

【平成20年8月末までの研究成果】

ショウジョウバエS2細胞をモデル系として、ハエ脆弱X遺伝子産物FMR1 (dFMR1) が形成する複合体に特異的な小分子RNAの同定を試みた。dFMR1はRISC中核因子Argonaute蛋白質の一つであるAGO2と相互作用することから、まず、AGO2複合体に含まれる小分子RNAの同定を行った。その結果、この複合体には内在性siRNAが含まれており、その多くがトランスポゾン（転移因子）に由来していた。線虫以外で内在性siRNAが同定されていたが、高等真核生物における最初の内在性siRNAの同定である。また、この成果はAGO2がトランスポゾンの抑制に関与していることを示唆し、したがって、dFMR1もその経路で機能する可能性がでてきた。一方、同様の解析をヒト細胞でも行う為に、ヒトFMR1やヒトAGO1-AGO4に対する免疫沈降法に使用可能なモノクローナル抗体のスクリーニングを進め、ヒトAGO1-AGO4に対するモノクローナル抗体を作成することができた。

【GNPとの関連・GNPへの貢献】

a) 転写・制御の解明に関連する研究成果

トランスポゾンの発現は染色体の修飾（ヘテロクロマチン化やDNAのメチル化）を通して転写レベルで抑制されていることが知られている。トランスポゾン由来の内在性siRNAの発見は、これら小分子non-coding RNAが特定染色体領域を修飾するためのガイド分子として機能する可能性を示唆する。

b) 縦軸研究（又は横軸研究）への貢献に繋がる研究成果

抗体を用いたタンパク質-小分子non-coding RNA複合体の精製法およびその複合体からの小分子non-coding RNAの単離同定法を確立した。これらの技術は今後ますます重要となるmiRNAに代表される小分子non-coding RNAの研究に極めて有用である。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

特になし。

【主な研究論文とその概要】

1. Gunawardane, LS., Saito, K., Nishida, KM., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H., and Siomi, MC. 2007. A Slicer-mediated mechanism for rasiRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* **315**: 1587-1590.

最近のRNAi関連分子経路の解析から、このメカニズムにおける鍵となる分子は 20-30 塩基長の小分子RNAであることが明らかとなった。これら小分子RNAは、多くの場合、タンパク質複合体が特定の核酸配列を認識する為のガイド分子として機能し、特定RNAの分解や翻訳抑制、さらにはDNAのメチル化や染色体のヘテロクロマチン化に参与する。このような小分子RNAが関与する遺伝子抑制現象は、現在、包括的にRNAサイレンシングと呼ばれている。RNAサイレンシングは特定遺伝子または特定染色体領域のoffスイッチとしての機能ばかりでなく、プロテオームを微調整 (fine-tuning) することで細胞タイプや組織タイプの多様化を生み出し、しかもいったん分化した細胞や組織をその状態に留めおく機能もあることがしだいに明らかとなって来た。また、最近、各種腫瘍を始めとして様々な疾患発症にRNAサイレンシング機構の異常または破綻が関与していることが明らかになりつつある。さらに、ES細胞におけるmiRNA制御の重要性が明らかにされつつあり、今後、RNAサイレンシング研究はiPSを含む幹細胞研究の重要な分野になっていくと予想される。RNAサイレンシングの中核となるタンパク質因子はArgonauteである。このタンパク質は、遺伝子ファミリーを形成し、ほぼ全ての細胞や組織で発現するグループと生殖細胞系に特異的に発現するグループの2つに分類される。前者はAGOサブファミリー、後者はPIWIサブファミリーと呼ばれている。ショウジョウバエにはAGOサブファミリーが2種類 (AGO1, AGO2)、またPIWIサブファミリーが3種類 (Ago3, Aub, Piwi) 存在する。この内、PIWIサブファミリータンパク質はpiRNA (rasiRNAとも呼ばれる) と呼ばれる小分子RNAと結合し、生殖幹細胞の形成と維持に必須であることがわかっていたが、piRNAの生合成経路は不明であった。本研究では、Ago3, Aub, Piwiにそれぞれ結合するpiRNAを単離し、その配列を決めた結果、Ago3には転移因子の転写産物に由来する、つまりセンス鎖に由来するpiRNAが、一方、AubとPiwiには転移因子の反対鎖に由来する、つまりアンチセンス鎖に由来するpiRNAが結合していること、しかも Ago3 に結合するpiRNAとAubに結合するpiRNAを比較した際、5'末端の 10 塩基が完全な相補性を示すものペアが数多く見つかった。これらの結果から、piRNAの5'端の形成はpiRNAと相互作用しているAgo3 とAubがその標的RNA切断活性 (Slicer) を用いて互いに反対鎖を切断し合うサイクルを形成していることを示唆する。

2. Azuma-Mukai, A., Oguri, H., Kin, T., Qian, ZR., Asai, K., Siomi, H., and Siomi, MC. 2008. Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**:7964-7969.

ヒト AGO サブファミリータンパク質に対する特異的なモノクローナル抗体の作成するため、これら 4 種の AGO サブファミリータンパク質において比較的相同性の低いアミノ末端 150 アミノ酸を GST 融合タンパク質として大腸菌で発現精製し、それらを抗原として用い、マウスを免疫した。その後、反応マウスのリンパ節細胞を用いてハイブリドーマを作製し、そこから免疫沈降法に使用できる抗体をスクリーニングした。その結果、hAGO2 と hAGO3 に関して、免疫沈降法に使用できるモノクローナル抗体を取得することができた (図 4)。これら抗体を用いて、図 1 で示した同じ手法を用い、小分子 RNA を精製した (図 5)。これら小分子 RNA をそれぞれゲルから単離し、クローニングを行い、その配列を 454 シーケンス法でそれぞれ 6 万から 8 万リードを決定した。

その結果、ヒト AGO2 と AGO3 いずれにおいても、結合している小分子 RNA の大部分が miRNA であった (図 6)。miRNA はほぼ全ての細胞に発現し、細胞の分化発生、さらには最近では、疾患や幹細胞の形成とその維持に極めて重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。ヒト AGO2 と AGO3 に結合している miRNA を詳細に調べると、幾つかの miRNA 種に関して結合に偏りが見られた。たとえば、miR-99b や miR-432-3p は AGO3 に、一方、miR-92b や miR-93 は AGO2 に優先的に結合していることが明らかになった。これらの結果から、ヒト AGO2 と AGO3 に機能分担があること、また、Dicer によるプロセッシング後、miRNA 種の違いにより、優先的にある種の AGO に結合する経路が存在することが示唆された。

3. Kawamura, Y., Saito, K., Kin, T., Ono, Y., Asai, K., Sunohara, T., Okada, NT., Siomi MC. & Siomi, H. 2008. *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute2 in somatic cells. *Nature* **453**: 793-797.

FMR1 の siRNA 分子経路への関与をさらに検討するため、dFMR1-AGO2 複合体に相互作用している内在性の siRNA の単離とクローニングを試みた。この複合体内で、dFMR1 それ自身には小分子 RNA は結合していないが、AGO2 には小分子 RNA が極めて強く結合していることが判明した。免疫沈降の条件を様々に検討し、Empigen を含むバッファを用いた際に、夾雑物を極めて低く抑えることができることがわかった。この条件でショウジョウバエ体細胞由来の培養細胞 S2 から免疫沈降法にて相互作用する小分子 RNA を同定した。これら AGO2 に結合している小分子 RNA をゲルから精製し、小分子 RNA クローニング法を用いて、クローニングし、その配列を 454 シーケンス法にて決めた。約 7 万のクローニング断片を読んだ結果、これら小分子 RNA (19~22 塩基長) の大部分がゲノムのトランスポゾン (特にレトロトランスポゾン) 領域に由来していた。また、これら小分子 RNA は Dicer2 依存的に産生されることを明らかにした。さらに、Dicer2 の変異体ではこれら小分子 RNA の産生が見られず、一方、幾つかのレトロトランスポゾンの発現が上昇していた。以上の結果を総合すると、AGO2 は各種トランスポゾンに由来する内在性 siRNA と相互作用しており、しかもこれら内在性 siRNA は体細胞において幾つかのレトロトランスポゾンの発現を抑制していることが明らかとなった。dFMR1 はこの AGO2 と相互作用していることになる。これらのことから、私達は脆弱 X 症候群発症における「トランスポゾン仮説」を提唱するに至った。この仮説は、トランスポゾンは神経前駆体細胞を含む体細胞でこれまで考えられていた以上に活発に転写されており、したがって、ある頻度でゲノムのある領域に転移挿入される可能性がある。AGO2/FMR1 複合体はこれら体細胞におけるトランスポゾンの転移を抑制しており、したがって、この複合体の機能異常がトランスポゾンの、たとえば、神経関連遺伝子へ転移挿入を変化させ、その結果、ある神経特異的遺伝子の過剰発現または過少発現を招く、というものである。

【特許出願数の実績】

なし。

ゲノムネットワークプロジェクトの
課題の報告

プログラム名	(1) ゲノム機能情報の解析 (2) ヒトゲノムネットワークプラットフォームの構築 (3) 次世代ゲノム解析技術の開発 (4) <u>個別生命機能の解析</u> (5) 動的ネットワーク解析技術開発					
課題の分類	(1) 中核機関 (2) 指定課題 (3) <u>公募課題</u>					
課題名 (和英併記)	個別生命機能における転写因子の機能ネットワークと疾患 (Functional Networks of Transcription Factors in Individual Biological Function and Related Diseases)					
代表研究者名 (所属機関・職名)	高橋 智 (国立大学法人筑波大学・教授)					
年度別研究費 (千円)	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	合計
	22,000	18,000	18,000	33,000	20,000	111,000
	研究者名		所属機関・部局・職			専門分野
研究 組 織 図	代表機関	☆高橋 智	筑波大学 大学院人間総合科学研究科・教授			発生工学
		濱田 理人	筑波大学 大学院人間総合科学研究科・研究員			分子生物学
		☆加藤 光保	筑波大学 大学院人間総合科学研究科・教授			実験病理学
		伊東 進	筑波大学 大学院人間総合科学研究科・准教授			分子生物学
		☆石井 俊輔	筑波大学 大学院人間総合科学研究科・教授			分子生物学
【研究目的】						
<p>高等生物個体の発生を担う転写因子群は、類似の生化学的構造を持つ分子群からなるファミリーを形成している。また、これらの転写因子群が機能するためには、転写因子とその活性を調節するシグナル分子群が一体となって機能的ネットワークを形成している。ゲノム情報の活用のためには、ゲノム上に分散している遺伝子群をこの機能的ネットワークを単位として捕らえることが必要で、それによって全く異なった遺伝子が同じ疾患の原因になることも理解することが可能となる。本申請では、様々な遺伝子改変方法が利用可能なマウスをモデル生物として、時空間的に使い分けられる転写因子群とシグナル伝達分子群を、個別生命機能に関与する機能的ネットワークとして同定し、それらの異常によって発生する表現型（疾患モデル）について解析する。</p>						
【課題の概要】						
<p>本申請では、マウスをモデル生物として、時空間的に使い分けられる転写因子群とシグナル伝達分子群を、個別生命機能に関与する機能的ネットワークとして同定し、それらの異常によって発生する表現型（疾患モデル）について解析する。特に本研究では、相互に機能を分担および相補するファミリーを形成する転写因子間ネットワーク（1次ネットワーク）と、タンパク質の相互作用（物理的会合やリン酸化）や標的結合配列の共有・競合によって形成される転写因子群間ネットワーク（2次ネットワーク）の個体発生における機能を明らかにするために、相互にネットワークを形成するTGFBR-Smadファミリー、Shnファミリーおよびb-Zip型転写因子であるATF-2とLarge Mafファミリーについて、個体レベルで解析を行う。</p>						

【平成20年8月末までの研究成果】

ALK-5D266Aノックインマウス、血管内皮細胞特異的Smad2, Smad3ダブルノックアウトマウス、内皮細胞特異的ALK-5ノックアウトマウスを作製し、Smad2, Smad3を介するTGF- β シグナルの血管新生における機能を明らかにした。さらに、TGF- β /BMPシグナルによる血管新生におけるE2-2を中心とした転写因子ネットワークを明らかにした。

Shn-2とATF-2ファミリー転写因子の変異マウスを用いて、Shn-2がBMP依存的な脂肪細胞分化に重要な役割を果たすこと、そしてATF-2が乳がん抑制因子として作用することを明らかにした。さらにATF-2ファミリー転写因子が、行動制御や脂肪細胞分化にも、重要な役割を果たすことを、明らかにしつつある。

大Maf群転写因子の変異マウスを用いて、MafAが成体のマウスにおいて、膵臓 β 細胞におけるインシュリンの転写及び分泌に必須の転写因子であることを明らかにした。また同じ大Maf群転写因子であるMafBが、胎生期の膵臓内分泌細胞で発現しており、MafBの欠損マウスでは、胎生期の膵臓 α および β 細胞の数が著しく減少すること明らかにした。さらに、MafAおよびMafBの二重欠損マウスでは、 β 細胞におけるインシュリンの転写がほとんど誘導されないことを明らかにした。これらの結果から、大Maf群転写因子は膵臓の内分泌細胞の最終分化に必須の転写因子であることを明らかにした。

一方、免疫担当細胞のマクロファージの機能発現にMafBが必須であることを明らかにしたが、MafB欠損のマクロファージでは、抗アポトーシス作用を有するAIMの発現誘導がおこらないため、様々な刺激に対してアポトーシスが誘導されやすいことを明らかにした。特に動脈硬化病巣で形成される泡沫細胞が形成されず、動脈硬化病巣が形成されにくいことを明らかにした。さらにc-Maf欠損マクロファージにおいても、造血支持能力が減少していることを明らかにした。このようにマクロファージの機能発現に、大Maf群転写因子が必須であることを証明しつつある。

【GNPとの関連・GNPへの貢献】

a) 転写・制御の解明に関連する研究成果

本研究で作製した遺伝子改変マウスを用いて、それぞれの転写因子、または関連因子によって制御される転写ネットワークを明らかにした。

1. 血管新生におけるSmad2, Smad3を介するTGF- β シグナルの役割の解明
2. TGF- β /BMPシグナルによる血管新生を制御する新たな転写因子ネットワークの同定
3. 脂肪細胞分化と乳がん発症を制御する新たな転写因子ネットワークの同定。
4. 膵臓 β 細胞の機能発現のネットワークの同定。
5. マクロファージ機能発現のネットワークの解明。

b) 縦軸研究（または横軸研究）への貢献に繋がる研究成果

脂肪細胞分化と乳がん発症に関連する遺伝子発現ネットワークのアレイ解析データを取得した。

縦軸間の共同研究として、高柳チーム、浅原チーム、井上チーム、岡崎チームに遺伝子改変マウスを供給した。

横軸の林崎チームにMafB欠損マクロファージのアレイデータを供給した。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

横軸FANTOM3 cDNA clone 88 clones、ヒトcDNA 2 clones、
GNP統合データベース

【主な研究論文とその概要】

1. Noda D, Itoh S, Watanabe Y, Inamitsu M, Dennler S, Itoh F, Koike S, Danielpour D, ten Dijke P and Kato M. ELAC2, a putative prostate cancer susceptibility gene product, potentiates TGF- β /Smad-induced growth arrest of prostate cells. *Oncogene* 25: 5591-5600, 2006. (GNP謝辞)
TGF- β による標的遺伝子の転写に、核タンパク質ELAC2が関与することを示した。
2. Jin W, Takagi T, Kaneshashi S, Kurahashi T, Nomura T, Harada J & Ishii S. Shn-2 controls BMP-dependent adipogenesis via interaction with Smad proteins. *Dev. Cell* 10, 461-471, 2006. (GNP謝辞)
Shn-2 KOマウスを用いて、Shn-2がSmadと相互作用し、BMP依存的な脂肪細胞分化に重要な役割を果たすことを明らかにした。
3. Maekawa T, Shinagawa T, Sano Y, Sakuma T, Nomura S, Nagasaki K, Miki Y, Saito-Ohara F, Inazawa J, Kohno T, Yokota J & Ishii S. Reduced levels of ATF-2 predispose mice to mammary tumors. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1730-1744, 2007. (GNP謝辞)
ATF-2ヘテロ変異マウスが高頻度に乳がんを発症し、ATF-2が乳がん抑制因子として作用することを明らかにした。
4. Moriguchi T, Hamada M, Morito N, Terunuma T, Hasegawa K, Zhang C, Yokomizo T, Esaki R, Kuroda E, Yoh K, Kudo T, Nagata M, Engel JD, Yamamoto M, Takahashi S. MafB is essential renal development and F4/80 expression in macrophage. *Mol Cell Biol.* 26, 5715-5727, 2006. (GNP謝辞)
MafBは菱脳形成、腎臓の糸球体形成およびマクロファージの機能分化に必須の転写因子であることを明らかにした。
5. Kato T, Shimano H, Yamamoto T, Yokoo T, Endo Y, Ishikawa M, Matuzaka T, Nakagawa Y, Yahagi N, Takahashi A, Sone H, Suzuki H, Toyoshima H, Hastay AH, Takahashi S, Gomi H, Izumi T, Yamada N. Granuphilin is activated by SREBP-1c and involved in impaired insulin secretion in diabetic mice. *Cell Metabolism.* 2, 143-154, 2006.
MafAが膵臓 β 細胞においてインシュリン分泌顆粒の細胞膜へのドッキングに必要なGranuphilinの発現誘導に必須であることを明らかにしたと同時に、脂質代謝制御転写因子であるSREBP-1cもGranuphilinの発現を誘導することを明らかにした。

【特許出願数の実績】

「遺伝子改変による新規糖尿病モデルマウスの開発」
(特願2006-345839、特開2008-154489)

ゲノムネットワークプロジェクトの
課題の報告

プログラム名	(1) ゲノム機能情報の解析 (2) ヒトゲノムネットワークプラットフォームの構築 (3) 次世代ゲノム解析技術の開発 (4) <u>個別生命機能の解析</u> (5) 動的ネットワーク解析技術開発					
課題の分類	(1) 中核機関 (2) 指定課題 (3) <u>公募課題</u>					
課題名 (和英併記)	運動器の形成・維持・老化に関わる遺伝子制御ネットワークの解明 (Gene Control Networks Associated with the Development, Maintenance, and Aging of the Locomotor System)					
代表研究者名 (所属機関・職名)	高柳 広 (国立大学法人東京医科歯科大学・教授)					
年度別研究費 (千円)	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	合計
	24,000	24,000	24,000	45,000	30,000	147,000
	研究者名	所属機関・部局・職			専門分野	
研究組 織 図	代表機関	☆ 高柳 広	東京医科歯科大学・分子情報伝達学・教授			骨免疫学・整形外科学
		篠原 正浩	東京医科歯科大学・分子情報伝達学・助教			骨免疫学・生化学
		中島 友紀	東京医科歯科大学・分子情報伝達学・助教			骨免疫学・分子生物学
分担機関	☆ (代表研究者)					
	(分担研究者)					
【研究目的】						
<p>高齢化社会が進展する中、生活の質に直結する運動器疾患の克服は医療上の大きな課題である。本業務課題では、骨・関節を構成する破骨細胞や骨芽細胞などを主な研究の対象とし、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析によって得られる遺伝子発現情報をもとにして、横軸研究で得られる情報を運動器分野において活用し、当該生体系において発現する遺伝子発現制御機構をネットワークとして理解することを目的とする。また、個別遺伝子の機能解析にあたっては、横軸研究から提供されるsiRNA、cDNAなどのリソースを活用し、最終的にはノックアウトマウスなどの遺伝学的手法を用いて個体レベルでの生理学的な意義の証明を推進することで、疾患治療に役立つ分子メカニズムの解明を目指す。</p>						
【課題の概要】						
<p>骨代謝細胞である破骨細胞、骨芽細胞の分化および機能に関する制御メカニズムを転写制御ネットワークの観点から解明する。破骨細胞および骨芽細胞分化段階における経時的網羅的遺伝子発現情報やプロテオーム解析を実施し、分化に伴って発現が亢進または抑制される分子を同定する。同定分子のノックアウトマウスの骨の表現型を解析することで、生命機能への関与を示すとともに、網羅的なプロモーター解析やタンパク質間相互解析を実施することで、運動器系における遺伝子発現制御機構ネットワークの解明を行う。</p>						

【平成20年8月末までの研究成果】

これまで骨代謝を担う細胞である破骨細胞及び骨芽細胞における転写因子 NFATc1 の重要な役割を中心に、骨代謝細胞における転写制御ネットワーク機構を明らかにしてきた。

NFATc1 は破骨細胞特異的な遺伝子発現を誘導することで成熟破骨細胞へと分化させるマスター転写因子として働くが、破骨細胞分化過程で発現量が上昇する共刺激免疫受容体 OSCAR も、NFATc1 の標的遺伝子として PU.1 や MITF より成る転写複合体によって制御されることを明らかにした。OSCAR はカルシウムシグナルを介して NFATc1 をさらに活性化する正のフィードバックループ機構を明らかにした (**J Biol Chem, 280:32905, 2005**)。

また NFATc1 の破骨細胞における機能は、相同性の高いファミリー分子である NFATc2 によって代償できない。NFATc1 および NFATc2 のプロモーター解析よりいずれも NFAT 結合配列を持つが、NFATc1 の特異的な自己増殖はクロマチンリモデリング因子が NFATc1 遺伝子のプロモーターに特異的に動員された結果によるもの、分化初期では、NFATc2、NFkB より形成される転写因子複合体が NFATc1 の初期誘導に関わり、分化の進行に伴って NFATc1 自身が c-Fos と複合体を形成して NFATc1 プロモーターに結合し、NFATc1 の自己増殖が生じることを明らかにした (**J Exp Med, 202:1261, 2005**)。

破骨細胞における NFATc1 の活性化にはカルシウムシグナルが必須であるが、このカルシウムシグナルの活性化に必須なキナーゼとして、トランスクリプトーム解析により破骨細胞における発現が高いことが判明した Tec ファミリーチロシンキナーゼを同定した。これらの酵素が破骨細胞分化に必須であることを証明した。さらに、PPI 情報から、破骨細胞分化に必須である RANK 及び ITAM アダプター会合性受容体下流で機能する遺伝子のデータを抽出し、破骨細胞のトランスクリプトーム情報との統合を行い、破骨細胞分化に関わる経時的シグナルネットワークを構築した。その結果、破骨細胞分化に必須な Tec ファミリーキナーゼとそのアダプタータンパク質との破骨細胞における新たな複合体の解明し、破骨細胞分化の分子メカニズムに新たな知見をもたらした (**Cell 132:794, 2008**)。一方、カルシウムシグナルは calmodulin-dependent kinase (CaMK) およびその下流で活性化される転写因子 CREB も活性化する。分子レベルでの解析により、CaMK-CREB 経路は NFATc1 自己増殖に必須の c-Fos の発現を誘導することで分化を制御している上、CREB と NFAT が協調的に破骨細胞特異的遺伝子の発現を誘導することで骨吸収活性も制御することを明らかにした。この CaMK/CREB 経路は、分化と機能の二層性に破骨細胞の転写制御に関わることが明らかになり、カルシウムで制御される二つの転写因子経路の協調による転写制御ネットワークが解明された (**Nat Med, 12:1410, 2006**)。

以上のように、NFATc1 は破骨細胞分化・機能に重要であることを考慮すると、NFATc1 を標的とした治療法が関節リウマチなどの破骨細胞性骨破壊に有効であることを示唆しているが、現存の抗リウマチ薬による関節リウマチの骨破壊抑制機構の機序には不明な点が多い。しかし抗リウマチ薬は NFATc1 発現を転写レベルで抑制し、破骨細胞分化を抑制することを明らかにし、NFATc1 の転写レベルでの発現に作用点を有する薬剤が破骨細胞性骨破壊疾患に有用であることを実証した (**Mod Rheumatol, 12:12, 2007**)。

破骨細胞分化因子 RANKL の発現誘導は、破骨細胞分化支持細胞による破骨細胞制御における重要な制御ポイントである。炎症性骨破壊の病態においては、T 細胞が破骨細胞分化を促進するが、IL-17 産生性 Th 細胞 (Th17 細胞) が骨芽細胞における破骨細胞分化因子 RANKL 遺伝子の発現を誘導することで、破骨細胞分化を促進するメカニズムを明らかにした (**J Exp Med, 202: 2673, 2006**)。

また、炎症性サイトカインのひとつ TNF α も破骨細胞分化を促進する。ゲノムワイドな遺伝子発現解析を行った結果、TNF α は共刺激シグナルを誘導する免疫受容体とそのリガンド

の発現亢進を介してNFATc1の活性を増強し、破骨細胞分化を強力に促進していることを解明した (Proc Natl Acad Sci USA 104:11394, 2007)。

転写因子NFATは破骨細胞のみならず骨芽細胞でも重要な役割を果たしていることを解明した。NFATの強力な阻害薬であるFK506は、破骨細胞分化を顕著に抑制するばかりでなく、骨芽細胞による骨形成も抑制することを見いだした。NFATは骨芽細胞分化の必須転写因子Osterixと協調的に骨芽細胞特異的遺伝子群の発現を制御していた。NFAT転写因子ネットワークの骨芽細胞における重要性に加え、NFATが細胞種特異的に標的遺伝子を決めるメカニズムとして、NFATを中心とした転写因子複合体の違いにあることが示唆された (Nat Med, 11:880, 2005)。さらに骨芽細胞の分化及び機能を制御する転写因子を同定する目的で、1480転写因子の骨芽細胞における網羅的な発現解析を行った結果、極めて顕著な発現誘導を示す転写因子としてc-Mafを同定した。このc-Mafは骨芽細胞の分化とともに発現が亢進し、骨芽細胞における機能が予想された。c-Mafの骨形成に対する生体レベルでの重要性を検討するため、c-Mafノックアウトマウスを解析したところ、骨形成が低下していることが判明した。c-Mafノックアウトマウス由来の骨芽細胞を用いて網羅的遺伝子発現を解析した結果、c-Mafは骨芽細胞特異的な遺伝子発現に重要であり、bglap1に対してはRunx2と協調的に作用することで発現を正に制御することが明らかとなった。一方、驚いたことに、c-Mafノックアウト細胞は脂肪細胞分化が亢進していた。骨芽細胞と脂肪細胞への分化能を有する細胞株に対してc-Mafの過剰発現を試みた結果、c-Mafは脂肪細胞分化を抑制する機能をもつことが示された。抑制機構の詳細な解析によって、c-Mafは脂肪細胞分化に重要なCebpdの転写活性を負に制御することが明らかとなった。本成果によって、c-MafがRunx2やCebpdの活性を調節することで、骨芽・脂肪細胞分化の運命決定に関与することが示唆された (現在、論文投稿中)。

この他、破骨細胞に特異的に発現し、骨を分解する酵素と考えられてきたカテプシン K の新たな機能についてカテプシンKのノックアウトマウスを用いて見出した (Science 319: 624, 2008)。このカテプシンKは、破骨細胞だけでなく樹状細胞においても発現しており、CpG刺激に応答したサイトカインの発現制御に関与していることも明らかにした。この結果はこれまで破骨細胞特異的と考えられていたプロテアーゼが、樹状細胞で働き、免疫の活性化に重要な役割を担うことを示している。

以上、これまで破骨細胞・骨芽細胞を中心にその分化段階における転写制御メカニズムを明らかにし、骨粗鬆症、変形性関節症、関節リウマチ、歯周病、先天性骨系統疾患などの種々の運動器疾患治療への転写制御ネットワークに基づいた分子基盤を確立してきた。

【GNPとの関連・GNPへの貢献】

a) 転写・制御の解明に関連する研究成果

破骨細胞における NFATc1 の標的遺伝子として同定された免疫受容体 OSCAR や破骨細胞特異的な TRAP は、PU.1 および MITF が NFATc1 と相乗的に働いて OSCAR プロモーターの活性を上げていることを明らかにした (J Biol Chem, 280:32905, 2005)。また、この NFATc1 遺伝子の特異性は、NFκB、c-Fos や NFATc2 などの転写因子による協調的な発現制御機構およびエピジェネティックなクロマチン制御に依存した遺伝子制御メカニズムの違いによって達成されていることが明らかとなった (J Exp Med, 202:1261, 2005)。さらに CaMK/CREB 経路も NFATc1 および c-Fos の発現誘導に関与し、破骨細胞分化に重要な役割を担っている上、分化後期では NFATc1 と協調的に破骨細胞特異的遺伝子の発現を制御していることを解明した (Nat Med, 12:1410, 2006)。NFATc1 の活性化するチロシンキナーゼとして Tec ファミリーキナーゼが必須であることを見出すとともに、PPI 情報と遺伝子発現情報を融合したデータを利用して、Tec ファミリーキナーゼとそのアダプタータンパク質との破骨細胞における新たな複合体の解明し、破骨細胞分化の分子メカニズムに新たな知見をもたらした (Cell 132 794, 2008)。さらに炎症性骨破壊における破骨細胞の分化促進は、Th17 細胞から産生される IL-17 が骨芽細胞の RANKL 遺伝子の発現を制御することでもたらされることが明らかとなった (J Exp Med, 202: 2673, 2006)。TNFαも炎症環境下において破骨細胞を促進するが、TNFα存在下におけるトランスクリプトーム解析を行ったところ、破骨細胞分化の共刺激シグナルを担う免疫受容体の一つである PIRA およびそのリガンドである MHC Class I の発現が亢進していることを突き止め、TNFαによる破骨細胞の分化促進効果を解明した (PNAS 104, 11394, 2007)。また抗リウマチ薬は破骨細胞前駆細胞において NFATc1 の発現を抑制することで、破骨細胞分化を抑制することを示し、NFATc1 発現を抑制する薬剤が破骨細胞による骨破壊に有用であることを示した (Modern Rheumatology, 12:12, 2007)。これらの成果は、GNP の転写制御ネットワークの一端を解明して新たな知見をもたらし、転写因子の制御が疾患治療の創出にも有用であることを示すものである。

一方、骨芽細胞においても NFAT は重要な役割を果たしており、NFATc1 は Osterix と結合して骨芽細胞特異的遺伝子の発現制御に関与していることを明らかにした (Nat Med, 11:880, 2005)。この他、転写因子 c-Maf は骨芽細胞分化に重要な Runx2 と協調的に働いて、骨芽細胞特異的遺伝子の発現を制御するだけでなく、脂肪細胞分化を Cebpδの発現抑制を介して負に制御していることを明らかにし、骨芽細胞における転写制御メカニズムの一端を解明した。

b) 縦軸研究 (または横軸研究) への貢献に繋がる研究成果

・慶応大学・柳川弘志博士との連携によって、破骨細胞及び骨芽細胞のトランスクリプトーム情報とIVV法によるPPIデータを統合したリソース (トランスクリプトーム-PPIデータ) の構築を行い、破細胞分化初期段階においてc-FosとNFκBの協調的な作用が見られる一方、分化過程の中期では、新たに発現してきたTPR遺伝子の相互作用に伴い、NFκBの関与が弱まり、最終分化段階においてc-Fosを中心とした転写因子ネットワークに移行していることが判明した。

・国立成育医療センター研究所・浅原弘嗣博士との共同研究によって、破骨細胞におけるCaMK/CREB経路のメカニズムの解析を行った (Nat Med, 12:1410, 2006)。

・筑波大学・高橋智博士との共同研究によって、c-Maf転写因子の骨解析を進めており、骨芽細胞におけるc-Mafの転写制御機構を解明した (論文投稿中)。

・中核機関との共同研究で、破骨細胞及び骨芽細胞機能転写因子のM2H、Y2H、IVVによるPPI解析を実施した。この情報を1で得られるトランスクリプトーム-PPIデータに加えること

で、より精度の高い転写因子ネットワークの構築が可能となった。

- ・中核機関との共同研究で、破骨細胞のCAGE解析を実施し、この結果をもとに破骨細胞特異的な転写産物、プロモーター構造、ncRNAの同定を行っている。
- ・東京工業大学・白髭克彦博士との連携によって、NFATc1のChIP on chip解析の準備を進めている。この解析結果により、NFATc1の破骨細胞特異的な標的遺伝子の同定及び破骨細胞分化過程におけるNFATc1の動的挙動の解析が可能となる。
- ・ヒト末梢血からの破骨細胞分化誘導系で、トランスクリプトーム解析の結果より抽出した候補遺伝子の機能解析を行うために、東京大学・秋山徹博士との連携で、レトロウイルス型siRNAを用いたノックダウン解析を予定している。
- ・かずさディー・エヌ・エー研究所・古閑比佐志博士との連携によって、トランスクリプトーム解析の結果より抽出した候補遺伝子のChIP on chip解析及び質量解析を用いたタンパク複合体解析を行うための抗体作製を実施中である。

【当該研究に関して活用した研究データ・リソース】

破骨細胞・骨芽細胞分化時における系時的遺伝子発現情報
プラットフォームより提供されるPPI情報

【主な研究論文とその概要】

1. Shinohara, M., Koga, T., Okamoto, K., Sakaguchi, S., Arai, K., Yasuda, H., Takai T., Kodama T., Morio T., Geha, R.S., Kitamura, D., Kurosaki, T., Ellmeier W., Takayanagi, H. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. **Cell** 132, 794-806(2008)
2. Asagiri, M., Hirai, T., Kunigami, T., Kamano, S., Gober, HJ., Okamoto, K., Nishikawa, K., Latz, E., Golenbock, DT., Aoki, K., Ohya, K., Imai, Y., Morishita, Y., Miyazono, K., Kato, S., Saftig, P., Takayanagi, H. Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. **Science** 319, 624-627(2008)
3. 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)
4. Asagiri, M., Sato, K., Usami, T., Ochi, S., Nishina, H., Yoshida, H., Morita, I., Wagner, E. F., Mak, T. W., Serfling, E., & Takayanagi, H. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. **J Exp Med** 202, 1261-1269(2005)
5. Koga, T., Matsui, Y., Asagiri, M., Kodama, T., de Crombrughe, B., Nakashima K. & Takayanagi, H. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. **Nat Med** 11, 880-885(2005)

【特許出願数の実績】

なし。