

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592772

研究課題名(和文) MEL1 / PRDM16 による骨分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of MEL1/PRDM16 function in bone differentiation

研究代表者

井川 加織 (Igawa, Kaori)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90423722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではMEL1/PRDM16遺伝子が正常骨分化機構で果たす役割を明らかにすることを目指し、検討を進めた。まず、本遺伝子が骨軟骨分化のマスター遺伝子Runx2を負に制御する可能性が示唆された。またBMP情報伝達系に対するMel1/Prdm16の関与を中心に解析を行い、本遺伝子がSmad4の核内移行を抑制している事を見いだした。さらに、Mel1/Prdm16の関わるシグナル制御に関わる分子機構の解明を目指し、本遺伝子が骨軟骨分化のスイッチングに働いている可能性を確認した。加えてMel1/Prdm16欠損マウスの骨異常を病理学的、分子生物学的に詳細に検討し、骨形成に果たしている役割を示した。

研究成果の概要(英文)：For investigation of Mel1/Prdm16 function, we produced the knock out mice, however we could establish only heterozygotic deficient lines, and homozygotic deficient mice became embryonic lethal. In other hands, facial malformation, cleft palate and abnormality incisor appeared in heterozygotic deficient mice. It suggested that Mel1/Prdm16 plays the important role in differentiation of bone differentiation. From the feature of deficient mice, it suggested that this gene is important in development of bone. Using osteoblast cell line and cartilage cell line, Mel1/Prdm16 works for the differentiation promoting in the cartilage cells, and suppressing in osteoblasts. In addition, Mel1/Prdm16 promote the nuclear translocation of the complex of R-Smad and Co-Smad in the cartilage cell line, and suppress that translocation to nuclear in osteoblasts. We are now analyzing of the mechanism of action of Mel1/Prdm16 in current bone differentiation.

研究分野：形態系基礎歯科学

キーワード：転写因子 骨分化

1. 研究開始当初の背景

我々は転写因子 MEL1 (MDS1/EVI1 like gene 1) を t(1;3)(p36;q21) を有する急性骨髄性白血病の転座点近傍より白血病関連遺伝子として同定した [Blood 2000, 2003]。さらに胃がん細胞を用いた検討において、癌原遺伝子産物である c-Ski が MEL1/PRDM16 と 2 量体を形成することにより、TGF シグナルを抑制していることを明らかにした [JBC 2009]。我々は MEL1 の機能を検討するため、通常の MEL1 欠損マウスの作製を行ったが、樹立した 8 系統のうちヘテロマウスを樹立できたのは 2 系統のみで、ホモ欠損マウスは胎生致死となった。さらにヘテロマウスにおいて顔面奇形、門歯の異常などの表現形が出現し、骨分化に重要な役割を果たしていることが示唆された [未発表データ]。

MEL1/PRDM16 遺伝子の存在する染色体領域に関連する疾患として、染色体微細欠損症候群 (1p36 欠失症候群) が知られている。1p36 欠失症候群は 1p36 領域の欠失が原因でおこる染色体微細欠失症候群であり、特徴的な顔貌、筋緊張低下、精神発達遅滞、言語発達遅滞を認める難治性疾患であるが、原因は特定されていない。我々は患者リンパ球細胞株 6 株を用いて高密度アレイ CGH 法にてゲノム検索を行い、いずれの欠失領域にも MEL1/PRDM16 が含まれていることを同定し、MEL1/PRDM16 がその原因遺伝子であるという可能性を見いだした [未発表データ]。

MEL1/PRDM16 は既に褐色脂肪細胞/骨格筋の分化のスイッチング因子であるということが既に報告されている [Nature 2008]。我々はそれに加えて MEL1/PRDM16 が中胚葉由来の臓器の形成に関わる主要な機能を担っていることを示唆する知見を得ている。

2. 研究の目的

MEL1/PRDM16 遺伝子は染色体 1p36 領域に存在する転写因子である。機能解析の目的で MEL1/PRDM16 欠損マウスを作製した所、ヘテロ欠損マウスにおいて顔面頭部奇形及び門歯の異常が確認された。また、遺伝病として知られる 1p36 欠失症候群と表現形が類似し、MEL1 がその原因遺伝子であることも考えられる。本研究では MEL1/PRDM16 が関与する骨分化の分子機構の解析を行い、MEL1 遺伝子欠損の分子病態を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

MEL1/PRDM16 発現抑制系を用いた骨分化における役割の解析

1. MEL1/PRDM16 の発現解析

MEL1/PRDM16 ノックアウトマウスの臓器における MEL1/PRDM16 の発現レベルの比較を行う。

MEL1/PRDM16 ノックアウトマウスは胎性致死である。発達過程での死亡が予想された為、受精後 9.5 日からの検討を行い、現在 E9.5-E10.5 付近までは存在しているという

知見を得ている。今後各臓器、各時期における主に骨組織における発現レベルを確認し、致死に至るメカニズムの検討を行う。また、成体における遺伝子及びタンパクの発現レベルの比較も行い、分化後の機能についての検討も行う。

2. 骨分化における MEL1/PRDM16 の発現の検討

骨芽細胞の分化段階における MEL1/PRDM16 及び関連遺伝子の発現を検討する。

骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いて、アスコルビン酸とグリセロリン酸を含む分化誘導培地で骨分化誘導を行ったところ、2 週間から 3 週間という長期間において、分化誘導マーカー (オステオカルシン、オステオポンチン、骨シアロタンパク) の発現やカルシウムの沈着と連動して MEL1 の発現レベルが徐々に上がることを確認した。また、BMP2 刺激によっても短時間 (2-4 時間) で MEL1/PRDM16 の発現が一時的に上昇することを確認した。これらのことから、転写因子 MEL1/PRDM16 は分化段階の長期にわたる変化のみならず、BMP 情報伝達系においても短期でその発現が変化していることが示唆された。この MEL1/PRDM16 の発現の増強が骨分化マーカーの発現の結果であるのか、原因であるのかを明らかにする必要がある。機能する時期を特定することで、情報伝達系におけるどの機構で働いているのかを明らかにできると考えられた。

まず、shRNA 発現ベクターを用いて、骨芽細胞において MEL1/PRDM16 発現抑制株を作成する。作成した細胞を用い、分化誘導における MEL1 の発現をコントロール細胞と比べ、MEL1/PRDM16 発現抑制における分化マーカーの変化を詳細に検討する。

3. MEL1/PRDM16 の機能解析

骨芽細胞における MEL1/PRDM16 の関与する TGF /BMP 情報伝達系異常の解明を中心に検討する。

MEL1 の発現低下による TGF /BMP 情報伝達系の活性化機構を、タンパク質結合、ならびに情報伝達系の活性化機構から同定する。我々は転写因子である MEL1/PRDM16 がレギュレーターである c-Ski と結合し、TGF 情報伝達系を抑制する事を報告 [JBC 2009] し、c-Ski がコリプレッサーであることを示した。このコリプレッサーである c-Ski の発現、上流の Smad のリン酸化状態の検討と、骨分化マーカーの転写活性化、カルシウム沈着量の比較を行う。これまで shRNA 発現ベクターを用いた検討、ならびに野生型マウスとヘテロ KO マウスから分離した骨芽細胞を用いた検討において、MEL1 の発現低下による骨分化マーカーの転写の増強及びカルシウム沈着量の増加が認められている。従ってこの MEL1/PRDM16 は骨分化マーカーの発現の制御因子である可能性があり、BMP 情報伝達系におけるコリプレッサーである c-Ski との相互

作用を中心とした機能解析も行う。

具体的にはマウスより分離した骨芽細胞及び骨芽細胞株 MC3T3-E1 の系において、MEL1/PRDM16 のみならず、c-Ski の遺伝子発現量も shRNA 発現ベクターにより調節し、各細胞における分化調節機構を明らかにする。

MEL1/PRDM16 過剰発現形を用いた TGF /BMP シグナルへの関与の解明

1. MEL1/PRDM16 の過剰発現による骨分化マーカー及び関連遺伝子の発現を検討

-2,3 で行った実験の対照実験として、MEL1/PRDM16 発現ベクターを用いて、骨分化マーカー及び関連遺伝子の発現を検討する。

c-Ski も MEL1/PRDM16 と同様に 1p36 上に存在し、c-Ski のホモ欠損マウスが口蓋裂を生じる事が報告されている [Nat Med, 2001]。しかしヘテロ欠損マウスには異常が出ておらず、骨形成異常が生じるには MEL1 との相互作用が重要である可能性が示唆された。MEL1 のみならず、c-Ski の発現を増強させることにより、TGF /BMP 情報伝達系へ与える影響について検討する。

MEL1/PRDM16 欠損マウスを用いた骨分化、TGF /BMP シグナルへの影響の解明。

1. MEL1 欠損マウスの発達障害、骨軟骨形成不全の解析

体重、骨格の形態観察を行う。

現在、出生 0 日から体重計量を行い、継続的な体格の変化の計測を行っている。

3. MEL1 欠損マウスにおける骨格の比較

骨形態の変化を計測する。

継続的な X 線撮影により、骨格にどのような変化が生じているか、また野生型マウスと比べ、ヘテロマウスにどのような形態異常が生じているのかを明らかにする。また、骨透明標本、骨格標本等を随時作成し、軟骨と硬骨の比率、骨密度の計測を試みる。

、 、 全ての項目においての検討を継続して実施する。また、得られた結果に従い、より詳細な検討と確認を行う。

4. 研究成果

MEL1/PRDM16 発現抑制系を用いた骨分化における役割の解析

1. MEL1/PRDM16 の発現解析

MEL1/PRDM16 ノックアウトマウスの臓器における MEL1/PRDM16 の発現レベルの比較を行った。表現形の見られる臓器(眼球、骨、肝臓等)に遺伝子レベル及びタンパクレベルで高発現していることが確認された(図 -1)。

2. 骨分化における MEL1/PRDM16 の発現の検討

骨軟骨の分化段階における MEL1/PRDM16 及

び関連遺伝子の発現を検討した。骨芽細胞株 MC3T3-E1 及び軟骨細胞株 ATDC5 をそれぞれの分化誘導培地で分化誘導を行ったところ、骨分化においては、分化誘導マーカーの発現やカルシウムの沈着と連動して MEL1 の発現レベルの上昇が認められた。また、軟骨分化においても、発現が上昇することが明らかとなった。また、ATDC5 細胞は、軟骨前駆細胞株として知られ、本細胞を用いた分化系は、未分化細胞から軟骨細胞への分化のみならず軟骨細胞の肥大化・石灰化を *in vitro* で効率よく再現する培養系で有るため、本研究において最適と考えられたため、ATDC5 細胞を用いてさらなる検討を行った。

shRNA 発現ベクターを用いて、ATDC5 細胞において MEL1/PRDM16 発現抑制株を作成し、作成した細胞を用い、分化誘導における MEL1 及び分化マーカーの変化と、分化における影響の検討を行った。その結果、MEL1/PRDM16 を抑制すると、軟骨分化不良及び過石灰化が認められ、骨軟骨分化のマスター遺伝子である Runx2 を制御している可能性が示唆された(図 -2)。

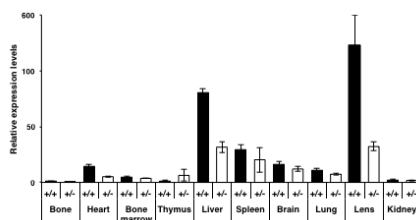


図 -1. 野生型及びヘテロ欠損マウスにおける MEL1/PRDM16 遺伝子発現レベル

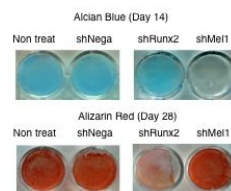


図 -2. MEL1/PRDM16 ノックダウン細胞における分化誘導の比較

3. MEL1/PRDM16 の機能解析

骨芽細胞における MEL1/PRDM16 の関与する TGF /BMP 情報伝達系異常の解明を中心に検討を行った。MEL1 のコリプレッサーである c-Ski の発現においては、有意な差は認められなかった。また、c-Ski の過剰発現系においても、有意な差が認められず、骨軟骨分化においては、c-Ski の関与は低いことが示唆された。

MEL1/PRDM16 と Runx2 との発現に逆相関が認められたため、Runx2 のプロモーター領域を探索した所、直接結合しうる領域が認められた。そこで、ルシフェラーゼ発現ベクターを用いた評価系での検討を行ったところ、Runx2 の発現を増強することが示唆された。一方で、Runx2 の regulator の一つである

Nkx3.2 のプロモーター領域にも直接結合する領域が認められ、同様に検討した結果 MEL1/PRDM16 は Nkx3.2 の発現も制御していることが明らかとなった。そこで、ATDC5 細胞を用いて MEL1/PRDM16 による Runx2 活性化を検討した所、逆相関する結果が得られた(図-3)。以上のことにより、MEL1/PRDM16 は骨軟骨細胞内環境によって、制御機構が異なると思われる。今後は分化の方向を決定づける co-factor の同定が必要であると考えられる。

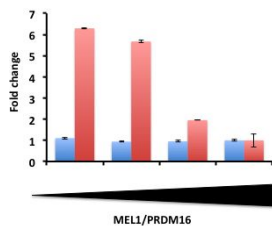


図 -3. ATDC5 細胞における MEL1/PRDM16 による Runx2 の抑制

MEL1/PRDM16 過剰発現形を用いた TGF/BMP シグナルへの関与の解明

1. MEL1/PRDM16 の過剰発現による骨分化マーカー及び関連遺伝子の発現を検討

-2,3 で行った実験の対照実験として、MEL1/PRDM16 発現ベクターを用いて、骨分化マーカー及び関連遺伝子の局在を検討した。MEL1/PRDM16 の過剰発現系において、上流の Smad のリン酸化状態と局在の検討を行ったところ、軟骨細胞と骨芽細胞における局在に差が認められ、骨芽細胞と軟骨細胞において、本遺伝子が異なる機能を有している可能性が示唆された。

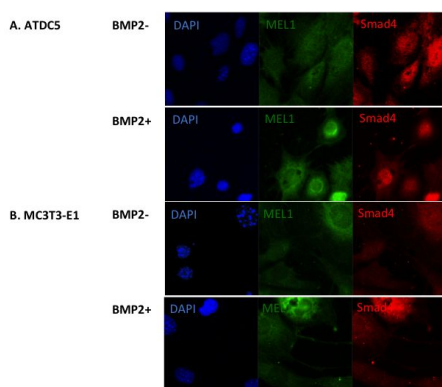


図 -1. Smad と MEL1/PRDM16 の局在

MEL1/PRDM16 欠損マウスを用いた骨分化、TGF/BMP シグナルへの影響の解明。

1. MEL1 欠損マウスの発達障害、骨軟骨形成不全の解析

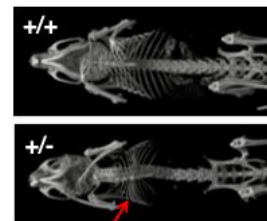
体重の経時測定及び骨格の形態観察を行った。出生 0 日から体重計量を行い、継続的な体格の変化の計測を行ったところ、初期においては MEL1 ヘテロ欠損マウスにおいて成長不良が認められたが、4 週齢以降は有意な

差が認められなかった。また、寿命に關しても有意な差は認められなかった。しかしながら、成体において大腿骨頭の組織染色を行った所、高率に軟骨形成不全が認められ、本遺伝子の発現量が軟骨形成に重要であることが示唆された。

3. MEL1 欠損マウスにおける骨格の比較

X 線 CT を用いて骨形態の計測を行った。野生型マウスと比べ、ヘテロ欠損マウスにどのような形態異常が生じているのかを明らかにする為に、各種パラメーターの比較を行った。ヘテロ欠損マウスにおいては、頭蓋骨密度が低く、また胸郭形成に若干の不良が認められた。骨透明標本を作成した所、特に軟骨形成に遅滞が見られることが明らかとなった。骨組織における骨形態の違いを詳細に比較したところ、骨密度と骨塩量が低下しており、軟骨形成異常のみならず、硬骨形成にも重要な役割を果たす遺伝子であることが示唆された。

図 -1. MEL1/PRDM16 ヘテロ欠損マウスにお



ける骨格異常

MEL1/PRDM16 は既に褐色脂肪細胞/骨格筋の組織分化のスイッチング因子であるということが既に報告されている。In vitro における検討、及び我々の樹立した MEL1/PRDM16 欠損マウスの特徴から、本遺伝子が骨軟骨分化の早期に働き、その分化のスイッチングに機能している可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

(1) Kaneda-Nakashima K, Igawa K, Ohta T, Sekimoto T, Chosa E, Imaizumi K, Phudit M, Yamaguchi R, Sakoda S, Morishita K. Investigation of MEL1/PRDM16 function in bone differentiation. 2014 年 10 月 15(水)・16日(木)・17日(金)・18日(土) 第 87 回日本生化学会大会

(2) Kaneda-Nakashima K, Igawa K, Ohta T, Kuroki S, Sekimoto T, Chosa E, Sakoda S, Morishita K. The role of

MEL1/PRDM16 in bone differentiation.
2013年12月3日(火)・4日(水)・5日
(木)・6日(金)第36回日本分子生物
学会年会 神戸国際会議場

- (3) 兼田加珠子、井川加織、大田智美、関本朝久、帖佐悦夫、迫田澄男、森下和広. Mechanisms of bone differentiation regulated by MEL1/PRDM16. 2013年9月11日(水)・12日(木)・13日(金)第86回日本生化学会大会 パシフィコ横浜
- (4) Kaneda-Nakashima K, Igawa K, Kurogi S, Sekimoto T, Chosa E, Sakota S, Morishita K. Mechanisms of bone differentiation regulated by MEL1/PRDM16. 2012年12月11日(火)・12日(水)・13日(木)・14日(金)第35回日本分子生物学会年会 マリンメッセ福岡

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井川加織 (IGAWA, Kaori)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90423722

(2) 研究分担者

兼田 加珠子 (KANEDA, Kazuko)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：00533209

(3) 連携研究者

森下 和広 (MORISHITA, Kazuhiro)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：80260321