

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390401

研究課題名(和文) オステリクス誘導新規骨芽細胞分化促進因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of novel Osterix-inducible osteoblast differentiation accelerators.

研究代表者

前田 真吾 (MAEDA SHINGO)

財団法人癌研究会・癌研究所生化学部・研究員

研究者番号：60353463

研究成果の概要:骨を造る骨芽細胞は未分化前駆細胞において Runx2 の発現で分化が決定し、転写因子 Osterix の誘導を境に分化成熟が進む。ところがなぜ Osterix が無ければ骨芽細胞分化が進まないのかは不明な点が多く残されている。我々は Osterix と骨形成蛋白(BMP)で誘導される未知の標的遺伝子が Osterix の骨芽細胞分化における機能に重要な役割を果たしていると仮定し、マイクロアレイ技術を用いて検索した。その結果候補遺伝子として Pitx2、Hesr1、そして機能未知の膜蛋白が同定された。Pitx2 が Osterix の発現抑制を介して骨芽細胞分化を負に制御する事、Hesr1 がファミリー分子の Hesr3 と協調的に骨芽細胞におけるオステオプロテジェリン(Opg)の発現促進を介して破骨細胞分化を負に制御する事、Osterix で誘導される機能未知の膜蛋白質が骨形成に重要な役割を演じる事を解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：骨・軟骨代謝学

## 1. 研究開始当初の背景

Osterix はそのノックアウトマウスにおいて骨芽細胞の分化が停止している事から骨芽細胞分化に必要な転写因子である事が分かっていた。遺伝学的に骨芽細胞分化決定に重

要な役割を演じる Runx2 の下流にあるが、骨芽細胞分化において Runx2 に加えて Osterix が必要である理由は不明であった。特に Osterix が転写因子として誘導する標的遺伝子については一部の骨基質蛋白遺伝子以外

ほとんど解っていなかった。また Osterix 単独の骨芽細胞分化促進能が極めて弱い事と BMP の添加でこれが劇的に進行する事を我々は既に明らかにしており、Osterix に加えて BMP の標的遺伝子が協調的に働く必要がある事が示唆されていた。さらに、Osterix の発現開始時期と既知の骨芽細胞分化マーカーの発現時期との間にタイムラグがあり、この間に Osterix の下流に未知の骨芽細胞分化調節因子の発現がある事も予想された。

## 2. 研究の目的

Osterix と BMP で協調的に誘導される標的遺伝子であり、かつ骨基質蛋白ではない未知の分子をマイクロアレイからスクリーニングし、絞り込んだ候補遺伝子の機能解析を行い、骨芽細胞分化に機能を有する新たな遺伝子を同定する。さらにその *in vivo* における役割を解析する為にノックアウトマウスを入手又は作製し、骨表現型を解析する。

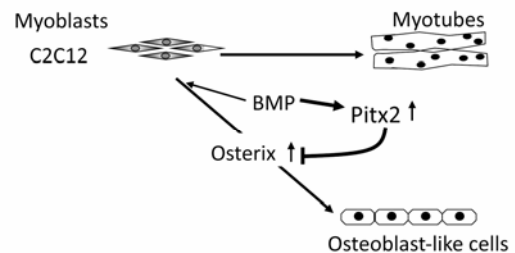
## 3. 研究の方法

マイクロアレイのスクリーニングにおいて、単一の細胞ではアーチファクトを拾う可能性を考慮し、Osterix 発現量と骨芽細胞分化能の異なる3種類の細胞、マウス骨髄ストローマ細胞(MSC)、マウス筋芽細胞株 C2C12、マウス胎仔繊維芽細胞株 C3H10T1/2 をもちいて、その発現プロファイルを比較し、内因性 Osterix との相関のある遺伝子の抽出に傾注した。全ての細胞において BMP による誘導効果が強いもの、BMP のみでは骨芽細胞分化が弱い C3H10T1/2 にて Osterix の導入による骨芽細胞分化誘導効果が強いものに分類し候補遺伝子を抽出した。候補遺伝子について過剰発現系とノックダウン系を用いて、*in vitro* 骨芽細胞分化に与える影響を骨芽細胞分化マーカーの発現や、基質の石灰化等で検討した。

既にノックアウトマウスが発表されている遺伝子はマウスの譲渡を受け、まだ未発表の遺伝子は委託でノックアウトマウスを作製し、*in vivo* 骨形成における役割を組織学的、あるいはマクロ的骨格評価で検討を検討した。

## 4. 研究成果

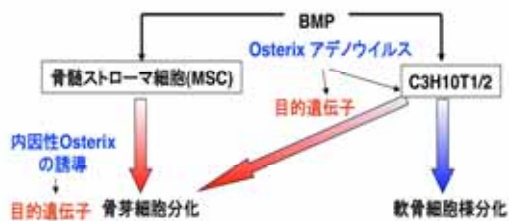
- (1) BMP 添加により C2C12 細胞のみで誘導される遺伝子として Pitx2 を同定した。C2C12 は 2~5%血清下で培養すると筋細胞に分化するが、BMP を加えると Osterix が誘導され骨芽細胞様に分化の方向を転換する事が良く知られている。Pitx2 は転写抑制因子であるが、この時 C2C12 細胞において誘導され、Osterix のプロモータに作用して Osterix の mRNA 発現を直接抑える事、すなわち Osterix の発現調節にかかる新しいメカニズムを解明した。ここで重要なのは、Pitx2 が誘導される事によって筋芽細胞の骨芽細胞化が抑制される事あり、全身の筋肉が骨化する難病である Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP)の予防・治療に光を当てる可能性を秘める発見である。



- (2) BMP 添加により全ての細胞において発現誘導され、骨芽細胞分化成熟期までその高い発現が持続する遺伝子として Hesr1/Hey1 を同定した。Hesr1 は転写抑制因子として知られていた事から、骨芽細胞分化に対して抑制的に働く事が予想された。ところが Hesr1 のノックアウトマウスを解析した所、骨芽細胞の *in vitro* 分化実験、*in vivo* の骨表現型のいずれも正常であった。ファミリー分子の機能的 redundancy を疑い検索すると Hesr3/HeyL も骨芽細胞において発現している事が分かったので、このノックアウトマウスも解析したが骨表現型は認めなかった。ところが、Hesr1 と Hesr3 のダブルノックアウトマウスは、骨形成に異常はないものの、骨吸収が亢進して骨量減少を呈した。すなわち骨粗鬆症様の骨表現型であっ

た。骨吸収を担う破骨細胞における Hes1 と Hes3 の発現を認めなかったため、骨芽細胞とのカップリング異常を疑ったところ、ダブルノックアウト骨芽細胞における Opg (破骨細胞分化抑制因子)の発現が低下している事が分かり、Opg プロモータ解析を通じて、Hes1 と Hes3 が Opg の mRNA 発現を促進する事が分かった。すなわち、これまで不明であった BMP の骨芽細胞・破骨細胞カップリングにおける役割の一端が明らかとなり、骨粗鬆症の治療対象として新たな分子標的を提示する事が出来た。

- (3) C3H10T1/2 細胞に BMP を添加すると軟骨細胞様分化と骨芽細胞様分化が同時に進行する。ここに Osterix をアデノウイルスで誘導すると劇的に骨芽細胞に分化の方向がシフトする事を見出した。この時に Osterix アデノウイルスで誘導される遺伝子と、BMP 単独添加で誘導される遺伝子、すなわち内因性 Osterix 誘導を伴う骨芽細胞分化を呈する MSC において誘導される遺伝子と共通のものを検索すれば、それはまさしく Osterix で誘導される骨芽細胞分化促進因子である可能性があると考えてスクリーニングした。



その結果、機能未知の膜蛋白遺伝子を同定出来た。この遺伝子の発現パターンを *in vitro* と *in vivo* で詳しく解析すると、Osterix のそれと全く一致する事が分かった。そこでこの遺伝子のプロモータ解析を行い、これが Osterix の直接標的遺伝子ある事も明らかにした。ノックダウン実験を行うと骨芽細胞分化が抑制された事から Osterix の下流で骨芽細胞分化に重要な働きを担う新たな分子である事が明らかとなった。骨基質蛋白以外では

初の Osterix 標的遺伝子の発見であり、今後はその *in vivo* 骨形成における機能の解明が必要である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Yuzawa H, Koinuma D, Maeda S, Yamamoto K, Miyazawa K, Imamura T. Arkadia represses the expression of myoblast differentiation markers through degradation of Ski and the Ski-bound Smad complex in C2C12 myoblasts. *Bone*, **44**:53-60, 2009. 査読有り.

Tominaga H, Maeda S (corresponding author), Miyoshi H, Miyazono K, Komiya S, Imamura T. Expression of osterix inhibits bone morphogenetic protein-induced chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *J Bone Miner Metab*, **27**:36-45, 2009. 査読有り.

Tominaga H, Maeda S (corresponding author), Hayashi M, Takeda S, Akira S, Komiya S, Nakamura T, Akiyama H, Imamura T. CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  promotes osteoblast differentiation by enhancing Runx2 activity with ATF4. *Mol Biol Cell*, **19**:5373-5386, 2008. 査読有り.

Hayashi M, Maeda S (corresponding author), Aburatani H, Kitamura K, Miyoshi H, Miyazono K, Imamura T. Pitx2 prevents osteoblastic transdifferentiation of myoblasts by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem*, **283**:565-571, 2008. 査読有り.

[学会発表](計 4件)

前田真吾、Hesr1とHesr3は骨芽細胞のOsteoprotegerin発現促進を介して骨吸収を制御し骨量を維持する、第26回日本骨代謝学会、2008年10月29日、大阪市、大阪国際会議場

前田真吾、小久保博樹、油谷浩幸、小宮節郎、宮園浩平：Hesr1とHesr3は相補的に骨芽細胞分化・骨量を制御する、BMB2007(第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会大会 合同大会)、2007年12月12日、横浜市

前田真吾、小久保博樹、小宮節郎、宮園浩平、今村健志。Hey1とHeyLは相補的に骨芽細胞分化を制御する。第22回日本整形外科学会基礎学術集会、2007年10月26日、浜松市

Shingo Maeda, Hiroki Kokubo, Hiroyuki Aburatani, Shintaro Nomura, Setsuro Komiya, Kohei Miyazono, Takeshi Imamura.  
Endogenous Hesr/Hey genes redundantly support osteoblast differentiation. 第29回アメリカ骨代謝学会、2007年9月19日、ホノルル市、ハワイ州、アメリカ合衆国

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

前田 真吾

財団法人癌研究会・癌研究所生化学部・研究員

研究者番号：60353463

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし