

## I. 背景

概日リズムは生物に備わっている約 24 時間周期で変動する生理現象で、1 日の明暗サイクルと密接に関係している。自律神経活動や血中ホルモン分泌に概日リズムが存在することは広く知られており、骨代謝にも概日リズムが存在することが示されている。しかし、骨代謝における概日リズムの分子機構は未だ十分に解明されていない。

生体概日リズムは *circadian locomotor output cycles kaput* (CLOCK)、*brain and muscle Arnt-like protein 1* (BMAL1)、*period* (PER) などの時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群によって形成された分子機構によって形成されると考えられている。BMAL1 タンパクは CLOCK タンパクと複合体を形成し、その他の時計遺伝子 (PER1、PER2) のプロモーター上にそれぞれ存在する E-box (CACGTG) 配列と結合し、概日リズムを調節することが知られている。

生体における概日リズムは中枢の視交叉上核 (SCN) に存在し、主に眼球から入ってくる光刺激によって制御されると考えられている。SCN での中枢の時間情報は交感神経活動やホルモン分泌を介して末梢組織に伝達され、その結果末梢組織の時計遺伝子に概日リズムが形成されると報告されている。しかし、SCN から末梢組織である破骨細胞への具体的な伝達機構については未だ解明されていない。

いくつかの研究では、末梢時計は末梢組織の概日リズムを形成するだけでなく、組織の分化の一因を担うことも報告されている。また様々な細胞において時計遺伝子の存在が確認されているが、破骨細胞に時計遺伝子が発現するのか、また発現するならばそれに生理的意義があるのかは未だ解明されていない。

今回の研究では、副腎皮質ホルモンである糖質コルチコイドが末梢破骨細胞へ概日リズムを伝達することで、末梢破骨細胞の概日リズムが調節されるのか、さらには破骨細胞の時計遺伝子 BMAL1 が E-box に結合することで、破骨細胞活動マーカーであるカテプシン K (CTSK) と分化マーカーである活性化 T 細胞核内因子 (NFATc1) 遺伝子の概日リズムが発現しそれを介して、破骨細胞概日リズムが調節される可能性があるか否かについて報告する。

## II. 実験材料および方法

### 1. 動物

4 週齢の雄性 ddY (Japan SLC Inc, Hamamatsu, Japan) を使用した。

### 2. 細胞培養

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を 50 ng/ml NF $\kappa$ B 活性化受容体リガンド (RANKL) (Pepro Tech, London, UK) と共に培養し破骨細胞に分化させた。一方骨髄細胞の初代培養では、骨髄マクロファージを 50 ng/ml マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) および 50 ng/ml RANKL で 3 日間培養し破骨細胞に分化させた。

### 3. 薬物処理

細胞は、合成糖質コルチコイドとしてのデキサメタゾン (DEX) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)、交感神経β作動薬としてのイソプレナリン (ISO) (Sigma Aldrich) と共に培養した。

### 4. Real-Time RT-PCR 解析

動物実験では、Total RNA は SCN と骨髄細胞と大腿骨 (海綿骨) から抽出した。

### 5. 副腎除去(ADX)

ペントバルビタールナトリウム (40 mg / kg 腹腔内注射) 麻酔下で、外科的に副腎除去 (ADX) を行った。

### 6. レーザーマイクロダイセクション

マウス右脛骨凍結切片をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション LMD6000 (Leica Microsystems, Tokyo, Japan) を用いて脛骨から破骨細胞を単離し回収した。

### 7. *In silico* コンピューター解析

NFATc1、CTSK と酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) のマウス遺伝子配列を NCBI 遺伝子データベースからダウンロードし、各遺伝子のプロモーター上の E-box 構成配列である CACGTG 配列を検索するため Data Base of transcriptional Start Sites (DBTSS) を用いて解析を行った。

### 8. クロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析

CTSK と NFATc1 のプロモーター上に存在する E-box と BMAL1 タンパクが結合するかどうかを調べるために、ChIP 解析を行った。解析には Active Motif (Tokyo, Japan) を使用した。

### 9. 統計的処理

統計的な有意差の検定には student's t-test を用いた。p<0.05 を統計的有意差ありと判定した。

## III. 結果

### 1. 骨組織における破骨細胞関連遺伝子と時計遺伝子の概日リズム

骨代謝関連遺伝子に概日リズムが存在するかどうか検討するため経時的にマウス大腿骨から RNA を採取した。CTSK、NFATc1、TRAP、RANKL、OPG といった破骨細胞関連遺伝子の最大発現は午後 7 時に認められた。CTSK と NFATc1 は最小値と最大値の間に有意差があり概日リズムが存在した。また、Type 1 collagen、Runx2 といった骨芽細胞関連遺伝子についても午後 7 時に最大発現を認め、さらに最小値と最大値の間に有意差があり概日リズムが存在した。

次に時計遺伝子に概日リズムが存在するかどうか検討を行った。大腿骨における PER1 と PER2 の最大発現は午後 7 時に BMAL1 は午前 7 時に認められた。PER1、PER2、BMAL1 は最小値と最大値の間に有意差があり、概日リズムが認められた。

## 2. 培養破骨細胞における各種薬剤の効果に対する PER1 発現の比較

RAW264.7 由来破骨細胞における糖質コルチコイドと交感神経シグナルの PER1 発現に対する影響を検討するために、合成糖質コルチコイドとして  $10^{-7}$ M DEX、もしくは、交感神経  $\beta$  作動薬として  $10^{-6}$ M ISO による処理を破骨細胞に行った。DEX 処理により時計遺伝子 PER1 に概日リズムが発現した。一方で、ISO 処理では PER1 発現に影響は認められなかった。

## 3. 破骨細胞における糖質コルチコイド処理後の概日リズムの経時的变化

培養破骨細胞の末梢時計遺伝子の発現に対する糖質コルチコイド処理の影響を検討するために、RAW264.7 由来破骨細胞を 2 時間  $10^{-7}$  M DEX で処理した。その結果、時計遺伝子発現の概日リズムが誘導された。さらに骨髓由来の破骨細胞を用いて同様の実験を行ったところ、DEX 処理により時計遺伝子発現に概日リズムが生じることが確認された。

次に、RAW264.7 細胞由来破骨細胞における CTSK、NFATc1 といった破骨細胞関連遺伝子の発現について検討した。CTSK、NFATc1 において DEX 処理により概日リズム様のパターンが認められた。さらに骨髓由来の破骨細胞を用いて同様の実験を行ったところ、DEX 処理により時計遺伝子である PER2 と BMAL1、破骨細胞連遺伝子である CTSK と NFATc1 の同期化が確認された。

## 4. 破骨細胞関連遺伝子の E-box 配列への BMAL1 タンパク質の結合

E-box 配列は PER の概日リズム形成に必要な配列であり、*in vivo* のデータから CTSK と NFATc1 の発現には PER1 と PER2 の発現と同様に午後 7 時に概日リズムがピークを示すことから、CTSK と NFATc1 に E-box 配列が存在するのではないかと仮説を立てた。そこで CTSK と NFATc1 のプロモーター領域に E-box が存在するか *in silico* コンピューター解析にて検索を行ったところ、CTSK は -1340 から -600 の間に、NFATc1 は -5640 から -5280 間にそれぞれ 2 つの E-box が存在した。さらに ChIP 解析によって、CTSK と NFATc1 それぞれのプロモーター上に存在する E-box が、-613/-607 と -5295/-5289 で BMAL1 タンパク質と結合することが示された。

## 5. 内因性糖質コルチコイドによる視交叉上核から骨への概日リズム情報伝達

生体内において、破骨細胞関連遺伝子の概日リズム発現が内因性糖質コルチコイドの影響か否か検討するために、マウスに ADX を行った。ADX により CTSK、NFATc1 といった破骨細胞関連遺伝子の概日リズムが消失した。TRAP においては午後 7 時に見られた最大発現が消失した。一方、PER2 の概日リズムは減弱したが、PER1 と BMAL1 の概日リズムは ADX マウスで維持されていた。さらに、レーザーマイクロダイセクションにより脛骨から単離した破骨細胞においても、PER2、CTSK の概日リズムが消失していた。

副腎は糖質コルチコイド以外にも複数のホルモンを産生し分泌している。そこで我々は ADX の効果が糖質コルチコイド消失による反応か否か検討を行うため、ADX マウスに DEX (3mg/kg) を午後 7 時に腹腔内投与した。CTSK、NFATc1 といった破骨細胞関連遺伝子の概日リズムが DEX 投与により再度形成された。また、時計遺伝子 PER1、PER2、BMAL1

においても DEX 投与により概日リズムが形成された。

#### IV. 結論

生体骨組織において、時計遺伝子、骨代謝関連遺伝子に概日リズムが存在することが明らかとなった。また、破骨細胞自身の時計遺伝子発現に概日リズムが存在しており、中枢からの時間情報の伝達に糖質コルチコイドが関与する可能性が示された。さらに、破骨細胞の時計遺伝子 BMAL1 が E-box に結合することで、破骨細胞関連遺伝子である CTSK と NFATc1 の概日リズムを制御する可能性が示された。