



Title	破骨細胞の機能とRNA結合タンパクHuRの関連
Author(s)	伊藤, 啓介
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第13490号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13490
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91592
Type	theses (doctoral)
File Information	Keisuke_Ito.pdf



[Instructions for use](#)

博士論文

破骨細胞の機能と RNA 結合タンパク HuR との関連

平成 31 年 3 月申請

北海道大学

大学院歯学研究院口腔医学専攻

伊藤 啓介

抄 録

【背景】破骨細胞は骨吸収を行う細胞で、骨芽細胞などと共に骨のリモデリングに関与することが知られている。破骨細胞の異常は様々な骨病変を引き起こすため、その分化や詳細な機能を理解することは、骨病変の理解および新しい治療法等に発展していく可能性があり非常に意義深い。破骨細胞は、その前駆細胞から RANKL の刺激を受けることにより分化し、その際、様々な分子を介したシグナル伝達機構が関与する。それらのタンパク分子をコードする mRNA には AU-rich element (ARE)を持つ mRNA が多い。ARE は mRNA の分解シグナルで、mRNA の 3'非翻訳領域に存在する。mRNA は、通常転写後すぐに分解されるが、ARE-mRNA に RNA 結合タンパク HuR が結合すると、核外輸送され安定化される。HuR は通常核に局在しているが、分化刺激やストレス等を受けると、ARE に結合して mRNA と共に細胞質に移動する事が知られている。従って、破骨細胞の分化や機能にも HuR の核外輸送や ARE-mRNA の安定化が関与する可能性がある。

本研究ではラット頸骨を材料として、各部位の破骨細胞の HuR 局在を検討し、破骨細胞の機能と HuR との関連を解析した。

【結果】7週齢および30週齢のラット破骨細胞では HuR が細胞質に局在し、骨形成の活性が高い部位では多くの破骨細胞で HuR の細胞質局在が認められたが、骨形成活性が低い骨膜下の破骨細胞では細胞質の HuR 発現が少なかった。また、30週齢ラットの破骨細胞の核に HuR の発現を認められなかった。破骨細胞の細胞質の HuR 局在とハウシッポ窩の形成の間には関係が認められなかったが、細胞質に HuR 発現を認めた多くの破骨細胞ではカテプシン K の発現が認められた。

【結語】活性化されている多くの破骨細胞では HuR が細胞質に局在し、その発現はカテプシン K を介した破骨細胞の骨吸収能に関連があることを示している。本研究により、初めて破骨細胞の機能と HuR との関連が明らかになった。

キーワード：破骨細胞, HuR, ARE-mRNA, カテプシン K

緒 言

破骨細胞は骨組織で骨吸収を担う細胞で、骨のリモデリングやモデリングの主要な役割を果たす多核巨細胞である。破骨細胞は骨髄由来の単球・マクロファージ系の前駆細胞が、骨芽細胞から分泌されるサイトカイン等の働きにより分化により形成され、核数は2～数十個と変化に富み、その形態と大きさは極めて多様である¹⁾。骨芽細胞の異常は、骨病変と密接に関連しており、それらの中には骨吸収能の異常を原因とする疾患が多数存在する。骨吸収抑制が原因で発症する大理石骨病、逆に骨吸収が亢進するのが主因の骨パジェット病、骨粗鬆症、歯周病における歯槽骨破壊、関節リウマチにおける骨破壊等がその代表例である²⁾。

破骨細胞前駆細胞はその表面に RANK (Receptor Activator NF- κ B) を発現しており、骨芽細胞表面に発現している RANKL (Receptor Activator NF- κ B Ligand) が結合する事で分化シグナルが伝達される。その過程で AP-1 や NF κ B, MITF, NFATc1 などの転写因子の発現が誘導され分化が進み、骨表面に結合後、細胞癒合しながら成熟した破骨細胞へと成長する。RANKL による刺激後は、Calcitonin receptor や MMP-9 などを発現し、その機能を果たすことが知られている^{1),3)}。これらの転写因子や様々な分化関連分子のタンパクをコードする mRNA の中には、AU-Rich Elements (ARE) と呼ばれる RNA エlementを持つものが多数存在することを我々は見出した。

ARE とは mRNA の 3' 非翻訳領域に存在するアデニンとウラシルを多く含む領域で、がん原遺伝子や転写因子、サイトカイン等、細胞の増殖に関わる遺伝子から転写される mRNA に多く存在している^{4,5)}。その役割は転写後調節であり、ARE は mRNA の分解シグナルとして働き、通常 ARE-mRNA は転写後すぐに分解される。そして、細胞に何らかのストレスが加わると、ARE-mRNA は一時的に核外輸送され、安定化される^{4,6)}。しかしながら、何らかの原因で ARE-mRNA が恒常的に安定化されると、細胞がん化、炎症性疾患、ウイルス感染症など関与することが指摘されており⁷⁾、また、疾患以外でも筋肉細胞の分化等に関連することが報告されている⁸⁾。

ARE-mRNA の分解や安定化には、ARE に結合する RNA 結合タンパクが重要な役割を果たすことが知られている。TTP や AUF などのタンパクは、ARE に結合すると ARE-mRNA の分解を促進する。一方、HuR タンパクは、ARE に結合すると mRNA を核外へ移動させ、ARE-mRNA を安定化する⁷⁾。従って、HuR の細胞内での局在を検討することで、ARE-mRNA の安定化を予想することができ、HuR が細胞質に局在している細胞では ARE-mRNA が安定化されていると考えられる。例えば、上述したがん細胞や分化時の骨格筋細胞では HuR が細胞質に局在する^{8,9)}。

前述のように、破骨細胞の分化過程においても ARE-mRNA によってコードされる転写因子等が発現している事から、破骨細胞の分化にも HuR 結合による ARE-mRNA の安定化機構の関与が考えられる。本研究では、ラット頸骨を材料として、頸骨各部位の HuR 局在を解析することで破骨細胞の HuR 局在を検討し、破骨細胞の活性化と HuR 局在との関連を明らかにし、さらに、破骨細胞の機能と密接に関係しているカテプシン K と HuR との発現とを解析することにより、HuR と破骨細胞の機能との関連を検討した。

材 料 と 方 法

1) 対象および標本作製

対象は 7 週齢および 30 週齢のラット (オス), 脛骨の近位端とした. EDTA-2Na10%溶液に 3 週間浸漬させて標本を脱灰し, 通法に従ってパラフィン包埋標本を作製した. 作成したパラフィン包埋標本は薄切して厚さ 4.5 μ m の連続切片とし, HE 染色を行った.

2) TRAP 染色

脱パラフィン処理後の切片を N,N-Dimethyl Formide (富士フイルム和光純薬, 大阪, 日本), Naphthol AS-BI Phosphate (Sigma-Aldrich Co. LLC, St-Louis, Missouri, USA), Fast Red Violete LB Salt (Sigma-Aldrich Co. LLC), L(+)-Tartaric Acid (Sigma-Aldrich Co. LLC), 0.2mol/l 酢酸緩衝溶液 (pH5.0) の混合溶液と 37°C で 45 分間反応させた. この後, マイヤーのヘマトキシリン (武藤化学株式会社, 東京, 日本) で 30 秒核染色を行った.

3) 免疫組織染色

脱パラフィン処理後, 1%BSA-PBS で 30 分前処理を行い, 一次抗体を室温で 45 分間処理した. 抗体は抗 HuR 抗体 (sc-5483 Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas,

Texas, USA) および抗カテプシン K 抗体 (sc-48353 Santa Cruz Biotechnology, Inc) を用いた. 希釈倍率は抗 HuR 抗体で 200 倍, 抗カテプシン K 抗体で 20000 倍とした. 次いで HuR に対してはペルオキシダーゼ標識抗ヤギ IgG 抗体, カテプシン K に対してはペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を二次抗体として室温で 30 分反応させた後、3,3'-Diaminobenzidine (DAB) で発色させマイヤーのヘマトキシリン (武藤化学株式会社, 東京, 日本) で核染色を行った.

4) 破骨細胞の定義と評価

本研究では TRAP 染色陽性の細胞を全て破骨細胞として観察した. HE 染色, TRAP 染色, HuR またはカテプシン K に対する免疫組織染色を行った各連続切片を比較して破骨細胞内の HuR の発現状況を比較した. 核の HuR 発現率は核数 3 個以上を持つ TRAP 陽性細胞のみで計算した. ハウシップ窩は HE および TRAP 染色, HuR およびカテプシン K に対する免疫組織染色を行った 4 枚の連続切片のうち, 最低 1 枚に破骨細胞下の陥凹を認めた場合を「ハウシップ窩あり」と判定した.

結 果

1. 破骨細胞における HuR の局在

破骨細胞に発現している HuR の局在を調べるために、ラットの脛骨に存在している破骨細胞の HuR を免疫組織染色法で検討した。対象は7週齢のオスのラットで、部位は脛骨近位端とした。また、7週齢はラットの成長期であり内部の構造が成長期の終わった個体の同部位と異なるため、観察部位を関節軟骨下および骨端線上端、海綿骨、骨膜下の4箇所に分けた。(図 1-1)

組織中の破骨細胞内に多くの HuR が発現しているのが確認できた。破骨細胞内の HuR 発現は一様ではなく、大きく分けて細胞質に HuR を認める破骨細胞(図 1-2 A,B)と認めない破骨細胞(図 1-2 C,D)に分けられ、さらにそれぞれ核に HuR を認める細胞(図 1-2 A,B,C)と認めない細胞(図 1-2 D)が存在した。また、破骨細胞は多核のため、HuR が認められる核と認められない核が混在した破骨細胞も存在した。(図 1-2 B)

2. 部位による HuR 発現の違い

次に、細胞質に HuR が認められた破骨細胞の分布を調べた。図 2-1 に示すように、関節軟骨下および骨端線上端、海綿骨では、細胞質に HuR が局在する細胞が多く存在することが分かった。それに対して、骨膜下には細胞質に HuR が

存在しない破骨細胞が集中していた。また、具体的に各部位での破骨細胞における HuR の細胞質への出現率を表 1 に示し、そのまとめを図 2-2 に示す。その結果、骨吸収が活発に行われている部位の破骨細胞では HuR の細胞質局在が高い事が明らかになり、細胞質での HuR の局在は関節軟骨下および骨端線上端、海綿骨です。73~98%を示したのに対して、骨膜下の破骨細胞では 18.6%と低い値を示した。(図 2-2)

3. 加齢による HuR 局在の変化

HuR は細胞の老化と関連することが知られており、ヒトでは加齢に伴い HuR の発現が低下する傾向にある事が分かっている¹⁰⁾。そこで、マウスの破骨細胞でも加齢による変化が認められるか観察するため、30 週齢のラットの脛骨標本に対して HuR の免疫組織染色を行った。比較部位は HuR が細胞質に局在している破骨細胞が多い関節軟骨下とした。その結果、30 週齢ラットの破骨細胞の細胞質 HuR 局在は 7 週齢ラットのそれと変わらなかったが、核の HuR 発現は全く認められず、大きく異なる結果となった。(図 3, 表 2)

4. 細胞質 HuR 局在と破骨細胞の機能

破骨細胞における HuR の細胞質発現と骨吸収能の関係について考察するため、骨膜下の破骨細胞を対象に細胞質の HuR 局在と破骨細胞下のハウシッポ窩の関連を検討した。図 4 に示すように、ハウシッポに隣接する破骨細胞には、HuR が細胞質に局在するものと、局在しない細胞とが混在しており、その比率に違いはなかった。

カテプシン K は破骨細胞から骨表面へ向けて分泌され、骨基質成分の I 型コラーゲンを分解することにより骨吸収に関わる。そこで、HuR の細胞質局在とカテプシン K の発現との関連を検討した。その結果、図 5A に示すように、細胞質に HuR を発現している破骨細胞では、全ての細胞でカテプシン K を発現していた。(表 3) 一方、細胞質に HuR が存在していなくても、30%程度の破骨細胞でカテプシン K を発現していた。(図 5B, 表 3)

考 察

本研究では、ラットの脛骨を用いて、破骨細胞の細胞質に局在する RNA 結合タンパク HuR を調べ、その発現と破骨細胞の機能との関連を解析した。その結果、活性化されている破骨細胞では、HuR の細胞質局在が顕著で、破骨細胞の機能の指標になるカテプシン K の発現も、細胞質に HuR が存在する破骨細胞で高かった。これらの結果は、HuR が細胞質に局在することが、破骨細胞の機能に密接に関連することを示している。破骨細胞の機能と HuR とが関連することを示したのは本研究が初めてである。

組織中の多くの破骨細胞で HuR の発現が認められ、その発現は多様な像を示した。(図 1-2) 多様な染色像の中には HuR が細胞質に局在している細胞が最も多く存在する事から (表 1), HuR による ARE-mRNA の核外輸送および安定化機構が破骨細胞でも機能している可能性が示唆された。前述のように、破骨細胞の機能発現に関わる分子は、ARE-mRNA にコードされていることが多いため、この結果はリーズナブルであるといえる。これらの結果は、HuR の細胞質局在は、破骨細胞の機能発現に深く関わる事を示唆している。

また、今回、図 2-2 に示すように、骨吸収が盛んにおこなわれている場所で細胞質に HuR が局在する破骨細胞が多いことも明らかになった。さらに、HuR が細胞質に局在している破骨細胞では、その機能に関わるカテプシン K が発現す

ることも明らかにした。(表 3) カテプシン K をコードする mRNA に ARE は存在しないが、カテプシン K 遺伝子の転写を活性化する JUN や FOS などの転写因子は ARE-mRNA から翻訳されるので⁴⁾、その発現の上昇もリーズナブルである。これらの結果は、破骨細胞での HuR の細胞質局在は、破骨細胞の機能にも深くかかわることを示唆している。また、カテプシン K と並んで破骨細胞から分泌される細胞外基質分解酵素である MMP-9 も破骨細胞の機能に必須であることが知られている^{1),3)}。MMP-9 は ARE-mRNA にコードされており、HuR の核局在によりその発現が上昇することが予想される。破骨細胞の HuR 局在と MMP-9 の発現との関連を検討することは今後の課題である。

本研究では、7 週齢と 30 週齢のラットの破骨細胞の HuR 局在について検討した。(表 2) その結果、30 週齢の破骨細胞の核に HuR を認めることができなかった。これまで、ヒトでは加齢に伴い細胞内の HuR が減少する傾向にある事が知られており、さらに、ヒト細胞を用いた研究では HuR の発現量を減少させると細胞老化が誘発されることが明らかになっている¹⁰⁾。従って、ラットでも同様な減少が起きているとすると、加齢に伴い細胞全体の HuR 量が減少した結果、核内に存在する HuR の量も減少したと考えられる。

骨膜下破骨細胞を対象にして HuR 局在と破骨細胞下のハウシツプ窩の関連を検討した結果 (図 4) , ハウシツプ窩は HuR の有無に関わりなく認められた。ハ

ハウシツ窩は骨表面が分解されて形成される。ヒドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) が分解されるには酸産生および波状縁からの分泌、波状縁下の酸性環境 (pH3~4) の維持が必要である¹⁾。このことからハウシツ窩が存在するという事は、破骨細胞の骨吸収能のうち酸産生および分泌、酸性環境の維持機能は正常に機能していると考えられる。本研究では、HuR の細胞質局在に関わらずハウシツ窩が存在したことから、骨吸収能を構成する要素のうち、酸産生およびその分泌、波状縁下の酸性環境の維持能は HuR による ARE-mRNA の核外輸送および安定化機構に依存していない可能性が考えられる。

本研究では、破骨細胞の HuR 染色の結果からその局在が多様であったことは、HuR による ARE-mRNA の核外輸送および安定化機構が常時機能している訳ではない可能性を示している。破骨細胞はその前駆細胞が遊走して骨芽細胞表面の RANKL と結合して単核の破骨細胞前駆細胞に分化し、骨表面に結合した後に融合して骨吸収能が活性化する、または破骨細胞前駆細胞が融合してから骨表面に結合して骨吸収能が活性化する¹⁾。従って、破骨細胞における HuR の細胞質局在は破骨細胞同士の融合に関わっていることも考えられる。この細胞同士の融合に深く関わる分子として CD9 が知られている¹¹⁾。RAW264.7 細胞の CD9 を阻害すると多核の破骨細胞様細胞が減少し、過剰発現させると RANKL の刺激なしに細胞同士の融合が進む事が分かっている¹²⁾。CD9 も ARE-mRNA に

コードされているタンパクで、乳がん細胞を用いた実験では、CD9 mRNA には HuR が結合することが明らかになっている¹³⁾。従って、破骨細胞での HuR の細胞質局在が CD9 mRNA の核外輸送および安定化を介して、破骨細胞前駆細胞の融合に関わる可能性があり、このことも今後の検討課題である。

結 論

本研究では、破骨細胞の細胞質に局在する RNA 結合タンパク HuR を調べ、その局在と破骨細胞の機能との関連を解析した。その結果、活性化されている破骨細胞では、HuR の細胞質局在が顕著で、活性化した破骨細胞で発現するカテプシン K の発現も、細胞質に HuR が存在する破骨細胞で高かった。これらの結果は、破骨細胞では HuR が細胞質に局在することが、その細胞の機能に密接に関連することを示しており、HuR により核外輸送及び安定化される ARE-mRNA の関与が初めて示唆された。

参 考 文 献

1. 小澤英浩, 中村浩彰 : 破骨細胞の形態学. 須田立雄, 小澤英浩, 高橋榮明編, 田中栄, 新・骨の科学第2版, 106-122, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2016.
2. 高橋直之 : 概論破骨細胞. 日本骨代謝学会編, 骨ペディアー骨疾患・骨代謝キーワード事典, 120-121, 羊土社, 東京, 2015.
3. Lee K, Seo I, Choi MH, Jeong D : Roles of Mitogen-Activated Protein Kinases in Osteoclast Biology. *Int J Mol Sci* 19, 2018.
4. Chen CY, Shyu AB : AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20 : 465-470, 1995.
5. Jacobson A, Peltz SW : Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 65 : 693-739, 1996.
6. Brennan CM, Steitz JA : HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58 : 266-277, 2001.
7. Hinman MN, Lou H : Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci* 65 : 3168-3181, 2008.
8. van der Giessen K, Di-Marco S, Clair E, Gallouzi IE : RNAi-mediated HuR depletion leads to the inhibition of muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 278 : 47119-47128, 2003.
9. Lopez de Silanes I, Fan J, Yang X, Zonderman AB, Potapova O, Pizer ES, Gorospe

M : Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene* 22 : 7146-7154, 2003.

10. Wang W, Yang X, Cristofalo VJ, Holbrook NJ, Gorospe M : Loss of HuR Is Linked to Reduced Expression of Proliferative Genes during Replicative Senescence. *Mol Cell Biol* 17 : 5889-5898, 2000.

11. 宮戸健二, 小林輝一, 目加田英輔 : 膜 4 回貫通型タンパク質 CD9 の新しい機能. *蛋・核・酵* 45 : 1728-1734, 2000.

12. Calaluce R1, Gubin MM, Davis JW, Magee JD, Chen J, Kuwano Y, Gorospe M, Atasoy U : The RNA binding protein HuR differentially regulates unique subsets of mRNAs in estrogen receptor negative and estrogen receptor positive breast cancer. *BMC Cancer* 10, 2010.

13. Ishii M, Iwai K, Koike M, Ohshima S, Kudo-Tanaka E, Ishii T, Mima T, Katada Y, Miyatake K, Uchiyama Y, Saeki Y : RANKL-induced expression of tetraspanin CD9 in lipid raft membrane microdomain is essential for cell fusion during osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 21 : 965–976, 2006.

謝 辞

研究を終えるにあたり、多大な御尽力を賜りました北海道大学大学院歯学
研究科血管生物分子病理学教室（旧口腔病理病態学教室）および口腔顎顔面外科
学教室の先生方に厚く御礼申し上げます。

図および表の説明

図 1-1：脛骨中の破骨細胞観察部位

ラット（7週齢・オス）の脛骨近位骨端を 1. 関節軟骨下, 2. 骨端板上縁, 3. 骨膜下, および 4. 海綿骨の 4 つの区画に分割して各部位に存在する破骨細胞を観察した.

図 1-2：破骨細胞における HuR 局在.

TRAP 染色で認識された破骨細胞における HuR の局在を観察し, 核及び細胞質に局在する HuR に注目し局在のパターンを分類した. A: 全ての核および細胞質に HuR が認められた破骨細胞, B: 一部の核および細胞質に HuR が認められた破骨細胞, C: 核は HuR が認められるが細胞質には認められなかった破骨細胞, D: 核および細胞質共に HuR が認められなかった破骨細胞.

図 2-1：細胞質に HuR が認められた破骨細胞の分布.

図 1-1 に示した脛骨近位骨端の破骨細胞の分布を示す. 赤は細胞質に HuR が認められた破骨細胞、緑は細胞質に HuR が細胞質に認められなかった破骨細胞の位置を示す.

表 1 : 脛骨各部位の破骨細胞における HuR の局在.

図 1-1 に示した脛骨各部位での破骨細胞における HuR の細胞質局在の有無を示す. (+) : 細胞質に HuR の局在が認められた破骨細胞 (-) : 細胞質に HuR の局在が認められなかった破骨細胞

図 2-2 : 脛骨各部位で HuR の細胞質発現を認めた破骨細胞の割合.

図 1-1 に示した脛骨各部位で, 細胞質に HuR が局在する破骨細胞の割合. 表 1 の値を示す. 赤枠は骨吸収の活性が高い領域. 青枠は骨吸収の活性が低い領域.

図 3 : 30 週齢ラットの脛骨に存在する破骨細胞の染色像.

HE : ヘマトキシレンエオジン染色, TRAP : 破骨細胞を示す染色, HuR : HuR の免疫染色. 黒矢頭は破骨細胞を示す. スケールバーは 50 μ m を示す.

表 2 : 7 週齢と 30 週齢のラット脛骨に存在する破骨細胞の HuR 局在.

(\pm): 一部の核に HuR の局在を認めた破骨細胞. 核(\pm)は核(+)として計算した.

図 4 : 骨膜下のハウシップ窩に隣接する破骨細胞 (黒矢頭)

A : HuR(+)かつ細胞下にハウシップ窩を認めた破骨細胞, B : HuR(-)かつ細胞下

にハウシツク窩を認めた細胞，骨膜下の破骨細胞の内，細胞質 HuR(+)は 18 個，HuR(-)は 29 個．標本は表 1,2 で使用したと個体と同じだが異なる切片を用いて計測した．スケールバーは 50 μ m を示す．

図 5：脛骨の骨膜下に存在する破骨細胞のカテプシン K の発現．

脛骨の骨膜下破骨細胞の HuR とカテプシン K の免疫染色像．A：細胞質に HuR を認め、かつカテプシン K が認められた破骨細胞．B：細胞質に HuR を認めず、カテプシン K が認めた破骨細胞胞．HE：ヘマトキシレンエオジン染色，TRAP：破骨細胞を示す染色，HuR：HuR の免疫染色．カテプシン K：カテプシン K の免疫染色．黒矢頭は破骨細胞を示す．

表 3：脛骨の骨膜下破骨細胞の細胞質 HuR 局在とカテプシン K 発現の関係．

Relationship between osteoclast function and RNA binding protein HuR

Keisuke Ito, Aya Matsuda-Yanagawa, Tetsuya Kitamura, Minoru Yohda,
Tomomi Takahashi, Tadashi Izuka, Fumihiro Higashino

ABSTRACT

[Background] Osteoclasts are bone resorbing cells and are known to be involved in bone remodeling together with osteoblasts. Since aberrant osteoclast is involved in various bone lesions, understanding its differentiation and detailed functions is very significant, as it may develop into understanding and cure of these diseases.

Osteoclasts differentiate from their progenitor cells by being stimulated with RANKL and various molecules are involved in this signal transduction. Many mRNAs encoding these protein molecules have AU-rich element (ARE).

ARE is a degradation signal of mRNA and is present in the 3'-untranslated region of mRNA. ARE-mRNA is usually degraded immediately after transcription, but when RNA binding protein HuR binds to ARE, it is exported to the cytoplasm of cells and stabilized.

Although HuR is usually localized in the nucleus, it binds to ARE and is exported to the cytoplasm together with mRNA when cells subjected to differentiation stimulation or stress. Therefore, HuR export and stabilization of ARE-mRNA may be involved in the

differentiation and function of osteoclasts.

In this study, HuR localization of osteoclasts was studied using rat tibia as a material, and the relation between osteoclast function and HuR was examined

[Materials and Methods] Serial sections of male rat tibia tissues at 7 and 30 weeks of age were prepared, stained with HE and TRAP, and immunostained them with HuR and cathepsin K protein antibodies.

[Result] HuR localized in the cytoplasm in many osteoclasts, the cytoplasmic localization of HuR was observed in many osteoclasts at sites where bone formation activity is high, however, osteoclasts under the periosteal bone that have low osteogenic activity , HuR expression in cytoplasm was low. In addition, there was no expression of HuR in the nucleus of osteoclasts at 30 weeks of age, no relationship was found between the HuR localization of the osteoclast cytoplasm and the formation of the Hauslip fossa Furthermore, the expression of cathepsin K was observed in many of the osteoclasts recognized cytoplasmic HuR expression.

[Conclusion] These results indicate that in many activated osteoclasts HuR localizes in the cytoplasm and its expression is related to Cathepsin K-mediated bone resorption capacity of osteoclast. This study revealed for the first time the relationship between osteoclast function and HuR.

Key Words : Osteoclast, HuR, ARE-mRNA, Cathepsin K

图 1-1

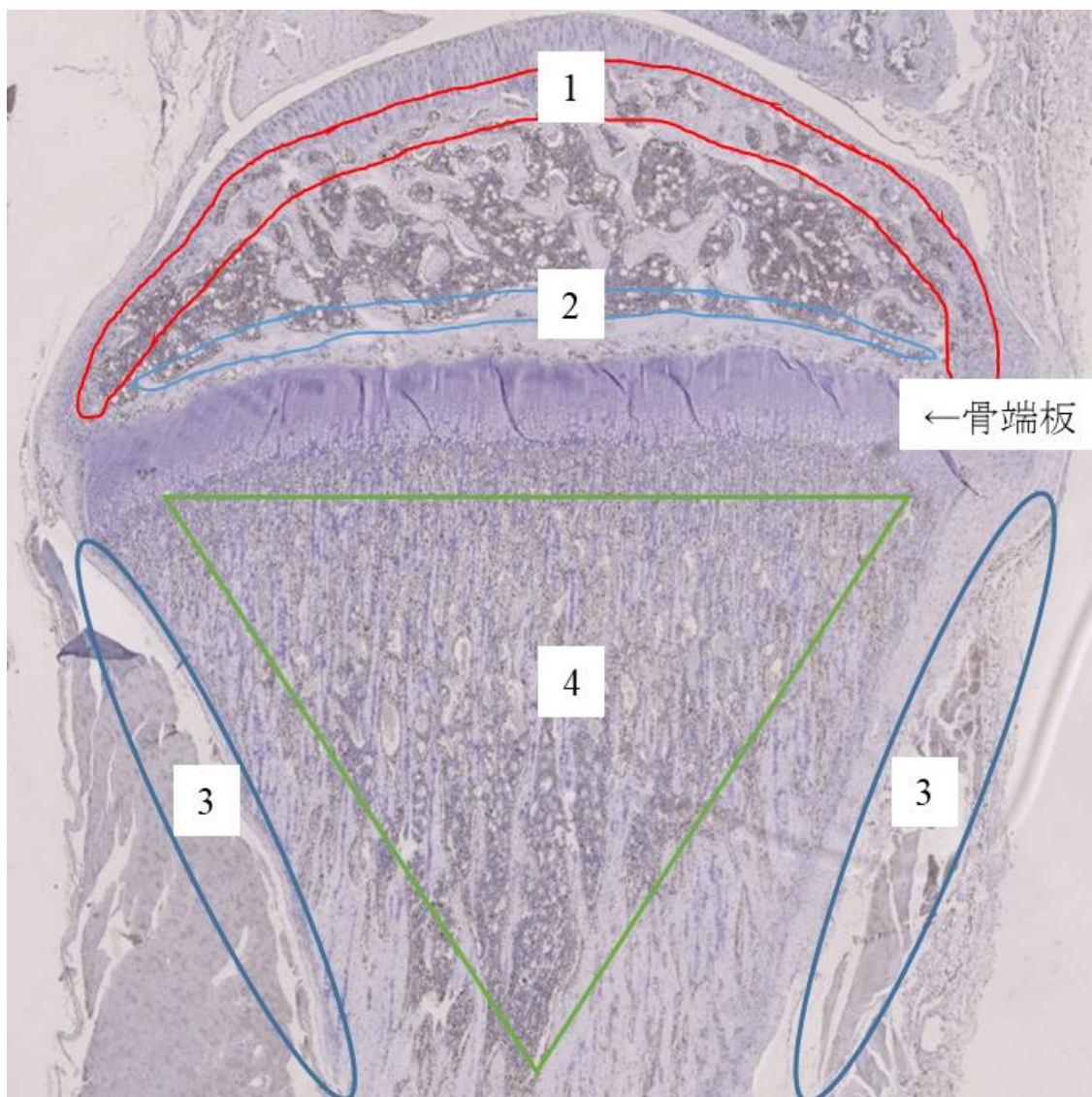


图 1-2

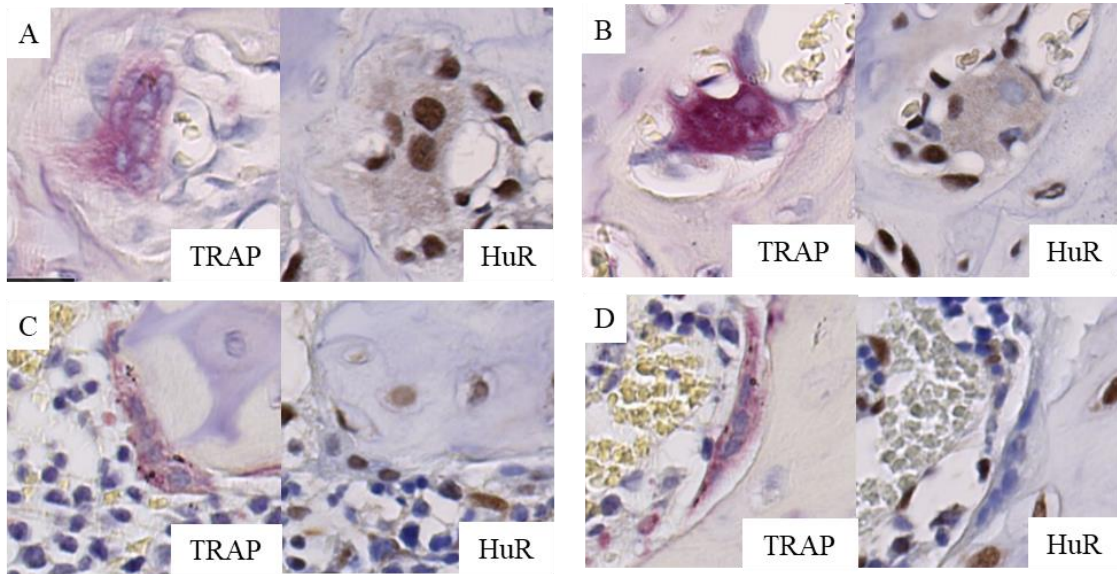


図 2-1

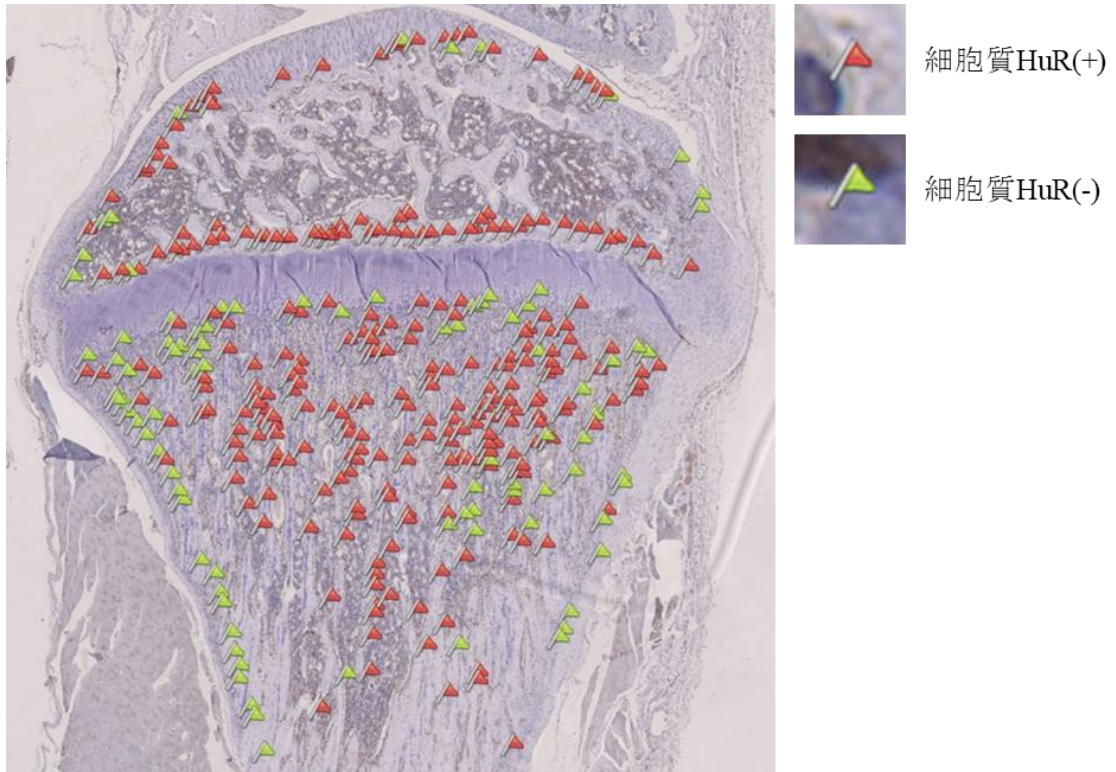


図 2-2

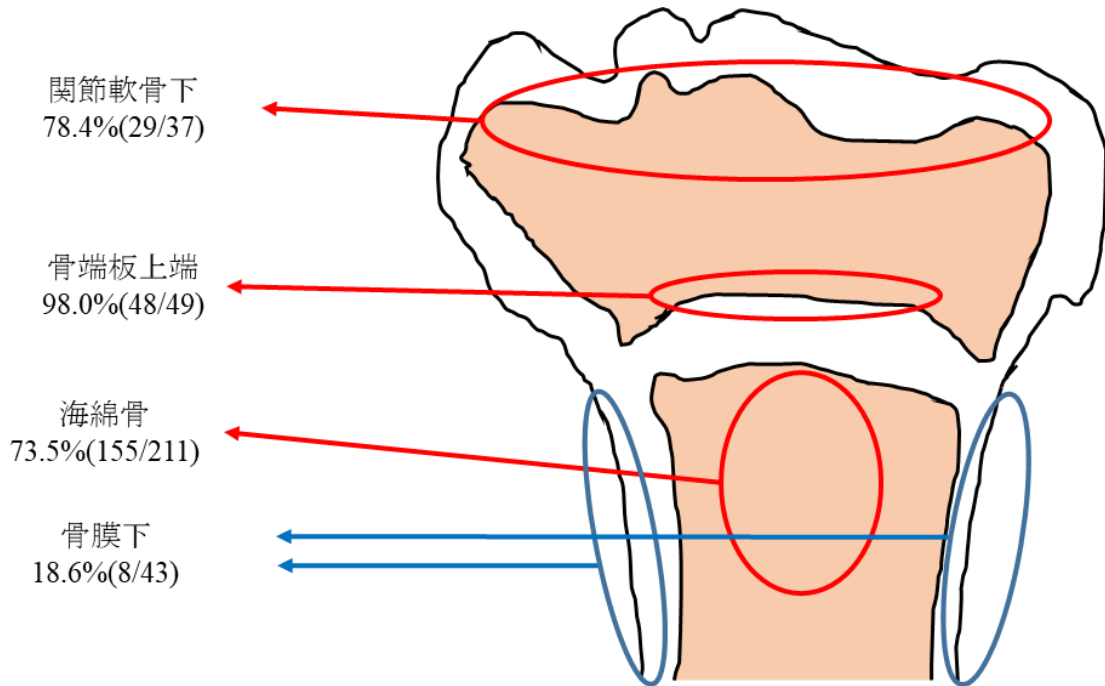


表 1

	細胞質HuR	割合 (個数)		細胞質HuR	割合
関節軟骨下 N=37	(+)	78.4% (26)	海綿骨 N=211	(+)	73.5% (155)
	(-)	21.6% (8)		(-)	26.5% (56)
骨端板上端 N=49	(+)	98% (48)	骨膜下 N=43	(+)	18.6% (8)
	(-)	2% (1)		(-)	81.4% (35)

図 3

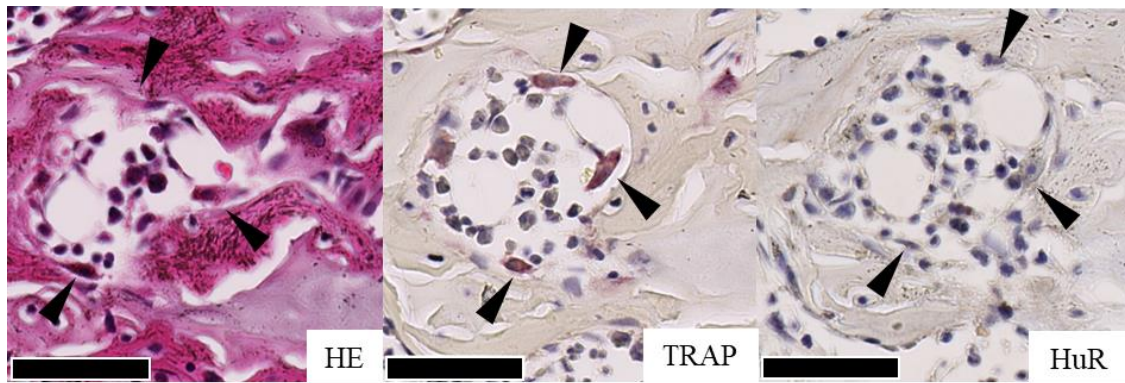


表 2

	細胞質/核	割合 (個数)		細胞質/核	割合 (個数)
7週齡 関節軟骨下 N=24	(+)/(+)	21% (5)	30週齡 関節軟骨下 N=25	(+)/(+)	0% (0)
	(+)/(±)	54.2% (13)		(+)/(±)	0% (0)
	(+)/(-)	0% (0)		(+)/(-)	84% (21)
核HuR(+) 79.2% (19)	(-)/(+)	4.2% (1)	核HuR(+) 0% (0)	(-)/(+)	0% (0)
	(-)/(±)	0% (0)		(-)/(±)	0% (0)
	(-)/(-)	20.6% (5)		(-)/(-)	16% (4)

図 4

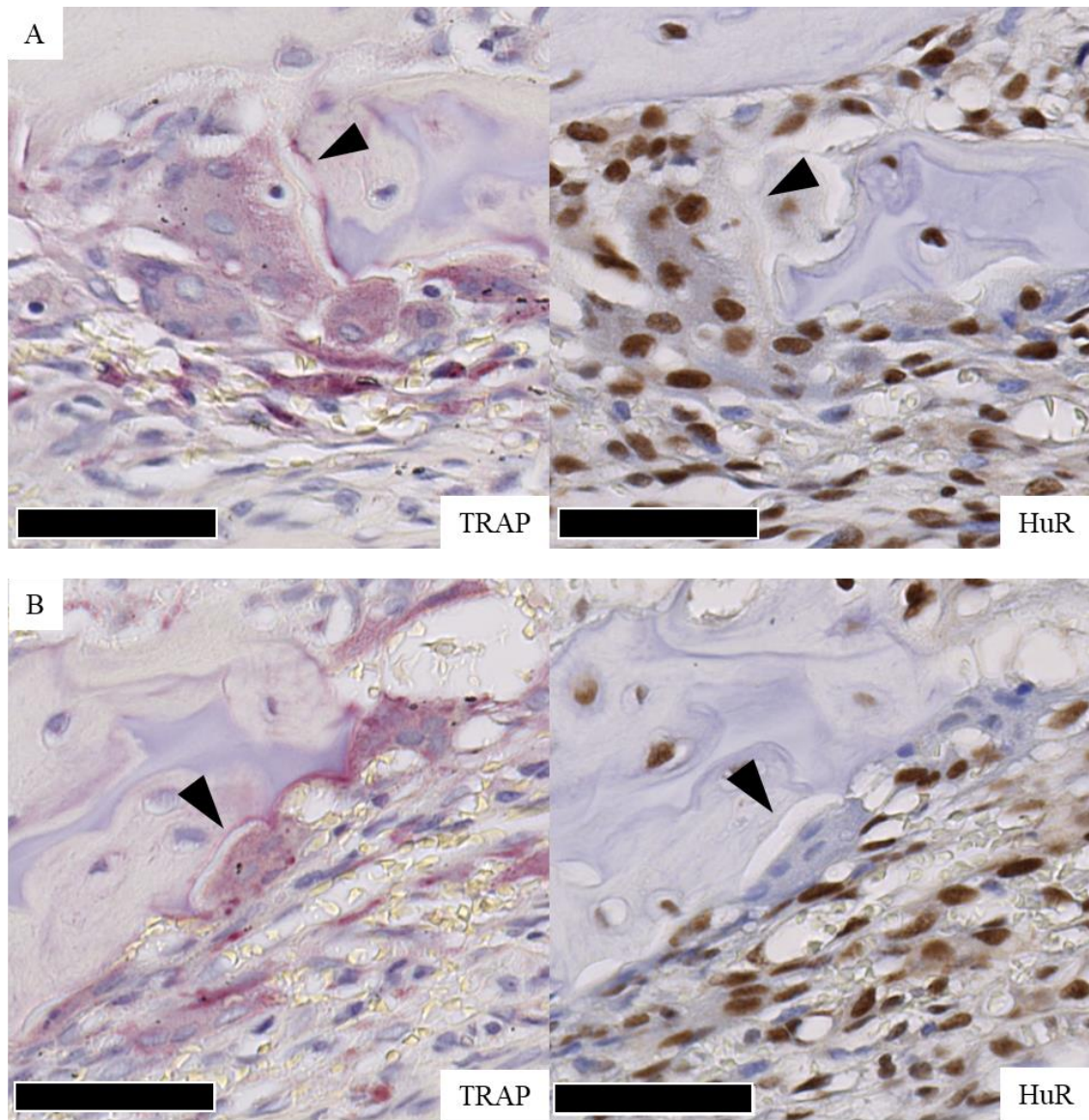


図 5

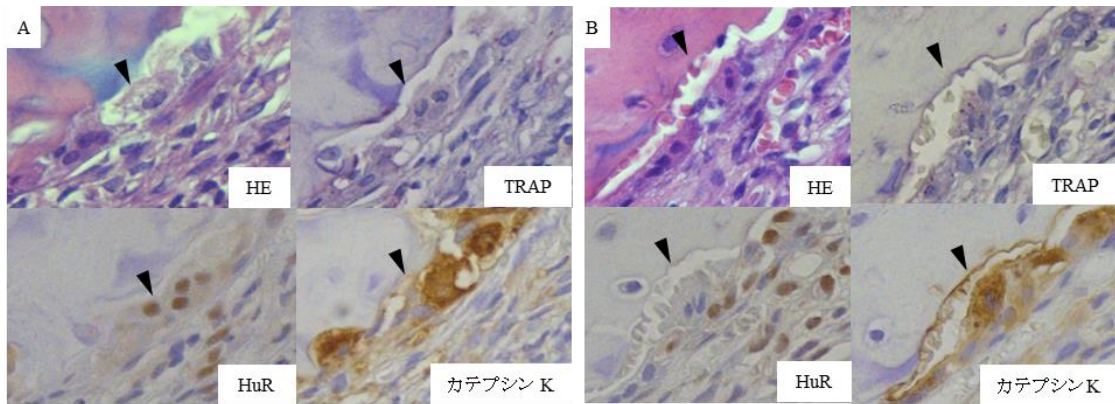


表 3

	カテプシンK(+)	カテプシンK(-)
HuR(+)	18	0
HuR(-)	10	19