

審査の結果の要旨

氏名 小俣 康德

本研究は次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析手法によって、RANKL 誘導性破骨細胞分化の制御機構における TGF- β の作用機序を解き明かすものであり、下記の結果を得ている。

1. TGF- β が RANKL 誘導性破骨細胞分化に対して促進的に作用することを TRAP 染色を行い、確認した。Smad2/3 に対する ChIPseq の解析の結果、Smad2/3 はプロモーター領域に多く結合していた。またヒストン修飾が遺伝子発現調節に関わるという過去の報告に着目し、Smad 標的遺伝子群のヒストン修飾の変化を調べた。TGF- β によって発現が上昇した Smad 標的遺伝子群は H3K27me3 のシグナル量が低く、ヒストン修飾の変化から転写が促進される方向に作用していることを示した。さらに Gene ontology 解析からも Smad 標的遺伝子は転写を制御する遺伝子が多いことを明らかにした。
2. 本研究では TGF- β だけでは破骨細胞分化が起こらない点に着目し、RANKL 刺激後に Smad と協調する分子の存在を明らかにすることを試みた。Smad2/3 の結合モチーフ解析によって AP-1 分子が候補分子として挙げられ、破骨細胞分化に必須な因子である c-Fos と Smad の関係を詳細に調べた。核内タンパクの発現解析により、TGF- β と RANKL の刺激によって核内 c-Fos、Smad の発現が上昇し、TGF- β 受容体阻害剤である SB431542 を用いた共刺激ではそれらの発現が減弱したことを示した。また免疫沈降法によっても c-Fos と Smad の直接的な結合を確認している。
3. 上記の結果を踏まえて、さらに RANKL 刺激後の状態における Smad と c-Fos の ChIPseq を行い、genomic な相互作用について解析を進めた。その結果、ゲノム上で Smad と c-Fos の共局在する領域が存在することがわかり、さらに 2 分子が存在する領域においては FAIREseq のシグナル量が高いことがわかった。全ゲノム解析によって Smad と c-Fos が FAIREseq のシグナルピークを中心として共局在することが示された。

4. 破骨細胞分化は *NfatC1* 遺伝子の発現によって促進することから、*NfatC1* 遺伝子におけるエピジェネティックな修飾変化を解析した。RANKL 刺激後の FAIREseq のシグナル量は TGF- β 刺激で増加した。Smad シグナル阻害下では、*NfatC1* 遺伝子への c-Fos の結合シグナル量が減少した。また逆に c-Fos 作用を欠失した状態における Smad のゲノム上への応答性を調べた。その結果、c-Fos ノックアウト細胞では RANKL と TGF- β 刺激を加えても Smad の結合が減少した状態のままであることを示した。これらの結果から、Smad と c-Fos は *NfatC1* 遺伝子上への結合制御を相互に行っていることが示唆された。

以上、本研究は、RANKL 誘導性破骨細胞分化において TGF- β 下流の Smad2/3 シグナルが必須であることを示し、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析によって、c-Fos と Smad の相互作用が分化を制御していることを示した。本研究は、最先端の研究手法によって破骨細胞の分化に関わるシグナルネットワーク群の一端を解明するものであり、学位の授与に値するものと考えられる。