

順天堂大学	博士 (医学)	氏名	石山 健太郎
論文題目	Involvement of PU.1 in the NFATc1 promoter function in osteoclast development (破骨細胞分化における NFATc1 プロモーター機能への PU.1 の関与)		

(論文内容の要約) (1000 字~1500 字)

【目的】

転写調節因子 PU.1 と Nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATc1)は関節リウマチの特徴的な病態である関節破壊において重要な役割を果たす破骨細胞の分化誘導に関わる。破骨細胞形成において、NFATc1 と PU.1 は破骨細胞特異的遺伝子群の転写活性を誘導し、NFATc1 や PU.1 が欠損すると、破骨細胞の分化形成不全により大理石骨病がみられることが知られている。しかしながら、PU.1 と NFATc1 の関係性についてはほとんど明らかになっていない。これらの背景から、我々は破骨細胞分化における NFATc1 遺伝子発現に PU.1 がどのように関与しているのかについて検討した。

【方法】

BALB/c マウスの骨髄細胞を採取し、macrophage colony-stimulating factor、receptor activator of nuclear factor- κ B ligand 存在下に培養して破骨細胞を分化誘導する過程において、siRNA を用いて PU.1 発現をノックダウンし、NFATc1 mRNA 発現を定量的 PCR を用いて解析した。マウス単球系細胞株である RAW264.7 細胞に PU.1 siRNA を導入し、NFATc1 のプロモーター活性に与える影響をルシフェラーゼアッセイにて解析した。さらに、抗 PU.1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により、沈降された染色体 DNA を解析した。また、破骨細胞分化過程において PU.1 発現をノックダウンし、TRAP 染色による破骨細胞形成や、定量的 PCR によるカテプシン k (Ctsk)、acid phosphatase 5 (Acp5)、osteoclast-associated receptor (Oscar)、インテグリン 3 (Itg3)など破骨細胞特異的遺伝子発現について検討した。

【結果】

破骨細胞分化過程において、siRNA により PU.1 をノックダウンすると、NFATc1 mRNA 発現が抑制され、PU.1 が NFATc1 転写に関与していることが示唆された。そこで PU.1 siRNA 導入 RAW264.7 細胞における NFATc1 プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにて解析したところ、PU.1 ノックダウンにより NFATc1 プロモーター活性の低下が認められた。抗 PU.1 抗体によるクロマチン免疫沈降法では、NFATc1 プロモーター領域遺伝子を含む染色体 DNA 沈降が認められ、PU.1 が NFATc1 に直接結合している可能性が考えられた。また、破骨細胞分化過程において、PU.1 をノックダウンすると、TRAP 活性が低下し、破骨細胞のマーカー遺伝子である Ctsk、Acp5、Oscar、Itg3 の mRNA 発現が抑制された。

【考察】

PU.1 は破骨細胞特異的遺伝子に対し直接的に転写活性を誘導することは知られていたが、この実験により PU.1 は NFATc1 遺伝子のプロモーター領域に直接結合することで間接的にも働き、破骨細胞への分化を誘導することが示唆された。PU.1 は樹状細胞において MHC class II、CD80、CD86、TNF- α の発現を調節し、肥満細胞においては Fc ϵ RI の発現を調節することが報告されており、単球系前駆細胞から分化する破骨細胞においても同様に遺伝子発現やその機能を調節していることが示された。