

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10486

研究課題名(和文) 骨髄脂肪化原因候補遺伝子Atoh8の骨芽細胞・脂肪細胞分化選別における機能解析

研究課題名(英文) Roles of Atoh8 in differentiation of osteoblasts and adipocytes

研究代表者

前田 真吾 (MAEDA, Shingo)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：60353463

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)：加齢と共に骨髄内の骨芽細胞が減少して骨粗鬆症になるが、その原因候補遺伝子として骨形成蛋白(BMP)シグナル標的遺伝子Atoh8の機能を解析した。Atoh8はin vitroでは骨芽細胞分化を抑制したが、ノックアウト(KO)マウスを用いたin vivo解析では骨形成には異常がなく、しかし破骨細胞増加による骨吸収亢進による骨量減少を呈した。Atoh8が骨髄における骨芽細胞のRankl/Opg発現比率を下げる事で破骨細胞分化を抑制し、骨量減少を防いでいることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Number and bone-forming activity of osteoblasts in bone marrow decreases in aging bone, which leads to osteoporosis. However, the mechanism is not fully understood. We analyzed function of Atoh8, a novel direct target gene of canonical bone morphogenetic protein (BMP) signaling, in osteoblasts in vivo and in vitro. siRNA-mediated loss of Atoh8 promoted osteoblast differentiation, however, bone formation parameters were not altered in Atoh8 knockout (KO) mice, assessed by micro-CT and bone morphohistometry analysis. Instead, osteoclast number and bone resorption was increased in KO mice bone, and bone volume was significantly reduced. Rankl/Opg expression ratio in KO osteoblast was increased which enhanced differentiation of osteoclasts.

研究分野：骨代謝学、整形外科学

キーワード：Atoh8 骨芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

この高齢化社会において、運動器不安定症は優先順位の高い解決命題であるが、それは高率に合併する骨粗鬆症がベースにあるので転倒等による骨折を引き起こし易く、結果として患者の生活の質や、生命を脅かすからである。加齢と共に骨髄中の骨芽細胞/脂肪細胞の数比が減少する事と、それが骨粗鬆症患者で特に顕著な事は現象論として良く知られている。間葉系幹細胞(MSC)は分化系統それぞれの特異的マスター転写因子を発現して、筋芽細胞、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞等に分化する能力を有するが、なぜ骨髄中では骨芽細胞と脂肪細胞にしか分化しないのか、さらにその分化比はなぜ加齢と共に変化するのか、ほとんど分かっていない。MSCは一方で、骨・軟骨再生医療のソースとしても実際に利用されているが、目的の組織のみに純分化させる手法は未だ完全ではなく、それはすなわちMSCの分化選別機構に不明な点が多い事に他ならない。MSCからの骨芽細胞と脂肪細胞の分化は、一方が増えれば他方が減るというシーソー様の関係で、これまで Wnt, Hedgehog, NELL-1 等のシグナルが、いずれも骨芽細胞分化を促進する一方で脂肪細胞分化を抑制する事が分かっているが、その作用分子メカニズムと他のシグナル経路については完全に解明されていない。

BMPシグナルは、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞の分化は促進し、筋芽細胞への分化は抑制する。我々はこれまで、BMPが誘導する Pitx2 が、筋芽細胞 C2C12 においては骨芽細胞分化に必須な Osterix の発現を抑制する事で筋表現型を維持する事[Hayashi M, Maeda S (corresponding), *et al*, *J Biol Chem*, 2008]、間葉系前駆細胞に BMP で誘導した軟骨細胞分化は、Osterix の導入により抑制され、骨芽細胞分化にシフトする事[Tominaga H, Maeda S (corresponding), *et al*, *J Bone Miner Metab*, 2009]を明らかにした。Osterix 自身も BMP によって誘導される為、BMP-誘導骨芽細胞分化選別の中心的役割を持つ。これらの経験から、我々は骨芽細胞と脂肪細胞の分化選別にも、BMP によって誘導される未知の転写因子が関わっていると仮説を立てた。先行実験として、MSC に分化能や性質が近い骨髄ストローマ細胞 ST-2 と、骨芽細胞株 MC3T3-E1 を BMP-2 で分化誘導し、比較的未分化な ST-2 では発現が上昇するが、骨芽細胞分化決定済みの MC3T3-E1 では発現変化をしない BMP-誘導性の転写因子をマイクロアレイで検索した。その結果、Atonal homolog 8 (*Atoh8*)を検出した。

*Atoh8* は、筋芽細胞分化に必須の MyoD と同じ basic helix-loop-helix (bHLH)転写因子に属する。ゼブラフィッシュの骨格筋形成に関わる事が示唆されているが、ノックアウト(KO)マウスは2ラインの報告があり、一つは胎生

早期致死、もう一つは明らかな表現型が無く生存する。しかし骨は解析されていなかった。すなわち *Atoh8* の骨芽細胞と脂肪細胞の分化における *in vivo* と cell-autonomous な機能は不明であった。我々はすでに先行実験として、ST-2 細胞に BMP-6 で分化誘導をかけて、siRNA による *Atoh8* の loss-of-function 効果を、骨芽細胞分化マーカー *Alp* と脂肪細胞分化マーカー *adipsin* 発現で観察していた。BMP-6 は骨芽細胞と脂肪細胞の両分化を促進するが、*Atoh8* ノックダウンは前者をさらに亢進し、逆に後者を抑制した。すなわち *Atoh8* は BMP 誘導骨・脂肪分化を脂肪分化方向に選別するスイッチの様な働きをする可能性が浮上した。一方で分化決定した骨芽細胞 (MC3T3-E1)では高い発現を示しており、骨芽細胞分化成熟へのブレーキとして働く可能性も考えられ、やはり BMP で誘導され骨芽細胞分化に抑制的な bHLH 蛋白である *Hey1* や *Hes1* との関わりも予想された。本研究では *Atoh8* が骨芽細胞/脂肪細胞分化比率を制御する可能性とその分子メカニズムを明らかにすることとした。

## 2. 研究の目的

- (1) 間葉系細胞の BMP 刺激による *Atoh8* の発現動態プロファイル  
BMPシグナルによる *Atoh8* の誘導は間葉系細胞普遍的なのか、または分化系統、分化成熟度に特異的なのか、脂肪細胞と骨芽細胞はもちろん、他の筋芽細胞、軟骨細胞等の分化系統細胞株を用いて、時系列を設定して発現動態を検討する。
- (2) 骨芽細胞・脂肪細胞分化における *Atoh8* の gain/loss-of-function の影響  
脂肪細胞と骨芽細胞に *Atoh8* の過剰発現系、ノックダウン系を用いて、BMP 刺激の有無で比較しながら、それぞれの分化表現型への影響を調べる。
- (3) *Atoh8* KO マウスの骨の解析

## 3. 研究の方法

- (1) *Atoh8* の間葉系細胞における BMPシグナルによる遺伝子発現プロファイリング  
*In vitro* では、マウス初代間葉系幹細胞、マウス骨髄ストローマ細胞系 (ST-2, D1)、マウス骨芽細胞 (MC3T3-E1)、脂肪細胞系前駆細胞 (3T3-L1, 3T3-F442A)、マウス軟骨細胞系前駆細胞 (C3H/10T1/2, ATDC5)、マウス筋芽細胞系 (C2C12) に対して、主に BMP-6 で刺激して、*Atoh8* の誘導パターンを経時的に mRNA を qRT-PCR 法で定量し、蛋白をウエスタンブロットで解析した。BMP の量で分化の振り分けが異なる

事も報告されており、基本的に1、10、100ng/mlと3段階に濃度を振って解析した。

Atoh8がBMPシグナルの直接標的遺伝子なのか、Atoh8のプロモーターを検索し、Smad1/5/8抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)実験を行った。また、Atoh8プロモーターDNAをルシフェラーゼ発現ベクターにクローニングし、BMP反応性を観ると共に、このdeletion mutantを造り、反応責任エレメントを検索し、ChIPの結果と比較・照合した。

## (2) 間葉系前駆細胞分化選別におけるAtoh8の影響

上記細胞、特に骨芽細胞、脂肪細胞系に着目してBMP-6にて分化誘導を行い、Atoh8 mRNAに対する3~4種類の独立したsiRNA(Dharmacon社、またはAmbion社)のカクテルをもちいてノックダウンを行い、それぞれの細胞の分化の方向性と成熟度を、各分化マーカーのqRT-PCRとウエスタンブロットで解析した。

過剰発現は、導入効率重視にはアデノウイルス、長期安定発現目的にはレンチウイルスを用いた。アデノウイルスはTaKaRa社の、レンチウイルスは、Life Technologies社のシステムで構築した。

## (3) Atoh8のin vivoにおける発現プロファイリング

胎生17.5日~新生3日マウス組織切片に対してAtoh8免疫組織化学染色とin situ hybridization解析をおこなった。

8週齢マウス脛骨に対してin situ hybridization解析をおこなった。

## (4) Atoh8の分子メカニズム

Atoh8のBMP/TGF- $\beta$ シグナルへの影響について、Smad1/5/8、Smad2/3のリン酸化をウエスタンブロットで、活性をそれぞれのルシフェラーゼ・レポーターで検討した。

## 4. 研究成果

Atoh8は前駆骨芽細胞(ST-2)、成熟骨芽細胞(MC3T3-E1)の両者において、BMP刺激によって再現よく発現誘導された。この誘導は、新生蛋白合成阻害剤シクロヘキシミドにて変化しなかったためBMP-Smad経路の直接標的と考えられた。そこで、Smad1抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)実験を行っ

たところ、Atoh8遺伝子のプロモーターとイントロン部への結合をそれぞれ検出できた。siRNAによるノックダウン実験を行ったところ、骨芽細胞分化は初期から亢進し、驚くべき事に骨芽細胞分化マスター転写因子Runx2の発現から上昇が観られた。

Atoh8蛋白の検出をウエスタンブロットで試みた。市販の抗体3種を試したが、いずれをもってしてもAtoh8蛋白の検出は出来なかったため、過剰発現系の構築を優先した。現時点で発現プラスミドの構築に成功し、これのトランスフェクションによるAtoh8蛋白検出を試みたが、プロテアソーム阻害剤MG132を用いるとはっきりとしたバンドを検出する事ができたので、Atoh8蛋白は分解速度、すなわちturn-overが早い事が示唆された。従ってin vivoマウス骨における発現を免疫組織化学染色で検討する際に用いる抗体の検討もできなかった。実際、マウス胎仔における蛋白発現を免疫組織化学染色で検討したが、シグナルを得る事はできなかった。そこでmRNAレベルで発現を検出する事とし、in situ hybridizationを試みた。その結果、Atoh8 mRNAは、上腕骨のperichondrium、頭蓋底や椎骨の軟骨原基に発現がある一方で、骨格筋により強い発現も認められた。8週齢マウス脛骨では、一次海綿骨の骨芽細胞と、成長板の肥大軟骨細胞に明らかな発現を検出することができた。

KOマウスの胎仔や新生仔の骨格標本作製して観察すると、ほぼ正常であったが、一部頭蓋冠や鎖骨遠位など、膜性骨化部位に骨形成の遅延が観られた。これもin vitroノックダウン実験と逆なので、細胞増殖への影響をWST assayで観察すると、KO骨芽細胞は成長が遅延する事がわかった。

本来の目的である高齢マウスの脂肪髄化に与えるAtoh8の影響を観るために、60週齢、24週齢それぞれの大腿骨について、 $\mu$ CT解析を行った。しかし、これら中高齢マウスでは確かに骨髄が脂肪化していたが、そのために骨量減少が著しく、かつその程度に個体間のばらつきが大きかったので、KOマウスと野生型の有意な差を検出する事ができなかった。そこで、young adultの8週齢について $\mu$ CT解析を行ったところ、KOマウスで有意に骨量が減る結果となった。これはin vitroのノックダウンによる骨芽細胞分化促進とは逆方向の表現型であった。8週齢マウス椎骨(第4腰椎)の骨形態計測も行ったところ、やはり骨量の減少を認めた。骨形成と骨吸収パラメーターから、骨形成に変化はないものの、破骨細胞が増えており、骨吸収が亢進して骨量が減少したと結論された。

骨芽細胞による破骨細胞分化制御と、破骨細胞自身のAtoh8による分化制御の可能性を、初代骨芽細胞-初代骨髄細胞および初代脾臓細胞の共培養実験で検討したところ、Atoh8の破骨細胞autonomousな影響はほぼなく、骨芽細胞を介した破骨細胞分化促進が予想された。

そこで、KOマウス由来骨芽細胞、およびマウスST-2骨髄間質細胞におけるAtoh8 siRNAノックダウンにおけるRanklとosteoprotegerin (Opg)の発現を定量的RT-PCRで検討すると、KO細胞でRankl/Opg ratioが増加していた。

RanklとOpg遺伝子のプロモーター解析に着手しているが、Atoh8発現プラスミドはRanklプロモーター・レポーターの活性には影響しないが、Opgプロモーターの活性は増加させた。Atoh8はbasic helix-loop-helix(bHLH)蛋白であり、OpgプロモーターにはbHLHの結合エレメントであるE-box配列が複数同定されている。

#### 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 16件)

- 1) 八尋雄平, 前田真吾, 森川真大, 鯉沼代造, 篠原直弘, 河村一郎, 佐久間大輔, 石堂康弘, 影山龍一郎, 宮園浩平, 小宮節郎: BMP シグナル標的遺伝子 Atoh8 欠損マウスの骨量は減少する. 第 35 回日本骨代謝学会学術集会, 2017, 福岡.
- 2) 八尋雄平, 前田真吾, 森川真大, 鯉沼代造, 篠原直弘, 河村一郎, 佐久間大輔, 石堂康弘, 影山龍一郎, 宮園浩平, 小宮節郎: BMP シグナル標的遺伝子 Atoh8 の骨代謝における役割. 第 18 回運動器科学研究会, 2017, 呉.
- 3) 八尋雄平, 前田真吾, 森川真大, 鯉沼代造, 佐久間大輔, 篠原直弘, 松山金寛, 河村一郎, 石堂康弘, 影山龍一郎, 宮園浩平, 小宮節郎: BMP 誘導因子 Atoh8 の欠損は骨量を減少させる. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2017, 宜野湾市.
- 4) Yahiro Y, Maeda S, Morikawa M, Koinuma D, Shinohara N, Matsuyama K, Kawamura I, Ishidou Y, Kageyama R, Miyazono K, Komiya S: Regulation of osteoblast differentiation by a novel BMP signaling target gene Atoh8. Orthopaedic Research Society 2017 Annual Meeting, 2017, San Diego, CA, USA.
- 5) Yahiro Y, Maeda S, Morikawa M, Koinuma D, Shinohara N, Matsuyama K, Sakuma D, Ishidou Y, Kageyama R, Miyazono K, Komiya S: Loss of BMP-inducible gene Atoh8 in mice decreases bone mass. Joint Meeting of the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society & the International Federation of Musculoskeletal Research Societies in Conjunction with the JSBMR, 2017, Brisbane, Queensland, Australia.
- 6) Yahiro Y, Maeda S, Morikawa M, Koinuma D, Shinohara N, Matsuyama K, Kawamura I, Ishidou Y, Kageyama R, Miyazono K, Komiya S: Atoh8, a direct target gene of BMP-Smad1/5/8 signaling, negatively regulates osteoblastic bone formation. 62nd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2016, Orlando, Florida, USA.
- 7) 八尋雄平, 前田真吾, 森川真大, 鯉沼代造, 篠原直弘, 松山金寛, 河村一郎, 石堂康弘, 影山龍一郎, 宮園浩平, 小宮節郎: 新規 BMP シグナル標的遺伝子 Atoh8 による骨芽細胞分化制御. 第 29 回日本軟骨代謝学会, 2016, 広島.
- 8) 八尋雄平, 前田真吾, 森川真大, 鯉沼代造, 篠原直弘, 河村一郎, 石堂康弘, 影山龍一郎, 宮園浩平, 小宮節郎: 新規 BMP シグナル標的遺伝子 Atoh8 による骨芽細胞分化制御. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会, 2016, 大阪.
- 9) 八尋雄平, 前田真吾, 森川真大, 鯉沼代造, 篠原直弘, 石堂康弘, 影山龍一郎, 宮園浩平, 小宮節郎: BMP 誘導遺伝子 Atoh8 の骨芽細胞分化における機能. 第 17 回運動器科学研究会, 2016, 大阪.
- 10) 八尋雄平, 前田真吾, 篠原直弘, 松山金寛, 河村一郎, 石堂康弘, 小宮節郎: 新規 BMP シグナル標的遺伝子 Atoh8 による骨芽細胞分化・骨形成制御. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016, 福岡.
- 11) 八尋雄平, 前田真吾, 森川真大, 鯉沼代造, 篠原直弘, 河村一郎, 石堂康弘, 影山龍一郎, 宮園浩平, 小宮節郎: 新規 BMP シグナル標的遺伝子 Atoh8 による骨芽細胞分化制御. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016, 横浜.
- 12) 八尋雄平, 前田真吾, 森川真大, 鯉沼代造, 篠原直弘, 松山金寛, 河村一郎, 横内雅博, 石堂康弘, 影山龍一郎, 宮園浩平, 小宮節郎: BMP シグナル標的遺伝子 Atoh8 のノックダウンは骨芽細胞分化を促進する. 第 1 回日本骨免疫学会, 2015, 宮古島.
- 13) 八尋雄平, 前田真吾, 篠原直弘, 横内雅博, 河村一郎, 石堂康弘, 小宮節郎: BMP

シグナル標的遺伝子 Atoh8 は骨芽細胞分化を抑制する. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会, 2015, 東京.

- 14) 八尋雄平, 前田真吾, 森川真大, 鯉沼代造, 篠原直弘, 松山金寛, 河村一郎, 横内雅博, 石堂康弘, 影山龍一郎, 宮園浩平, 小宮節郎: BMP シグナル標的因子 Atoh8 は骨芽細胞分化を抑制する. 第 16 回運動器科学研究会, 2015, 鹿児島.
- 15) 八尋雄平, 前田真吾, 篠原直弘, 横内雅博, 河村一郎, 石堂康弘, 小宮節郎: 新規 BMP シグナル標的遺伝子 Atoh8 は骨芽細胞分化成熟を抑制する. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015, 富山.
- 16) 八尋雄平, 前田真吾, 森川真大, 鯉沼代造, 篠原直弘, 松山金寛, 河村一郎, 横内雅博, 石堂康弘, 影山龍一郎, 宮園浩平, 小宮節郎: BMP シグナル標的遺伝子 Atoh8 による骨芽細胞分化抑制. 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015, 神戸.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表

前田 真吾 (MAEDA SHINGO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号: 60353463

(2)研究分担者

河村 一郎 (KAWAMURA ICHIRO)  
鹿児島大学・附属病院・医員

研究者番号: 90535832

小宮節郎 (KOMIYA SETSURO)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号: 30178371