

破骨細胞融合を制御する新たな転写調節因子の同定に成功

～転写調節因子 *Sbno2* が破骨細胞融合の促進を介して骨量を制御することの発見～

論文題名 : *Strawberry notch homologue 2 regulates osteoclast fusion by enhancing the expression of DC-STAMP.*

掲載雑誌 : *The Journal of Experimental Medicine*

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医師らの研究グループは、転写調節因子 *Sbno2* が破骨細胞の正常な融合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. 転写調節因子 *Sbno2* の欠損は重篤な大理石骨病の発症につながる
2. 転写調節因子 *Sbno2* を欠損した破骨細胞は、融合が著明に障害されている
3. 転写調節因子 *Sbno2* は、破骨細胞融合のマスターレギュレーターである DC-STAMP の発現を、DC-STAMP 転写の阻害因子である *Tal1* を抑制することで正に制御している

1. 背景

細胞融合とは2個以上の同種或いは異種の細胞同士が細胞膜を融合させることで単一細胞となる現象を意味する。1957年にセンダイウイルスによる細胞融合が報告されたことを契機に多くの研究者の関心がこの現象に注がれ、この流れを受けてB細胞とミエローマの融合細胞を用いたモノクローナル抗体作成技術が確立された。人工的な細胞融合技術なくして抗体医療や免疫学の発展が望めなかったことを考えると、細胞融合が現代医学に与えたインパクトははかりしれない。このような歴史的背景から一般には病原体や薬剤によって誘導されるものというイメージが強い細胞融合であるが、この現象が発生過程や細胞分化といった生理的局面においても重要な役割を果たしていることは意外に知られていない。例えば、精子と卵子は受精過程で融合し、骨格筋細胞は最終分化段階において融合プロセスを経て多核の巨細胞となる。さらに、骨を吸収する破骨細胞は多核細胞の代表格であるが、この細胞は骨芽細胞上に存在するRANKLが単核の破骨細胞前駆細胞に働きかけてそれらの融合が促進された結果形つくられる。

超高齢社会を迎えた日本において、患者数が100万人にのぼる骨粗鬆症の解決は緊喫の課題である。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粗鬆症予防の切り札として抗RANKL抗体が実用化されつつあるが、丸山らはRANKL及びその下流で活性化される転写因子群の有する自然免疫調節作用を報告することで、こうした治療の持つ危険性についてかねてより警鐘を鳴らしてきた^{2,3,4,5}。実際、抗RANKL抗体使用に伴う免疫異常や低Ca血症による死亡例などの報告数は増加しているため、RANKL以外の破骨細胞をターゲットとした骨粗鬆症治療標的を明らかにすることは依然として重要である。RANKLが破骨細胞前駆細胞のRANKL受容体であるRANKと結合すると、NF- κ B, c-Fos, Jdp2, NFATc1, MITFなどの転写因子が活性化し、TRAP, CTSK, DC-STAMPといった破骨細胞特異的

遺伝子群の発現が誘導される。破骨細胞特異的遺伝子群のなかでも、DC-STAMP は破骨細胞融合のマスターレギュレーターであることが知られており、DC-STAMP 欠損マウスからは単核の破骨細胞しか形成されない。最近、破骨細胞における DC-STAMP の発現は転写因子 MITF によって誘導され、破骨細胞前駆細胞では転写抑制因子 Tal1 が DC-STAMP プロモーターに結合して MITF による DC-STAMP の転写活性化をブロックしていることが明らかにされた。こうしたことから、破骨細胞融合は複数の転写因子によって厳密に調節されていると考えられている。

RANKL 以外にも、さまざまなサイトカインや病原微生物の刺激が転写因子 NF- κ B を活性化する。NF- κ B は破骨細胞分化に必須であるだけでなく、病原体構成成分による TLR の刺激によっても強く活性化され、炎症性サイトカインが誘導される。近年、IL-10 が STAT3 依存的に DExD/H ヘリカーゼファミリーに属する転写調節因子 Strawberry notch homologue 2 (Sbno2) を誘導し、NF- κ B の活性化を抑制することが示された。こうしたことから、Sbno2 は炎症性サイトカイン産生を負に制御する因子と考えられたが、個体レベルでのその自然免疫応答に果たす役割や生理的機能については明らかでなかった。そこで本研究グループはこの疑問に答えるため、ノックアウトマウス技術を用いた Sbno2 の機能解析を試みた。

2. 本研究で得られた知見

Sbno2 は骨髄での発現が高く、血球系細胞の中ではマクロファージや破骨細胞で特に強く発現していた。そこで、これらの細胞における Sbno2 の機能を明らかにする目的でノックアウトマウスを作成したところ、10 週齢において野生型と比べ若干の体重減少が認められ、成長障害が疑われた。その一方で、明らかなマクロファージ・好中球・リンパ球などの分化異常は認められず、マクロファージの炎症性サイトカイン産生能や NF- κ B の活性化も正常であった。こうしたことから、Sbno2 は以前報告されていたような NF- κ B の抑制作用は有していないことが明らかとなった。次に Sbno2 ノックアウトマウスの骨を解析したところ、10 週齢において著明な骨量の上昇が認められ、大理石骨病を発症していることが判明した。組織解析では破骨細胞の数は正常であったが一細胞あたりの核の数が減少しており、融合障害が疑われた (図 1)。さらに、骨形成速度の低下が認められたことから、骨芽細胞の分化障害の存在も示唆された。実際、*in vitro* で Sbno2 ノックアウトマウス由来の骨芽細胞を培養すると軽度の分化障害が観察された。ノックアウト由来の骨芽細胞では骨芽細胞分化を促進する因子である Jagged1 の発現が著明に減弱しており、これを培養液中に加えると分化障害が救済されたことから、Sbno2 は Jagged1 の発現を正に制御することで適切な骨芽細胞分化を実現させていることも明らかとなった。次に、ノックアウト由来の細胞を使って *in vitro* における RANKL 誘導性の破骨細胞分化を検討したところ、*in vivo* で観察されたように破骨細胞あたりの核数が著明に低下していた (図 1)。個々の破骨細胞の骨吸収活性と分化マーカーの発現状態は正常であったことから、この異常は融合障害に起因していると考えられた。さらに、IL-4 誘導性のマクロファージ融合現象や、異物を皮下に留置した際に観察されるマクロファージ融合現象も部分的に障害されていたことから、Sbno2 は破骨細胞だけでなく広くマクロファージの融合を制御している分子であることが明らかとなった。続いて、Sbno2 がどのようなメカニズムで細胞融合を制御しているのかを明らかにする目的で細胞融合を正に制御することが報告されている遺伝子群の発現状態を検討したところ、破骨細胞融合のマスターレギュレーターである DC-STAMP の発現が著明に減弱していた。そこで、レトロウイルスを用いてノックアウト由来の破骨細胞に DC-STAMP を発現させたところ、融合障害は完全に救済された。次に、DC-STAMP の発現を制

御する転写因子群 (MITF, Ta11, c-Fos, PU.1, NFATc1, NF- κ B) の DC-STAMP プロモーター領域への結合状態をクロマチン免疫沈降法で検討したところ、DC-STAMP 発現を正に制御する MITF の結合が減弱している一方で、DC-STAMP の発現を抑制する Ta11 の結合がノックアウトの細胞で増強していた。そこで、ノックアウト由来の破骨細胞で Ta11 をノックダウンしたところ、破骨細胞の融合障害は部分的に救済された。さらに、Sbno2 は Ta11 と直接結合することにより Ta11 の活性を抑制していることも免疫沈降法とレポーターアッセイにより確認されたことから、Sbno2 による Ta11 抑制を介した DC-STAMP 発現亢進による破骨細胞融合促進機構がはじめて明らかとなった (図 2)。

3. 本成果の医学的意義および今後の課題

超高齢社会を迎えた日本において今後も患者数の増大が予想される骨粗鬆症の解決は重大な医学的課題である。そのため、破骨細胞分化を抑制する骨粗鬆症治療薬の開発が現在急ピッチで進められているが、そうした医薬品の多くは免疫系の攪乱作用や低 Ca 血症、顎骨壊死などの副作用をもつため、分化抑制を作用機序としない新たな治療薬の開発が切望されている。Sbno2 が欠損した破骨細胞は分化が正常である一方で融合だけが障害され、免疫系には異常がみられなかったことから、この分子がより安全な次世代の骨粗鬆症治療薬の標的となることが期待される。

4. 参考文献

1. **Maruyama, K., et al.** Strawberry notch homologue 2 regulates osteoclast fusion by enhancing the expression of DC-STAMP. *J Exp Med* (2013). in press
2. **Maruyama, K., et al.** Receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin regulate proinflammatory cytokine production in mice. *J Immunol* **177**, 3799-3805 (2006).
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* **75**, 1520-1523 (2007).
4. **Maruyama, K., Kawagoe, T., Kondo, T., Akira, S. & Takeuchi, O.** TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK) is a negative regulator of osteoclastogenesis and bone formation. *J Biol Chem* **287**, 29114-29124 (2012).
5. **Maruyama, K., et al.** The transcription factor jdp2 controls bone homeostasis and antibacterial immunity by regulating osteoclast and neutrophil differentiation. *Immunity* **37**, 1024-1036 (2012).

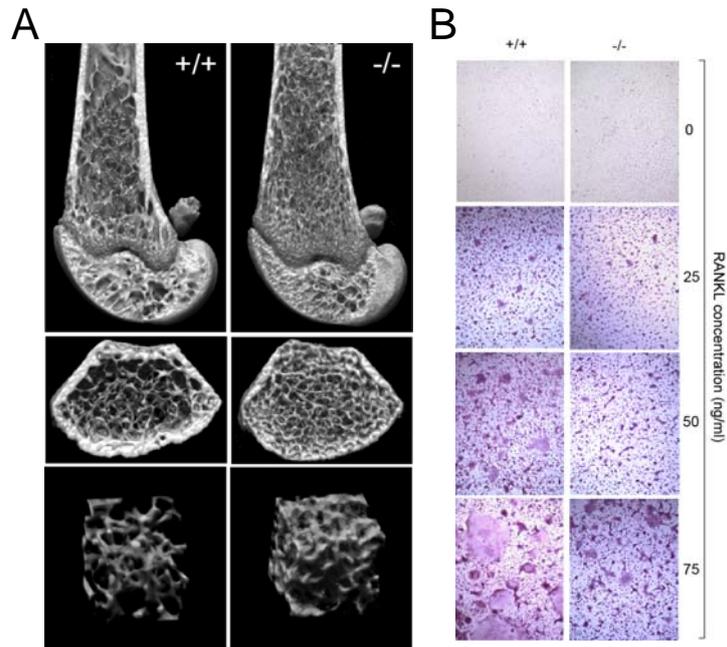


図 1、Sbn2 欠損マウスは破骨細胞融合障害に伴う大理石骨病を発症する (A: 大腿骨遠位部の CT 画像、B: in vitro における RANKL 誘導性破骨細胞分化の様子)

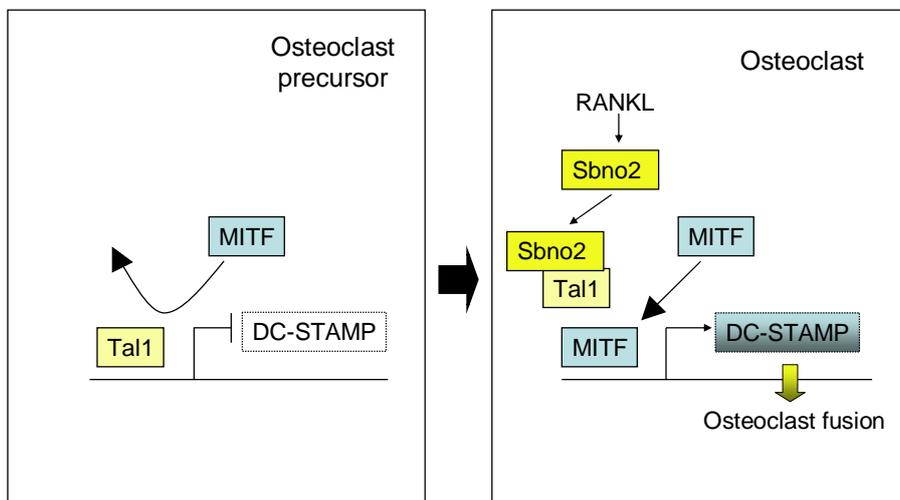


図 2、Sbn2 は転写抑制因子 Tal1 の抑制を介して DC-STAMP の発現を正に制御する