

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462817

研究課題名(和文)細胞分化コントロールによる新たな骨疾患治療法開発を目指す基礎研究

研究課題名(英文)A therapeutic approach to bone diseases by regulating osteoblast differentiation

## 研究代表者

松口 徹也 (Matsuguchi, Tetsuya)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：10303629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞が分化過程で発現するオステオポンチン(OPN)は、サイトカイン様の働きで慢性骨炎症性疾患の病態に関わる。骨芽細胞をJNK阻害下に分化誘導すると、OPNを高発現するが、後期分化マーカーであるオステオカルシン(OCN)の発現や基質石灰化能の低い分化骨芽細胞が出現した。また、JNK特異的フォスファターゼ欠損マウスでは、血清中OPN量は有意に低かった。さらにJNK活性抑制によって出現するOPN型骨芽細胞分化の制御因子として、Id4を同定した。骨芽細胞分化にはOCN型とOPN型の2つの分化様式が存在し、これは初期のJNK活性によって制御されるId4の発現量の増減で調節されている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Osteopontin (OPN) is osteogenic marker protein which have regulatory effects on inflammatory diseases and bone metabolic disorders. Inhibition of JNK significantly inhibited osteogenic differentiation characterized by matrix mineralization and the gene expression of osteocalcin (OCN), whereas it increased OPN expression, indicating two types of osteogenic differentiation: OCN secretion type and OPN secretion type. The appearance of OPN type was decreased in DUSP16, a JNK specific phosphatase, knockout mouse. Gene expression analysis using DNA microarray revealed that OPN type osteoblasts specifically express secretory proteins and some surface markers. Moreover, inhibitor of differentiation 4 (Id4) suppressed the inhibitory effect of Hey1 on OPN promoter activity and regulated the induction of OPN type osteoblasts. Our findings suggested that JNK signaling regulates multifunctional differentiation of OPN and OCN type osteoblasts.

研究分野：生化学

キーワード：骨代謝 骨芽細胞 細胞内シグナル伝達 細胞分化 JNK オステオポンチン オステオカルシン  
幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞から分化する骨芽細胞は、I型コラーゲン、アルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオカルシン (OCN) などを分泌し、石灰化を伴う豊富な骨基質を形成しながら骨細胞へ分化する。一方、オステオポンチン (OPN) は骨芽細胞分化中期に発現されるリン酸化糖蛋白だが、発現は一過性で、分化後期には殆ど認められなくなる。また、OPN ノックアウトマウスで骨格の異常が認められないことから、骨芽細胞における OPN 発現は骨基質形成には必須でないと考えられている。

OPN は RGD 配列を有し、細胞表面のインテグリンを介して炎症性細胞等の遊走・接着を誘導する。近年、RA や歯周病などの慢性骨炎症性疾患の病巣部に OPN が高レベルで存在し、病態の進行に深く関わっていることが多数報告されている。よって、骨芽細胞由来の OPN 発現量を制御することで、慢性骨疾患の病勢をコントロールできることが推定されるが、骨芽細胞分化における OPN 分泌能の制御機構についての詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

我々は以前、JNK 特異的なフォスファターゼ (DUSP16) のトランスジェニックマウス等の解析結果より、CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (Th) 内の JNK 活性が Th1/Th2 分化調節の鍵因子となることを報告した (J Biol Chem, 2011)。本研究の目的は、骨芽細胞における Th 様の多様性の分化を仮説として提唱し、分化条件の違いによって、OPN を多量に分泌するタイプの分化骨芽細胞が出現する可能性を検討することである。

予備的実験結果において、骨芽細胞分化誘導時の JNK 活性を抑制すると、石灰化基質形成が阻害され、OCN の発現が抑制されるが、逆に OPN の発現が著しく上昇した骨芽細胞が出現した。この結果に基づき、骨芽細胞には石灰化誘導型の一般的分化形式 (OCN 型)

と OPN を多量発現する分化形式 (OPN 型) が存在し、分化誘導条件の違いで分化形式の方向が変化することを実証し、その分子機構を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞の分化様式における JNK シグナルの役割を解析する目的で、C57BL/6 マウス由来骨芽細胞及びマウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 を、特異的 JNK 阻害剤 (SP600125) 存在下もしくは非存在下に、アスコルビン酸、BMP2、FGF2 による各種分化誘導をかけ、骨芽細胞分化マーカーの発現レベルの変動をリアルタイム PCR 法で、基質石灰化をアリザリンレッド S 染色法にて解析した。

(2) 我々が作成した JNK の内因性抑制制御分子である JNK 特異的フォスファターゼ DUSP16 の遺伝的欠損マウスの胎仔頭頂骨から骨芽細胞を単離し、骨芽細胞分化誘導時の遺伝子発現パターン、生体の血清中 OPN 濃度を解析し、野生型マウスと比較した。

(3) 未分化骨芽細胞、通常条件での分化骨芽細胞、SP600125 存在下で分化誘導した骨芽細胞の3種類の細胞における遺伝子発現パターンをマイクロアレイで網羅的に比較解析した。また、マイクロアレイによる網羅的解析で OPN 分泌型への分化制御因子として同定した inhibitor of differentiation 4 (Id4) を未分化骨芽細胞に強制発現させ、骨芽細胞分化に対する影響を解析した。

(4) 実際の生体内骨組織中の多様性分化の存在を実証するため、野生型 C57BL/6 マウスから複数部位の骨組織 (頭蓋骨、脊椎、四肢骨) を単離し、OPN と OCN のタンパクおよび mRNA 発現レベルを定量的に解析・比較した。

(5) 間葉系幹細胞からの骨芽細胞/脂肪細胞分化のスイッチングにおける遺伝子発現パターンの変化を解析し、スイッチング制御における JNK シグナルの役割を検討した。

(6) メカニカルストレスが骨芽細胞に与える影響を解析する目的で、C57BL/6 マウス由来骨芽細胞に圧刺激を与え、誘導される遺伝子発現パターンの変化を解析した。また、低出力超音波 (LIPUS) によるメカニカルストレス刺激が間葉系幹細胞の多分化能の維持とその後の骨芽細胞への分化誘導に与える影響を解析した。

(7) 骨芽細胞が分化過程で分泌する OPN 蛋白が骨芽細胞自体のストレス反応性に与える影響を解析し、その分子機構を解明した。

(8) 軟骨細胞分化におけるシグナル伝達機構において、細胞の飢餓センサーとして知られる AMPK キナーゼの役割を中心に解析した。

#### 4. 研究成果

(1) マウス頭頂骨由来骨芽細胞 (初代培養細胞) 及びマウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 の両方において、アスコルビン酸、BMP2、FGF2 の各種分化誘導因子の差異に関わらず、JNK 阻害剤下に分化誘導をかけると OCN を発現せず OPN を高発現する細胞が出現した (図 1)。また JNK 阻害剤の投与時期を変えた実験によって、OPN 型と OCN 型の分化方向の変化には、骨分化のごく初期の JNK 活性が重要であることが示された。

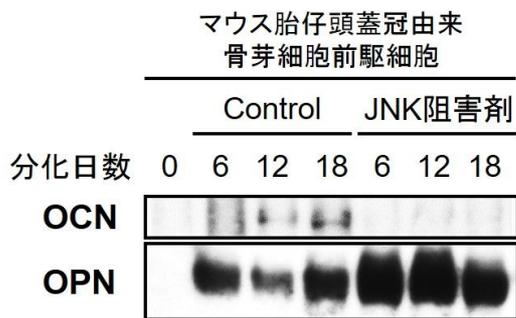


図 1

(2) JNK 活性が構成的に野生型マウスに比べて高い JNK 特異的フォスファターゼ DUSP16 欠損マウスでは、OPN 型骨芽細胞の出現率が減少し、また、血清中 OPN 量は

有意に低かった。これより、OPN 型骨芽細胞分化の存在が実際の生体内でも示唆されると同時に、その制御に JNK 活性が重要であることが示された。

(3) 未分化骨芽細胞、OCN 型、OPN 型分化骨芽細胞における発現遺伝子の網羅解析の結果、OPN 型に特徴的な分泌タンパク質群と、特異的表面発現分子群を見出した。更に OPN 分泌型への分化制御因子として、Id4 を同定した。Id4 を強制発現させると OPN 分泌型の出現比は増加、逆に Id4-shRNA の導入は JNK 活性阻害によって誘導される OPN 型の出現を抑制した。よって、OCN 型と OPN 型の骨芽細胞分化様式は、分化初期の JNK 活性によって制御される Id4 の発現量の増減で調節されている可能性がある (図 2、3)。

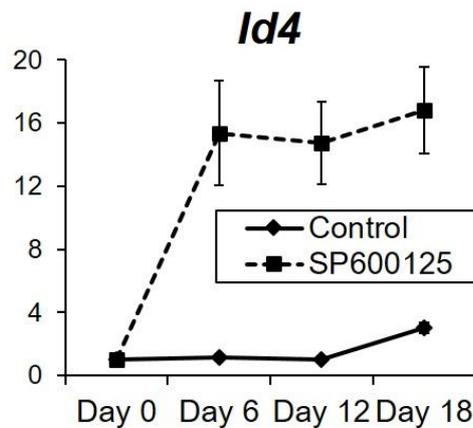


図 2

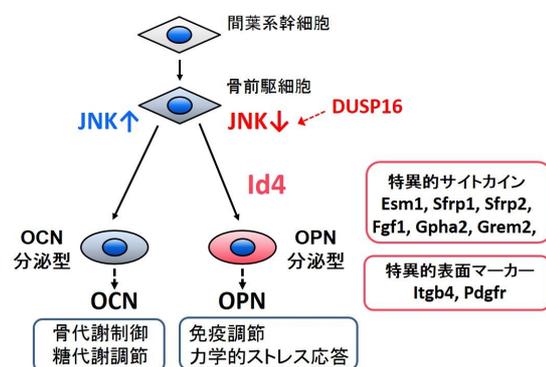


図 3

(4) 野生型C57BL/6マウスから複数部位の骨組織におけるOPNとOCNのタンパクおよびmRNA発現レベルを定量的に解析したところ、部位によってOPN/OCNの発現量比に偏りがあることを見いだした。これは実際の生体内で、骨芽細胞分化様式の違いが部位特異的に起こっていることを示唆する貴重な所見と考えられた(図3)。( (1) ~ (4) の所見については現在論文投稿準備中)

(5) 低出力超音波によるメカニカルストレス刺激が、多能性幹細胞特異的に発現するNanog遺伝子の発現を誘導することで間葉系幹細胞の多分化能の維持に有効であることを示した。その後の骨芽細胞方向の分化誘導に有効に働くことを示した。また、間葉系幹細胞におけるJNKの構成的活性が、脂肪細胞分化に関わる転写因子であるc/EBP deltaの発現を介して、間葉系幹細胞から骨芽細胞/脂肪細胞への分化方向の調節に重要な役割を果たすことを示した。(論文投稿済み)

間葉系幹細胞からの骨芽細胞/脂肪細胞の分化方向の調節にケモカインの1種であるCXCL3が重要な働きを持つことを、siRNAを用いた遺伝子ノックダウン実験などによって示した(図4)。CXCL3がオートクライン様式にて、間葉系幹細胞から脂肪細胞への分化に促進的に働くことが示唆された。(J. Lipid Res誌に発表済み、2016)

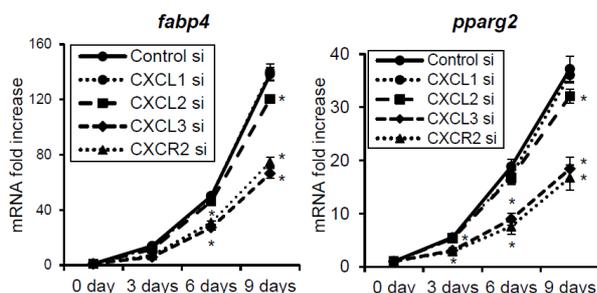


図4

(6) マウス初代培養骨芽細胞が圧刺激依存性にケモカインを発現する分子機構について解析し、ケモカイン発現能が骨芽細胞からの

IL-1 $\beta$ の恒常的発現を必要とすること、またそれが自然免疫系シグナル経路であるMyD88分子依存性であることを示した。(Bone誌に発表済み、2015)

(7) 軟骨細胞分化において、AMPK活性が分化抑制的に働くことを見だし、それに関わる転写因子を同定した。(Bone誌に発表済み、2015)

(8) 骨芽細胞が分化過程で分泌するOPN蛋白が骨芽細胞の反応性を抑制すること。また、その分子機構を解析し、OPNによるLMW-PTP(Low Molecular weight protein tyrosine phosphatase)の発現誘導、および、それによるFocal Adhesion Kinase (FAK)の脱リン酸化が重要であることを示した。(Mol. Biol. Cell.誌に発表済み、2017)

## 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6件)

1. Kusuyama J., Bandow K., Ohnishi T., Hisadome M., Shima K., Semba I., Matsuguchi T. Osteopontin inhibits osteoblast responsiveness through the downregulation of focal adhesion kinase mediated by the induction of low molecular weight-protein tyrosine phosphatase. Mol. Biol. Cell. 2017 Mar 22. pii: mbc.E16-10-07 doi:10.1091/mbc.E16-10-0716 査読有
2. Hisadome M., Ohnishi T., Kakimoto K., Kusuyama J., Bandow K., Kanekura T., Matsuguchi T. Hepatocyte growth Factor reduces CXCL10 expression in keratinocytes. FEBS Lett. 2016 Oct;590(20):3595-3605. doi: 10.1002/1873-3468.12452. Epub 2016 Oct 18. 査読有
3. Kusuyama J., Komorizono A., Bandow

- K., Ohnishi T., Matsuguchi T. CXCL3 positively regulates adipogenic differentiation. *J. Lipid. Res.* 2016 Oct;57(10):1806-1820. Epub 2016 Aug 10. DOI:10.1194/jlr.M067207 査読有
4. Kusuyama J., Hwan Seong C., Bandow K., Ohnishi T., Matsuguchi T. 10. Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) Stimulation Helps to Maintain the Differentiation Potency of Mesenchymal Stem Cells by Induction in Nanog Protein Transcript Levels and Phosphorylation. *J. Orthop. Trauma* 2016 Aug;30(8):S4-5. doi: 10.1097/01.bot.0000489983.17459.0b.P MID: 27441771 査読無
  5. 松口徹也 : 骨再生のキープレイヤー : 骨芽細胞の分化調節機構 鹿歯会報 TEETHFUL vol. 129, no. 708, p9-11, 2016. 査読無
  6. Maeda A, Bandow K., Kusuyama J, Kakimoto K., Ohnishi T., Miyawaki S, Matsuguchi T. Induction of CXCL2 and CCL2 by pressure force requires IL-1 $\beta$ -MyD88 axis in osteoblasts. *Bone.* 2015; 74: 76-82. 査読有
  7. Bandow K., Kusuyama J, Kakimoto K., Ohnishi T., Matsuguchi T. AMP-activated protein kinase (AMPK) activity negatively regulates chondrogenic differentiation. *Bone.* 2015; 74: 125-133. 査読有
- [学会発表](計 16 件)
1. 楠山譲二、中村利明、大西智和、榮樂菜保子、野口和行、松口徹也: 低出力超音波 (LIPUS) による歯根膜由来幹細胞の BMP9 誘導性骨分化及び炎症性応答の制御 第 20 回超音波骨折治療研究会 2017 年 1 月 21 日 品川インターシティホール (東京都品川区)
  2. 楠山譲二、中村利明、大西智和、榮樂菜保子、野口和行、松口徹也: 低出力超音波 (LIPUS) による歯根膜由来幹細胞の BMP9 誘導性骨分化及び炎症性応答の制御 第 15 回日本超音波治療研究会 2016 年 11 月 12 日 東京女子医科大学 (東京都新宿区)
  3. 松口徹也、榮樂菜保子、楠山譲二、大西智和: BMP9 は Wnt 非依存的に骨芽細胞の GSK3b/b-catenin シグナルを活性化する 第 58 回歯科基礎医学会 2016 年 8 月 26 日 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
  4. 楠山譲二、大西智和、松口徹也: JNK シグナリングは骨芽細胞の多様性分化を制御する 第 58 回歯科基礎医学会 2016 年 8 月 26 日 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
  5. 楠山譲二、中村利明、大西智和、榮樂菜保子、野口和行、松口徹也: 低出力超音波 (LIPUS) は歯根膜由来幹細胞の BMP9 誘導性骨分化を促進し炎症応答を防ぐ 第 25 回硬組織再生生物学会 2016 年 8 月 20 日 日本大学歯学部 (東京都千代田区)
  6. 楠山譲二、大西智和、松口徹也: JNK シグナリングは骨芽細胞の多様性分化を制御する 第 34 回日本骨代謝学会 2016 年 7 月 23 日 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
  7. Matsuguchi T.: Dynamic regulation of bone metabolism. Professional Talk Series (招待講演) 2016 年 7 月 23 日 Universiti Teknologi MARA (Selangor, Malaysia)
  8. 楠山譲二、小森園杏奈、坂東健二郎、大西智和、松口徹也: ケモカイン CXCL3 は脂肪分化を促進する 平成 28 年度日本生化学会九州支部例会 2016 年 5 月 15 日 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)
  9. 中尾寿奈、楠山譲二、田沼順一、松口徹也 : 低出力超音波刺激 (LIPUS) は骨芽細胞

- の LPS 誘導性炎症反応を抑制する 第 4 回超音波分子診断治療研究会、2016 年 3 月 5 日、福岡大学（福岡県福岡市）
10. 大西智和、楠山譲二、坂東健二郎、柿元協子、松口徹也：骨芽細胞分化による ATP 産生経路の呼吸鎖から解糖系への移行 第 88 回日本生化学学会大会 2015 年 12 月 1 日 神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）
11. 前田綾、坂東健二郎、宮脇正一、松口徹也：圧刺激による骨芽細胞のケモカイン発現誘導には IL-1b と MyD88 シグナル伝達系が必要である 第 74 回日本矯正歯科学会大会 2015 年 11 月 18 日、福岡国際会議場・マリノメッセ（福岡県福岡市）
12. 楠山譲二、坂東健二郎、大西智和、仙波伊知郎、松口徹也：p46JNK2 の構成的活性は脂肪分化前期における C/EBPd の発現に必須である 第 57 回歯科基礎医学会 2015 年 9 月 11 日、朱鷺メッセ（新潟県新潟市）
13. 楠山譲二、成昌ファン、坂東健二郎、柿元協子、大西智和、松口徹也：LIPUS による間葉系幹細胞の未分化能の維持 第 18 回超音波骨折治療研究会、2015 年 1 月 17 日、ANA クラウンプラザホテル神戸（兵庫県神戸市）
14. 坂東健二郎、楠山譲二、大西智和、柿元協子、松口徹也：軟骨細胞分化における AMP-activated kinase の役割 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
15. 楠山譲二、松口徹也：脂肪細胞によって分泌されるケモカイン CXCL3 は脂肪分化を促進する 第 35 回日本肥満学会 2014 年 10 月 24 日 宮崎フェニックスシーガイアコンベンションセンター（宮崎県宮崎市）
16. 楠山譲二、坂東健二郎、社本光央、柿元協子、大西智和、松口徹也：オステオポ

ンチンは LMW-PTP を介して骨芽細胞の生理的応答性に影響を与える 第 56 回日本歯科基礎医学会、2014 年 9 月 25 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

〔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〕

ホームページ等 該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松口 徹也 (MATSUGUCHI, Tetsuya)  
鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授  
研究者番号：10303629

### (2) 研究分担者

大西 智和 (OHNISHI, Tomokazu)  
鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授  
研究者番号：30244247

柿元 協子 (KAKIMOTO, Kyoko)  
鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教  
研究者番号：40274849

坂東 健二郎 (BANDOW, Kenjiro)  
明海大学・歯学部・講師  
研究者番号：50347093

### (3) 連携研究者

該当なし。

### (4) 研究協力者

該当なし。