HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	破骨細胞の機能とRNA結合タンパクHuRとの関連
Author(s)	伊藤, 啓介; 松田, 彩; 北村, 哲也 他
Citation	北海道歯学雑誌, 41(2), 125-131
Issue Date	2021-03-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80688
Type	journal article
File Information	41_02_04.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道歯誌　41：125−131，2021.

原　著

破骨細胞の機能とRNA結合タンパクHuRとの関連

伊藤　啓介[1,2)]　松田　彩[2)]　北村　哲也[2)]　養田　稔[1,2)]
高橋　智美[3)]　飯塚　正[3)]　鄭　漢忠[1)]　東野　史裕[2,4)]

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．

【材料と方法】7週齢および30週齢のオスのラット脛骨組織の連続切片を作成し，HEおよびTRAP染色を行い，HuRおよびカテプシンKタンパクの抗体を用いて免疫染色を行った．

【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局在とハウシップ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役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-kβ）を発現しており，骨芽細胞表面に発現しているRANKL（Receptor Activator NF-kβ Ligand）

[1)] 〒060-8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究院　口腔病態学分野　口腔顎顔面外科学教室（鄭　漢忠　教授）
[2)] 〒060-8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究院　口腔病態学分野　血管生物分子病理学教室（樋田　京子　教授）
[3)] 〒060-8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究院　学術支援部（飯塚　正　准教授）
[4)] 〒060-8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院医理工学院分子医理工学コース　生物医理工学講座分子腫瘍学分野（東野　史裕　准教授）

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 kβ，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エレメント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，ラット顎骨を材料として，顎骨各部位の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 μm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），0.2 mol/l酢酸緩衝溶液（pH5.0）の混合溶液と37 ℃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箇所に区分けした．（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

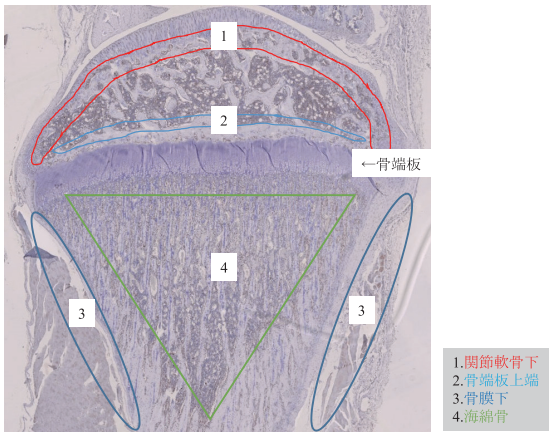

図1-1　脛骨中の破骨細胞観察部位
ラット（7週齢・オス）の脛骨近位骨端を1．関節軟骨下，2．骨端板上縁，3．骨膜下，および4．海綿骨の4つの区画に分割して各部位に存在する破骨細胞を観察した．

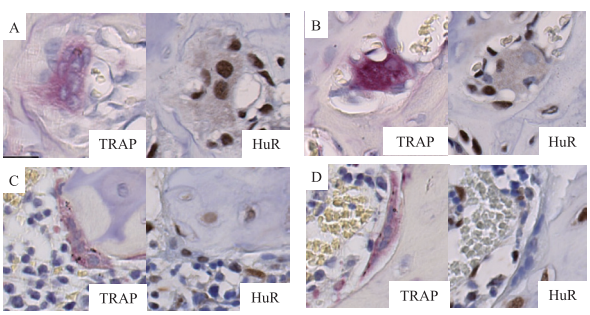

図1-2　破骨細胞におけるHuR局在．
TRAP染色で認識された破骨細胞におけるHuRの局在を観察し，核及び細胞質に局在するHuRに注目し局在のパターンを分類した．A：全ての核および細胞質にHuRが認められた破骨細胞，B：一部の核および細胞質にHuRが認められた破骨細胞，C：核はHuRが認められるが細胞質には認められなかった破骨細胞，D：核および細胞質共にHuRが認められなかった破骨細胞．

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

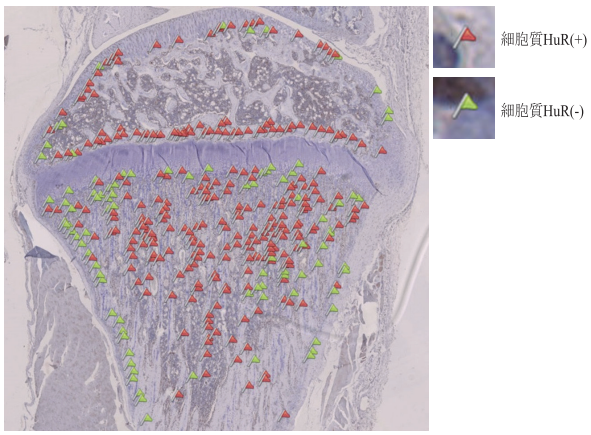

図2-1　細胞質にHuRが認められた破骨細胞の分布．
図1-1に示した脛骨近位骨端の破骨細胞の分布を示す．赤は細胞質にHuRが認められた破骨細胞，緑は細胞質にHuRが細胞質に認められなかった破骨細胞の位置を示す．

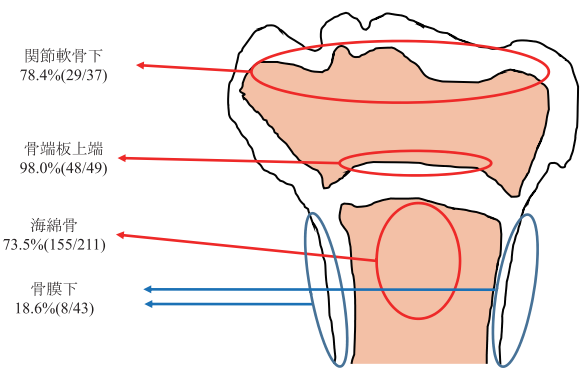

図2-2　脛骨各部でHuRの細胞質発現を認めた破骨細胞の割合．
図1-1に示した脛骨各部位で，細胞質にHuRが局在する破骨細胞の割合．表1の値を示す．赤枠は骨吸収の活性が高い領域．青枠は骨吸収の活性が低い領域．

	細胞質HuR	割合（個数）
関節軟骨下 N=37	(+)	78.4%（26）
	(-)	21.6%（8）
骨端板上端 N=49	(+)	98%（48）
	(-)	2%（1）

	細胞質HuR	割合
海綿骨 N=211	(+)	73.5%（155）
	(-)	26.5%（56）
骨膜下 N=43	(+)	18.6%（8）
	(-)	81.4%（35）

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

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

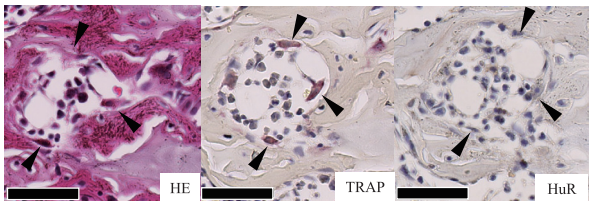

図3　30週齢ラットの脛骨に存在する破骨細胞の染色像.
HE：ヘマトキシレンエオジン染色，TRAP：破骨細胞を示す染色，HuR：HuRの免疫染色．黒矢頭は破骨細胞を示す．スケールバーは50 μmを示す.

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

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

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プ窩の関連を検討した．図4に示すように，ハウシップ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，

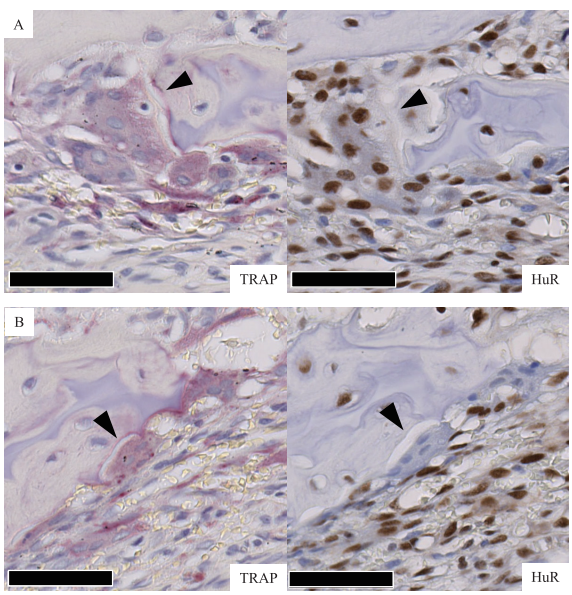

図4　骨膜下のハウシップ窩に隣接する破骨細胞（黒矢頭）
A：HuR(+)かつ細胞下にハウシップ窩を認めた破骨細胞．B：HuR(−)かつ細胞下にハウシップ窩を認めた細胞，骨膜下の破骨細胞の内，細胞質HuR(+)は18個，HuR(−)は29個．標本は表1, 2で使用したと個体と同じだが異なる切片を用いて計測した．スケールバーは50 μmを示す.

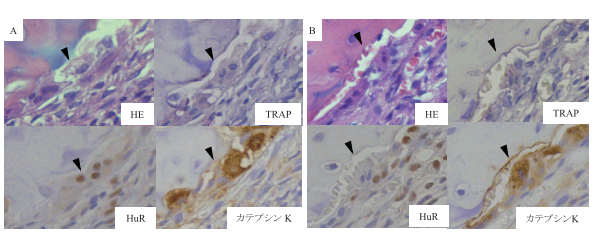

図5　脛骨の骨膜下に存在する破骨細胞のカテプシンKの発現.
脛骨の骨膜下破骨細胞のHuRとカテプシンKの免疫染色像.
A：細胞質にHuRを認め，かつカテプシンKが認められた破骨細胞．B：細胞質にHuRを認めず，カテプシンKが認めた破骨細胞胞．HE：ヘマトキシレンエオジン染色，TRAP：破骨細胞を示す染色，HuR：HuRの免疫染色．カテプシンK：カテプシンKの免疫染色．黒矢頭は破骨細胞を示す.

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

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.

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ップ窩の関連を検討した結果（図4），ハウシップ窩はHuRの有無に関わりなく認められた．ハウシップ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（$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$）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]．この事からハウシップ窩が存在するということは，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ップ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．

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院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．

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.

Hokkaido J. Dent. Sci., 41 : 125−131, 2021.

ORIGINAL

Relationship between osteoclast function and the mRNA binding protein HuR

Keisuke Ito[1, 2], Aya Matsuda-Yanagawa[2], Tetsuya Kitamura[2], Minoru Yohda[1, 2]
Tomomi Takahashi[3], Tadashi Iizuka[3], Kanchu Tei[1] and Fumihiro Higashino[2, 4]

ABSTRACT :

[Background] Osteoclasts are bone-resorbing cells that are involved in remodeling of bone together with osteoblasts. Aberrant osteoclasts have been observed in various bone lesions; therefore, it is important to determine the differentiation potential and detailed functions of these cells in order to improve our understanding of these diseases.

Osteoclasts differentiate from their progenitor cells after being stimulated by RANKL. In addition, various other molecules are known to be involved in this signaling pathway. Furthermore, several mRNAs encoding these protein molecules are known to possess the AU-rich element (ARE).

ARE is a degradation signal present in the 3′-untranslated region of the mRNA. ARE-mRNA is usually degraded immediately after the transcription; however, it is exported to the cytoplasm of the cells and stabilized after binding to the RNA-binding protein HuR. Although HuR is usually localized in the nucleus, it binds to ARE and is exported to the cytoplasm together with the mRNA when the cells are subjected to differentiation, stimulation, or stress. Therefore, the HuR-associated export and stabilization of ARE-mRNA might be involved in the differentiation and function of osteoclasts.

In this study, the localization of HuR in the osteoclasts was examined in rat tibia, and the relationship between osteoclast function and HuR localization was determined.

[Materials and Methods] Serial sections of tibia tissues from male rats (7 and 30 weeks of age) were obtained and stained with HE and TRAP. Subsequently, the sections were immunostained with HuR and Cathepsin K protein antibodies.

[Result] HuR was localized in the cytoplasm in many osteoclasts. The cytoplasmic localization of HuR was observed at sites where bone formation activity was high. However, osteoclasts under the periosteal bone that had low osteogenic activity demonstrated low HuR expression in the cytoplasm. No HuR expression was detected in the nucleus of osteoclasts at 30 weeks of age. Furthermore, no relationship was observed between HuR localization in the cytoplasm and the formation of Haushiip fossa. Cathepsin K was observed in many of the osteoclasts containing cytoplasmic HuR expression.

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

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

[1] N-13, W-7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Oral Pathobiological Science, Hokkaido University Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, (Professor : Kanchu Tei)
[2] N-13, W-7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan
Department of Vascular Biology and Molecular Pathology, Hokkaido University Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine (Professor : Kyoko Hida)
[3] N-13, W-7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan
Support Section for Education and Research, Hokkaido University Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine (Associate Professor : Tadashi Iizuka)
[4] N-13, W-7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan
Department of Molecular Oncology, Hokkaido University Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Biomedical Science and Engineering (Associate Professor : Fumihiro Higashino)