

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462786

研究課題名(和文) プロテインホスファターゼ PP2A による骨形成と間葉系細胞分化機構の解明

研究課題名(英文) Role of PP2A in bone formation and mesenchymal cell differentiation

研究代表者

岡村 裕彦 (OKAMURA, Hirohiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・准教授

研究者番号：20380024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：PP2トランスジェニックマウス(PP2A-Tg)およびPP2A発現を抑制した間葉系前駆細胞を用いて骨形成と脂肪細胞分化におけるPP2Aの役割について検討した。PP2A-Tgマウスは野生型に比べて、体重、骨量および骨髄内脂肪量の増加が認められた。PP2Aを抑制した骨芽細胞と共培養した未分化間葉系細胞では脂肪細胞への分化が促進された。また、PP2Aを抑制した骨芽細胞の培養上清は破骨細胞分化を抑制した。PP2Aは、骨関連因子の発現を介して骨形成を調節する重要な因子であることが分かった。さらに、骨芽細胞のPP2A発現は脂肪細胞や破骨細胞の分化に関与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Transgenic mice that specifically express dominant negative PP2A in osteoblastic cells showed higher bone mineral density and increase in body weight and adipose tissue of tibia bone marrow. PP2A-knockdown (shPP2A) cells showed accelerated osteoblast differentiation with the upregulation of bone-related genes. To examine the effect of PP2A in osteoblasts on adipocyte differentiation, mesenchymal stem cells were co-cultured with shPP2A cells. shPP2A cells revealed higher ability to induce adipocyte differentiation and the expression of adipocyte marker genes in mesenchymal stem cells. Furthermore, supernatant of shPP2A cells inhibited osteoclastogenesis. Our results indicate that PP2A plays important roles in the regulation of bone formation through the expression of bone-related transcription factors. In addition, PP2A in osteoblasts is considered to be involved in controlling adipocyte and osteoclast differentiation.

研究分野：口腔組織学

キーワード：プロテインホスファターゼ PP2A 骨形成 骨芽細胞 脂肪細胞 間葉系細胞

1. 研究開始当初の背景

本申請の目的は、**PP2A α による骨形成と間葉系細胞分化のメカニズムを解明すること**であった。骨は骨格運動系の中心であるだけでなく、カルシウム代謝調節器官であり、造血幹細胞の維持・血球系細胞の分化増殖を支える免疫組織でもある。つまり、骨の恒常性は局所の硬組織疾患だけでなく、全身の代謝・循環器疾患にも影響を与える重要な要素と考えられる。また、**骨を形成する骨芽細胞は脂肪細胞や軟骨細胞の起源でもある間葉系前駆細胞から分化する**。様々な細胞種における現象と同様、間葉系前駆細胞の分化・機能は蛋白質リン酸化酵素（プロテインキナーゼ）と蛋白質脱リン酸化酵素（プロテインホスファターゼ）による蛋白質のリン酸化・脱リン酸化により厳密にコントロールされている。PP2A は真核生物において必須のセリン・スレオニンプロテインホスファターゼであり、細胞分裂、シグナル伝達や代謝などに必要な酵素である。我々はこれまで骨芽細胞におけるプロテインホスファターゼの役割について骨に必須の転写調節因子との関連を中心に研究を行ってきた (Okamura et al, BBRC, 2009; Yang et al, J Biol Chem, in press)。これらの研究をもとに、**世界で初めて PP2A α が骨芽細胞の分化と石灰化および破骨細胞分化能に与える重要な酵素であることを報告した** (Okamura et al, Bone, 2011; J Cell Physiol, 2013; FEBS Lett, 2013)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでの研究結果を踏まえ、*in vivo*での骨形成および間葉系前駆細胞の分化における PP2A α の役割について明らかにすることであった。具体的には、PP2A α トランスジェニックマウスおよび PP2A α 発現を抑制した間葉系前駆細胞を用いて *in vivo*での骨形成と脂肪細胞分化における PP2A α の役割について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) *in vivo*での骨形成における PP2A α の役割を調べる。

マイクロCTを用いて、PP2A-Tg マウスの骨量・骨密度の解析を行った。摘出した腰椎、大腿骨および脛骨の切片を作製し、各種染色を行い、骨形態計測を行った。骨密度・骨形態の変化をコントロール群と比較し、*in vivo*の骨形成における PP2A α の機能を評価した。

(2) PP2A α による骨芽細胞分化の調節機構について調べる。

PP2A α が骨芽細胞分化・石灰化をどのような転写調節因子を介して制御するかを解明した。PP2A α の発現を抑制した骨芽細胞を用いて、リアルタイム PCR、ウエスタンブロットやルシフェラーゼアッセイにより、転写調節因子の発現と機能を調べる。変化が認

められた転写調節因子の発現抑制を行い、PP2A α による骨芽細胞分化と転写調節因子の関係を明らかにした。

(3) 脂肪細胞における PP2A α の役割について調べる。

PP2A α が骨芽細胞以外の間葉系細胞種への分化に与えるか調べた。PP2A α の発現を抑制した間葉系前駆細胞を樹立し、分化誘導後、脂肪・軟骨細胞分化マーカーの発現について調べた。

(4) 骨芽細胞の PP2A α 発現が脂肪細胞分化に与える影響を調べる。

PP2A α を発現抑制した骨芽細胞と間葉系前駆細胞または脂肪前駆細胞の共培養を行い、脂肪細胞分化について検討した。細胞をメンブレンによって区分された共培養プレートの上下段に播種し、培養した後、脂肪細胞を回収し、脂肪細胞分化マーカーの発現をリアルタイム PCR 等より測定し、脂肪細胞分化における骨芽細胞の PP2A α の役割を明らかにした。

4. 研究成果

(1) PP2A α は骨形成を促進する。

PP2A-Tg マウスは野生型に比べて体重が大きく、骨密度が高かった。また、脛骨骨髄内の脂肪量の増加も認められた。このことは、骨芽細胞の PP2A α が脂肪細胞の分化をも制御していると考えられる。

(2) PP2A α は骨に必須の転写調節因子を制御する。

PP2A α の発現を抑制した骨芽細胞では Osterix, Runx2, Dlx5 など骨に必須の転写調節因子群の発現が顕著に増加していた。また、これらの転写調節因子の発現抑制により PP2A α の発現を抑制した骨芽細胞でみられた分化の促進が抑制された。これらのことは、PP2A α が転写調節因子群の上流に位置し、発現をコントロールする重要な因子と考えられる。

(3) PP2A α は脂肪細胞への分化を制御する。

PP2A α の発現を抑制した未分化間葉系細胞を脂肪細胞分化誘導培地で培養した。これらの細胞は、脂肪細胞の分化に必須の転写調節因子の発現が増加し、分化が促進された。

(4) 骨芽細胞 PP2A α は脂肪細胞の分化を制御する。

PP2A α の発現を抑制した骨芽細胞と未分化間葉系細胞を共培養したところ、脂肪細胞への分化が促進された。

以上の結果より、骨芽細胞における PP2A α は、骨芽細胞の分化のみならず、脂肪細胞の分化にも関与する重要な因子と考えられる。

また、PP2A α は、軟骨細胞や破骨細胞など**間葉系を中心とした未分化細胞の形質維持に関わっている可能性が高く**、今後、さらなる機能解明を行い、骨関連疾患治療などへの応用に繋げたい。

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 13 件)

Yoshida K, Okamura H, Hiroshima Y, Abe K, Kido J, Shinohara Y, Ozaki K.
PKR induces the expression of NLRP3 by regulating the NF κ B pathway in Porphyromonas gingivalis-infected osteoblasts. *Experimental Cell Research* (2017), 354(1), 57-64. DOI: 10.1016/j.yexcr. 査読有

Teramachi J, Inagaki Y, Shinohara H, Okamura H, Yang D, Ochiai K, Baba R, Morimoto H, Nagata T, Haneji T.
PKR regulates LPS-induced osteoclast formation and bone destruction in vitro and in vivo. 査読有
Oral Disease, 23(2), 181-188, 2017. DOI: doi: 10.1111/odi.12592.

Ma N, Yang D, Okamura H, Teramachi J, Hasegawa T, Qiu L, Haneji T.
Involvement of interleukin-23 induced by Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide in osteoclastogenesis. *Molecular Medicine Reports*, 15 (2), 559-566, 2017. DOI: 10.3892/mmr.2016.6041. 査読有
Okamura H, Yoshida K, Morimoto H, Teramachi J, Ochiai K, Haneji T, Yamamoto A

Role of protein phosphatase 2A in osteoblast differentiation. *Journal of Clinical Medicine* (2017), 6(3), pii:E23. DOI: 10.3390/jcm6030023. 査読有

Yang D, Okamura H, Morimoto H, Teramachi J, Haneji T.
Protein phosphatase 2A α regulates proliferation, migration, and metastasis of osteosarcoma cells. *Laboratory Investigation* (2016), 96(10), 1050-1062. DOI: 10.1038/labinvest.2016.82. 査読有

Yang D, Okamura H, Teramachi J, Haneji T.
Histone demethylase Jmjd3 regulates osteoblast apoptosis through targeting anti-apoptotic protein Bcl-2 and pro-apoptotic protein Bim.

Biochimica Biophysica Acta-Molecular Cell Research (2016), 1863, 650-659. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.01.006. 査読有
Takamura H, Yoshida K, Okamura H, Fujiwara N, Ozaki K.

Porphyromonas gingivalis attenuates the insulin-induced phosphorylation and translocation of forkhead box protein O1 in human hepatocytes. *Archives Oral Biology*, 69, 19-24, 2016. DOI: 10.1016/j.archoralbio. 査読有
Yang D, Okamura H, Teramachi J, Haneji T.
Histone demethylase Utx regulates differentiation and mineralization in osteoblasts.

Journal of Cellular Biochemistry (2015), 116 (11), 2628-2636. DOI: 10.1002/jcb.25210. 査読有
Shinohara H, Teramachi J, Okamura H, Yang D, Nagata T, Haneji T.
Double stranded RNA-dependent protein kinase is necessary for TNF- α -induced osteoclast formation in vitro and in vivo. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116 (9), 1957-1967, 2015. DOI: 10.1002/jcb.25151. 査読有

Yu Y, Yang D, Qiu L, Okamura H, Guo J, Haneji T.

Tumor necrosis factor- α induces interleukin-34 expression through nuclear factor- κ B activation in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Molecular Medicine Reports* (2014), 10 (3), 1371-1376. DOI: 10.3892/mmr.2014.2353. 査読有

Yoshida K, Yoshioka M, Okamura H, Moriyama S, Kawazoe K, Grenier D, Hinode D.

Preventive effect of Daiokanzoto (TJ-84) on 5-fluorouracil-induced human gingival cell death through the inhibition of reactive oxygen species production.

PLoS One (2014), 9 (11), e112689. DOI: 10.1371/journal.pone.0112689. 査読有
Okamura H, Yang D, Yoshida K, Teramachi J, Haneji T.

Reduction of PP2A α stimulates adipogenesis by regulating the Wnt/GSK-3 β / β -catenin pathway and PPAR γ expression.

Biochimica Biophysica Acta-Molecular Cell Research (2014), 1843 (11), 2376-2384. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.06.008. 査読有

Guo J, Yang D, Okamura H, Teramachi J, Ochiai K, Qiu L, Haneji T.

Calcium hydroxide suppresses *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide-induced bone destruction.

Journal of Dental Research (2014), 93 (5),
508-513. DOI: 10.1177/0022034514526886.
査読有

〔学会発表〕(計 29 件)

岡村裕彦, Yang Di, 寺町順平
ヒストン脱メチル化酵素 Jmjd3 は Bcl-2
および PKD1 の発現を介して骨芽細胞の
アポトーシスを制御する
第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集
会, 2017 年 3 月 28-30 日, 長崎大学坂本キ
ャンパス (長崎県・長崎市)
寺町順平, 日浅雅博, 天真寛文, 岡村裕
彦, 安倍正博, 羽地達次
骨髄腫瘍進展と骨破壊病変形成にお
ける TAK-1 の枢軸的役割
第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集
会, 2017 年 3 月 28-30 日, 長崎大学坂本キ
ャンパス (長崎県・長崎市)
岡村裕彦, 寺町順平
骨芽細胞の分化と機能におけるプロテ
インホスファターゼ PP2A C α の役割
日本解剖学会第 71 回中国・四国支部学
術集会, 2016 年 10 月 22-23 日, 岡山大学
鹿田キャンパス Junko Fukutake Hall (岡
山県・岡山市)
寺町順平, 日浅雅博, 岡村裕彦, 安倍正
博, 羽地達次
骨髄腫の腫瘍進展と骨破壊病変形成に
おける TAK1 の枢軸的な役割
日本解剖学会第 71 回中国・四国支部学
術集会, 2016 年 10 月 22-23 日, 岡山大学
鹿田キャンパス Junko Fukutake Hall (岡
山県・岡山市)
岡村裕彦, 吉田賀弥, 寺町順平
骨芽細胞と脂肪細胞の分化におけるプ
ロテインホスファターゼ PP2A C α の役
割
第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016
年 8 月 24-26 日, 札幌コンベンションセ
ンター (北海道・札幌市)
吉田賀弥, 岡村裕彦
PKR は骨芽細胞において Porphyomonas
gingivalis が誘導する NLRP3 発現を
NF- κ B 経路を介して制御する
第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016
年 8 月 24-26 日, 札幌コンベンションセ
ンター (北海道・札幌市)
寺町順平, 岡村裕彦, 羽地達次
TAK-1 阻害による腫瘍進展の抑制と骨
病変の改善効果
第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016
年 8 月 24-26 日, 札幌コンベンションセ
ンター (北海道・札幌市)
岡村裕彦, 羽地達次
PP2A C α は Wnt/ β -catenin 経路と PPAR γ
の発現を介して脂肪細胞の分化を調節
する

第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集
会, 2016 年 3 月 28-30 日, ビッグパレット
ふくしま (福島県・郡山市)
岡村裕彦, 楊諦, 寺町順平, 羽地達次
骨形成および骨芽細胞の分化に関する
研究とその手法
第 135 回徳島生物学会, 2015 年 12 月 23
日, 徳島大学常三島キャンパス地域連携
小ホール (徳島県・徳島市)
寺町順平, 篠原宏貴, 稲垣裕司, 岡村裕
彦, 永田俊彦, 羽地達次
炎症性骨破壊における PKR の枢軸的役
割
第 135 回徳島生物学会, 2015 年 12 月 23
日, 徳島大学常三島キャンパス地域連携
小ホール (徳島県・徳島市)
岡村裕彦, 寺町順平, 羽地達次
骨芽細胞と脂肪細胞の分化におけるプ
ロテインホスファターゼ PP2A C α の役
割
日本解剖学会第 70 回中国・四国支部学
術集会, 2015 年 10 月 24-25 日, 愛媛大学
城北キャンパス 南加記念ホール (愛媛
県・松山市)
馬場拓朗, 岡村裕彦, Yang Di, 永尾
寛, 羽地達次, 市川哲雄
ラット臼歯部咬合支持の喪失がオトガ
イ舌骨筋および咬筋の筋組成へ与える
影響
日本解剖学会第 70 回中国・四国支部学
術集会, 2015 年 10 月 24-25 日, 愛媛大学
城北キャンパス 南加記念ホール (愛媛
県・松山市)
寺町順平, 日浅雅博, 岡村裕彦, 安部
正博, 羽地達次
Pim-2 を標的とした骨髄腫細胞における
骨破壊の抑制
日本解剖学会第 70 回中国・四国支部学
術集会, 2015 年 10 月 24-25 日, 愛媛大学
城北キャンパス 南加記念ホール (愛媛
県・松山市)
岡村裕彦, 寺町順平, 羽地達次
プロテインホスファターゼ PP2A C α は、
骨芽細胞と脂肪細胞の分化を制御する
第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会,
2015 年 9 月 11-13 日, 朱鷺メッセ 新潟
コンベンションセンター (新潟県・新潟
市)
寺町順平, 岡村裕彦, 羽地達次
Pim 阻害による骨髄腫骨吸収亢進の抑制
第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会,
2015 年 9 月 11-13 日, 朱鷺メッセ 新潟
コンベンションセンター (新潟県・新潟
市)
吉田賀弥, 岡村裕彦, 尾崎和美
PKR やインフラマソームが P. gingivalis
を感染させた骨芽細胞において骨吸収
に関連する因子の発現に与える影響
第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会,
2015 年 9 月 11-13 日, 朱鷺メッセ 新潟

コンベンションセンター (新潟県・新潟市)

Okamura Hirohiko, Yang Di, Teramachi Jumpei, Haneji Tatsuji

PP2A Calpha in osteoblasts controls osteoblast and adipocyte differentiation. Proceedings of the 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, March 21-23, 2015, Kobe (兵庫県・神戸国際会議場・展示場, 兵庫県・神戸市)

Yang Di, Okamura Hirohiko, Teramachi Jumpei, Haneji Tatsuji

Histone demethylase Jmjd3 regulates osteoblast differentiation and apoptosis. Proceedings of the 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, March 21-23, 2015, Kobe (兵庫県・神戸国際会議場・展示場, 兵庫県・神戸市)

Teramachi Jumpei, Morimoto Hiroyuki, Okamura Hirohiko, Haneji Tatsuji

Critical role of PKR in TNF- α -induced osteoclastogenesis. Proceedings of the 120th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists and the 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, March 21-23, 2015, Kobe (兵庫県・神戸国際会議場・展示場, 兵庫県・神戸市)

岡村裕彦, Yang Di, 寺町順平, 羽地達次

プロテインホスファターゼ PP2A C α は、脂肪細胞分化に關与する
日本解剖学会第 69 回中国・四国支部学術集会, 2014 年 10 月 25-26 日, 広島大学霞キャンパス (広島県・広島市)

⑳ 楊諦, 岡村裕彦, 羽地達次

H3K27demethylase Jmjd3 associates with the transcription factors Runx2 and Osterix to regulate osteoblast differentiation
日本解剖学会第 69 回中国・四国支部学術集会, 2014 年 10 月 25-26 日, 広島大学霞キャンパス (広島県・広島市)

㉑ 寺町順平, 篠原宏貴, 稲垣裕司, 楊諦, 岡村裕彦, 永田俊彦, 羽地達次

PKR による炎症性骨破壊制御
日本解剖学会第 69 回中国・四国支部学術集会, 2014 年 10 月 25-26 日, 広島大学霞キャンパス (広島県・広島市)

㉒ 岡村裕彦, Yang Di, 寺町順平, 羽地達次

プロテインホスファターゼ PP2A C α は、脂肪細胞分化に關与する
日本解剖学会第 69 回中国・四国支部学術集会, 2014 年 10 月 25-26 日, 広島大学霞キャンパス (広島県・広島市)

㉓ 楊諦, 岡村裕彦, 羽地達次

H3K27demethylase Jmjd3 associates with the transcription factors Runx2 and Osterix to regulate osteoblast differentiation
日本解剖学会第 69 回中国・四国支部学術集会, 2014 年 10 月 25-26 日, 広島大学霞キャンパス (広島県・広島市)

㉔ 岡村裕彦, 寺町順平, 羽地達次
脂肪細胞分化におけるプロテインホスファターゼ PP2A C α の役割

第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014 年 9 月 25-27 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

㉕ 寺町順平, 森本景之, 岡村裕彦, 羽地達次

歯周病における LPS および TNF- α による破骨細胞形成促進の重要な因子である

第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014 年 9 月 25-27 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

㉖ 吉田賀弥, 吉岡昌美, 岡村裕彦, 日野出大輔

大黃甘草湯は活性酸素やインフラマソームを介して 5-fluorouracil が誘導する細胞死を改善させる

第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014 年 9 月 25-27 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

㉗ 岡村裕彦, 寺町順平, 羽地達次
骨形成・骨芽細胞分化におけるプロテインホスファターゼ PP2A C α の役割

第 32 回日本骨代謝学会学術集会, 2014 年 7 月 24-26 日, 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

㉘ 寺町順平, 稲垣裕司, 岡村裕彦, 永田俊彦, 羽地達次

PKR は歯周病変における破骨細胞形成及び骨吸収を制御する

第 32 回日本骨代謝学会学術集会, 2014 年 7 月 24-26 日, 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 裕彦 (OKAMURA, Hirohiko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号: 20380024

(2) 研究分担者

吉田 賀弥 (YOSHIDA, Kaya)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師
研究者番号: 60363157

羽地 達次 (HANEJI, Tatsuji)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
(平成 27 年度まで研究分担者)
研究者番号: 50156379

(3) 連携研究者

寺町 順平 (TERAMACHI, Jumpei)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：20515986