

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

丸木記念特別賞受賞

ゲノム編集法を利用した破骨細胞分化における Nfatc1 アイソフォームの機能解析

研究代表者 佐藤 浩二郎 (大学病院 リウマチ膠原病科)

研究分担者 立花 秀介*, 柳澤 麻依子*

緒 言

関節リウマチ (RA) は原因不明の炎症性多発関節炎であり, 発症には自己免疫の関与が想定されている. 炎症の主座は関節滑膜にあり, 炎症が持続する結果として骨の破壊と関節の変形がもたらされる. 骨の破壊において, 破骨細胞と呼ばれる単球/マクロファージ系の多核細胞が重要な役割を果たすと考えられている. 骨基質を吸収する破骨細胞と骨を形成する骨芽細胞の機能は通常バランスを保っており, 正常な骨格系を保つが, 破骨細胞の機能が亢進する場合にRAにおける骨破壊や, 骨粗鬆症に見られる骨密度の低下を引き起こす. 従って, 破骨細胞の分化や機能の亢進のメカニズムを理解することは医学的に重要な課題である. 1998年に破骨細胞分化因子としてのサイトカインRANKLが同定された後, 破骨細胞研究は飛躍的に進歩した. 生存因子であるM-CSFと組み合わせることによりin vitroで破骨細胞を分化させることが可能となり, 破骨細胞分化のマスターレギュレーター転写因子としてnuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 1 (Nfatc1) が同定された¹⁾. 破骨細胞分化の過程でNFATc1の発現量はmRNA, タンパクレベルのいずれにおいても著増する. またNfatc1の欠損マウスは胎生致死であるがキメラマウスを用いた検討によりNfatc1欠損細胞は破骨細胞に分化できないことがin vitro, in vivoで証明された²⁾. Nfatc1を含むNFATファミリー転写因子は元々T細胞の分化・機能に重要な役割を果たすことが知られており, その核移行を抑制するサイクロスポリンAやタクロリムスは免疫抑制薬として臓器移植の際の拒絶の抑制や自己免疫疾患の治療に用いられる重要な薬剤である. タクロリムスは本邦では関節リウマチにも保険適応がある. ただし各NFATメンバーに特異的な阻害薬ではない. Nfatc1には5種類のアイソフォームが存在することが報告されている. 2002年にSerflingらによってT細胞においてはNfatc1 short formがアポトーシスの阻害に働くことが提唱された³⁾. しかしその具体的な標的遺伝子は明らかになっていない. short formは利用するプロモーター (P1) が他のアイソ

フォーム (P2) と異なっている³⁾. 破骨細胞分化の過程で発現が確認できるアイソフォームは3種類であり, 更に発現が著増するアイソフォームはshort formのみである. short formはexon 1を他のアイソフォームと異にするため, N末側のアミノ酸配列がユニークであり, basalに発現している他のアイソフォームとはリン酸化などの制御が異なることが予測される. また, short formのみが特異的に著増する現象の意義は明らかではない. 本研究の目的は

- (i) 破骨細胞分化の過程で発現が誘導されるNfatc1 short form特異的ノックアウト (KO) マウスを作出し, 破骨細胞分化における同分子の機能をin vivoおよびin vitroの両面から明らかにすること
 - (ii) GFP融合タンパクの強制発現実験によってNfatc1 アイソフォームの核移行の詳細を明らかにすること
- である. 本研究は2016年5月の時点で完結してないため, 今回はこれまでの途中経過について解説する.

材料と方法

破骨細胞分化過程における Nfatc1 アイソフォームの同定と定量

マウス大腿骨より骨髓細胞を採取した. 10%ウシ胎仔血清添加αMEM培地で培養したが, 2日間は10 nM M-CSF存在下で培養し破骨細胞前駆細胞を得た. その後3日間10 nM M-CSFおよび50 nM RANKL存在下で培養した. 培地交換は2日おきに行った. TRAP染色を行いTRAP陽性多核細胞を破骨細胞と定義した. Nfatc1各アイソフォーム特異的なプライマーを用いたRT-PCRおよびサイバークリーン法による定量RT-PCRを行った. 用いたプライマーは下記の通りである.

[5' 側プライマー]

- ① Nfatc1Sense P1 GGA TGC CAA GTA CCA GCT TTC
あるいは
- ② Nfatc1Sense P2 GAC ATG ACG GGG CTG GAG CAと
- ③ Nfatc1Antisense GAA CAG CTG AGA TAC CCG GG
の組み合わせ

[3' 側プライマー]

- ④ Nfatc1Sense ver3 CCT TTC CGC AAC CAG AGG ATと

*大学病院 リウマチ膠原病科

- ⑤ Nfatc1Antisense short CTC AGT AAA AAC CTC CTC TCA G
- ⑥ Nfatc1Antisense long only GCT ACT GTT CAG ATG TGG AC
- ⑦ Nfatc1Antisense long+middle TTA GGA GTG GGG GAT CGT GCの組み合わせ

short全長の増幅には①と⑤の組み合わせmiddleおよびlong全長の増幅には②と⑦の組み合わせを用いた。

Nfatc1 アイソフォームのクローニングおよびレトロウイルスベクターの構築

3種類のNfatc1アイソフォームのcDNAをpMD20-Tvector (Takara) にTAクローニングした。ShortおよびmiddleについてはインサートをHindIII (切断後平滑化), EcoRIで切り出した後にPMX-IRES-GFPベクター (EcoRI, StuIで切断) にligationすることでレトロウイルスベクターを構築した。LongについてはインサートをHindIII (切断後平滑化), EcoRIで切り出した後にBamHI (切断後平滑化), EcoRIで切断したベクターにligationした。

レトロウイルスベクターの感染実験

PlatE細胞をパッケージング細胞として上記レトロウイルスベクターをトランスフェクションした。FuGENE HD (プロメガ) をプロメガ社のプロトコール通りに用いた。2日後に培養上清を回収し、polybren 10 ng/mL, ウシ胎仔血清5%, M-CSF 10 ng/mL (いずれも最終濃度) を添加し培養2日目, 3日目の破骨細胞前駆細胞に4時間ずつ感染させた。4日目よりM-CSF, RANKL添加培養液に切り替えた (すなわち通常の破骨細胞培養よりもRANKLを添加するタイミングが1日遅れる)。

Nfatc1-GFP融合タンパク発現ベクターの構築

クローニングされた3種類のNfatc1アイソフォームをtemplateとしてPCRによりインサートを調整した。プライマーは下記の通りである。

[5' 側プライマー]

- ⑧ aaaEcoShortSense:

AAAGAATTCGGATGCCAAGTACCAGCTTTC

- ⑨ aaaEcoLongSense:

AAAGAATTCGACATGACGGGGCTGGAGCA

[3' 側プライマー]

- ⑩ aaaSalShortAnti:

AAAGTCGACAAACCTCCTCTCAGCTCACTC

- ⑪ aaaSalMiddleAnti:

AAAGTCGACTGCGGCTGTAGCCTGGCGG

- ⑫ aaaSalLongAnti:

AAAGTCGACTGGGGGATCGTGCTGGAGAG

shortの増幅には⑧⑩, middleには⑨⑪, longには⑨⑫の組み合わせでKOD-plus-Ver. 2 (TOYOBO) を用いて増幅した。EcoRI, SalIで切断し精製したインサートをEcoRI,

SalIで切断したpRetroQ-AcGFP1-N1 Vector (Takara) にligationした。

Nfatc1 short form特異的ノックアウトマウスの作出

ノックアウトマウスの作出はMashikoらの方法に倣った⁴⁾。まずOptimized CRISPR design tool (<http://crispr.mit.edu/>) を用いてguide RNAの候補を4種類選択した。その配列を用いて4種類のpX330ベクターを構築した。ゲノム編集の効率を確認するため、CAS9のターゲット配列を含むNfatc1ゲノム断片をGFP遺伝子の間に挿入することで蛍光を発しない発現ベクター (pDGXXFP-Nfatc1) を構築し、各pX330-Nfatc1ベクターと共にHEK293T細胞に導入した。ターゲット配列が切断され、生じた末端がhomology-directed repairにより修復されるとGFP遺伝子が再構築され、発現したタンパク質が蛍光を発する。蛍光を発する細胞の割合が高いことはすなわちCAS9のNfatc1 short form切断活性が高いことを意味する。そのようなベクターを選んでマウス受精卵前核に顕微注入し、得られた仔マウスの遺伝子をダイレクトシーケンスし、Nfatc1遺伝子改変の有無を確認した。変異の波形が十分に高い個体 (すなわちキメラ率が高いと考えられる個体) を3種類選んでF1作製に供した。ヘテロ変異マウスの交配によりホモ変異マウスを得た。

結 果

既報の通り3種類のアイソフォームが存在すること、最も短い塩基配列を持つアイソフォーム (short form) のmRNAが分化の過程で数百倍のオーダーで増加すること、残りの2種類は分化過程で増加しないことを見いだした (図1A)。タンパクレベルでも破骨細胞分化後に3本の独立したバンドが確認された (図1B)。

構築したレトロウイルスベクターをHEK293T細胞に導入すると、破骨細胞で認められる3種類のバンドに相当するバンドがそれぞれ認められた (図1B)。同様にGFP融合タンパクも発現が確認された (図1C)。

3種類のウイルスをそれぞれ感染させた場合、RANKL非存在下では破骨細胞 (TRAP陽性多核細胞) の誘導は認められなかったが、RANKL存在下ではshort formの強制発現の場合にのみTRAP陽性多核細胞がRANKL添加2日目より認められた (図2)。

guide RNAの候補を図3に示す。pDGXXFP-Nfatc1と各pX330-Nfatc1ベクターと共にHEK293T細胞に導入したときに蛍光を発する細胞が多いと判断されたものはpX330-Nfatc1-1, pX330-Nfatc1-4の2種類であった。pX330-Nfatc1-1, pX330-Nfatc1-4をマウス受精卵前核に顕微注入し、得られたキメラマウスを野生型マウスと交配した。目的のヘテロ変異マウスを選び交配することで予定通り3系統のノックアウトマウスを樹立した。ノックアウトマウスはメンデル則に従い誕生し、明らかな外見的異常を認めなかった。更にin vitroにおける破骨細胞分化

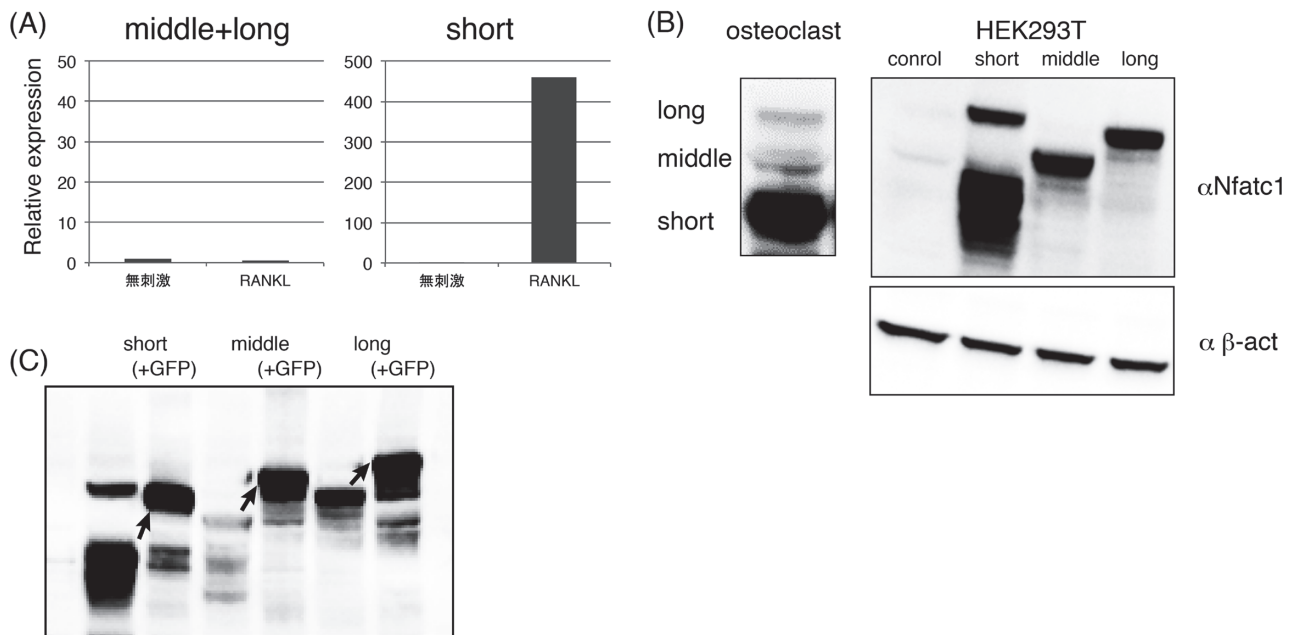


図 1. (A) 破骨細胞前駆細胞をRANKLあり/なしの条件で培養3日後に回収, Nfatc1のshort特異的プライマーおよびmiddle, longに共通のプライマーを用いてqRT-PCRに供した. Gapdhをコントロールとし, RANKLなしのサンプルの発現を1とした場合の発現レベルを示す. (B) 破骨細胞(前駆細胞をRANKL存在下で3日培養したもの)とHEK293T細胞にNfatc1各アイソフォームの発現ベクターをトランスフェクションして2日目の細胞のNfatc1のタンパクレベルの発現. 対応するバンドが観察されている. (C) Nfatc1各アイソフォームの発現ベクターおよび, それぞれのアイソフォームにGFPを融合させたタンパクの発現ベクターをトランスフェクションして2日目のHEK293T細胞を用いたウェスタンブロットティング. 各アイソフォームのシフトが観察される.

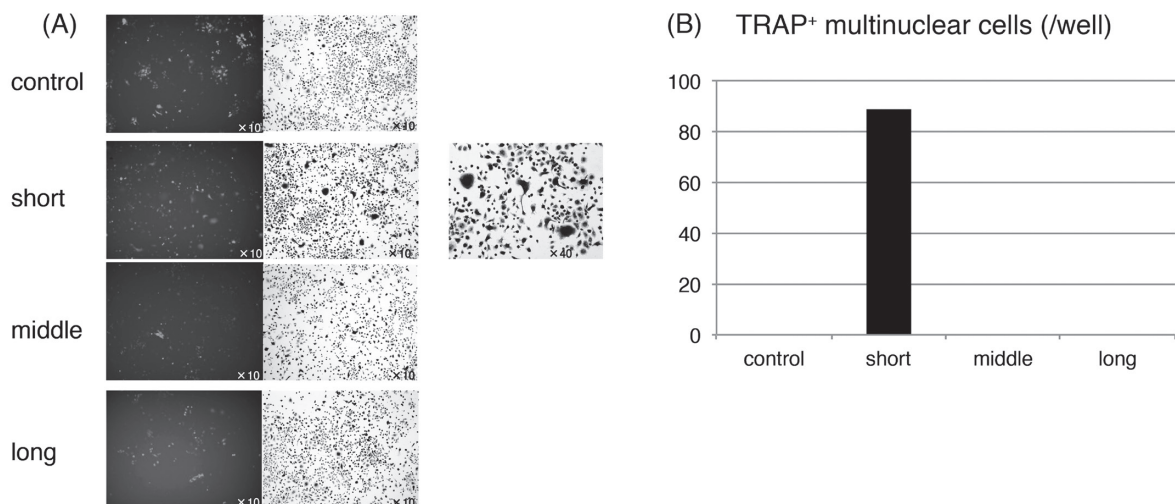


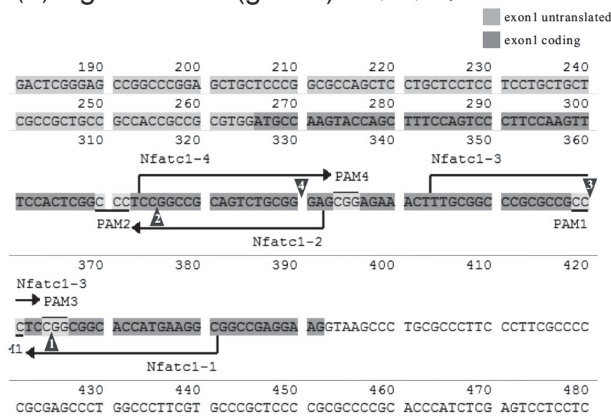
図 2. (A) 破骨細胞前駆細胞にレトロウイルスを用いてNfatc1各アイソフォームを強制発現した. 感染細胞はGFPを発現するため蛍光顕微鏡で蛍光が観察される. RANKL刺激後2日目でshort formを強制発現した細胞のみTRAP陽性多核細胞が観察された. RANKL刺激後3日目ではコントロールを含む全てのwellで破骨細胞が観察された (data not shown). またRANKL刺激無しでは破骨細胞は観察されなかった (data not shown) (B) (A) の定量化.

の程度は同腹の対照マウス(野生型)と比べて差異を認めなかった(図4). 意外なことにWestern blot解析ではshort formに相当するバンドが対照サンプルと同程度に認められた(図4).

考 察

RANKLの非存在下ではどのNfatc1のアイソフォームを強制発現しても破骨細胞の分化は認めなかった. このことはNfatc1単独では破骨細胞分化を誘導することが

(A) guide RNA (gRNA) のデザイン



(B) Nfatc1 gRNA の評価

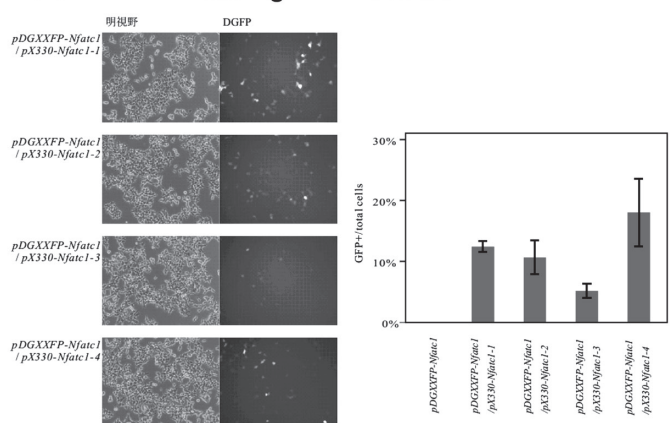
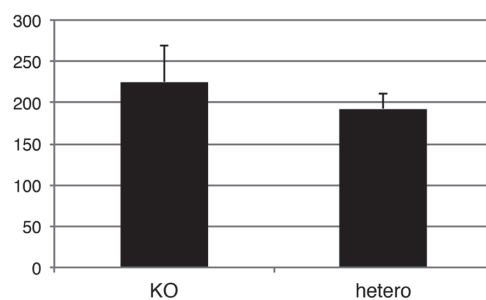


図 3. (A) guide RNA (gRNA) のデザインNfatc1のshort formを特異的にノックアウトするようにexon 1をターゲットとして4種類設計した。(B) Nfatc1 exon 1を導入したpDGXXFP-Nfatc1と各gRNAを導入したpX330-Nfatc1-1~4をco-transfectionした。切断および組み替えが起きた細胞ではGFPが発現するようになり蛍光を発することを利用して切断効率を評価できる。

(A) TRAP+ multinuclear cells (/well)



(B) KO hetero

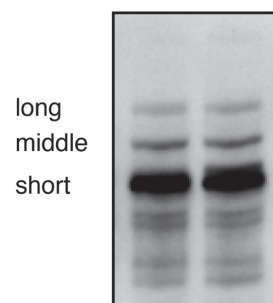


図 4. (A) Nfatc1欠損マウス (樹立した3種類の内のクローンNo3) 由来の骨髄細胞からin vitroで破骨細胞を誘導した。ヘテロ欠損マウスをコントロールとして用いた。(B) 同じサンプルを用いてNfatc1のタンパクレベルの発現を評価した。ホモ欠損マウスでもshort formが強く誘導されていることが確認された。他のクローンでも同様の結果であった (data not shown)。

できないことを意味する。今回のNfatc1は恒常活性化型ではないため、Caシグナルの不足から十分に核移行できず、破骨細胞分化を誘導する程度の転写活性を示すことができない可能性も考えられる。

一方で、RANKL存在下ではshort formの強制発現の場合のみ破骨細胞分化のタイミングが早まることが観察された。このことからshort formはmiddle, longの各アイソフォームとは異なる機能を果たしていることが示唆される。今後GFP融合Nfatc1の強制発現実験により各アイソフォームの細胞内局在や、各種キナーゼやホスファターゼの阻害薬添加の影響を評価する予定である。

今回、最近実用化された遺伝子編集技術 (CRISPR/Cas) を用いて遺伝子改変マウスを作出した。Nfatc1のノックアウトマウスは胎性致死であることが知られているため今回のshort form特異的ノックアウトマウスでも同様の表現型を示す可能性はあったが、実際にはホモ遺伝子改変マウスは生まれてきており、予想外に

外見上の異常を全く示さなかった。in vitroの破骨細胞分化にも著変が無く、更に意外なことにshort formに相当するバンドがWestern blot解析で認められた。このことからshort formがノックアウトされていない可能性が示唆される。この原因として、報告されていた翻訳開始点の次のATGが翻訳開始点として機能していることも考えられる。そのため今後はペプチドシーケンスなどを用いてshort formの先頭部分のアミノ酸配列を同定することを計画している。実際に2番目のATGが翻訳開始点になっている場合はそもそも従来の翻訳開始点が誤っている可能性もある。同部位の配列はヒトとマウスで保存されているため、ヒトのサンプルでも同様にshort formの翻訳開始点を解析する必要が出てくるかもしれない。

謝 辞

本研究は平成27年度学内グラント (丸木記念特別賞) の助成を受けて行われたものであり、ここに深謝致します。

参考文献

- 1) 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 Dec; 3(6): 889-901.
- 2) Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med* 2005 Nov 7; 202(9): 1261-9.
- 3) Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrsin D, Akimzhanov A, Moroz D, Jha MK, et al. Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity* 2002 Jun; 16(6): 881-95.
- 4) Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep* 2013 Nov 27; 3: 3355.

研究成果リスト

論文

- 1) Miyoshi F, Sato K and Mimura T. Changes in the pattern of cytokine production from peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab and their relation to plasma arginase activity. Version of Record online: 12 MAY 2016, DOI: 10.1111/1756-185X. 12864

学会発表

- 1) 柳澤麻依子, 立花秀介, 相崎良美, 佐藤浩二郎, 三村俊英. キメラ培養系を用いたヒト破骨細胞の共存培養系確立の試み, 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016年4月21日, パシフィコ横浜
- 2) 立花秀介, 相崎良美, 柳澤麻依子, 佐藤浩二郎, 三村俊英. 破骨細胞分化におけるNFATc1 isoformによる機能的差異の検討, 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016年4月21日, パシフィコ横浜

特許出願等

なし