

論文の内容の要旨

論文題目 Novel functions of IFN- β and Stat1 in the regulation of bone homeostasis

和訳 IFN- β 及び Stat1 の骨恒常性における新規機能の解析
指導教官 谷口維紹教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月 入学

医学博士課程

病因病理学専攻

氏名 金宣和

本研究では、免疫応答に重要な役割を果たすインターフェロン (IFN) - β 及び転写因子 Stat (signal transducer and activator of transcription) 1 が骨代謝の制御に関与するという新たな機能を明らかにした。

骨恒常性は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスによって維持されている。骨芽細胞及び破骨細胞の機能の異常はさまざまな骨疾患の原因になることから、その制御機構を明らかにすることは疾患の発症機序や治療法の開発という視点からも極めて重要である。BMP (bone morphogenetic protein) -2 を含む様々なサイトカインのシグナルにより誘導される骨芽細胞の分化機構は良く研究されており、骨芽細胞分化の必須転写因子 Runx2 の機能はヒトの鎖骨頭蓋異形成症候群や Runx2 欠損マウスの解析などにより明らかになっている。破骨細胞分化は M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) 及び破骨細胞分化因子 RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) からのシグナルにより誘導され、一方ではデコイ受容体 OPG (osteoprotegerin) が RANKL の受容体 RANK を競合阻害することで抑制されることが良く知られている。これらの骨芽細胞及び破骨細胞の分化と活性化は骨代謝の恒常性維持のために厳密に制御される必要があり、上記のシグナル分子や転写因子の作用については複雑な調節機構が働いているものと考えられる。

(1) IFN- β による破骨細胞の分化の制御。

私はまず、破骨細胞分化の機構を明らかにすることを目的として RANKL 標的遺伝子を gene chip を用いて網羅的に解析した。その結果、破骨細胞から RANKL シグナルにより様々な I 型 IFN (IFN - α/β) 誘導遺伝子が誘導されることが見いだされた。さらに、*IFN- β* mRNA が RANKL シグナルにより誘導されることも明らかにした。自然免疫系における I 型 IFN の機能は大変良く研究されているが、I 型 IFN 系が RANKL シグナルによる破骨細胞の分化系にどうかかわっているのかは全く未知であった。そこで、私は I 型 IFN シグナルを欠損したマウスの骨組織を検討した。そして、I 型 IFN 受容体 (IFNAR1) 欠損マウスおよび IFN- β 欠損マウスが、過剰な破骨細胞形成の結果、骨粗鬆症様の病態、すなわち骨減少症 (osteopenia)を呈することから、I 型 IFN 系が破骨細胞の分化の負の制御系を担っていることが明らかになった。IFNAR1 欠損マウスの破骨細胞前駆細胞では、可溶性 RANKL による破骨細胞形成が亢進しており、RANKL 刺激により前駆細胞自身が産生する IFN- β の破骨細胞分化制御における重要性が明らかになった。さらに、IFN- β による RANKL シグナルの抑制機構の解析を行い、IFN- β は下流で活性化される転写因子複合体 ISGF 3 (IFN stimulated gene factor 3) 依存的に RANKL シグナルの必須転写因子である c-Fos の発現をタンパク質レベルで低下させることを明らかにした。レトロウイルスを用いた c-Fos 過剰発現により、IFN- β の抑制作用が解除されたことから、IFN- β シグナルの標的が c-Fos であることが示された。また、IFN- β による c-Fos 抑制作用の一部が PKR (double strand RNA-dependent protein kinase) を介して行われていることも明らかになった。さらに、IFN- β プロモータに c-Fos が直接結合すること、RANKL による IFN- β 誘導が Fos 欠損マウスでは認められないこと及び IFN- β プロモータの RANKL 及び c-Fos による活性化が IFN- β プロモータの c-Fos 結合部位に変異を入れることで消失することから、RANKL による IFN- β の誘導には c-Fos 自身が必須であることが判明した。即ち、RANKL シグナルが c-Fos を介し自らの抑制因子である IFN- β を誘導する、いわゆる「自己制御」と呼べるフィードバック制御機構が働いていることが明らかになった。IFN- β 投与は LPS (lipopolysaccharide) による炎症性骨破壊モデルの過剰破骨細胞形成と骨量減少を抑制し、IFN- β が個体レベルでの骨量維持を調節できることが示された。

以上より、ウイルス感染時に誘導される生体防御因子である IFN- β に、破骨細胞分化の抑制因子として生理的な骨代謝維持に必須のサイトカインであるという新たな側面が明らかになり、治療への応用の可能性も示唆された。

(2) Stat1 による骨代謝の制御。

IFN- β による破骨細胞分化の抑制に必須であった転写因子複合体 ISGF3 を構成する Stat1 及び IRF-9 の骨代謝における意義を明らかにするため、私は Stat1 及び IRF-9 欠損マウスの骨組織の解析を行った。免疫系における Stat1 及び IRF-9 の機能は IFN 系のシグナル伝達に必須の転写因子としてよく研究されてきた。すなわち、I 型 IFN が受容体に結合すると、Jak1 および Tyk2 が活性化し、リン酸化された Stat1 及び IRF-9 が Stat2 とともに転写因子 ISGF3 複合体を形成し ISRE (IFN signal response element) と呼ばれる転写調節配列に結合して標的遺伝子を誘導する。一方、II 型 IFN (IFN- γ)が受容体に結合すると、Jak1, Jak2 が活性化し、リン酸化した Stat1 は二量体 GAF (IFN- γ activated factor) を形成し、GAS 配列に結合して標的遺伝子を誘導する。私は、IRF-9 の欠損マウスは IFN- β 及び IFNAR1 欠損マウスと同様の過剰な破骨細胞形成による骨減少症を呈することを明らかにした。しかしながら、興味深いことに Stat1 欠損マウスでは破骨細胞の形成や活性の増加が見えながらも、骨芽細胞の機能がさらに亢進したため、骨量が著しく増加していた。さらに、*in vitro* 培養系において、Stat1 欠損細胞における骨芽細胞への分化マーカーの発現の増加が見られ、Stat1 欠損マウスの骨量増加が骨芽細胞の分化の亢進によるものであることが明らかになった。また、レトロウイルスを用いた Stat1 過剰発現により骨芽細胞分化が抑制されたことより、Stat1 が骨芽細胞分化の負の制御にかかわっていることが判明した。骨芽細胞の分化を誘導するシグナルの解析により Stat1 欠損細胞は BMP-2 による反応性が高まっていること、その下流の骨芽細胞分化の必須転写因子である Runx2 の DNA 結合能が著しく増加していることが明らかになった。さらに、Stat1 と Runx2 が骨芽細胞内で結合することを明らかにし、様々な Stat1 及び Runx2 の変異体を作成、相互結合に必須な領域を同定した。Stat1 は DNA binding domain や linker domain を介して Runx2 の runt domain 及び PST domain の領域に結合していることが明らかになった。Stat1 及び Runx2 のレトロウイルスを用い

た過剰発現の実験により、主に核に局在する Runx2 が Stat1 と複合体を形成することで細胞質に留まることが明らかになった。また、この機構により Runx2 による骨芽細胞の分化が抑制されることが示唆された。Stat1 の tyrosine701 のリン酸化が起きない Stat1CYF が Stat1 と同様に Runx2 と複合体を形成し、Runx2 の機能を抑制することから、Runx2 を介し骨芽細胞の分化を調節する Stat1 の機能にはリン酸化が関係ないことが判明した。本研究により Stat1 による新たな骨芽細胞分化調節機構が明らかになった。すなわち Stat1 転写因子は細胞質内で Runx2 の核内移行を負に調節する“attenuator”として作用することが判明した。

私は博士課程の一連の研究により、IFN- β 及び Stat1 の骨代謝調節における新たな機能とその作用機構を明らかにした。この研究の結果は、生理的な骨代謝制御機構の解明において重要な意義をもつだけでなく、骨疾患の治療という臨床的な応用も期待される。