



Lipopolysaccharide Suppresses RANK Gene Expression in Macrophages by Down-Regulating PU.1 and MITF

石井, 淳子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3054

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003054>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 石井 淳子
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博ろ第 3054 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付 平成 21 年 3 月 9 日

【 学位論文題目 】

Lipopolysaccharide Suppresses RANK Gene Expression in Macrophages by Down-Regulating PU.1 and MITF (リポ多糖は PU.1 と MITF を負に制御することによってマクロファージにおける RANK 遺伝子発現を抑制する)

審 査 委 員

主 査 教 授 林 祥剛
教 授 黒坂 昌弘
教 授 南 康博

学位論文の内容要旨

<序>

骨組織において骨吸収を担う破骨細胞は、単球マクロファージ系の造血幹細胞より分化・成熟する。この破骨細胞形成過程において、前駆細胞上に発現する受容体 Receptor activator of NF- κ B (RANK) と、骨芽細胞上の RANK Ligand (RANKL) との結合シグナルが重要な役割を果たしている。また、いくつかの転写因子が必須であることが知られている。その中で、PU.1 及び MITF は、それらの欠損マウスにおいて、分化した機能的破骨細胞が欠損することによって大理石病になることから、破骨細胞分化において必須であることがわかっている。

一方、Lipopolysaccharide (LPS) は、グラム陰性菌細胞表面の重要な構成成分であり、細菌による炎症の主因子である。細菌感染において、宿主は、LPS に反応して免疫システムを活性化し、種々のサイトカインを産生することによって感染防御している。また、特に歯科領域疾患において、LPS は骨リモデリングに作用し、破骨細胞形成を調節する。

本研究において、申請者は、PU.1 と MITF による RANK 発現調節機構に着目し、マウス RANK 遺伝子プロモーターをクローニングし、その構造及び機能を解析した。その結果、PU.1 と MITF が協同的に RANK 発現を調節することを見いだした。また、LPS はマクロファージ/破骨細胞系の細胞において、少なくとも部分的には、PU.1 と MITF の発現抑制を介して、RANK 遺伝子発現を抑制することを見いだした。

<方法及び結果>

① マウス RANK 遺伝子プロモーターのクローニング及び構造解析

既知の RANK 遺伝子を含む BAC clone より、制限酵素処理及び PCR 法にてマウス RANK 遺伝子 5' 上流領域約 6kb のクローニングに成功し、全塩基配列を決定した。また、5'-RACE 法により転写開始部位を決定した。基本転写領域に TATA-box はなく、4 つの連続する SP1 site 及び、その直下に 4 カ所の転写開始部位が存在した。また、上流 1kb 以内には、PU.1 site、CRE/AP-1、3 カ所の MITF 結合配列、3 カ所の NFAT 結合配列が存在することがわかった。MITF 予想結合配列を含む 3 つのプロンプを用いて、ゲルシフトアッセイにより蛋白-DNA 結合を解析したところ、そのうち 1 カ所に MITF が特異的に結合することがわかった。PU.1 結合配列に対しても同様に、特異的な結合が確認された。

② ルシフェラーゼアッセイによるプロモーター活性検討

マウス破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞 (以下 RAW 細胞) を用いて、得られた領域のプロモーター活性を検討した。5' 上流領域約 6kb 及び 1kb をルシフェラーゼに結合させたベクターを作成し、RAW 細胞に導入してルシフェラーゼアッセイを行ったところ、両者とも

に有意なプロモーター活性を示した。以下の実験では、1kb 断片を含むベクター (pGL3-WT) を用いた。また、PU.1 及び MITF 結合配列に変異を入れたベクターをそれぞれ作成した。

PU.1 及び MITF タンパク発現ベクターを共発現させたところ、プロモーター活性は PU.1 により約 2 倍に、MITF により約 3 倍に、両者では約 6 倍に上昇することがわかった。PU.1 及び MITF 結合配列変異導入ベクターでは、これらの上昇効果が認められなかったため、プロモーター活性上昇効果は、これらの結合配列への結合によることが明らかになった。

③ siRNA による発現抑制実験

RAW 細胞を用いて、siRNA により MITF 及び PU.1 の発現を抑制し、その効果を検討した。siRNA で MITF mRNA の発現を 63% に、PU.1 mRNA の発現を 74% に抑制したところ、RANK mRNA の発現はそれぞれ、82%、49% に抑制され、両者によって、44% に抑制された。

④ マウス骨組織における RANK 発現に対する LPS の効果

コントロール及び LPS 投与マウスの骨組織において、破骨細胞のマーカーである tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) 染色及び、*in situ* hybridization による RANK 発現を検討した。コントロールマウスでは、骨表面の TRACP 陽性破骨細胞及び破骨細胞前駆細胞において RANK 発現が認められるのに対し、LPS 投与マウスでは TRACP 染色は同様にみられる一方、それらの細胞における RANK 発現が低下していることを見いだした。

⑤ RAW 細胞における RANK mRNA 発現に対する LPS の効果

RAW 細胞における RANK mRNA 発現に対する LPS の効果を RT-PCR 法により検討した。可溶性 RANKL 非存在下及び存在下いずれにおいても、LPS 刺激によって、RANK mRNA の発現が約 50% に抑制された。TRACP の発現は、可溶性 RANKL により 196 倍に上昇したが、LPS によってこの上昇効果が 196 倍から 46 倍へと抑制された。RANKL 存在下では、MITF、PU.1 mRNA の発現も、LPS 刺激によって 250% から 155% へ、198% から 134% へとそれぞれ抑制されていた。これらの結果から、LPS 刺激下においては、MITF 及び PU.1 の発現抑制を介して、RANK 発現が抑制される可能性が示唆された。

⑥ RANK プロモーター活性に対する LPS の効果

pGL3-WT を RAW 細胞に導入し、可溶性 RANKL 存在下及び非存在下で LPS 刺激すると、RANK プロモーター活性は両者において約 70% に抑制された。また、これらの抑制効果は、MITF 及び PU.1 結合配列変異導入ベクターでは認められなかった。よって、RANK プロモーター活性に対する LPS の抑制効果は、MITF、PU.1 を介することが示された。

<考察>

破骨細胞は、単球マクロファージ系の造血幹細胞より RANKL と colony-stimulating factor 1 (CSF-1) (M-CSF) によって分化し、骨吸収を担う非常に特化した機能をもつ細胞である。

RANKL, CSF-1 は骨芽細胞によって産生されるため、骨芽細胞と破骨細胞の情報伝達は、破骨細胞の分化、活性化、細胞機能の維持において中心的役割を果たしている。中でも、RANKL がその受容体である RANK に結合すると、多くの破骨細胞特異的遺伝子が活性化され、破骨細胞は最終分化を行う。よって、破骨細胞とその前駆細胞における RANK 発現は、骨組織の恒常性維持の為に、非常に厳密に制御されていなければならない。一方、組織食細胞も同様に単球マクロファージ系由来であり、破骨細胞と同じ前駆細胞から分化する。しかし、これらの2種類の細胞は全く異なる役割を果たしている。食細胞は、外因性物質を消化する多くのリソソームを含み、病原体等に対する初期免疫システム反応として役立っている。

RANK-RANKL シグナルは、破骨細胞形成において必須の過程であるため、RANK 遺伝子発現制御の分子メカニズムを解明することは、単球マクロファージ系細胞を最終分化させて破骨細胞前駆細胞に向かわせるか、あるいは非特異的食細胞にするかの重要な鍵を握っていると考え、マウス RANK 遺伝子プロモーターの構造解析を試みた。

マウス RANK 遺伝子プロモーターの基本転写因子領域は、ヒトと非常に高い相同性を示した。また、PU.1 と MITF が RANK 遺伝子発現を正に、また相乗的に制御していることがわかった。基本転写因子領域は、PU.1 及び MITF 結合配列を有しているが、TATA-box はなく、過去に解析された osteoclast-associated receptor (OSCAR)、カテプシン K 遺伝子プロモーターと類似していた。これは、破骨細胞分化においてターゲットとなる一群の遺伝子が、同様の性質を持ち、いずれも PU.1 と MITF によって制御されていることを示している。

細菌感染による歯周炎が虫歯の主な原因であることからわかるように、LPS は骨に対して骨吸収作用を持っている。この骨吸収作用は、ほとんどが骨芽細胞からの TNF- α , IL-1, IL-6 などのサイトカイン産生を介して、間接的に行われている。一方、本研究によって、LPS は、TNF- α , IL-1, RANKL 非依存的に破骨細胞前駆細胞に直接働き、破骨細胞形成を抑制することがわかった。よって、LPS は破骨細胞に対して2つの異なる作用を発揮すると考えられる。すなわち、間接的には破骨細胞形成を誘導すると同時に、直接的には、RANK 発現を負に制御し、成熟破骨細胞及び前駆細胞の寿命を制限している。やや複雑な現象であるが、特に敗血症の急性期においては、細菌が骨を蝕むのを防御するという点で合目的であると思われる。さらに、歯周炎のような炎症の慢性期においても、宿主はまず、ダメージを受けた骨や腐骨を素早く処理するために局所の破骨細胞を活性化し、次に炎症局所の破骨細胞数を制限することによって、骨組織損失から防御している可能性が考えられる。

以上、本研究によって申請者は、RANK 遺伝子発現が PU.1, MITF によって正に制御されていることを見いだした。また LPS は、PU.1 と MITF の発現を抑制することによって、破骨細胞系細胞において直接的に RANK 発現を抑制することを見いだした。これは、炎症による急性期及び慢性期の骨リモデリングにおいて、重要な役割を果たしていると考えられる。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|----------------------------------|---|----|-------|
| 受付番号 | 乙 第2052号 | 氏名 | 石井 淳子 |
| 論文題目 Title of Dissertation | <p>Lipopolysaccharide Suppresses RANK Gene Expression in Macrophages by Down-Regulating PU.1 and MITF</p> <p>リポ多糖は PU.1 と MITF を負に制御することによってマクロファージにおける RANK 遺伝子発現を抑制する</p> | | |
| 審査委員 Examiner | <p>主 査 林 祥 剛 Chief Examiner</p> <p>副 査 黒 坂 昌 弘 Vice-examiner</p> <p>副 査 南 康 博 Vice-examiner</p> | | |

(要旨は1,000字~2,000字程度)

要旨

骨組織において骨吸収を担う破骨細胞は、単球マクロファージ系の造血幹細胞より分化・成熟する。この破骨細胞形成過程において、前駆細胞上に発現する受容体 Receptor activator of NF- κ B (RANK)と、骨芽細胞上の RANK Ligand (RANKL)との結合シグナルが重要な役割を果たしている。また、いくつかの転写因子が必須であることが知られている。その中で、PU.1 及び MITF は、それらの欠損マウスにおいて、分化した機能的破骨細胞が欠損することによって大理石病になることから、破骨細胞分化において必須であることがわかっている。

破骨細胞は、単球マクロファージ系の造血幹細胞より RANKL と colony-stimulating factor 1 (CSF-1)(M-CSF)によって分化し、骨吸収を担う非常に特化した機能をもつ細胞である。RANKL, CSF-1 は骨芽細胞によって産生されるため、骨芽細胞と破骨細胞の情報伝達は、破骨細胞の分化、活性化、細胞機能の維持において中心的役割を果たしている。中でも、RANKL がその受容体である RANK に結合すると、多くの破骨細胞特異的遺伝子が活性化され、破骨細胞は最終分化を行う。よって、破骨細胞とその前駆細胞における RANK 発現は、骨組織の恒常性維持の為に、非常に厳密に制御されていなければならない。一方、組織食細胞も同様に単球マクロファージ系由来であり、破骨細胞と同じ前駆細胞から分化する。しかし、これらの2種類の細胞は全く異なる役割を果たしている。食細胞は、外因性物質を消化する多くのリソソームを含み、病原体等に対する初期免疫システム反応として役立つ。

本研究において、RANK-RANKL シグナルは、破骨細胞形成において必須の過程であるため、RANK 遺伝子発現制御の分子メカニズムを解明することは、単球マクロファージ系細胞を最終分化させて破骨細胞前駆細胞に向かわせるか、あるいは非特異的食細胞にするかの重要な鍵を握っていると考え、マウス RANK 遺伝子プロモーターの構造解析を試みられた。

マウス RANK 遺伝子プロモーターの基本転写因子領域は、ヒトと非常に高い相同性を示した。また、PU.1 と MITF が RANK 遺伝子発現を正に、また相乗的に制御していることがわかった。基本転写因子領域は、PU.1 及び MITF 結合配列を有しているが、TATA-box はなく、過去に解析された osteoclast-associated receptor (OSCAR)、カテプシン K 遺伝子プロモーターと類似していた。これは、破骨細胞分化においてターゲットとなる一群の遺伝子が、同様の性質を持ち、いずれも PU.1 と MITF によって制御されていることを示している。

細菌感染による歯周炎が虫歯の主な原因であることからわかるように、LPS は骨に対して骨吸収作用を持っている。この骨吸収作用は、ほとんどが骨芽細胞からの TNF- α , IL-1, IL-6 などのサイトカイン産生を介して、間接的に行われている。一方、本研究によって、LPS は、TNF- α , IL-1, RANKL 非依存的に破骨細胞前駆細胞に直接働き、破骨細胞形成

を抑制することがわかった。よって、LPS は破骨細胞に対して2つの異なる作用を発揮すると考えられる。すなわち、間接的には破骨細胞形成を誘導すると同時に、直接的には、RANK 発現を負に制御し、成熟破骨細胞及び前駆細胞の寿命を制限している。やや複雑な現象であるが、特に敗血症の急性期においては、細菌が骨を蝕むのを防御するという点で合目的であると思われる。さらに、歯周炎のような炎症の慢性期においても、宿主はまず、ダメージを受けた骨や腐骨を素早く処理するために局所の破骨細胞を活性化し、次に炎症局所の破骨細胞数を制限することによって、骨組織損失から防御している可能性が考えられる。

本研究は、RANK 遺伝子発現が PU.1, MITF によって正に制御されていることを見出し、LPS は、PU.1 と MITF の発現を抑制することによって、破骨細胞系細胞において直接的に RANK 発現を抑制することを見いだした。さらに、RANK 遺伝子発現が炎症による急性期及び慢性期の骨リモデリングにおいて、重要な役割を果たしていることを示した研究であり、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。