

骨代謝系と自然免疫系を同時に制御する転写因子の同定に成功

～転写因子 Jdp2 が破骨細胞と好中球の正常分化に必須であることの発見～

論文題名: *The transcription factor Jdp2 controls bone homeostasis and antibacterial immunity by regulating osteoclast and neutrophil differentiation.*

掲載雑誌: *Immunity* 37(6), 1024-36

大阪大学免疫学フロンティア研究センター自然免疫学の審良静男教授、日本学術振興会特別研究員の丸山健太らの研究グループは、転写因子 Jdp2 が破骨細胞および好中球の正常分化に必須であることを個体レベルで明らかにすることに成功した¹。

<本研究成果のポイント>

1. 転写因子 Jdp2 の欠損は破骨細胞の分化障害に起因する大理石骨病の発症につながる
2. 転写因子 Jdp2 の欠損は分化障害を伴った好中球の機能低下を引き起こし、細菌・真菌感染に対する個体の脆弱性につながる
3. 転写因子 Jdp2 は転写・エピジェネティック双方のレベルで破骨細胞・好中球特異的遺伝子の発現を制御している

1. 背景

超高齢社会を迎えた日本において、患者数が 1000 万人にのぼる骨粗鬆症の解決は緊喫の課題である。骨は骨をこわす破骨細胞と骨をつくる骨芽細胞によって日夜分解と合成を繰り返しているダイナミックな臓器であり、骨粗鬆症は破骨細胞による骨破壊が骨形成を上回ることによって生じる。骨芽細胞上には RANKL という分子が存在し、これが破骨細胞前駆細胞上に存在する RANK という受容体を刺激すると、AP1 ファミリー転写因子群が活性化し破骨細胞の分化が誘導される。日本学術振興会特別研究員の丸山らはこれまでに RANKL シグナルや AP-1 ファミリー転写因子群に関係する分子が骨代謝のみならず自然免疫系においても重要な役割を果たしていることを報告しており^{2 3 4}、複数の「骨自然免疫系」調節因子を同定してきた。RANKL を欠損させたマウスには破骨細胞が全く存在しないことから、骨粗鬆症予防のあらたな手段として抗 RANKL 抗体デノスマブの使用に注目が集まっている⁵。本邦でも 2012 年から多発性骨髄腫および固形癌骨転移による骨破壊抑制を適応として本抗体の使用が開始されたが、その強力な破骨細胞抑制に伴う低カルシウム血症での死亡例や、RANKL 抑制による免疫異常に起因するとも考えられる副作用が報告されている。そのため、RANKL 以外の骨破壊治療標的の同定は重要である。骨粗鬆症につぐ代表的な骨破壊性疾患としては患者数が 100 万人にのぼるとされる関節リウマチが挙げられる。本疾患の治療成績は生物学的製剤の登場により以前よりは改善が見られるものの、根治は依然として困難を極めている。炎症と関節破壊を特徴とする関節リウマチ患者の関節包内には多量の好中球などの自

然免疫細胞と破骨細胞が存在していることから、過剰な自然免疫細胞の集積/活性化と骨破壊を同時に制御するような「骨自然免疫系」調節因子を同定することは新たな炎症性骨破壊の治療戦略を考える上で重要である。

AP-1ファミリー転写因子群のひとつである **Jdp2** はこれまでに破骨細胞分化を促進する因子として⁶、一方ではアポトーシスを抑制する因子として報告されていた⁷。さらに近年、**Jdp2** はヒストンアセチル化酵素活性を抑制することが見出され、そのエピジェネティック調節因子としての機能にも注目が集まっていた⁸。しかしながら、個体レベルでの **Jdp2** の生理的意義は殆ど明らかにされていなかった。そこで本研究グループは、**Jdp2** の発現が破骨細胞および好中球で特に高いことに着目し、「骨自然免疫系」における **Jdp2** の機能をノックアウトマウス技術を用いて解明することを試みた。

2. 本研究で得られた知見

Jdp2 の発現は破骨細胞において **RANKL** 刺激に伴い強く誘導された。さらに、破骨細胞分化に必須の AP-1 ファミリー転写因子群のひとつである **c-Fos** をノックダウンするとこの誘導は消失した。次に、**Jdp2** 欠損マウスを作成し **RANKL** 誘導性破骨細胞分化を観察したところ、驚くべきことに破骨細胞は全く形成されなかった(図 1)。**Jdp2** 欠損マウス由来の細胞では **RANKL** による **c-Fos** の誘導は正常に生じている一方で、破骨細胞のマーカーである **CTSK** や **TRAP** の誘導はおこらなかったことから、**Jdp2** は **c-Fos** 依存的な発現制御をうけており、同時に破骨細胞特異的遺伝子群の誘導に不可欠であることが判明した。次に **Jdp2** 欠損マウスの骨を解析したところ骨量の上昇が認められ、軽度の大理石骨病を発症していることが明らかとなった(図 1)。組織解析では、骨形成速度や骨芽細胞に異常は認められなかった一方で、破骨細胞の量と骨吸収活性の低下が認められた。以上より、**Jdp2** は生体内における正常な破骨細胞分化に必須の因子であることが明らかとなった(図 3)。

続いて、**Jdp2** の発現が高い好中球に着目したところ、**Jdp2** 欠損マウスの好中球では分化マーカーである **Ly6G** の発現が著減していることが明らかとなった(図 2)。**Jdp2** 欠損マウスの骨髄を使った各種血球成分のコロニー形成能は正常で、好中球分化に必須のサイトカインである **G-CSF** に対するシグナルも正常に生じていたことから、本形質は好中球内在性の **Jdp2** 欠損に起因した最終分化段階での異常で生じていることが示唆された。さらに興味深いことに、**Jdp2** 欠損マウスの好中球は自発的なアポトーシスが部分的に障害されており、抗アポトーシスタンパク質である **Bcl2** の発現が上昇していることが明らかとなった。また、**Jdp2** 欠損マウスの好中球の各種自然免疫受容体の発現や炎症性サイトカインの産生は正常であったが、**NADPH** オキシダーゼサブユニットの一つである **NCF1** の発現低下により活性酸素の産生が減弱していた。さらに、好中球が様々な刺激に応じて放出する高粘度の殺菌活性を持ったクロマチンである **Neutrophil Extracellular Trap** の形成も障害されており、その結果として細菌や真菌の殺傷能が低下していた。以上より、**Jdp2** 欠損マウスの好中球は分化障害を伴った機能異常を有していることが明らかとなった。

Jdp2 の好中球における標的遺伝子を明らかにするため、Jdp2 欠損マウスの好中球の遺伝子発現・ヒストンアセチル化状態を DNA chip や次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析したところ、好中球顆粒に含まれる酵素遺伝子群 (MPO, CTSG, PR3) など、C/EBP 結合サイトを有する遺伝子群の mRNA が Jdp2 欠損マウスの好中球で著しく上昇していることが判明した。詳細な解析の結果、Jdp2 は好中球の最終分化段階において C/EBP α と直接結合しこれを抑制することで適切な遺伝子発現状態を作り出し、好中球にアポトーシスや殺菌活性などの機能を発揮させていることが明らかとなった。さらに、Jdp2 と同じ AP1 ファミリー転写因子群のひとつである ATF3 の発現が Jdp2 欠損マウスの好中球では上昇しており、Jdp2 は ATF3 のプロモーターに結合することでその結合領域のヒストンアセチル化を阻害していた。ATF3 を野生型マウスの細胞に導入し好中球に分化させると Ly6G の発現が減弱したことから、ATF3 は新規の好中球分化阻害因子であり、Jdp2 はこの発現を直接抑制することでも適切な好中球の最終分化状態を実現させているものと考えられた(図 3)。

好中球は生体における細菌・真菌感染防御の要であるため、最後に Jdp2 欠損マウスに黄色ブドウ球菌やカンジダを感染させた。その結果、野生型と比べ Jdp2 欠損マウスではこれら病原体の全身臓器における排除能が低下しており、感染に対して脆弱であることが明らかとなった(図 2)。さらに、放射線照射後に Jdp2 欠損マウスの骨髄を移植された野生型マウスも、野生型マウスの骨髄を移植されたコントロール群と比べて黄色ブドウ球菌感染に対する脆弱性を呈した。また、この感受性の差は両群で好中球を除去すると消失したことから、Jdp2 欠損マウスの易感染性の原因は好中球の異常に起因するものと考えられた。

3. 本成果の医学的意義および今後の課題

今回の発見は、Jdp2 が破骨細胞および好中球の正常分化に必須の転写因子であることを同定したのみならず、それが個体レベルにおいて新規の「骨自然免疫系」制御因子であることを明確に提示した(図 3)。Jdp2 ノックアウトマウスの骨は少ないながらも破骨細胞を有し比較的マイルドな骨量の増加を呈しているため、Jdp2 は低カルシウム血症などの心配が少ないより安全な新規の骨粗鬆症治療標的となりうる可能性がある。また、Jdp2 が好中球機能の一面を制御していることも明らかとなったため、Jdp2 の抑制は好中球と破骨細胞がともに活性化している関節リウマチなどの病態制御に(一定の感染リスクを伴いながらも)有用となる可能性がある。Jdp2 の活性を阻害する低分子化合物の開発が「骨自然免疫系」制御を具現化してゆく上での今後の重要な課題である。

4. 参考文献

1. Maruyama K, Fukasaka M, Vandenbon A, et al. The Transcription Factor Jdp2 Controls Bone Homeostasis and Antibacterial Immunity by Regulating Osteoclast and Neutrophil Differentiation. *Immunity*. 2012 in press.
2. Maruyama K, Takada Y, Ray N, et al. Receptor activator of NF- κ B ligand and

osteoprotegerin regulate proinflammatory cytokine production in mice. *J Immunol.* 2006;177:3799-3805.

3. Maruyama K, Sano G, Ray N, Takada Y, Matsuo K. c-Fos-deficient mice are susceptible to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun.* 2007;75:1520-1523.

4. Maruyama K, Kawagoe T, Kondo T, Akira S, Takeuchi O. TRAF family member-associated NF-kappaB activator (TANK) is a negative regulator of osteoclastogenesis and bone formation. *J Biol Chem*;287:29114-29124.

5. Khosla S. Increasing options for the treatment of osteoporosis. *N Engl J Med.* 2009;361:818-820.

6. Kawaida R, Ohtsuka T, Okutsu J, et al. Jun dimerization protein 2 (JDP2), a member of the AP-1 family of transcription factor, mediates osteoclast differentiation induced by RANKL. *J Exp Med.* 2003;197:1029-1035.

7. Huang YC, Saito S, Yokoyama KK. Histone chaperone Jun dimerization protein 2 (JDP2): role in cellular senescence and aging. *Kaohsiung J Med Sci.* 2010;26:515-531.

8. Jin C, Kato K, Chimura T, et al. Regulation of histone acetylation and nucleosome assembly by transcription factor JDP2. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13:331-338.

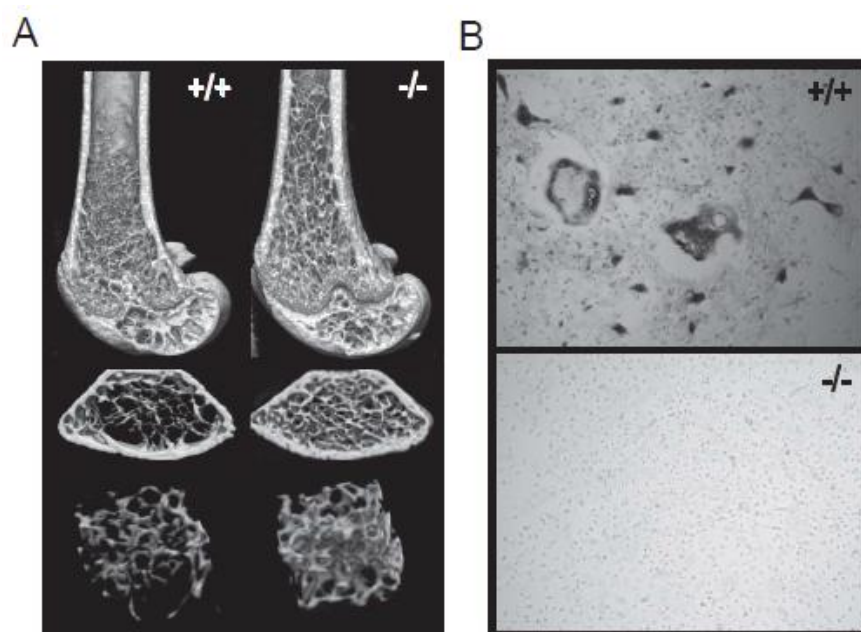


図1 Jpd2 欠損マウスは破骨細胞分化障害に伴う大理石骨病を発症する
(A: 大腿骨遠位部の CT 画像、B: in vitro における RANKL 誘導性破骨細胞分化の様子)

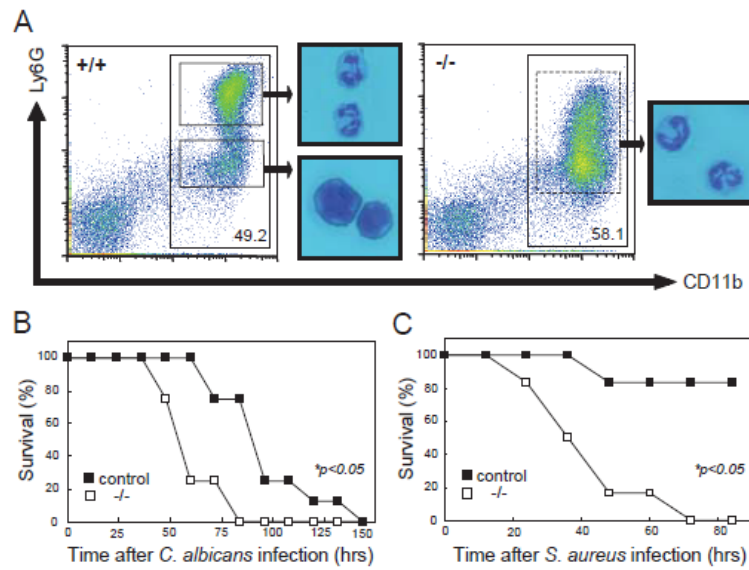


図2 Jdp2 欠損マウスは好中球の分化障害により感染に対し脆弱となる(A: 好中球の分化マーカーLy6G の発現を解析した FACS スキャタープロット、B・C: 黄色ブドウ球菌(B)及びカンジダ(C)感染に対するマウス生存曲線)

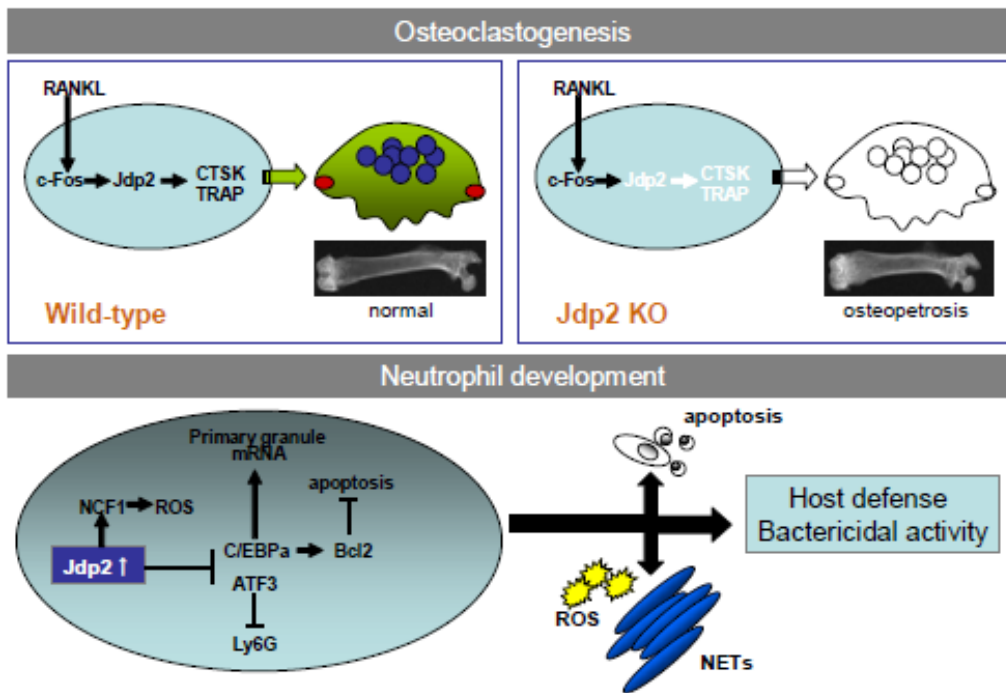


図3 Jdp2 は新規の「骨自然免疫系」制御因子である