本鎖DNAを作製しこれをプローブとして用いゲルシフトアッセイを行った。まずウサギ網状赤血球の抽出液を使った*in vitro*の転写/翻訳でPax6を合成し、RI標識したDNAプローブとの結合を調べたところ、PA1, PA2サイトともに結合が確認された (data not shown)。次に破骨細胞内の内在性 Pax6タンパクがこれらのプローブに結合するか調べるために、RANKL 刺激前の骨髄マクロファージ細胞と刺激後5日目の破骨細胞の細胞抽出液を用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果Pax6はPA2サイトよりPA1サイトに強く結合し、骨髄マクロファージ細胞よりRANKL 刺激後の破骨細胞抽出液でプローブとの結合が強いことを見出し (Fig. 2B)。このことからPA1サイトのプローブを用いて以下の実験を進めた。非標識のPA1プローブを反応させるとDNA結合活性は著明に抑制されたが、Pax6非結合配列の非特異的プローブを加えた場合には抑制効果は観察されず (Fig. 2C, Lanes3, 4), Pax6が特異的にPA1サイトに結合することが確認された。さらに、抗Pax6抗体との反応によりバンドのスーパーシフトがみられたがコントロールのウサギ抗IgG抗体ではスーパーシフトは見られず、Pax6の特異的な結合であることが証明された (Fig. 2C, Lane5)。さらに破骨細胞分化過程でPax6のDNA結合能が変化するかを調べるために、RANKL 刺激後7日までの細胞抽出液を使用しゲルシフトアッセイを行った。その結果RANKL 刺激後1日で結合が一端減弱し、その後結合は徐々に増強することがわかった (Fig. 2D)。これらの結果から、Pax6は骨髄マクロファージ細胞の時点からTRAP 遺伝子プロモーターに結合しているが、RANKL 刺激でDNA結合活性が一時的に減弱することが示唆された。

次にPax6がTRAP 遺伝子発現に影響を与えるかどうか調べるために、TRAP 遺伝子プロモーター (上流1492 bp) にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたレポー



**Fig. 1.** Paxファミリーの骨髄マクロファージ細胞と破骨細胞での発現. A. 骨髄マクロファージ細胞をM-CSF (40 ng/ml) と RANKL (100 ng/ml) の存在下に5日間培養した. 全RNAを抽出しRT-PCRにてPax1, 2, 3, 4, 5, 6のmRNAの発現を調べた. コントロールとして $\beta$ -actinの発現を調べた. B. 骨髄マクロファージ細胞をRANKL (100 ng/ml) で刺激し7日間培養した. 1日おきに全RNAを抽出しPax6のmRNAの発現を調べた. C. 骨髄マクロファージ細胞をRANKL (100 ng/ml) で刺激し1日おきに細胞抽出液を採取しPax6の抗体でタンパク質の発現をウエスタンブロット法で調べた.

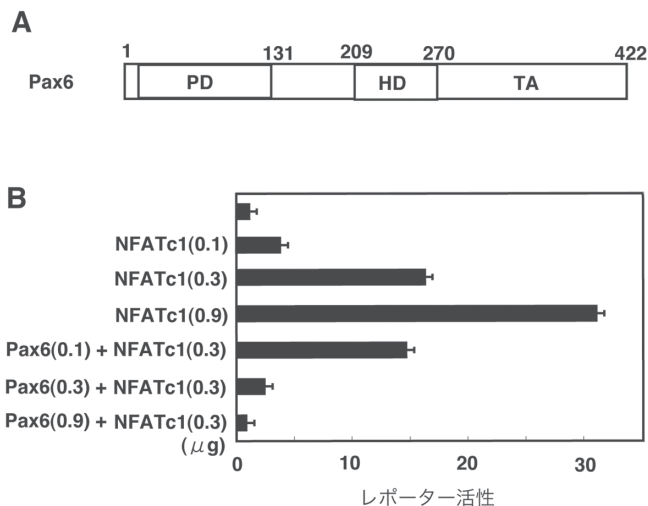


**Fig. 2.** Pax6のTRAP 遺伝子プロモーターへの特異的結合. A. マウスTRAP 遺伝子プロモーターのPax6の結合部位 (PA1とPA2). N; NFATc1結合部位, P1, P2; PU.1結合部位. B. 骨髄マクロファージ細胞と破骨細胞の抽出液とマウスTRAP 遺伝子プロモーターに存在するPax6の結合部位のプローブを使いゲルシフトアッセイをおこなった. C. 骨髄マクロファージ細胞をRANKL 刺激後5日で採取した細胞抽出液とPA1をプローブとしたゲルシフトアッセイをおこなった. 競合アッセイでは10倍のラベルなし野生型プローブと変異型プローブを混合した. スーパーシフトアッセイでは抗Pax6抗体とコントロールとして抗IgG抗体を使った. D. 骨髄マクロファージ細胞をRANKL 刺激して、隔日で採取した細胞抽出液とPA1をプローブとしたゲルシフトアッセイをおこなった.

ター遺伝子を作成し、レポーター遺伝子アッセイを行った。Pax6の構造は2つのDNA結合ドメイン(N末端にペアードドメイン, 中央にホメオドメイン)を有し, C末端にプロリン-セリン-スレオニンリッチ転写活性化ドメインが存在する (Fig. 3A)。TRAP 遺伝子の活性化因子であるNFATc1とPax6をHEK293細胞に強制発現させ, プロモーター活性を計測したところNFATc1は量依存性にTRAP 遺伝子発現を増強したが, Pax6は0.1  $\mu\text{g}$  で10%, 0.3  $\mu\text{g}$  で80%, 0.9  $\mu\text{g}$  でほぼ100%と量依存性にNFATc1の効果を抑制することが示された (Fig. 3B)。これらの結果よりPax6はTRAP 遺伝子プロモーターに直接結合し, NFATc1によるTRAP 遺伝子の発現を著明に抑制することが明らかとなった。

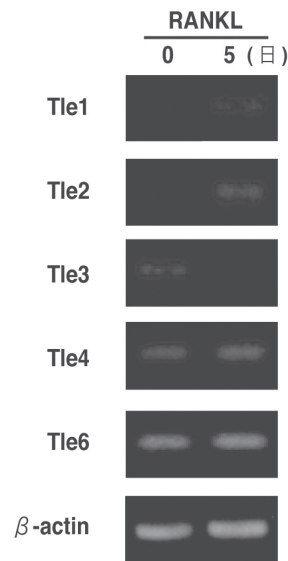
### Tle6とPax6の協調作用

Pax6がNFATc1によるTRAP 遺伝子発現を抑制する機序を調べるため, Pax6とNFATc1の相互作用を調べたが直接の結合は認めなかった (data not shown)。Paxファミリーの転写抑制に関わる共役因子であるコリプレッサーのTleファミリーはPaxファミリーと結合しB細胞<sup>28, 29)</sup>やメラノサイト<sup>30)</sup>の分化を抑制することから, Pax6による抑制効果がTleファミリーを介して増強される可能性が考えられた。そこで骨髄マクロファージとRANKL刺激5日目の破骨細胞より抽出したmRNAをもちいてTleファミリーの発現を調べた。Tle1, 2はわずかに発現しているのみで, Tle3は発現はあるがRANKL刺激で減少し, Tle4, 6の発現が強くなりながらも発現量はほとんど変化なかった (Fig. 4)。今

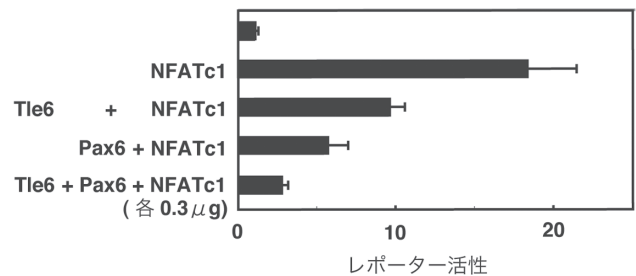


**Fig. 3.** Pax6によるTRAP 遺伝子のプロモーター活性への影響。A. 422アミノ酸で構成されるPax6の構造。PD; paired domain, HD; homeodomain, AD; activation domain. B. HEK293細胞にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたTRAP (1.5  $\mu\text{g}$ )とNFATc1 (0.1, 0.3, 0.9  $\mu\text{g}$ )とPax6 (0.1, 0.3, 0.9  $\mu\text{g}$ )を遺伝子導入した。48時後ルシフェラーゼ活性を測定した。同時に遺伝子導入した $\beta$ ガラクトシダーゼ活性を測定し, 測定値を補正した。

回は我々はこの中で最も発現の強いTle6を候補としてさらに検討を進めた。Tle6がPax6のTRAP 遺伝子プロモーター活性抑制に影響を与えるかどうか調べるために, レポーター遺伝子アッセイを行った。TRAP 遺伝子プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を結合させたレポーター遺伝子と各0.3  $\mu\text{g}$ のNFATc1, Pax6, Tle6の各プラスミドを組み合わせてHEK293細胞に強制発現させた。NFATc1によるTRAP 遺伝子発現の増強効果を, Tle6単独では約50%, Pax6単独では約70%, Tle6とPax6両方では約90%抑制することがわかった (Fig. 5)。これらの結果よりPax6はコリプレッサーTle6と協調してTRAP 遺伝子発現を抑制する働きがあることが示された。



**Fig. 4.** Tleファミリーの骨髄マクロファージ細胞と破骨細胞での発現。骨髄マクロファージ細胞をM-CSF (40 ng/ml)とRANKL (100 ng/ml)の存在下に5日間培養した。全RNAを抽出しRT-PCRにてTle family (1/2/3/4/6)のmRNAの発現を調べた。コントロールとして $\beta$ -actinの発現を調べた。



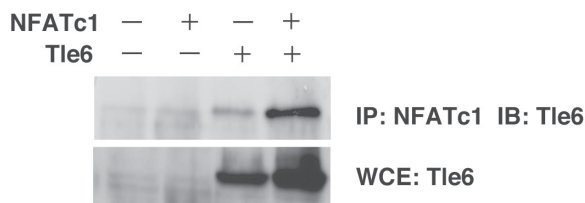
**Fig. 5.** Tle6によるPax6のTRAP 遺伝子のプロモーター活性抑制への影響。HEK293細胞にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたTRAPプロモータープラスミド (1.5  $\mu\text{g}$ )とNFATc1プラスミド (0.3  $\mu\text{g}$ ), Pax6プラスミド (0.3  $\mu\text{g}$ ), Tle6プラスミド (0.3  $\mu\text{g}$ )を遺伝子導入した。48時後ルシフェラーゼ活性を測定した。同時に遺伝子導入した $\beta$ ガラクトシダーゼ活性を測定し, 測定値を補正した。

### Tle6とPax6, NFATc1との相互作用

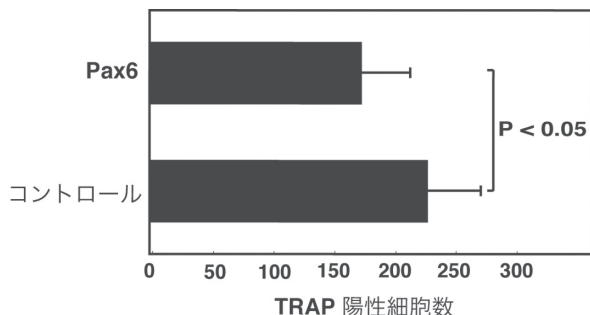
Tle6のTRAP遺伝子発現抑制作用がPax6やNFATc1と直接結合して効果を発揮するのか否か調べるために、Tle6, Pax6, NFATc1をHEK293細胞に強制発現させ、細胞抽出液を抗M2抗体(Pax6), 抗NFATc1抗体で免疫沈降した後、抗Tle6抗体を使ったウェスタンブロッティングにて検出を行い相互作用を調べた。Tle6はPax6とは特異的な結合は検出されなかったが(data not shown), NFATc1とは直接的な結合があることがわかった(Fig. 6)。これら結果からTle6はNFATc1と直接結合してTRAP遺伝子の発現を抑制しており、Pax6との協調作用では他の因子の介在やタンパク質の修飾などが存在する可能性が考えられた。

### レトロウイルスによるPax6の破骨細胞内強制発現

Pax6が実際に破骨細胞内で分化に与える影響を調べるために、骨髄マクロファージ細胞にレトロウイルスベクターを使ってPax6を強制発現させた後に、RANKL刺激により破骨細胞分化を誘導した。Pax6導入群ではコントロール群に比較し、TRAP陽性の巨細胞の分化は著明に抑制された(data not shown)。多核破骨細胞の形成も有意に抑制されていた(Fig. 7)。こ



**Fig. 6.** Tle6とNFATc1の相互作用。HEK293細胞にTle6プラスミド(3 μg)とNFATc1プラスミド(3 μg)それぞれを遺伝子導入した。48時間後細胞抽出液を採取し、200 μgのタンパク質をそれぞれ抗NFATc1抗体で免疫沈降した後、9% SDS-PAGEにて電気泳動しウェスタンブロット法にてTle6を検出した。



**Fig. 7.** Pax6による破骨細胞分化抑制。pMX-Pax6とコントロールとしてpMX-GFPをレトロウイルスをつかって骨髄マクロファージに感染させた後、M-CSF(40 ng/ml)とRANKL(100 ng/ml)存在下に5日間培養した。培養細胞は固定後、TRAP染色を行い多核(3核以上)のTRAP陽性細胞を計測した。

れら結果から、破骨細胞内で実際にPax6が分化誘導を抑制することが明らかとなった。さらにPax6が破骨細胞の融合を阻害する可能性が示唆された。

### 考 察

PaxファミリーはこれまでにコリプレッサーであるTransducin-like enhancer of split (Tle)ファミリーと結合し細胞分化を抑制をすることが分かっている<sup>28,30</sup>。今回破骨細胞内で強い発現が確認されたTle6がPax6の抑制効果を増強する因子ではないかと考え実験を行った。その結果Tle6はPax6と協調してTRAP遺伝子の転写活性を抑制すること、NFATc1と直接結合することが分かり、Pax6によるTRAP遺伝子発現の抑制メカニズムの一端を担う因子であると考えられた。Tle/Groucho (Gro)ファミリーは転写コリプレッサーとして細胞分化抑制に機能を発揮するが、Tle/Groはそれ自身ではDNA結合能はもっておらず、DNA結合転写因子により誘導されて複合体を形成する。実際これまでもPaxファミリーの一つでB細胞の分化調節因子であるPax5はTle4, Tle1, Tle3と複合体を形成してB細胞の分化抑制機能を発揮する<sup>28,29</sup>ことや、Pax2及びPax8も同様にTle4に結合し転写抑制を引き起こす<sup>28</sup>ことが報告されている。さらにPax3もTle4と結合してメラノサイトの分化を抑制する<sup>30</sup>ことが分かっている。しかしながら今回の実験ではTle6とPax6の直接結合は検出されなかった。B細胞の分化ではTle4はPU.1に結合することによりリクルートされPax5の細胞分化抑制誘導することが分かっており<sup>30</sup>、Pax6とTle6の間にも別の因子が存在する可能性も考えられる。さらにPax6はHomeodomain-interacting Protein Kinase 2 (HIPK2)によりリン酸化されて活性化され、DNA結合能と転写活性化能が増加するとの報告<sup>31</sup>がありPax6の修飾による影響も考えられ、今後さらなる検討が必要である。

Pax6はこれまで脳、眼胚、腭臓の腭島などで発現が報告されている<sup>32-35</sup>が、本研究ではPax6が骨髄マクロファージ細胞と破骨細胞に発現することが初めて観察され直接的な骨代謝への関与が示唆された。これまでPax遺伝子ファミリーが骨代謝への関与する報告としては、Pax5遺伝子ノックアウトマウスの破骨細胞数の増加と骨量減少<sup>36</sup>、Pax9遺伝子欠損マウスの歯の欠損<sup>37</sup>、Pax7遺伝子変異マウスの顎の欠損などがあり<sup>38</sup>、Pax遺伝子が骨代謝に何らかの影響を与えることが示唆されたが、その詳細なメカニズムは明らかではなかった。Pax6遺伝子のノックアウトマウス解析では著明な脳の変形・欠損、眼・鼻構造の消失、腭臓の形成不全がみられ周産期致死となり<sup>39-41</sup>、骨に対する影響は明らかでなかった。そこで破骨細胞に発現するPax6の作用メカニズムの解明はPaxファミリーの骨代謝への影響の解明にも重要であると考えられた。

今回の実験では、Pax6は量依存性にTRAP遺伝子発現を抑制した (Fig. 3B). また骨髄マクロファージ細胞内よりその発現がみられ (Fig. 1B, C), TRAP遺伝子プロモーターと結合しているという結果 (Fig. 2C, D) から、Pax6はTRAP遺伝子の発現を抑制して破骨細胞分化を負に制御する因子として働いている可能性が考えられる. さらにRANKL刺激が加わると何らかのシグナルがPax6に伝わりTRAP遺伝子プロモーターから結合がはずれると破骨細胞は分化を始める. 分化に伴い再度結合能を回復し (Fig. 2D) 破骨細胞の過形成を抑制するようになるという仮説が考えられる. 言い換えると、Pax6が破骨細胞の分化抑制のスイッチを分化過程でオン・オフの状態に切り替える作用をしているのではないかと推測される. 破骨細胞の機能亢進を抑制する働きは生体内で骨代謝のバランスを保つために常に働いており、生理的リモデリングの過程ではRANKL刺激で破骨細胞内でc-Fos依存的にIFN- $\beta$ の発現が誘導され、さらにIFN- $\beta$ が破骨細胞に作用してc-Fosの発現を抑制することにより破骨細胞分化を阻害する<sup>23)</sup>ネガティブフィードバックの機構が働いている. 炎症時の病的な骨吸収の際は、T細胞は破骨細胞の分化促進因子のRANKLやTNF- $\alpha$ を産生する一方でIFN- $\gamma$ を産生し、破骨細胞内のTRAF6を分解し破骨細胞分化を抑制している<sup>22)</sup>. また破骨細胞の抑制因子Idは前駆細胞でMitfと結合してOSCAR遺伝子プロモーターへの結合を抑制しているが、RANKL刺激で結合が離れることにより破骨細胞の分化が進む<sup>24)</sup>. Pax6はこれらの因子と共に破骨細胞の過剰な分化を抑制する新たな調節因子であると考えられる. さらに、レトロウイルスを使ったPax6の強制発現で破骨細胞への分化が抑制されたこと (Fig. 7) は、Pax6が破骨細胞内で分化抑制因子として重要な働きをすることを支持する結果であった. しかしながらPax6のみの強制発現では多核の巨細胞への分化は著明に抑制されたが破骨細胞分化を完全に抑制はしておらず、*in vivo*でもPax6が他の因子と協調して作用を増強する可能性を示唆する結果が得られた.

## 結 語

我々はPax6が破骨細胞の分化を抑制する新しい機能を有することを見出した. RANKL刺激によりその発現量やTRAP遺伝子プロモーターへの結合能が変化することから、破骨細胞の分化が過剰に亢進しないように作用している可能性が示された. Pax6の破骨細胞の分化抑制因子としての機能が解明され、分化を制御することができれば、破骨細胞の機能亢進の病態である骨粗鬆症や関節リウマチといった疾患の新たな有効な治療法の開発として発展することが期待される.

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導頂いた埼玉医科大学糖尿病・内分泌学教室 片山茂裕教授、同大学分子生物学教室 禾泰壽教授、城西国際大学臨床薬理講座 和田誠基教授に深謝いたします. また直接ご指導いただいた埼玉医科大学分子生物学教室 松本征仁講師に深く感謝いたします.

## 文 献

- 1) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999;20:345-57.
- 2) Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 2002;8:147-59.
- 3) Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 2002;20:795-823.
- 4) Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, et al. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999;13:1015-24.
- 5) Naito A, Azuma S, Tanaka S, Miyazaki T, Takaki S, Takatsu K, et al. Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* 1999;4: 353-62.
- 6) Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423: 337-42.
- 7) Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289:1504-8.
- 8) Wong BR, Josien R, Lee SY, Vologodskaja M, Steinman RM, Choi Y. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* 1998;273:28355-9.
- 9) Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 1995;270:14843-6.
- 10) Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* 2000;2:110-6.
- 11) Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, et al. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 1994;266:443-8.
- 12) Iotsova V, Caamano J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R.

- Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med* 1997;3:1285-9.
- 13) Tondravi MM, McKercher SR, Anderson K, Erdmann JM, Quiroz M, Maki R, et al. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* 1997;386:81-4.
  - 14) Weilbaecher KN, Motyckova G, Huber WE, Takemoto CM, Hemesath TJ, Xu Y, et al. Linkage of M-CSF signaling to Mitf, TFE3, and the osteoclast defect in Mitf(mi/mi) mice. *Mol Cell* 2001;8:749-58.
  - 15) Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 2002;3:889-901.
  - 16) Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, et al. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development* 1996;122:3151-62.
  - 17) Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13453-8.
  - 18) Kim N, Takami M, Rho J, Josien R, Choi Y. A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. *J Exp Med* 2002 Jan 21;195(2):201-9.
  - 19) Matsumoto M, Kogawa M, Wada S, Takayanagi H, Tsujimoto M, Katayama S, et al. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem* 2004;279:45969-79.
  - 20) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19.
  - 21) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998;139:1329-37.
  - 22) Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 2000;408:600-5.
  - 23) Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 2002;416:744-9.
  - 24) Lee J, Kim K, Kim JH, Jin HM, Choi HK, Lee SH, et al. Id helix-loop-helix proteins negatively regulate TRANCE-mediated osteoclast differentiation. *Blood* 2006;107:2686-93.
  - 25) Dahl E, Koseki H, Balling R. Pax genes and organogenesis. *Bioessays* 1997;19:755-65.
  - 26) Luchin A, Purdom G, Murphy K, Clark MY, Angel N, Cassady AI, et al. The microphthalmia transcription factor regulates expression of the tartrate-resistant acid phosphatase gene during terminal differentiation of osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2000;15:451-60.
  - 27) Matsumoto M, Hisatake K, Nogi Y, Tsujimoto M. Regulation of receptor activator of NF-kappaB ligand-induced tartrate-resistant acid phosphatase gene expression by PU.1-interacting protein/interferon regulatory factor-4. Synergism with microphthalmia transcription factor. *J Biol Chem* 2001;276:33086-92.
  - 28) Eberhard D, Jimenez G, Heavey B, Busslinger M. Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho family. *EMBO J* 2000;19:2292-303.
  - 29) Linderson Y, Eberhard D, Malin S, Johansson A, Busslinger M, Pettersson S. Corecruitment of the Grg4 repressor by PU.1 is critical for Pax5-mediated repression of B-cell-specific genes. *EMBO Rep* 2004;5:291-6.
  - 30) Lang D, Lu MM, Huang L, Engleka KA, Zhang M, Chu EY, et al. Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature*. 2005;433:884-7.
  - 31) Kim EA, Noh YT, Ryu MJ, Kim HT, Lee SE, Kim CH, et al. Phosphorylation and transactivation of Pax6 by homeodomain-interacting protein kinase 2. *J Biol Chem* 2006;281:7489-97.
  - 32) Sander M, Neubuser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* 1997;11:1662-73.
  - 33) van Heyningen V, Williamson KA. PAX6 in sensory development. *Hum Mol Genet*. 2002;11:1161-7.
  - 34) Chi N, Epstein JA. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* 2002;18:41-7.
  - 35) Pichaud F, Desplan C. Pax genes and eye organogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12(4):430-4.



- 36) Horowitz MC, Xi Y, Pflugh DL, Hesslein DG, Schatz DG, Lorenzo JA, et al. Pax5-deficient mice exhibit early onset osteopenia with increased osteoclast progenitors. *J Immunol* 2004;173:6583-91.
- 37) Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 1998;12:2735-47.
- 38) Mansouri A, Stoykova A, Torres M, Gruss P. Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7<sup>-/-</sup> mutant mice. *Development* 1996;122:831-8.
- 39) Simpson TI, Price DJ. Pax6; a pleiotropic player in development. *Bioessays* 2002;24:1041-51.
- 40) Hill RE, Favor J, Hogan BL, Ton CC, Saunders GF, Hanson IM, et al. Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 1991;354:522-5.
- 41) Stoykova A, Fritsch R, Walther C, Gruss P. Forebrain patterning defects in Small eye mutant mice. *Development* 1996;122:3453-65.