

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09999

研究課題名(和文) 骨細胞における核膜構成タンパク lamin A の役割と相互作用を示す新規因子の探索

研究課題名(英文) Investigation of novel factors that interact with lamin A in osteocytes

研究代表者

高橋 富久 (TAKAHASHI, Tomihisa)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：40246905

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)：核膜タンパク lamin A の骨細胞に与える影響を調べるため、骨細胞株化細胞 MLO-Y4 に lamin A を過剰発現させた細胞株の Y4-lamin A (+) とベクターのみを発現させた Y4-Wt における遺伝子・タンパクの発現変化を調べた。Y4-lamin A (+) は Y4-Wt よりも BMP-1, -2, -6, axin, GSK-3, Wnt および -catenin の発現が増加した。また、Y4-lamin A (+) は Y4-Wt よりも OPG と IL-6 の発現が増加した。マイクロアレイによって、Y4-lamin A で発現レベルが増加した遺伝子が約 1,200 個、そして発現が減少した遺伝子が約 800 個検出できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨細胞は、骨芽細胞や破骨細胞に直接働きかけ、骨の恒常性維持に重要な役割を演じている。Lamin A が骨細胞における BMP-1, -2, -6 の発現を誘導することから、骨組織内での骨芽細胞分化を促進させる因子と考えられる。また、Wnt/ -catenin シグナルの活性化とも関係し、その下流で機能する BMP ファミリーをはじめとする様々な因子の発現と骨芽細胞の機能を調整していることが示唆された。本研究で得られた結果は、lamin A が骨細胞の機能維持にとって重要な因子であるとともに、早老症における骨細胞の機能不全を密接に関連づけた。

研究成果の概要(英文)：To define the effect of a nuclear protein lamin A, a full length lamin A cDNA was overexpressed in osteocyte-like cell line MLO-Y4, Y4-lamin A (+), and mRNA and protein expressions were compared between Y4-lamin A (+) and control cells, Y4-Wt, which only vector was expressed. Increased expressions of BMP-1, -2, -6, axin, GSK-3, Wnt and -catenin were detected Y4-lamin A (+) compared to those of Y4-Wt. Furthermore, the expression levels of OPG and IL-6 in Y4-lamin A (+) were higher than those in Y4-Wt. Microarray analysis detected the increased approximate 1,200 genes and the decreased approximate 800 genes in Y4-lamin A (+) compared to Y4-Wt. These results suggest that lamin A regulated osteocytes function and stimulate osteoclasts differentiation indirectly.

研究分野：解剖学

キーワード：Lamin A 骨細胞 Wnt/ catenin シグナル伝達

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)核ラミナの構成成分である lamin A は、LMNA 遺伝子から転写・翻訳され、細胞分化や器官形成等に重要な役割を持つとともに、lamin A の変異体が老化関連因子の1つとして注目されていた。また、多くの細胞で lamin A の発現が報告されているが、骨細胞での lamin A の発現メカニズムは不明な点が多かった。

(2)種々のメカニカルストレスを骨細胞に作用させた場合に骨形成の促進に伴い lamin A の発現が増加するという報告があるが、骨細胞における lamin A の上流、あるいは下流で機能する具体的な因子については現在に至っても解明されていなかった。

### 2. 研究の目的

(1)Lamin A は LMNA 遺伝子から prelamina と呼ばれる precursor として翻訳され、C 末端のアミノ酸修飾を受けて成熟型 lamin A になる。我々の研究から lamin A は骨組織に存在する骨芽細胞、骨細胞および骨梁周辺に局在する lining cell で発現がみられ、骨芽細胞分化に必要な因子であることが明らかにされている。骨芽細胞から最終分化を遂げた骨細胞は、周囲の骨芽細胞や破骨細胞とクロストークし、骨組織の恒常性維持に重要な役割を演じている。骨細胞は、メカニカルストレスに反応し、遺伝子やタンパクの発現が変化する。そこで、lamin A が骨細胞の細胞内・外で如何なる因子と相互作用し、骨芽細胞と破骨細胞の分化を調節しているのか明らかにする。

(2)我々の研究からメカニカルストレスは、骨細胞株化細胞の ML0-Y4 で lamin A の発現減少が認められた。しかし、骨細胞を中心とするイントラネットに影響を及ぼす lamin A の作用メカニズムについては、国内外の研究を見渡してもほとんどない。本研究は、lamin A の発現が増加した骨細胞と、減少した骨細胞をそれぞれ作製し、表現型の変化を遺伝子・タンパクレベルで詳しく解析することによって、骨細胞で lamin A と相互作用する新たなシグナル伝達系を明らかにし、併せて骨芽細胞と破骨細胞の分化に影響を及ぼす lamin A の作用メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Lamin A 過剰発現およびノックダウン細胞の作成

すでに作成済みのマウス lamin A cDNA を組込んだ発現ベクターを ML0-Y4 へ遺伝子導入する。発現ベクターの pPyCAG-IP vector に full length のマウス lamin A cDNA をサブクローニングした後、ML0-Y4 へトランスフェクションし、安定的に lamin A の発現が増加した細胞株を得た。細胞は、real-time RT-PCR と Western blot 法によって lamin A の発現量の変化を確認し、ベクターのみを導入した ML0-Y4 である Y4-Wt と比較して発現量が顕著に増加した細胞を Y4-lamin A (+) として実験に使用した。

(2) Y4-lamin A (+) を 3, 7, 10, 14, 21, 24 日培養した後、RNA と細胞溶解液を抽出し、

real-time RT-PCR と Western blot によって骨細胞の表現型の変化を調べた。骨芽細胞マーカーとして Col1, ALP, OC, BSA, Runx2, 骨細胞マーカーとして CX43, E11/gp38, DMP1, PHEX, MEPE, FGF23, SOST, MMP-2, -13, -14, 骨芽細胞分化関連因子として BMP, TGF, IGF, FGF, Wnt, 破骨細胞分化関連因子として OPG, RANKL, M-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN, IL-1, -6, -7, -8, -11, -15, -17, -23, -34 などの発現を調べた。

(3) Y4-lamin A (+)における Wnt と  $\beta$ -catenin の発現, および  $\beta$ -catenin と相互作用する GSK-3 $\beta$ , axin の発現パターンを real time RT-PCR と Western blot によって検討した。また,  $\beta$ -catenin の結合配列が組込まれた当研究室所有の TOP/EGF ベクターを Y4-lamin A (+)へトランスフェクションし, GSK-3 $\beta$  の発現と axin との結合から解離した活性化  $\beta$ -catenin の DNA 結合能について調べた。

(4) Y4-lamin A (+)と Y4-Wt の遺伝子発現の違いを網羅的に検討するために, マイクロアレイを利用して解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 骨細胞での核ラミナ構成成分の lamin A の発現メカニズムを明らかにするため, 骨芽細胞様株化細胞 MLO-Y4 に lamin A cDNA を遺伝子導入し, lamin A を過剰発現させた細胞株を樹立した。21 個のクローンを樹立し, そのうち lamin A の発現が強いクローンを Y4-lamin A (+)とし, ベクターのみ発現させた細胞株 Y4-Wt と表現形質の変化を調べた。また, MLO-Y4 へ lamin A cDNA の shRNA を遺伝子導入し, lamin A の発現をノックダウンさせた細胞株も樹立した。25 個のクローンを樹立し, そのうち安定的に lamin A の発現が抑制されているクローンを Y4-lamin A (-)として, 同じくベクターのみを発現させた Y4-Sh と表現形質の変化を調べた。その結果, Y4-lamin A (+)と Y4-Wt の細胞形態と増殖速度については有意な変化は認められなかった。また, ALP と OC の発現を軽度促進したが, 同じ骨タンパクである BSA, Runx2, osteonin や, 骨細胞マーカーとして考えられている CX43, E11/gp38, DMP1, PHEX, MEPE, FGF23, SOST, MMP-2, -13, -14 の発現は有意な変化は認められなかった。破骨細胞分化に関係する OPG と RANKL の発現についても有意な変化は認められなかった。Y4-lamin A (-)と Y4-Sh と細胞形態, 増殖速度は Y4-Sh と大きな違いはなかったが, OC の発現が軽度に増加した。骨タンパクや骨細胞マーカーの発現は有意な変化は認められなかった。しかしながら, Y4-lamin A は継代することによって, lamin A の発現が Y4-Sh と同じにレベルまで回復してしまうことから, 再現性のあるデータが得られず Y4 lamin A (-)を使用した実験を断念することになった。そこで, 当初の計画とは異なり Y4-lamin A (+)を使用して研究を進めることとした。Y4-lamin A (+)の培養系に 10ng/ml の BMP-2 を加えた結果, OC の発現が有意に増加した。また, ALP の発現は軽度に減少したが, 他の骨タンパクと骨細胞マーカーおよび破骨細胞分化関連因子の発現は有意な変化は認められなかった。

(2) Y4-lamin A (+)と Y4-Wt を使用して real-time PCR と Western blot 法によって BMP, TGF, IGF および FGF の発現を調べた結果, BMP-1, -2, -6 の発現は Y4-lamin A (+)の方が Y4-Wt

よりも高い発現レベルを示した。Wnt/ $\beta$ -cateninシグナル関連分子については axin, GSK-3 $\beta$ , Wnt および  $\beta$ -catenin の発現が増加した。しかしながら, Wnt/ $\beta$ -catenin の古典的経路に含まれている PLC, PKC およびカルシニューリンの発現およびリン酸化には Y4-lamin A (+)と Y4-Wt の間には差は認められなかった。 $\beta$ -catenin の遺伝子プロモーター領域への結合能力について調べた結果, Y4-lamin A で高い値を示した。次に破骨細胞の分化および活性化に必要な OPG, RANKL, M-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN, IL-1, -6, -7, -8, -11, -15, -17, -23, -34 の発現について調べた結果, Y4-lamin A (+)は Y4-Wt よりも OPG と IL-6 の発現レベルが増加した。続いて細胞内シグナル分子の ERK と JunD リン酸化の違いについて調べたところ, Y4-lamin A (+)と Y4-Wt どちらも ERK と JunD のリン酸化は認められたが, そのレベルの違いは見られなかった。Lamin A は老化関連因子の NRF2 を不活性化することから, Y4-lamin A (+)と Y4-Wt における NRF2 の発現とリン酸化について検討した。しかし, 両細胞間には顕著な変化は認められなかった。

(3)Y4-lamin A (+)と Y4-Wt を使用して, 細胞周期に関係する  $\beta$ -galactosidase, lamin B1, 老化関連遺伝子の SASP, さらに lamin A の発現によって変化する細胞内シグナル分子の p16, p21, p56 の発現レベルを調べた結果, いずれの分子も Y4-lamin A (+)と Y4-Wt の間では顕著な変化は認められなかった。同様に p16, p21, p56 のリン酸化レベルも変化しなかった。しかしながら, GSK-3 $\beta$ , Wnt および  $\beta$ -catenin の発現レベルは増加していたが, BMP-1, -2, -6, axin, IL-6 および OPG の発現レベルは変化しなかった。さらにリン酸化レベルが上昇した ERK と JunD の発現も Y4-lamin A (+)と Y4-Wt 間では違いが認められなかった。GSK-3 $\beta$  と  $\beta$ -catenin の細胞内での発現は Y4-lamin A で強く誘導されるとともに  $\beta$ -catenin の核内移行の促進やプロモーター領域への結合促進も認められた。しかし,  $\beta$ -catenin の下流で機能すると考えられている Tcf, PPAR $\delta$ , lymphoid enhancer D1, Twin の発現レベルの変化は認められなかった。そこで, Y4-lamin A (+)と Y4-Wt からそれぞれ RNA を抽出してマイクロアレイを利用して遺伝子発現の網羅的な解析を行った。その結果, Y4-lamin A (+)で発現レベルが増加した遺伝子を約 1,200 個, 逆に発現が減少した遺伝子を約 800 個それぞれ検出できた。これらは ML0-Y4 にメカニカルストレスをかけた場合の遺伝子発現と一部であるが類似性を認めた。以上の研究成果から lamin A は骨細胞内で主に Wnt/ $\beta$ -catenin や MAP kinase に関係する遺伝子・タンパクの発現に関与していると考えられた。また, lamin A の変異によって生じる早老症発症の誘因として Wnt/ $\beta$ -catenin あるいは MAP kinase シグナルの伝達障害があることも示唆された。今後は, マイクロアレイによって得られたデータを詳細に解析して, lamin A の細胞内の機能について解明を進めていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shimizu Natsuo, Fujiwara Kyoko, Mayahara Kotoe, Motoyoshi Mitsuru, Takahashi Tomihisa	4. 巻 9
2. 論文標題 Tension force causes cell cycle arrest at G2/M phase in osteocyte-like cell line MLO-Y4	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e13236 ~ e13236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2023.e13236	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 -
1. 著者名 熊崎敏真、高橋富久、中野 隆、坂井建雄	4. 巻 68
2. 論文標題 Action and contribution of the Iliopsoas and rectus femoris as hip flexor agonists examined with anatomical analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 順天堂医	6. 最初と最後の頁 352 ~ 362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14789/jmj.JMJ22-0009-OA	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 -
1. 著者名 Nagashima T, Ninomiya T, Nakamura Y, Nishimura S, Ohashi A, Aoki J, Mizoguchi T, Tonogi M, Takahashi T	4. 巻 40
2. 論文標題 p53 deficiency promotes bone regeneration by functional regulation of mesenchymal stromal cells and osteoblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Bone Miner Metab	6. 最初と最後の頁 434-447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-022-01314-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 酒井 嶺, 藤原恭子, 永島利通, 清水なつ生, 大橋晶子, 佐藤秀一, 本吉 満, 外木守雄, 高橋富久	4. 巻 96
2. 論文標題 転写因子TFAP2Eの発現抑制が誘導する口腔扁平上皮癌細胞の遺伝子発現変化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日大歯学	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 大橋晶子, 永島利通, 酒井 嶺, 外木守雄, 佐藤秀一, 高橋富久	4. 巻 96
2. 論文標題 セピアペテリンの末梢投与による脳内セロトニン代謝回転の亢進	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日大歯学	6. 最初と最後の頁 11-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 大橋晶子, 高橋富久	4. 巻 94巻
2. 論文標題 テトラヒドロピオプテリンの薬理作用と臨床応用について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日大歯学	6. 最初と最後の頁 55 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 二宮 禎, 西村 調, 仮屋仁志, 高橋富久
2. 発表標題 歯根膜由来leptin receptor陽性細胞が発現するLRP1の役割
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水なつ生, 藤原恭子, 馬谷原琴枝, 高橋富久, 本吉 満
2. 発表標題 張力付加が骨細胞株化細胞ML0-Y4の細胞周期に与える影響
3. 学会等名 第81回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原恭子、清水なつ生、高橋富久
2. 発表標題 牽引負荷刺激は骨細胞のストレス応答遺伝子を活性化し細胞周期の停止を誘導する
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二宮 禎, 西村 調, 仮屋仁志, 高橋富久
2. 発表標題 歯根膜由来leptin receptor陽性細胞が発現するLRP1の役割
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水なつ生, 藤原恭子, 馬谷原琴枝, 高橋富久, 本吉満
2. 発表標題 張力付加が骨細胞様株化細胞MLO-Y4の細胞周期に与える影響
3. 学会等名 第81回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原恭子, 清水なつ生, 高橋富久
2. 発表標題 牽引負荷刺激は骨細胞のストレス応答遺伝子を活性化し細胞周期の停止を誘導する
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二宮 禎, 永島利通, 中村純基, 西村 調, 仮谷仁志, 高橋富久
2. 発表標題 p53遺伝子欠損マウスにおける骨損傷修復の検討
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原 恭子, 酒井 嶺, 高橋 富久
2. 発表標題 転写因子TFAP2Eは歯肉がん細胞のM期進行の制御に関与する
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村純基, 西村調, 二宮禎, 高橋富久, 本吉満
2. 発表標題 歯根膜leptin receptor陽性細胞による骨代謝調節機能
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原 恭子, 酒井 嶺, 高橋 富久
2. 発表標題 転写因子 TFAP2E は口腔癌細胞の細胞周期進行における G2/M 遷移の制御に関与する
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原恭子、酒井 嶺、高橋富久
2. 発表標題 転写因子TFAP2Eは歯肉がん細胞のM期進行の制御に関与する
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二宮 禎、永島利通、中村純基、西村 調、高橋富久
2. 発表標題 p53欠損は、間葉系細胞の機能を増強することで骨欠損の修復を促進する
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二宮 禎、永島利通、中村純基、高橋富久
2. 発表標題 p53発現抑制による骨組織修復の促進
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------