



Title	破骨細胞の分化とRNA結合タンパクHuRとの関連
Author(s)	養田, 稔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13880号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13880
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93736
Type	doctoral thesis
File Information	Minoru_Yohda.pdf



博 士 論 文

破骨細胞の分化と
RNA 結合タンパク HuR との関連

令和 2 年 3 月 申請

北海道大学
大学院歯学研究科口腔医学専攻

養田 稔

目 次

発表論文目録および学会発表目録

1. 要旨	3 頁
2. 緒言	5 頁
3. 材料と方法	9 頁
4. 結果	17 頁
5. 考察	32 頁
6. 結論	37 頁
7. 謝辞	38 頁
8. 参考文献	39 頁

要 旨

破骨細胞は骨吸収を行う唯一の多核巨細胞であり、その分化メカニズムを解明することは、破骨細胞が関わる様々な疾患の治療につながる。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に由来し、外部から種々の刺激により、破骨細胞に分化する。破骨細胞前駆細胞は表面に RANK を発現し、骨芽細胞表面に発現する RANKL と結合することで分化シグナルが伝達される。分化の過程では、様々な転写因子が重要な役割を果たし、分化後骨表面に接着し、融合しながら成熟破骨細胞へと成長する。転写因子や様々な分化関連因子のタンパクをコードする mRNA には AU-Rich Element (ARE) と呼ばれる RNA エlementをもつものが多い。

ARE-mRNA は、通常転写後すぐに分解されるが、RNA 結合タンパク HuR が結合すると、核外輸送・安定化される。細胞にストレス刺激などが加わると、ARE-mRNA は一時的に核外輸送・安定化されるが、HuR により恒常的に安定化されると細胞のがん化や様々な疾患に関与することが知られている。また、ARE-mRNA は細胞の分化にも関与することが報告されており、分化中の骨格筋細胞では HuR が細胞質に局在し、ARE-mRNA が安定化されている。本研究では、破骨細胞の分化に HuR がどのように関わるかを明らかにすることを目的とした。

ラット脛骨組織中の免疫染色によって、破骨細胞の多くで HuR の細胞質局在を認め、RAW264.7 細胞を RANKL により分化した破骨細胞でも HuR の細胞質局在が認め

められた. 破骨細胞の分化に対する HuR の役割を検討するために, 熱ショックで HuR の分解を促進した結果, 破骨細胞への分化が抑制され, CMLD-2 で HuR の機能を阻害しても, 濃度依存的に破骨細胞への分化が抑制された. また, 分化した成熟破骨細胞では Actin ring を認めたが, CMLD-2 処理した細胞では Actin ring は認められなかった. 破骨細胞の骨吸収能と HuR との関連を調べるために Pit formation assay を行った結果, CMLD-2 で HuR 阻害した系では Pit (吸収窩) の数が減少し, HuR を阻害することにより, 破骨細胞の骨吸収能が低下した. さらに, 破骨細胞の分化の最終段階でのアポトーシスと HuR との関係を調べた結果, アポトーシス中の破骨細胞では, 核に局在する HuR が減少していた.

破骨細胞で HuR の細胞質局在を認めたことは, 破骨細胞の分化には HuR による ARE-mRNA の核外輸送・安定化が関与することを示している. また, HuR 阻害すると Actin ring の形成や骨吸収能が抑制され, HuR が破骨細胞の分化だけではなく, 細胞骨格形成や細胞接着にも関連することが考えられる. また, アポトーシス中の破骨細胞で核に局在する HuR の低下を認めたことから, 分化からアポトーシスまでの破骨細胞の一生に HuR が寄与していることが示された. これらの結果より, HuR を破骨細胞分化のマーカーとして利用できる可能性が示された.

緒

言

破骨細胞は骨組織を破壊・吸収する生体内で唯一の細胞である。多核の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から、骨芽細胞より産生されるサイトカインによって分化され、細胞融合によって形成され、多核の巨細胞を形成する。核は 2～100 個以上と変化に富み、細胞質内に多数のミトコンドリアやゴルジ装置の発達を認め、エネルギー代謝やタンパク質合成が活発で、多数の偽足様突起を伸ばしているものがあるなど形態や大きさは様々である¹⁾。

また、破骨細胞のマーカー酵素は酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) であり、組織染色法による破骨細胞のマーカーとして用いられている。破骨細胞には極性があり、骨基質に接着すると帯状の明帯 (シーリングゾーン) を形成して骨を取り囲み、その内側にヒダ状の波状縁を形成して活発に骨吸収を行い、吸収窩 (ハウシップ窩) を形成する。明帯にはアクチンフィラメントやインテグリンなどが存在し、破骨細胞の接着や運動に関与していると考えられている¹⁾。また、波状縁は、酸 (H^+) や種々のプロテアーゼを分泌することで、アパタイト結晶やコラーゲンなどの骨基質を溶解している²⁾。骨代謝は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨の添加による骨のリモデリングによって恒常性が保たれており、恒常性が崩れると様々な病変を引き起こす。破骨細胞の骨吸収能の異

常を原因とする疾患は多数存在し、骨吸収能の低下により骨が異常に成長して硬化する大理石病や骨吸収能の異常亢進によって骨が脆くなる骨ペーজেット病、骨粗鬆症、歯周病による歯槽骨破壊、関節リウマチによる骨破壊などが有名である^{1),3)}。

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⁴⁾。その過程で AP-1 (FOS + JUN) , 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、破骨細胞が骨表面に接着後、細胞融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 を発現して、骨吸収能を獲得することが知られている^{1),3)}。AP-1 (FOS + JUN) , NF κ B, MITF, NFATc1 など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^{5),6)}。

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⁵⁾、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^{6),7)}。その役割は転写後調節であり、通常 ARE-mRNA は転写後すぐに分解されるが、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^{6,8)}。しかしながら、がん細胞や炎症性疾患、ウイルス感染症などの様々な疾患に関する細胞で ARE-mRNA の恒常的な核外輸送・安定化が指摘されており^{9,10)}、また、疾患以外でも筋肉細胞の分化等にも同様に、ARE-mRNA の核外輸送・安定化が関連することが報告されている^{8,11)}。

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 に特異的に結合すると ARE-mRNA の分解を促進する。一方、embryonic lethal abnormal vision (ELAV) family に属する HuR タンパクは、ARE に特異的に結合し、核外輸送タンパクと共に mRNA を核外へ移動させ、輸送された ARE-mRNA は安定化される^{9,12)}。従って、HuR の細胞内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、上述したがん細胞や分化時の骨格筋細胞では HuR が細胞質に局在し^{8,12)}、ARE-mRNA の安定化されることが報告されている。

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多く発現していることから、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。そこで本研究では、破骨細胞の分化と HuR との関連を検討した。ラット脛骨中の破骨細胞および RAW264.7 細胞を RANKL 処理により分化させた破骨細胞では、HuR の細胞質局在を認め

た. 熱ショックや阻害剤により HuR の働きを抑制すると, 分化刺激を加えても, 分化した破骨細胞の数が著しく減少した. 破骨細胞の機能を解析するために, Pit formation assay を行ったところ, HuR を阻害することにより破骨細胞の骨吸収能が低下した. さらに, アポトーシスを起こしている破骨細胞では核に存在する HuR 量が低下した. これらの結果は, 破骨細胞の分化や機能に HuR が関わっていることを示しており, ARE-mRNA の核外輸送・安定化がこれらを仲介することが予想される.

材 料 と 方 法

1. 対象および標本作製

対象は7週齢のラット (オス), 脛骨の近位端とした(3匹, 両側の脛骨). 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. 組織 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, マイヤーヘマトキシリン溶液 (武藤化学株式会社, 東京, 日本) で 30 秒反応させ, 核染色を行った.

3. 免疫組織染色

脱パラフィン処理後の切片を, 1%BSA-PBS で 30 分ブロッキングを行い, 一次抗体を室温で 45 分間反応させた. 一次抗体として抗 HuR 抗体 (3A2 Santa Cruz

Biotechnology, Inc, Dallas, Texas, USA) を用い, 希釈倍率は 200 倍とした. 次いでペルオキシダーゼ標識抗ヤギ 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ヘマトキシリン溶液 (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 陽性細胞を「破骨細胞」と定義して, TRAP 染色および HE 染色標本で破骨細胞を確認し, 特定した破骨細胞の細胞質の HuR 局在を比較検討した. なお観察は染色切片を NanoZoomer に取り込み液晶モニター上で行った.

脛骨各部位における破骨細胞内の HuR の局在については, 7 週齢のラット脛骨の骨端を関節軟骨下および骨端板上端, 海綿骨, 骨膜下の 4 か所に区分けしてそれぞれの部位の破骨細胞の細胞質における HuR の局在を観察した.

5. 細胞培養と Western blotting

破骨細胞の前駆細胞として, マウス由来マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞 (ATCC® TIB-71™; Manassas, VA, USA) を使用した. RAW264.7 細胞は RANK を発現するため, M-CSF の刺激がなくても, RANKL による刺激によ

り破骨細胞へ分化する. RAW264.7 細胞は 10%FBS (FETAL BOVINE SERUM :MP Biomedicals, LLC, France) を含む Dulbecco's Modified Eagle's 培地 (D-MEM;SIGMA-ALDRICH United Kingdom) を用いて培養した. 細胞を 100mm ディッシュ(True Line, USA) 上で 37°C, 5%CO₂-95%気相下にて培養し, 培地面積の 70~80%まで増殖した後回収し, 9mm×9mm のカバーガラス上に RAW264.7 細胞を細胞密度が 2.5×10^2 個/mm² となるように播種した. RAW 細胞を破骨細胞に分化させるため, 10 % FBS, 1 % L-Alanyl-L-Glutamine (SIGMA-ALDRICH United Kingdom) , 0.1 %アスコルビン酸および 100ng/ml RANKL (Oriental Yeast Corp, Tokyo, Japan) を含む α -minimum essential 培地 (α -MEM;SIGMA-ALDRICH United Kingdom) を用いて 37°C, 5%CO₂-95%気相下にて培養した. カバーガラスに RAW264.7 細胞を播種した日を 1 日目とし, 1, 3 日目に RANKL (100ng/ml) 含有培養液で処理を行った.

Western blotting は, Aoyagi の方法に従った¹³⁾. プロテアーゼ阻害剤を含む RIPA バッファー (150 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl, pH 7.6; 1%Nonidet P-40; 1%デオキシコール酸ナトリウム; 0.1%SDS) を用いて全細胞溶解物を回収した. 各サンプルを 10%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し, ポリフッ化ビニリデン膜 (Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した. 一次抗体としては, 抗 HuR 抗体 (3A2, Santa Cruz

Biotechnology, Santa cruz, CA, USA) , 抗 β -actin 抗体 (C4 HRP mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, Santa cruz, CA, USA) を使用した. 二次抗体として m-IgG κ BP-HRP (Santa Cruz Biotechnology)を使用した.

6. 細胞 TRAP 染色

上記の方法で破骨細胞に分化させた RAW 細胞を培養後 5 日目に 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) の混合溶液で 37°C, 5%CO₂-95%気相下にて 45 分間反応させた. この後, マイヤーヘマトキシリン溶液 (武藤化学株式会社, 東京, 日本) で 30 秒核染色を行った.

7. 免疫細胞染色

RAW 細胞を上記同様に培養し, 細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回すすぎ, 4%パラホルムアルデヒドで 15 分間固定 (室温) し, 0.3%Triton X-100 (PBS) で 5 分間透過処理 (室温) し, 1%BSA (PBS) でブロッキングした. 次に, 抗 HuR 抗体 (3A2 mouse monoclonal IgG₁ Santa Cruz Biotechnology), 抗

Calcitonin receptor 抗体 (rabbit anti rat calcitonin receptor, polyclonal IgG, BIO RAD), 抗 Cleaved Caspase 3 抗体 (Cleaved Caspase 3(Asp175)) で 4°Cで一晩インキュベートした後, PBS とブロッキングバッファーで洗浄し,それぞれ Alexa Fluor 488 (A 11017 goat anti mouse IgG) および Alexa Fluor 568 (A 11036 goat anti rabbit IgG) で室温で 1 時間処理した. 細胞核を DAPI solution (4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, solution) で対比染色し, スライドにマウントした.オリンパス confocal を使用して細胞を観察した. 画像は, Olympus Fluoview Software (FV10-ASW 4.2 ビューアー) を使用した.

8. HuR 阻害

HuR が破骨細胞の分化に関わっているかを検討するため, RAW264.7 細胞に熱ショックを与えることにより HuR の分解を促し¹⁴⁾, RANKL による破骨細胞への分化を検討した.

RAW264.7 細胞を 43°C, 2 時間で熱ショックを行い, 直後, 30 分後, 2 時間後に細胞を回収して, HuR (細胞全体) の発現を western blotting で検討した.

次に, 熱ショックにより RAW264.7 細胞の HuR 発現が低下することにより, 破骨細胞への分化にどのように影響するか検討した. カバーガラスに播種した日を 1 日目とし, 実験群の対照群の RAW 細胞に 1 日目, 3 日目, 5 日目に 43°C, 2

時間熱ショックを行った後, 100ng/ml の RANKL で処理を行った. 対照群の RAW264.7 細胞には 1 日目, 3 日目, 5 日目に 100ng/ml の RANKL で処理を行った. 実験群, 対照群で TRAP 染色を行い, 破骨細胞への分化を検討した. 実験群、対照群それぞれ 3 サンプルの全細胞および破骨細胞の数を計測し, (成熟破骨細胞/全細胞) $\times$ 100%で計算した.

CMLD-2 が RAW264.7 細胞の HuR の発現を変化させるか検討するため, RAW264.7 細胞を 100mm ディッシュに播種し, 対照群には 10 μ M の DEMSO, 実験群には 10 μ M の CMLD-2 で処理し, 24h, 48h 後に Western blotting で HuR の発現量を解析した.

次に RAW264.7 細胞を 9mm $\times$ 9mm のカバーガラス上に 2.5 $\times$ 10² 個/mm² で播種し, カバーガラスに播種した日を 1 日目とし, 1 日目, 3 日目, 5 日目に 100ng/ml の RANKL で処理を行い, 対照群には 10 μ M の DEMSO, 実験群にはそれぞれ 1, 5, 10 μ M の CMLD-2 で処理し, 7 日間培養後, TRAP 染色, 免疫染色 (HuR), Actin 染色で破骨細胞への分化, タンパクの局在を検討した. F-actin は免疫染色後, スライドにマウントする直前に Phalloidin-Tetramethyl-rhodamine B isothiocyanate を 5 μ g/ μ l で添加した. なお分化した破骨細胞の定量解析については実験群、対照群それぞれ 3 サンプルの全細胞および破骨細胞の数を計測し, (成熟破骨細胞/全細胞) $\times$ 100%で計算した.

9. Pit formation assay

破骨細胞の機能と HuR の関連を検討するため、デンチンスライスを用いて Pit formation assay を行い, CMLD-2 処理群と未処理群で Pit (吸収窩) 数を計測することにより, 骨吸収能を検討した^{15),16)}.

直径 6mm のデンチンスライス (Dentin Slice, from Ivory, Thick Type, Wako) 上に RAW264.7 細胞を播種した。細胞密度は $2.5 \times 10^2 / \text{mm}^2$ 個になるように調整した。デンチンスライスに RAW264.7 細胞を播種した日を 1 日目とし, 1, 3, 5 日目に 100ng/ml の RANKL, $10 \mu\text{M}$ の CMLD-2 で処理し, HuR の機能阻害により, 分化した破骨細胞の機能に影響があるか検討した。

7 日目に, TRAP 染色で破骨細胞への分化を確認し, 1M アンモニア水中で超音波処理により細胞を破壊し, pit (吸収窩) をヘマトキシリンで染色した。乾燥後 pit (吸収窩) を観察した。実験群、対照群それぞれ 3 枚のデンチンスライスで 3 視野の平均の pit 数を計測した。

10. 破骨細胞の定義と評価

TRAP 染色において赤く染色し, 丸みを帯びて核を辺縁に持つ多核巨細胞を成熟破骨細胞とした。また, F-actin が辺縁にリング状に存在 (Actin ring 形成) し

ている破骨細胞を成熟破骨細胞とし, Cleaved caspase 3 が細胞質に発現している破骨細胞をアポトーシス中の破骨細胞とした.

11. 破骨細胞アポトーシスと HuR の切断

RAW264.7 細胞を播種した日を 1 日目とし, RANKL を 1 日目, 3 日目, 5 日目に加え, 破骨細胞への分化を誘導し, 5, 9, 11 日目に細胞回収し, HuR (細胞全体) の発現を western blotting で検討した. 一次抗体として, 抗 HuR 抗体(3A2 mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology), 抗 β -actin 抗体 (C4 HRP mouse monoclonal IgG Santa Cruz Biotechnology), 二次抗体として m-IgG κ BP-HRP (Santa Cruz Biotechnology) を使用し, 切断された HuR 断片を観察した.

結 果

1. 破骨細胞の HuR 局在

組織の破骨細胞の HuR 局在を検討するため、7 週齢のラットの脛骨から連続切片を作成し、それぞれ HE 染色、TRAP 染色、HuR の組織免疫染色を行い、破骨細胞に存在する HuR の局在を観察した。その結果、多くの破骨細胞で HuR が存在し、約 70% の破骨細胞で HuR の細胞質局在を認めた (図 1 および表 1)。また、骨端板上端など骨形成が盛んに行われて、破骨細胞の活性が高いと予想される部位では 98% の破骨細胞に HuR の細胞質局在を認めた (表 1)。

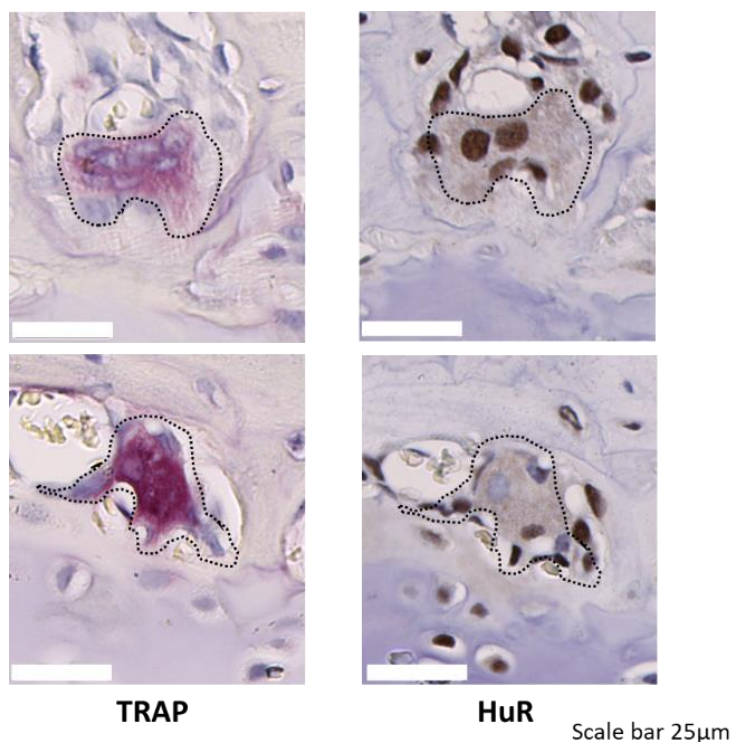


図 1 7 週齢ラットの脛骨に存在する破骨細胞の HuR 局在
ラット脛骨の連続切片を TRAP 染色および HuR の免疫染色を行う。
黒点線は破骨細胞を示す。スケールバーは 25μm を示す。

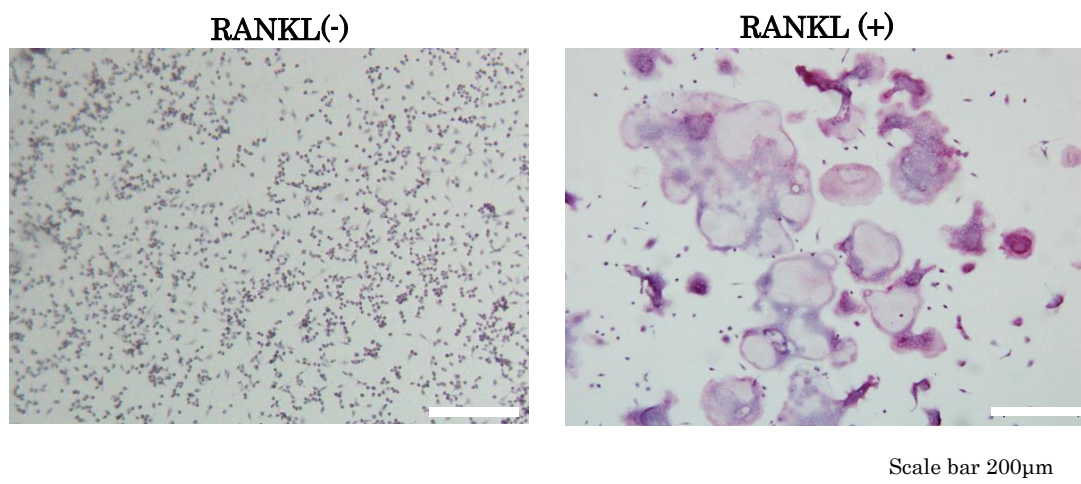
	細胞質HuR	割合			細胞質HuR	割合
関節軟骨下 N=37	(+)	78.40%		海綿骨 N=211	(+)	73.50%
	(-)	21.60%			(-)	26.50%
骨端板上端 N=49	(+)	98.00%		骨膜下 N=43	(+)	18.60%
	(-)	2.00%			(-)	81.40%

表 1 ラット脛骨各部に存在する破骨細胞中の細胞質 HuR 発現の割合

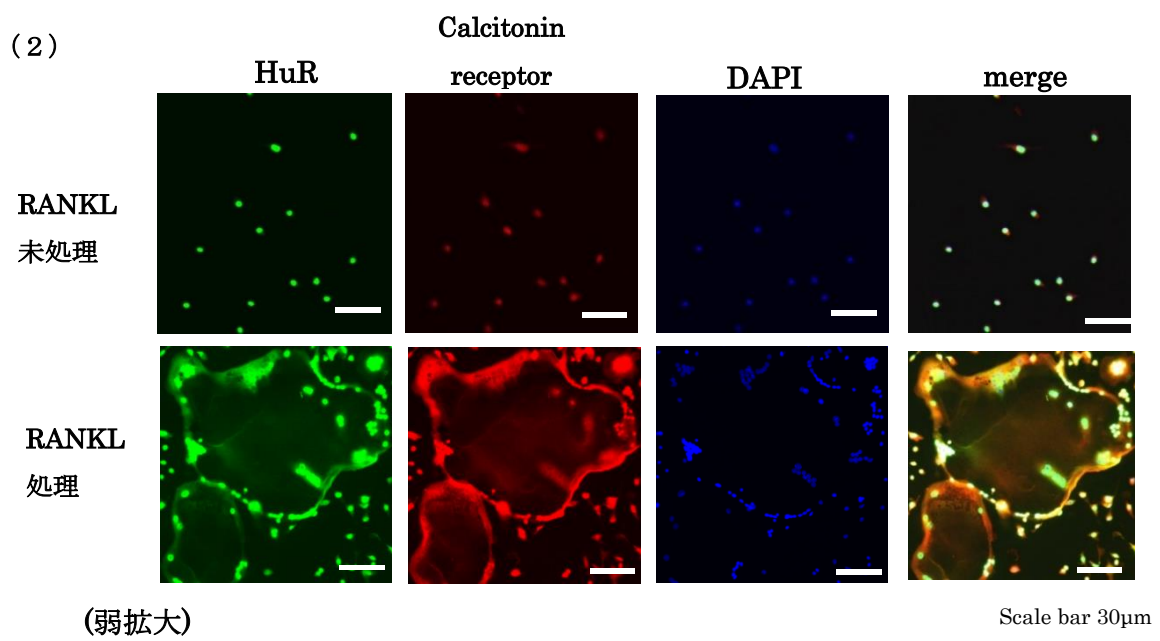
ラット（7 週齢・オス）の脛骨各部位(関節軟骨下, 骨端板上端, 海綿骨, 骨膜下)で, 細胞質に HuR が局在する破骨細胞の割合を示す.

次に同様の細胞質局在を培養細胞で検討した. RAW264.7 細胞を RANKL で処理し, TRAP 染色で破骨細胞への分化を確認し (図 2-1), HuR と破骨細胞分化に関するタンパクの局在を免疫染色で検討した. その結果, RANKL 未処理の RAW264.7 細胞では HuR が主に核に局在したのに対して, RANKL 処理群では, カルシトニン受容体陽性の多くの破骨細胞の細胞質に HuR が局在した. それに対して RANKL 未処理の細胞では HuR は核内に局在した (図 2-2, 2-3). これらの結果より, 分化した破骨細胞において HuR は細胞質に局在することが明らかになった.

(1)



(2)



(3)

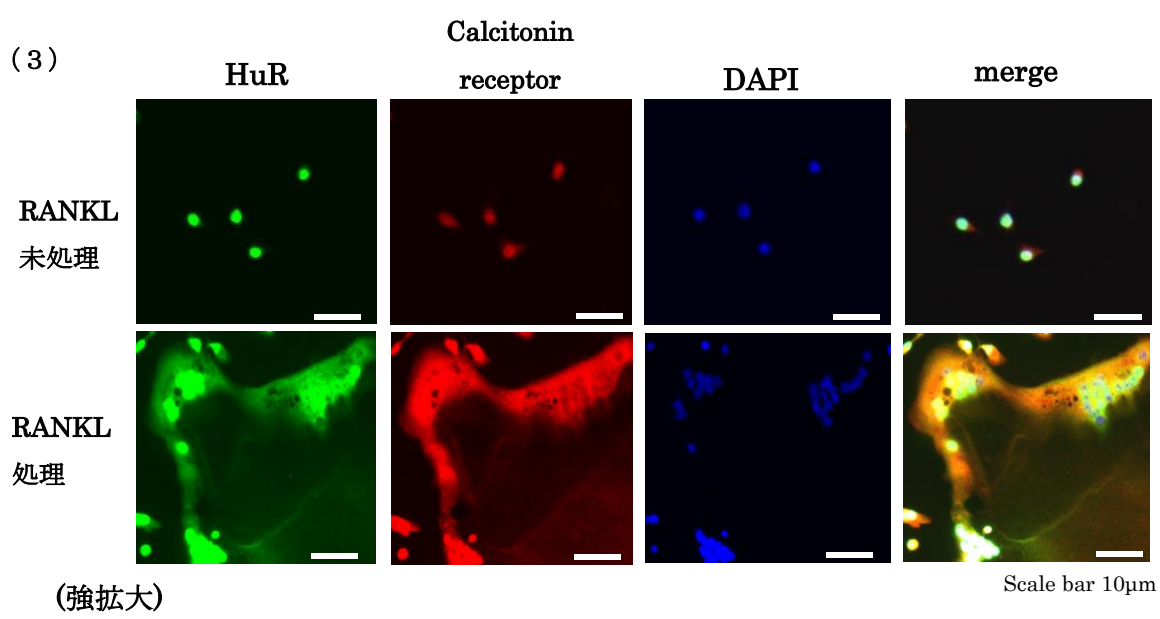


図 2 RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化と HuR 局在

(1) RAW264.7 細胞を RANKL で処理後, TRAP 染色を行い, 破骨細胞を確認した. スケールバーは 200 μ m を示す.

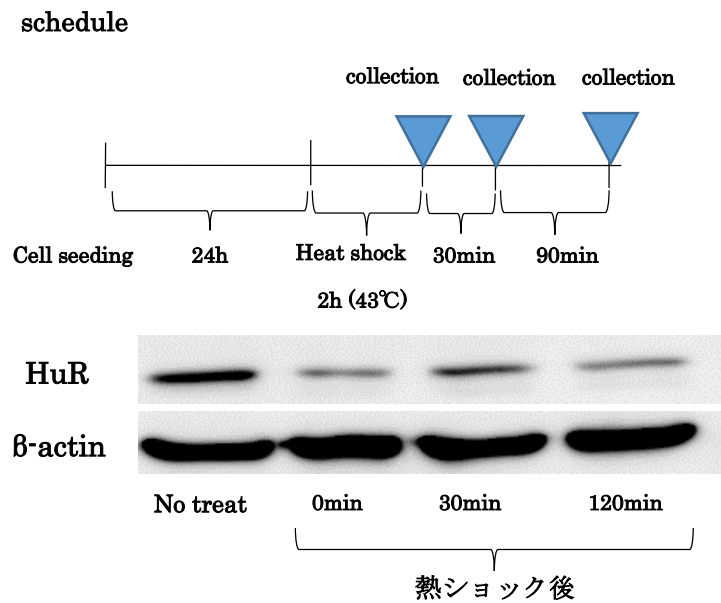
(2) RAW264.7 細胞を RANKL 処理後, HuR と Calcitonin receptor の免疫細胞染色を行った. DAPI は核の染色を示す. スケールバーは 30 μ m を示す.

(3) 図 2-2 の強拡大図. スケールバーは 10 μ m を示す.

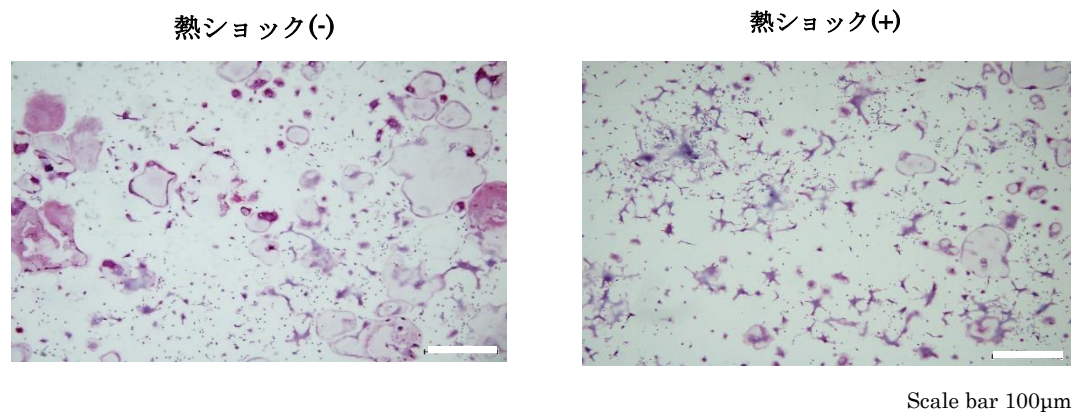
2. HuR 阻害後の破骨細胞の分化

次に, 破骨細胞の分化に対する HuR の役割を検討するために, RAW264.7 細胞に熱ショックを加え, HuR の分解を促進してから RANKL の刺激により破骨細胞に分化するか検討した. RAW264.7 細胞の HuR 量は熱ショック後 120 分まで減少することをウエスタン法で確認できた (図 3-1). 同様の細胞を用いて, TRAP 染色で破骨細胞への分化を検討した. その結果, 熱ショックを加えることにより分化した破骨細胞の形態が変化し (図 3-2, 破骨細胞の数も明らかに減少した (図 3-3)). この結果は, HuR 量を減少させることにより RAW264.7 細胞が破骨細胞へ分化することが阻害されることを示唆している.

(1)



(2)



(3)

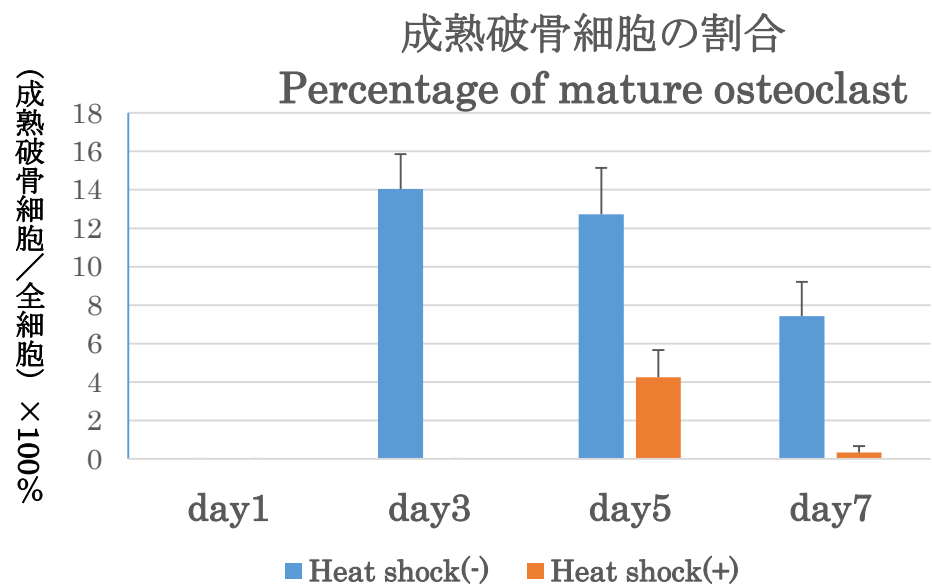
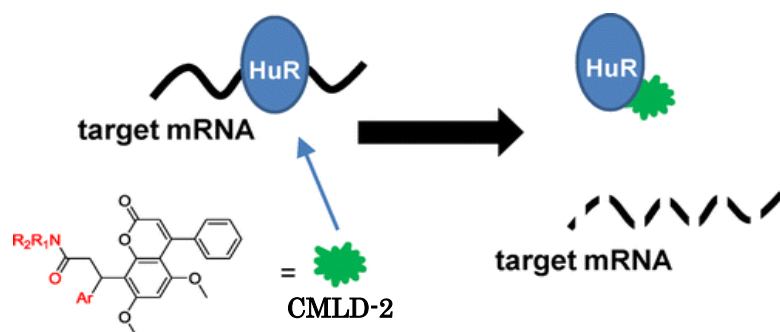


図 3 熱ショック後の破骨細胞分化と HuR 発現

- (1) RAW264.7 細胞に熱ショックを与え, HuR の発現を Western blotting で検討した. RAW264.7 細胞を 43°C, 2 時間で熱ショックを行い, 直後, 30 分後, 2 時間後に細胞を回収して, Western blotting で検討した.
- (2) 熱ショック後に RAW 細胞を RANKL で処理し, 破骨細胞への分化を TRAP 染色で検討した. スケールバーは 100 μ m を示す.
- (3) (2) で分化した成熟破骨細胞の割合をグラフで示す. 3 視野で破骨細胞の数を計測し, (成熟破骨細胞/全細胞) $\times$ 100% で破骨細胞の割合を示す.

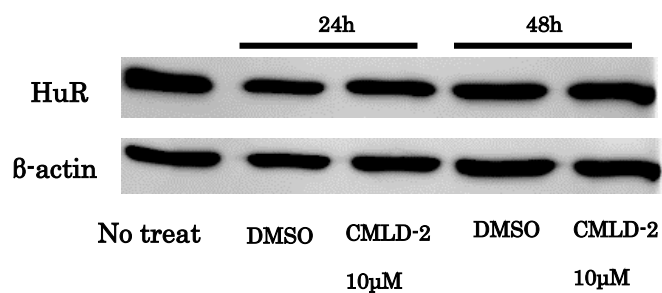
熱ショック処理は, HuR の減少以外にも細胞に多くの影響を与えるので, HuR のみを阻害すると考えられる阻害剤 (CMLD-2) を用いて破骨細胞の分化を検討した. CMLD-2 は細胞透過性化合物で, HuR と競合的に結合することで, HuR が mRNA の ARE と結合するのを阻害する^{17),18)} (図 4-1). 最初にこの薬剤で HuR 量が変わらないことを確認したところ, control 群と CMLD-2 群で差は認めなかった (図 4-2). 次に CMLD-2 処理して RAW264.7 細胞の分化を TRAP 染色で検討した. その結果, control 群では丸く大きく成熟した破骨細胞に分化したのに対し, CMLD-2 処理群では多核ではあるが破骨細胞とは明らかに異なる木の枝状の形態になった (図 4-3). さらに, CMLD-2 濃度依存的に分化した破骨細胞の数が減少した (図 4-4).

(1)

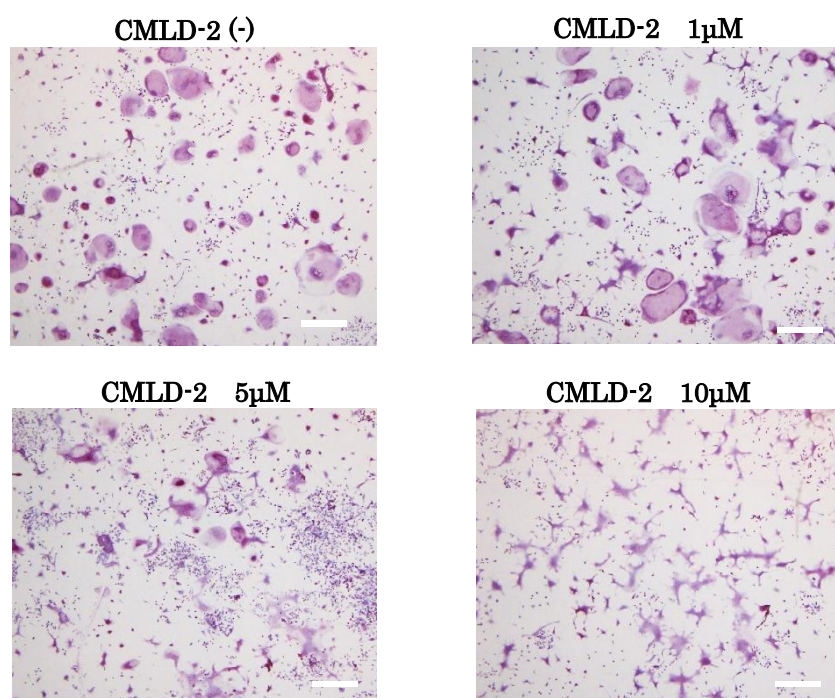


出典 : Wu X, et al. Identification and validation of novel small molecule disruptors of HuR-mRNA interaction. ACS Chem Biol. 2015;10:1476–1484. doi: 10.1021/cb500851u.

(2)



(3)



Scale bar 200μm

(4)

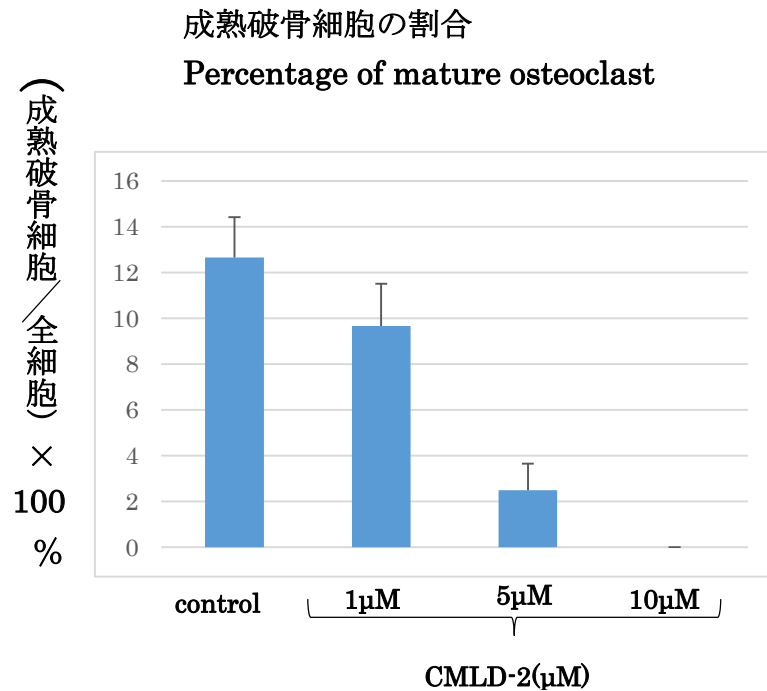


図 4 CMLD-2 による破骨細胞分化と HuR 発現

- (1) CMLD-2 の化学構造を示す. CMLD-2 は細胞透過性化合物で, HuR と競合的に結合することで, HuR が ARE-mRNA と結合するのを阻害する.
- (2) CMLD-2 処理し, 24, 48 時間後の RAW264.7 細胞の HuR 発現量を比較した.
- (3) RAW264.7 細胞を 0, 1, 5, 10μM の CMLD-2 で処理し, 破骨細胞への分化を TRAP 染色で検討した.
- (4) (3) で検討した成熟破骨細胞への分化の割合を示す. 3 視野で破骨細胞の数を計測し, (成熟破骨細胞/全細胞)×100%で破骨細胞の割合を示す.

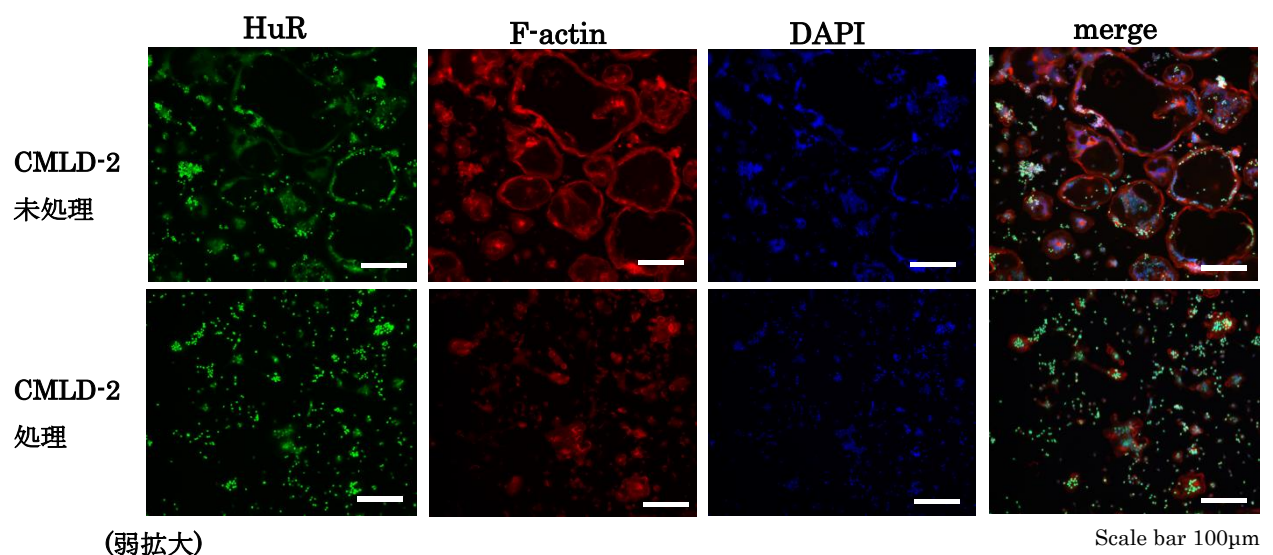
これらの結果は, HuR を阻害することにより破骨細胞への分化が阻害されることを示しており, 破骨細胞の分化に対して HuR が重要な役割を果たしていることを示している.

3. Actin ring と HuR 阻害

成熟した破骨細胞では Actin ring が形成され, 骨吸収能を果たすことが知ら

れているので^{19),20)}, HuR 阻害による Actin ring の形成を検討した. その結果, control 群では 丸くおおきな Actin ring が形成され,核が細胞辺縁に局在しているのに対し,CMLD-2 処理群では、Actin ring の形成は認めず,いびつな形態で核が細胞中央に集まっていた (図 5-1). この結果は, HuR が Actin ring の形成にも関与することを示している.

(1)



(2)

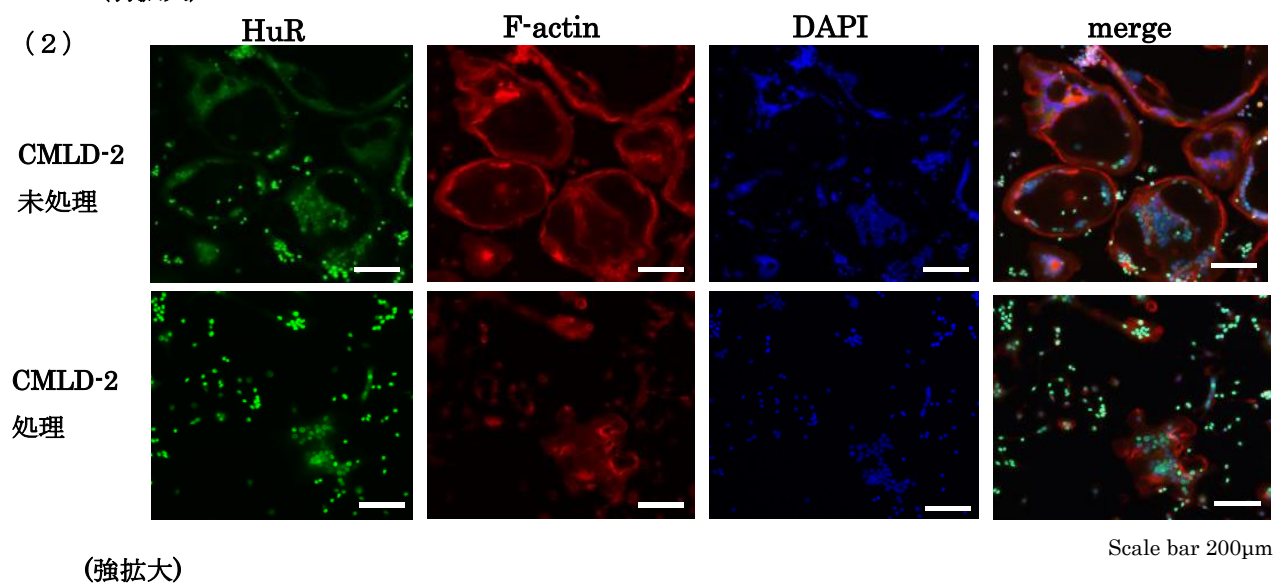


図 5 破骨細胞に形成される Actin ring と HuR 阻害

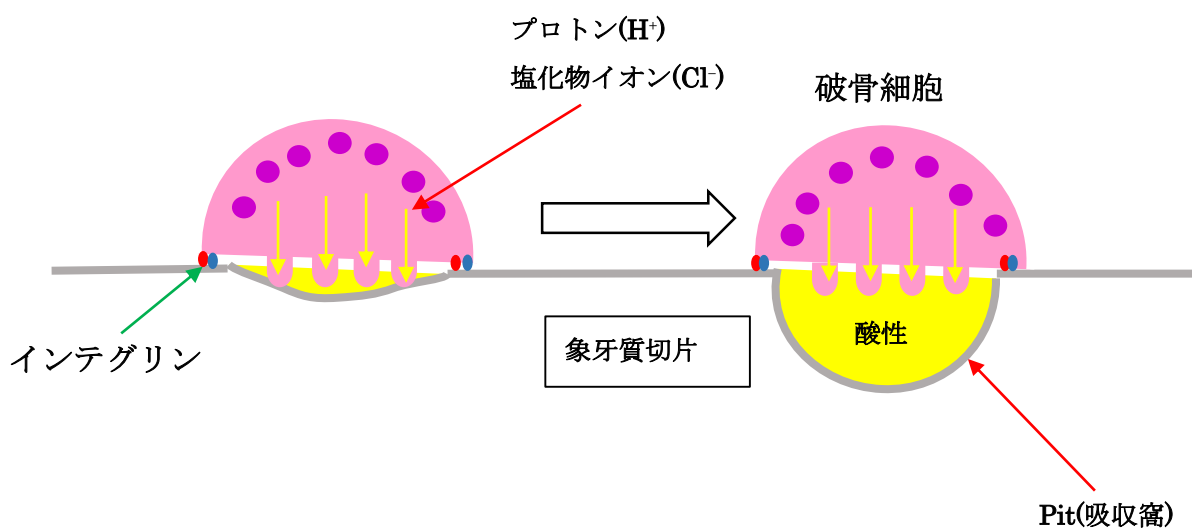
(1) RAW264.7 細胞を RANKL 処理後, CMLD-2 で処理し, HuR と F-actin を染色した。DAPI は核の染色を示す。スケールバーは 100 μ m を示す。

(2) (1) の強拡大図。スケールバーは 200 μ m を示す。

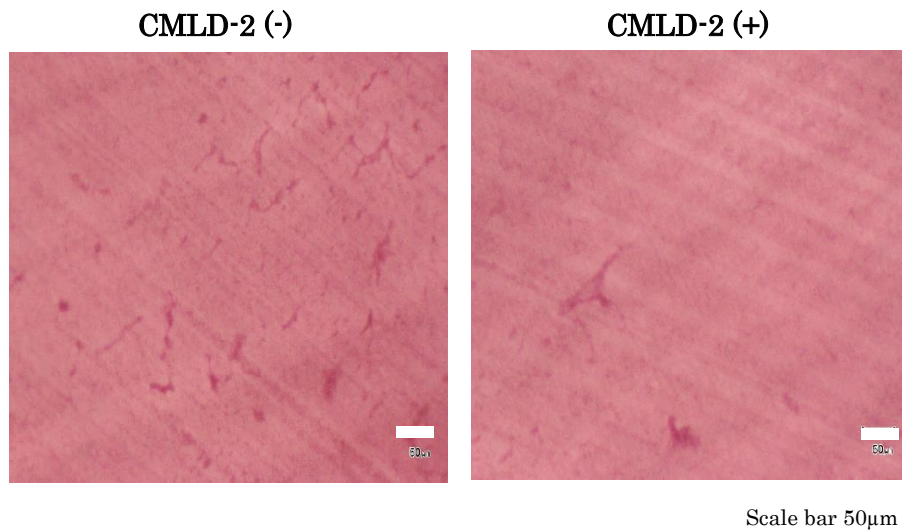
4. 骨吸収能と HuR との関連

HuR が破骨細胞の骨吸収能に関わっているか検討するため, デンチンスライスをを用いて Pit formation assay を行い, 破骨細胞の骨吸収能を検討した。Pit formation assay の模式図を図 6-1 に示す。CMLD-2 により, HuR を阻害すると, Pit (吸収窩) の数が著しく減少した (図 6-2, 6-3)。この結果は, HuR 阻害により破骨細胞の骨吸収能が低下することを示しており, HuR は破骨細胞の機能にも関与することを示唆している。

(1)



(2)



(3)

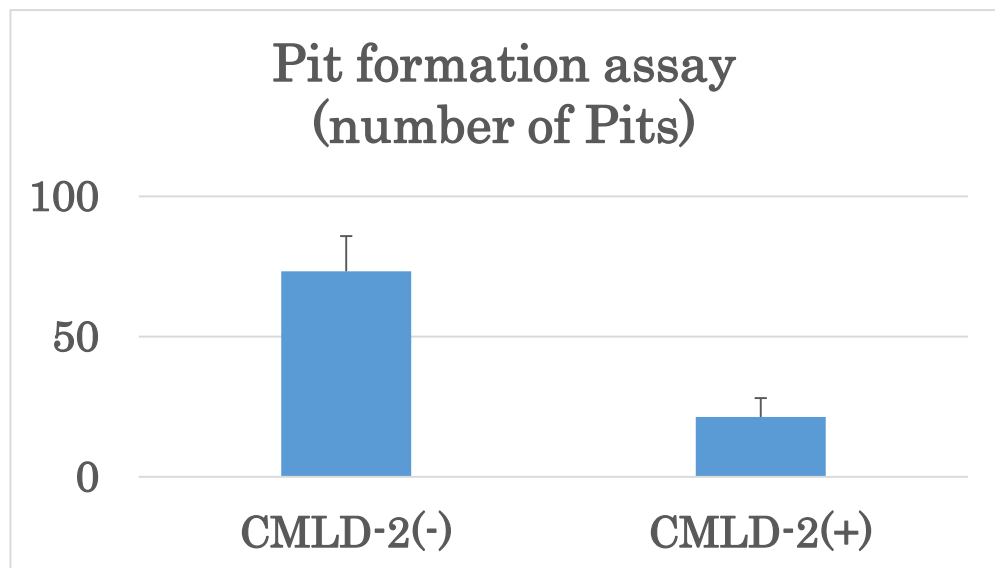


図 6 Pit formation assay

(1) Pit formation assay の概要.

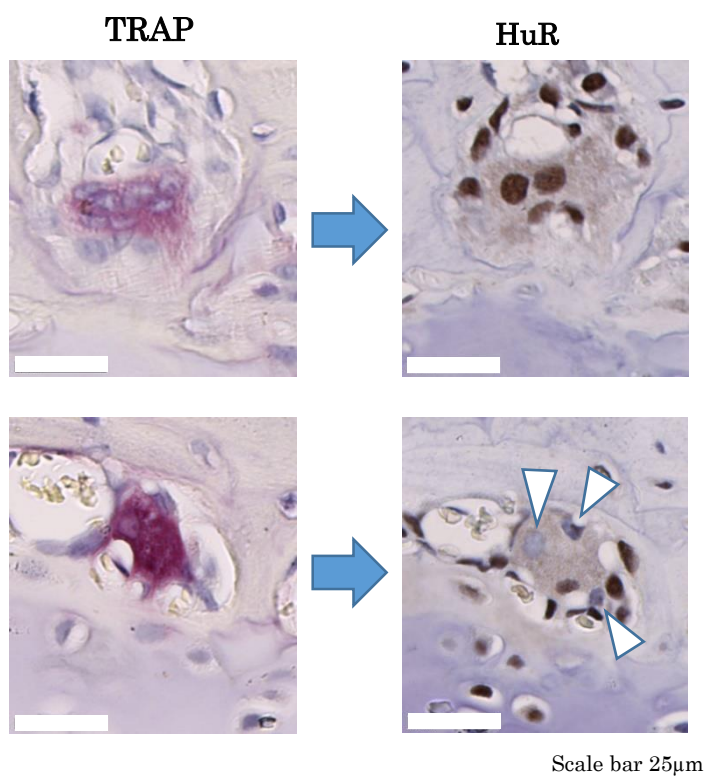
(2) および (3) CMLD-2 で HuR 阻害し, RANKL で分化誘導した破骨細胞を処理して染色後, デンチンスライス上の pit 数を計測することにより骨吸収能を検討した. (2) のスケールバーは 50μm を示す.

5. 破骨細胞のアポトーシスと HuR

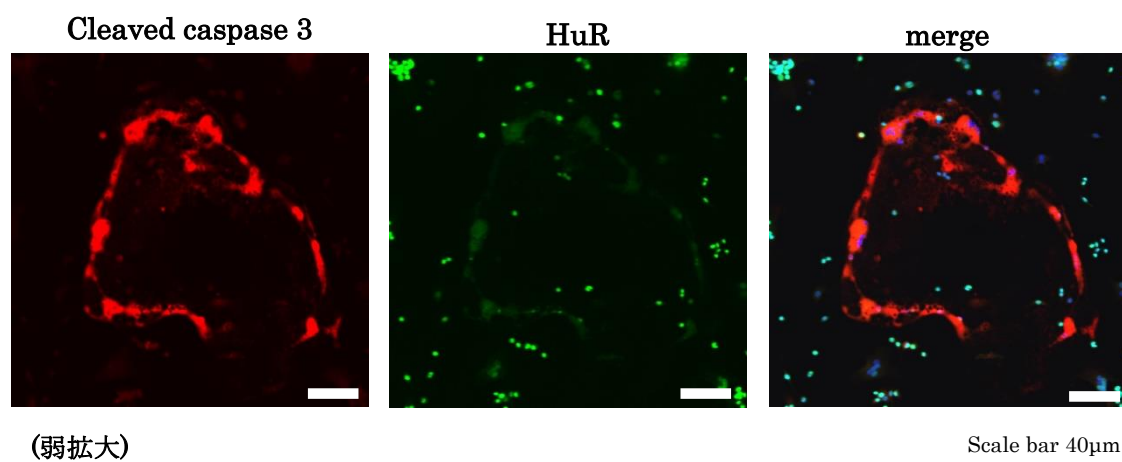
ラット組織中の破骨細胞では，TRAP に濃く染まっている破骨細胞はアポトーシスを起こしていると報告されている^{21),22)}．そこで，ラット脛骨の組織でアポトーシスを起こしていると思われる破骨細胞を観察した．その結果，活性の高い破骨細胞では核，細胞質ともに HuR 陽性であるのに対し，アポトーシスを起こしていると思われる破骨細胞では，核に HuR が認められないことが明らかになった (図 7-1)．

このことをさらに解析するために，RAW264.7 細胞を破骨細胞に分化させ 9 日経過した破骨細胞に局在する caspase-3 と HuR を免疫染色法で解析した．その結果，caspase-3 が細胞質に発現しアポトーシスを起こしていると認められる細胞では，核に HuR が存在しないものが多く認められ (図 7-2, 7-3) ，アポトーシスを起こしている破骨細胞では核の HuR の発現が減少することが明らかになった．

(1)



(2)



(3)

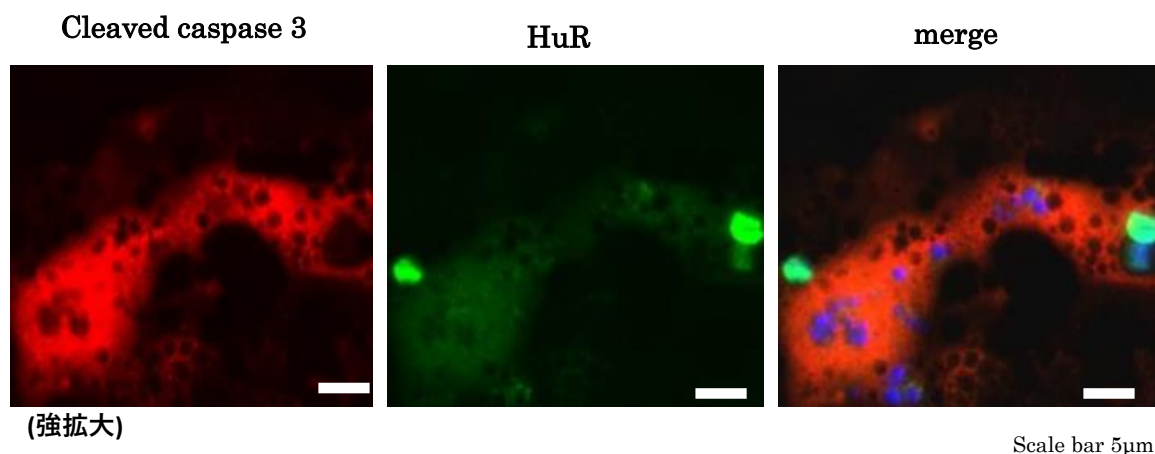


図 7 破骨細胞のアポトーシスと HuR 局在

(1) TRAP 染色で薄く染まっている破骨細胞と、濃く染まっている破骨細胞の HuR 局在。矢頭は HuR が局在しない核を示す。スケールバーは 25μm を示す。

(2) RAW264.7 細胞から破骨細胞に分化させ、9 日後の caspase-3 と HuR を免疫染色法で解析した。スケールバーは 40μm を示す。

(3) (2) の強拡大図。スケールバーは 5μm を示す。

6. 破骨細胞アポトーシスと HuR の切断

細胞が強いストレス刺激を受けると HuR が細胞質に輸送され、caspase-3 より一か所が分断され、HuR CP1 断片が生じることが報告されている^{23),24)}。そこで、アポトーシスを起こし、核で減少している HuR が caspase-3 により分解され、HuR CP1 断片が生じるか検討した。その結果、アポトーシスを起こしている破骨細胞において HuR CP1 を認めることができなかった (図 8)。従って、アポトーシスにより減少した HuR は、caspase-3 非依存的に分解されていることが予想

された.

schedule

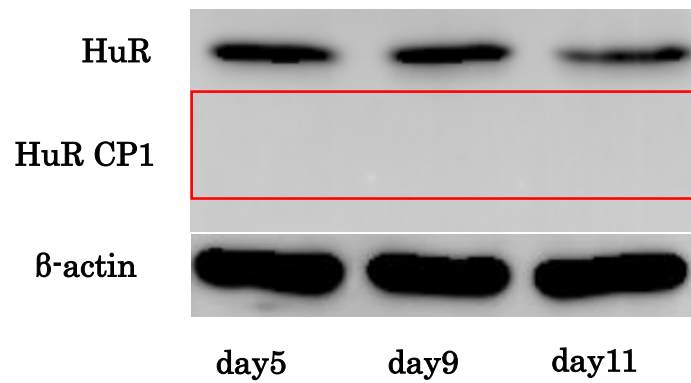
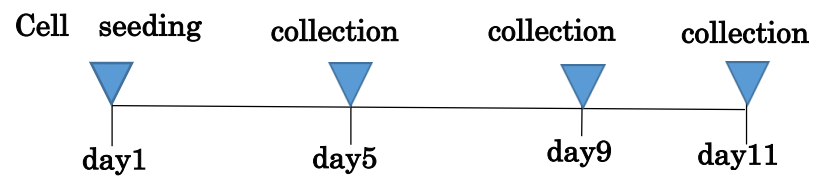


図 8 破骨細胞のアポトーシスと HuR の切断

破骨細胞に分化後 5, 9, 11 日目の HuR CP1 の発現を Western blotting で検討した. 上は細胞を集めるタイムスケジュール.

考 察

本研究では、ラットの脛骨および RAW264.7 細胞を用いた実験より、分化した破骨細胞では RNA 結合タンパク HuR が細胞質に局在することが明らかになった。HuR を阻害することにより RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化が抑制されたことから、HuR は破骨細胞の分化に必須であることが示された。また、HuR を阻害すると Actin ring の形成や骨吸収能が抑制されたことは、HuR が破骨細胞の機能にも関連があり、破骨細胞の細胞骨格形成や細胞接着に関連することを示している。さらに、アポトーシスを起こしている破骨細胞では、核の HuR の低下を認めたことから、HuR は破骨細胞の生存活性やアポトーシスにも関連すると考えられる。これらの結果から、HuR は破骨細胞の分化・機能に重要であるだけでなく、破骨細胞の分化の始まりから終わりまで HuR が関与することが示唆された (図 9)。

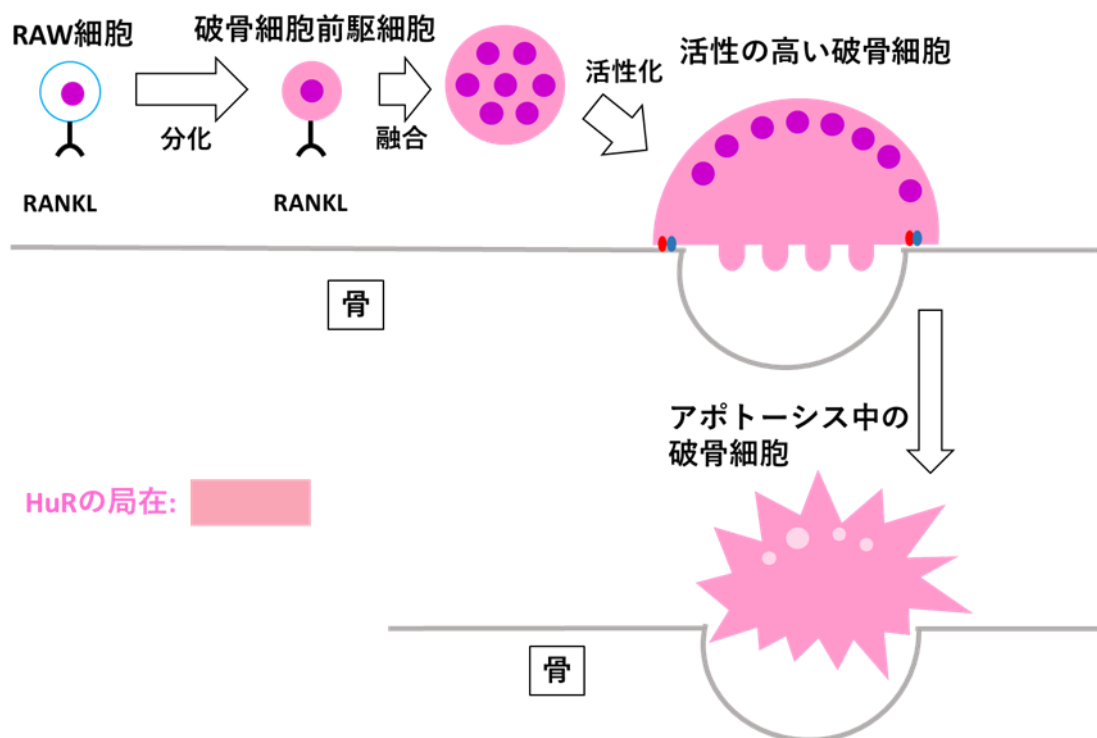


図9 破骨細胞の一生と HuR 局在

分化した破骨細胞では細胞質に HuR 局在が認められたが、分化した破骨細胞は多様な形態を示した. HuR を阻害せずに分化した破骨細胞は、TRAP 染色で赤く染色され、丸みを帯び、複数の核を辺縁に持つ形態を示したのに対し、HuR を阻害した場合は、TRAP 染色で赤く染色され、多核ではあるが、いびつな木の枝状の形態を示すものが増えた. このことは、HuR が破骨細胞の形態維持や細胞極性の維持にも関与し、その分化を促進していることを示唆している.

また、分化させた破骨細胞では Actin ring の形成を多く認めたのに対し、HuR

阻害により Actin ring の形成が抑制されていた. Actin をコードする mRNA には ARE が存在することが以前から知られている²⁵⁾. 従って, 細胞を CMLD-2 で処理すると, たとえ RANKL で刺激しても, HuR が Actin mRNA の ARE に結合できないため, Actin ARE-mRNA が細胞質に輸送・安定化されないことが予想される. それが理由で, 翻訳される Actin タンパクの量も減少し, Actin ring の形成が阻害されている可能性が考えられる.

HuR を阻害すると破骨細胞の pit formation が抑制された.これらのことから, HuR が成熟した骨吸収能 (活性) の高い破骨細胞への分化にも関与することが想定される. しかしながら, HuR が分化のみに関わっていた場合も, 最終的には成熟した破骨細胞の形成は阻害され, pit の形成力も低下するはずである. 従って, 現時点では HuR が分化のみに関わるのか, もしくは分化と機能の両方に関わるのかといった点に関しては不明である. 今後, 破骨細胞の分化や機能に必要なタンパクの ARE-mRNA と HuR との結合を解析するなどして, 破骨細胞の分化に関わる分子機構を解明する必要があると思われる.

破骨細胞の骨吸収には,破骨細胞が明帯で骨基質に接着し,その内側に波状縁を形成する必要がある. 細胞内で産生されたプロトン(H^+)や塩素イオン(Cl^-)は波状縁の細胞膜に存在するプロトン ATPase, ClC7 により吸収窩内に輸送され,この酸性環境内でヒドロキシアパタイトは溶解される. 明帯は骨基質との接着に

関与する領域であり、波上縁が面している骨吸収面を周囲から遮断して、吸収面での酸や酵素の作用を効率的にするための骨吸収環境を維持していると考えられる¹⁾。破骨細胞をファロイジン染色した際の Actin ring は破骨細胞の骨吸収環境を維持している明帯相当部位を染色していることから²⁶⁾,HuR 阻害による Actin ring の形成抑制から,HuR が明帯における骨基質への接着に関連していることが考えられる^{27),28),29)}。

アポトーシスを起こしている破骨細胞では,ラットの組織でも、分化させた RAW264.7 細胞でも、ともに核の HuR 量の減少を認めた。通常、細胞内では加齢とともに HuR の量が減少することが知られていることから³⁰⁾、核 HuR の減少と老化もしくはアポトーシスの関連が考えられる。HuR は強いストレス刺激を受けると細胞質に輸送され、細胞質のカスパーゼ刺激によって HuR と HuR CP1 に分解されることが報告されている^{23),24)}。このことから、アポトーシスを起こしている破骨細胞でも、HuR から切断された、HuR CP1 を認めるか検討した。その結果、アポトーシス中の破骨細胞では、HuR の切断による HuR CP1 断片の出現を認めなかった (図 8)。従って、アポトーシス時の HuR の減少は、カスパーゼ非依存的であることが予想される。

今後は、破骨細胞の分化に関係する ARE-mRNA を検索するため、RIP-assay などにより HuR と結合する ARE-mRNA の網羅的検索や、分化の過程において HuR

に結合する ARE-mRNA の時間経過を考慮した解析などにより、破骨細胞の分化に関わる分子機構を解明する必要があると思われる。さらに、それらの分子機構を応用して、破骨細胞に関わる疾患の治療に寄与する必要がある。

結 論

本研究により, ARE-mRNA の核外輸送及び安定化に必須な HuR が破骨細胞の分化や機能に重要な役割を果たすことが明らかになり, さらに, 破骨細胞の分化の始まりから細胞死まで, HuR が何らかの関わりを持つことが解明された.

謝

辞

本研究に多大なるご支援とご協力をいただきました北海道大学大学院歯学研究院 口腔病態学講座血管生物分子病理学教室 樋田京子教授，東野史裕准教授，松田彩特任助教，間石奈湖助教，北海道口腔病理診断所 所長 北村哲也先生（前・血管生物分子病理学教室特任講師）ならびに血管生物分子病理学教室 教室員各位，口腔病態学講座口腔顎顔面外科教室 鄭漢忠教授ならびに教室員各位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. Teitelbaum SL. Osteoclasts: What do they do and how do they do it? *Am J Pathol.* 2007;170:427–35.
3. 高橋直之 : 概論破骨細胞. 日本骨代謝学会編, 骨ペディア—骨疾患・骨代謝キーワード事典, 120-121, 羊土社, 東京, 2015.
4. Jimi E, Nakamura I, Amano H, Taguchi Y, Tsurukai T, Tamura M, Suda T. Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinology.* 1996;137:2187–2190.
5. Chen CY, Shyu AB : AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20 : 465-470, 1995.
6. Jacobson A, Peltz SW : Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 65 : 693-739, 1996.
7. Brennan CM, Steitz JA : HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58 : 266-277, 2001.
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. Hinman MN, Lou H : Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci* 65 : 3168-3181, 2008.
10. Wang J., Guo Y., Chu H., Guan Y., Bi J., Wang B. Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:10015–10041.
11. van der Giessen K, Gallouzi IE. Involvement of transportin 2-mediated HuR import in muscle cell differentiation. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 2619-29;
12. Lopez de Silanes I, Lal A, Gorospe M. HuR: post-transcriptional paths to malignancy. *RNA Biol* 2005; 2: 11-13.
13. Aoyagi M, Higashino F, Yasuda M, Takahashi A, Sawada Y, Totsuka Y, Kohgo T, Sano H, Kobayashi M, Shindoh M. Nuclear export of adenovirus E4orf6 protein is necessary for its ability to antagonize apoptotic activity of BH3-only proteins. *Oncogene*. 2003 Oct 9;22(44):6919-27.
14. Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, Lal A, Kim HH, Kuwano Y, Galban S, Becker KG, Kamara D, de Cabo R, Gorospe M. Ubiquitin-mediated proteolysis of HuR by heat shock. *EMBO J.* 2009 May 6;28(9):1271-82. doi: 10.1038/emboj.2009.67. Epub 2009 Mar 26.

15. S. Uehara, N. Udagawa, H. Mukai, A. Ishihara, K. Maeda, T. Yamashita, K. Murakami, M. Nishita, T. Nakamura, S. Kato, Y. Minami, N. Takahashi, Y. Kobayashi :Protein kinase N3 promotes bone resorption by osteoclasts in response to Wnt5a-Ror2 signaling. *Sci Signal*, 10 (2017)
16. Vesprey A, Yang W. 2016. Pit assay to measure the boneresorptive activity of bone marrow - derived osteoclasts. *BioProtoc* 6:6.
17. Lorenzo Allegri, Federica Baldan, Sudeshna Roy, Jeffrey Aubé, Diego Russo, Sebastiano Filetti, Giuseppe Damante, The HuR CMLD-2 inhibitor exhibits antitumor effects via MAD2 downregulation in thyroid cancer cells *Sci Rep*. 2019; 9: 7374. Published online 2019 May 14.
18. Xiaoqing Wu, Lan Lan, David Michael Wilson, Rebecca T. Marquez, Wei-chung Tsao, Philip Gao, Anuradha Roy, Benjamin Andrew Turner, Peter McDonald, Jon A Tunge, Steven A Rogers, Dan A. Dixon, Jeffrey Aubé, Liang Xu, Identification and Validation of Novel Small Molecule Disruptors of HuR-mRNA Interaction *ACS Chem Biol*. Author manuscript; available in PMC 2016 Jun 19. Published in final edited form as: *ACS Chem Biol*. 2015 Jun 19; 10(6): 1476–1484. Published online 2015 Mar 17.
19. Garbe A.I., Roscher A., Schuler C., Lutter A.H., Glosmann M., Bernhardt R., Chopin

- M., Hempel U., Hofbauer L.C., Rammelt S., Egerbacher M., Erben R.G., Jessberger R. Regulation of bone mass and osteoclast function depend on the F-actin modulator SWAP-70. *J. Bone Miner. Res.* 2012;27:2085–2096.
20. Suzuki H., Nakamura I., Takahashi N., et al. Calcitonin-induced changes in the cytoskeleton are mediated by a signal pathway associated with protein kinase A in osteoclasts. *Endocrinology*. 1996;137(11):4685–4690.
21. Takanori Domon T(1), Taniguchi Y, Inoue K, Ushijima N, Taishi Y, Hiramatsu A, Wakita M, Yoshida .Apoptosis of odontoclasts under physiological root resorption of human deciduous teeth. *Cell Tissue Res.* 2008 Feb;331(2):423-33. Epub 2007 Nov 13.
22. Boyce BF, Wright K, Reddy SV, Koop BA, Story B, Devlin R, Leach RJ, Roodman GD, Windle JJ (1995) Targeting simian virus 40 T antigen to the osteoclast in transgenic mice causes osteoclast tumors and transformation and apoptosis of osteoclasts. *Endocrinology* 136:5751–5759
23. Imamachi K, Higashino F, Kitamura T, Kakuguchi W, Yanagawa-Matsuda A, Ishikawa M, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M. pp32r1 controls the decay of the RNA-binding protein HuR. *Oncol Rep.* 2014 Mar;31(3):1103-8. doi: 10.3892/or.2013.2956. Epub 2013 Dec 31.

24. Mazroui R, Di Marco S, Clair E, von Roretz C, Tenenbaum SA, Keene JD et al. (2008). Caspase-mediated cleavage of HuR in the cytoplasm contributes to pp32/PHAP-I regulation of apoptosis. *J Cell Biol* 180: 113-127.
25. Henics T, Nagy E, Szekeres-Barthó J. Interaction of AU-rich sequence binding proteins with actin: possible involvement of the actin cytoskeleton in lymphokine mRNA turnover. *J Cell Physiol.* 1997 Oct;173(1):19-27.
26. Mishra M., Huang J. and Balasubramanian M. K. (2014). The yeast actin cytoskeleton. 38, 213-227. 10.1111/1574-6976.12064
27. Habiba U, Kuroshima T, Yanagawa-Matsuda A, Kitamura T, Chowdhury A, Jehung JP, Hossain E, Sano H, Kitagawa Y, Shindoh M, Higashino F. HuR translocation to the cytoplasm of cancer cells in actin-independent manner. *Exp Cell Res.* 2018 Aug 15;369(2):218-225. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.05.021. Epub 2018 May 26.
28. Matsubara T, Kinbara M, Maeda T, Yoshizawa M, Kokabu S, Takano Yamamoto T. Regulation of osteoclast differentiation and actin ring formation by the cytolinker protein plectin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Aug 5;489(4):472-476. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.174. Epub 2017 May 30.
29. Doller A, Schulz S, Pfeilschifter J, Eberhardt W. RNA-dependent association with myosin IIA promotes F-actin-guided trafficking of the ELAV-like protein HuR to

polysomes. *Nucleic Acids Res.* 2013 Oct;41(19):9152-67.

30. W. Wang, X. Yang, V. Cristofalo, N. Holbrook, M. Gorospe :Loss of HuR is linked to reduced expression of proliferative genes during replicative senescence *Mol. Cell. Biol.*, 21 (2001), pp. 5889-5898