

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09616

研究課題名(和文)新規骨量規定因子による骨代謝調節機構の解明 - 骨形成促進のための基盤研究

研究課題名(英文) Investigation of novel regulatory factors of bone formation

研究代表者

加藤 剛 (Kato, Tsuyoshi)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・非常勤講師

研究者番号：80447490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨のリモデリングの分子機構、特に骨形成のメカニズムに関しては未だ不明な点が多い。申請者は近年その生理的意義が注目されているフォークヘッド遺伝子に注目した。尚、これまでのところ、骨代謝領域でのフォークヘッド遺伝子の意義は、Foxo1を除き、殆どが不明である。本研究の目的はこれまで機能が未知のフォークヘッド遺伝子であるFoxf2の骨代謝における意義及び、フォークヘッド遺伝子の新たな生理機能調節機構を明らかにすることである。我々は分子生物学的なアプローチにより、Foxf2がWnt2b/カテニンシグナル伝達経路を介し、MSCの骨芽細胞への分化を調節することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化は、骨形成に不可欠である。今回、Foxf2が間葉系幹細胞の骨芽細胞分化の過程で発現が上昇する上位遺伝子の一つであることを見出し、この過程におけるFoxf2の機能を検討した。Foxf2は、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化に重要な役割を担っており、臨床的な観点から、FOXF2の発現を全身的あるいは局所的に抑制することは、骨粗鬆症や骨折などの骨関連疾患の治療戦略として有望であると思われる。

研究成果の概要(英文)：Much remains unknown about the molecular mechanisms of bone remodeling, especially bone formation. In this study, we focused on the forkhead gene, whose physiological significance has been attracting attention in recent years. So far, the significance of forkhead genes in bone metabolism is mostly unknown, with the exception of Foxo1. The purpose of this study is to elucidate the significance of Foxf2, a forkhead gene whose function has been unknown, in bone metabolism and the new physiological regulatory mechanism of the forkhead gene. Using a molecular biological approach, we found that Foxf2 regulates MSC differentiation into osteoblasts via the Wnt2b/ β -catenin signaling pathway. javascript: onTransientSave()

研究分野：整形外科

キーワード：骨代謝

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学の進歩は、骨細胞、骨芽細胞及び破骨細胞に関する研究を飛躍的に進展させ、骨粗鬆症治療の進歩に多大な貢献をもたらした。特に破骨細胞分化に関しては、骨細胞、骨芽細胞の発現する RANKL が必須であること、シグナル伝達因子 TRAF や転写因子 NFATc1、NF- κ B などにより調節を受けることなど画期的な知見が相次いで報告されている。しかしながら、骨形成に関しては、転写因子 Runx2、Osterix が骨芽細胞の分化に必須であることが示されているものの、Runx2 は未熟骨芽細胞から成熟骨芽細胞に移行する際にはむしろ抑制的に働くなど未だ不明な点が多い。臨床的にも、破骨細胞研究に比して、骨芽細胞、骨細胞の研究の進展が遅延していることが、現状の骨粗鬆症の治療薬は骨吸収抑制薬が主体である一因とも考えられる。骨折の治療に利用可能な保険適用のある骨形成促進薬が本邦では未だ存在しないこと、現時点で骨粗鬆症に保険適応がある骨形成促進薬も 1 年間もしくは 2 年間しか使用できず、適切な使用が難しいことなどは骨形成に関する研究が遅れていることを示唆している。

人の骨量は思春期以降から閉経までの間、骨形成と骨吸収のバランスが保たれることによりほぼ一定で経過する。この骨量の維持には、骨形成及び骨吸収を調整する機構（リモデリング）が必要である。しかしながら、骨のリモデリングの分子機構、特に骨形成のメカニズムに関しては未だ不明な点が多く、その解明にあたり、既存的手法ではなく、新しい視点からのアプローチが必要であると考えられている。そこで申請者は近年その生理的意義が注目されているフォークヘッド遺伝子に注目した。尚、これまでのところ、骨代謝領域でのフォークヘッド遺伝子の意義は、線虫の寿命に関わる Daf16 の哺乳動物ホモログである Foxo1 を除き、殆どが不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的はこれまで機能が未知のフォークヘッド遺伝子である Foxf2 の骨代謝における意義及び、フォークヘッド遺伝子の新たな生理機能調節機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

マウス骨髄由来間質系幹細胞である ST2 細胞の骨芽細胞への分化過程で、発現量の変化する遺伝子を RNA シークエンスで網羅的に解析した。骨芽細胞分化の過程での、経時的な Foxf2 の発現量の変化を定量的 RT-PCR で測定した。ST2 細胞で Foxf2 をノックダウンあるいは過剰発現させ、骨分化マーカーの発現量を定量的 RT-PCR により測定した。

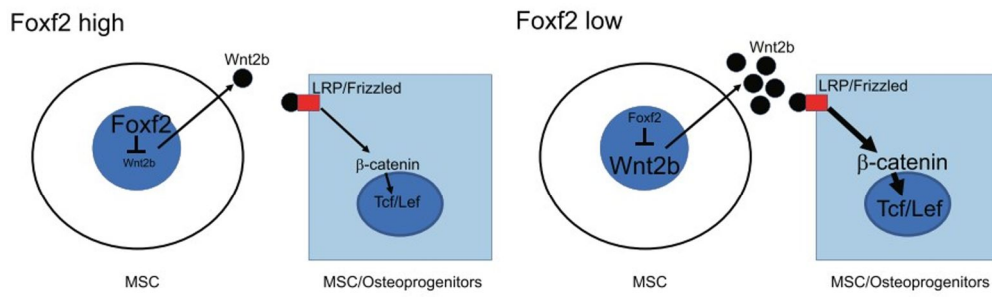
Prx1 promoter を用いて間葉系幹細胞特異的 Foxf2 ノックアウトマウス(cK0)を作製し、骨形態計測にて表現型について検討した。RNA シークエンス及び分子生物学的解析により、Foxf2 の標的因子について検討を行った。また、骨リモデリングに対する Foxf2 のノックダウンの効果を検証するために、マウス骨髄除去モデルを作成した。最後に、ヒト脊椎骨より RNA を抽出し、FOXF2 発現量と骨密度との関連について検討した。

4. 研究成果

(1) ST2 細胞の骨芽細胞への分化前と分化後から RNA を抽出し、RNA シークエンスを行った結果、ST2 細胞が骨芽細胞へ分化する過程で、Foxf2 の発現量は増加することが明らかになった。Foxf2 の発現量は、骨芽細胞分化の過程で一過性に上昇し、ST2 細胞で、Foxf2 をノックダウンすると骨芽細胞分化は促進され、過剰発現では骨芽細胞分化は抑制された。

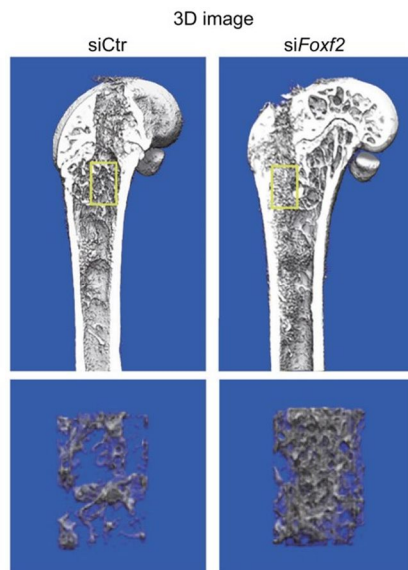
cK0 マウスの大腿骨 μ CT ではコントロールマウスと比較し、高骨量を示した。骨形態計測では、破骨細胞数の変化を認めず、骨芽細胞数の上昇を認めた。血清中の、骨形成マーカー (P1NP) の上昇を認め、一方で骨吸収マーカー (CTX-) はコントロールマウスと比較し、有意差は認めなかった。

(2) マウス頭蓋骨より RNA を抽出し、RNA シークエンスを行った結果、Foxf2 が Wnt 経路を調節していることが示唆された。そして、標的因子候補となった Wnt2b について、Western blotting、ChIP アッセイによる解析を行った。そして、Foxf2 が Wnt2b のプロモーター領域に直接結合し、その発現調節を介し、骨芽細胞分化を抑制していることを明らかとした。更に、ST2 細胞で Foxf2 を過剰発現させると骨芽細胞分化は抑制されるが、Wnt2b を共に過剰発現させることにより、骨芽細胞分化は回復した。以上より、Foxf2 は Wnt2b の発現調節を介し、骨芽細胞分化を調節することが明らかとなった (次図)。



図：Foxf2はWnt2bの発現調節を介し、骨芽細胞分化を調節する

(3) 骨髄除去モデルではコントロール群と比較し、Foxf2 ノックダウンにより再生海綿骨量が増加した(下図)。そして、ヒト脊椎骨において FOXF2 発現量と大腿骨骨密度に相関を認めた。ヒト MSCs においても、FOXF2 をノックダウンすると骨芽細胞分化は促進された。



図：Foxf2のノックダウンにより骨再生が促進される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka T, Takahashi A, Kobayashi Y, Saito M, Xiaolong S, Jingquan C, Ito Y, Kato T, Ochi H, Sato S, Yoshii T, Okawa A, Carlsson P, and Inose H	4. 巻 -
2. 論文標題 Foxf2 represses bone formation via Wnt2b/beta-catenin signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s12276-022-00779-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 寛来、佐藤 信吾、越智 広樹、猪瀬 弘之
2. 発表標題 Foxf2のWntシグナルを介した骨形成制御
3. 学会等名 日本骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 寛来、小林 裕、高橋 晃、斎藤 正徳、加藤 剛、佐藤 信吾、越智 広樹、佐藤 信吾、吉井 俊貴、大川 淳、猪瀬 弘之
2. 発表標題 Foxf2はWnt経路を介して骨芽細胞分化を調整する
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	猪瀬 弘之 (Inose Hiroyuki) (30615711)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------