

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09111

研究課題名(和文) -catenin類似分子CTNNB1の骨芽細胞分化選別機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of the function of CTNNB1 in osteoblast differentiation

研究代表者

河村 一郎 (Kawamura, Ichiro)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教

研究者番号：90535832

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)：CTNNB1の骨軟骨細胞分化における機能解析を当初遂行したが、表現型が再現性に乏しく、その結合パートナーであるCDC5Lの機能解析を推し進めた。一連の解析の中でCDC5Lは初期軟骨分化を促進し骨芽細胞分化は抑制する機能があることが分かった。また未分化間葉系細胞では腱・靭帯への分化を抑制する可能性も考えられた。以上の結果からCDC5Lは骨軟骨前駆細胞から軟骨細胞分化への分子スイッチとも考えられた。CDC5Lは後縦靭帯骨化症における疾患感受性領域の候補遺伝子の1つであり、骨化過程においてその最初の靭帯軟骨変性、または間質細胞や血管細胞の軟骨細胞分化に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Catenin-beta-like 1(CTNNB1)との結合パートナーであるCDC5L (cell division cycle 5-like)遺伝子は脊椎後縦靭帯骨化症(OPLL)患者のゲノムワイド関連解析で得られた疾患感受性領域の候補遺伝子群の1つである。それぞれの間葉系幹細胞の分化選別スイッチとして、軟骨細胞を選別する役割を解明することで、内軟骨性骨化のメカニズムの1つを明らかにし、特に脊柱靭帯骨化症の病態解明の手掛かりの一助となりえる結果である。

研究成果の概要(英文)：We initially analyzed the function of CTNNB1 in osteochondrogenic differentiation, but the phenotype was not reproducible, so we proceeded to analyze the function of its binding partner CDC5L. In a series of analyses, CDC5L was found to promote early chondrogenic differentiation and inhibit osteoblast differentiation. In addition, CDC5L may inhibit the differentiation of undifferentiated mesenchymal cells into tendons and ligaments. These results suggest that CDC5L may be a molecular switch from osteochondral progenitor cells to chondrocyte differentiation. It was suggested that it may play an important role in the initial ligamentous cartilage degeneration during the ossification process, or in the chondrocyte differentiation of interstitial and vascular cells.

研究分野：脊椎外科

キーワード：CTNNB1 CDC5L 骨芽細胞分化 軟骨細胞分化

1. 研究開始当初の背景

内軟骨性骨化や軟骨再生の分子メカニズムを明らかにすることは、昨今の超高齢化社会の健康寿命を高める観点からも、運動器治療の発展に多大なる貢献が考えられる。骨形成タンパク (BMP) は、間葉系幹細胞からの骨芽細胞分化に加えて、軟骨細胞と脂肪細胞の分化も誘導するので、いかに望まない分化方向を抑えて効率を上げるかが重要な課題である。これらを明らかにすることは、骨・軟骨の形成という運動器の基本となる発生メカニズムを明らかにするのみならず、脊柱靭帯骨化症などの病態の解明、骨軟骨再生を明らかにすることでの再生医療への新たな分子標的となる可能性を有している。

2. 研究の目的

Wnt/catenin シグナルは、骨芽細胞分化は促進し、軟骨細胞と脂肪細胞の誘導は抑制するので、BMP との併用により選択的骨芽細胞分化誘導を可能にする可能性がある。しかし、catenin には機能的相補性を有する他の類似分子が存在し、catenin 単独制御では期待通りの結果が得られない可能性がある。これらの間葉系細胞の分化については不明である。catenin 類似分子 CTNNB1 (Catenin-like 1) は、細胞分化はもとより Wnt シグナルとの関連も不明であるが、本研究では CTNNB1 の Wnt シグナルと骨芽細胞・軟骨細胞分化の関わりを解析し、運動器医療の新たな分子標的として検証することを目的とした。CTNNB1 は、本邦で行われた後縦靭帯骨化症 (OPLL) における大規模のゲノムワイド関連解析 (GWAS) で明らかにされた (Nakajima M *et al*, *Nature Genet*, 2014)、候補遺伝子の 1 つである CDC5L を結合パートナーとすることが分かっている。骨芽細胞による膜性骨化に加えて、内軟骨性骨化においても重要な働きを担っている可能性が高い。従って CTNNB1 及び CDC5L が骨・軟骨代謝学及びその関連疾患 (骨粗鬆症や変形性関節症など) に与える影響も十分に予想される為、本研究は OPLL 病因との関係に加えて、軟骨・骨分化における機能を主な研究対象として、*in vitro* と *in vivo* の解析をもって検証し、運動器関連疾患分野にフィードバックする事を目指した。

3. 研究の方法

(1) 間葉系細胞の分化決定と成熟過程における CTNNB1 の機能解析

靭帯細胞のモデルとして線維芽細胞 NIH3T3、前駆軟骨細胞に C3H10T1/2、分化決定後軟骨細胞に ATDC5、前駆骨芽細胞として骨髄ストローマ細胞 ST-2、分化決定後骨芽細胞に MC3T3-E1 (clone 4) を準備した。siRNA は Dharmacon 社の同一遺伝子標的に対する独立した 4 種類の siRNA カクテルを使用し、その十分なノックダウン効率を RNA レベルと表現型で確認した。

過剰発現系は、Ctnnb1 siRNA は発現プラスミドを構築し検証した。

分化の方向と程度の評価は、それぞれの分化マーカーを qRT-PCR にて評価した。具体的には、線維芽細胞は *Col1a1* や *Col3a1* 等、軟骨細胞は、*Sox9*, *Col2a1*, *Acan*, *Col10a1*, *Mmp13* 等、骨芽細胞分化は *Runx2*, *Sp7*, *Col1a1*, *Alpl*, *Bsp*, *Osteocalcin* 等が検討項目となった。また、軟骨細胞分化は、アルシアン・ブルー染色で軟骨基質を、成熟石灰化は von Kossa 染色でも検出した。骨芽細胞分化は、ALP 染色で初期分化を、後期基質石灰化を von Kossa 染色で評価した。基質染色でマーカー発現との整合性を常にモニタリングすると共に、分化過程における CDC5L 自体の発現変化も追跡した。

(2) ヒト OPLL 組織における CDC5L の発現動態

OPLL 組織を中心にサンプリングした。

組織切片に対して CDC5L の免疫組織化学染色を行う。

4. 研究成果

CTNNB1 と CDC5L は複合体形成が指摘されているので、COS-7 細胞のトランスフェクション系における免疫沈降実験にて、CTNNB1 と CDC5L が確かに結合することを確認した。CTNNB1 は catenin と立体構造に相同性のある蛋白で、catenin は古典的 Wnt シグナルの重要な伝達因子であるが、CTNNB1 が WNT シグナルを調節する機能があるか不明である。そのため、Wnt/catenin 経路シフェラーゼ・レポーター (TOP/FOP flash) アッセイで確認すると、CTNNB1 は有意に活性を増強した。ウエスタンブロットで確認すると、CDC5L は CTNNB1 の蛋白量を抑えるという結果になった。古典的 Wnt シグナルは骨芽細胞分化に促進的で軟骨細胞分化選別に抑制的なことが分かっているが、ST-2 細胞において CDC5L は WNT 3A による骨芽細胞分化促進を抑制し、CTNNB1 はこれをキャンセルした。ただし CTNNB1 単独の効果は明らかではないため、Ctnnb1 siRNA を用いたノックダウン実験やプラスミドを用いた過剰発現系を骨芽細胞分化および軟骨細胞分化系における検討も行ったが、表現型の再現性に乏しく、CTNNB1 単独の機能評価は断念し、その結合パートナーである CDC5L の機能解析に方針を修正した。

後縦靭帯骨化症 (OPLL) は、靭帯が変性して内軟骨性骨化様のプロセスを経て骨化に至ることが指摘されているが、CDC5L は、OPLL 標本の II 型コラーゲンを産生する軟骨細胞様線維芽細胞

に発現を認め、*in vitro* では分化した ATDC5 軟骨細胞に発現していることを発見した。OPLL の変性した PLL 細胞における CDC5L の発現増加は、靭帯の表現型を排除し、軟骨内骨化を開始するための軟骨性の特性を割り当てて示唆していると考えられる。それ故 OPLL の予防や治療法としては、CDC5L の活性を阻害することで PLL の軟骨形成をなくすことが有効であると考えられる。

軟骨細胞に Cdc5l の siRNA を導入すると、初期の軟骨形成遺伝子である Sox9 と Col2a1 の発現が減少し、細胞培養物のアルシアン・ブルー染色の強度が低下した一方で、静止軟骨細胞マーカーである Pthrp の発現が増加した。Cdc5l shRNA を用いたノックダウン実験では、培養したマウス胚性中足骨軟骨の原基の成長が抑制された。また、Cdc5l のノックダウンは ATDC5 細胞の成長を抑制し、FACS 解析では細胞周期の G2/M 移行が阻害されていることが明らかになった。Cdc5l の siRNA は、G2/M 移行の阻害因子である Wee1 の発現を増強した。ヒト CDC5L の過剰発現または Wee1 遺伝子の siRNA によるノックダウンは、siCdc5l が媒介する ATDC5 細胞の成長阻害を逆転させた。

Cdc5l の機能獲得の影響を調べるために、アデノ随伴ウイルス (AAV) システムを用いてヒト CDC5L 遺伝子を過剰発現させた。ZsGreen タンパク質を発現させた AAV を感染させて、すべての血清型の AAV システムの感染効率を確認したところ、予想に反して、AAV-CDC5L は ATDC5 細胞の増殖を抑制した。細胞周期の乱れはしばしばアポトーシスを引き起こすことから、この状態ではアポトーシスの可能性と考えた。蛍光末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ DUTP ニックエンドラベリング (TUNEL) アッセイにより、CDC5L の強制発現が ATDC5 細胞のアポトーシスを大幅に誘導することがわかった。このアポトーシスは、Cdc5l siRNA を共存させると消失したことから、CDC5L が生理的レベルを超えて過剰に発現するとアポトーシスを引き起こすことが示唆された。そこで、機能獲得効果をさらに検討するために、レスキュー実験を計画した。siCdc5l を導入した細胞に AAV-CDC5L を感染させ、誘発された CDC5L タンパク質レベルが内因性 Cdc5l と同等であることをイムノプロットングで確認したところ、siCdc5l によって誘導された Wee1 タンパク質の増加は、AAV-CDC5L によって、タンパク質レベルと mRNA レベルの両方で抑制された。単純に過剰発現させた場合とは対照的に、AAV-CDC5L は Cdc5l をノックダウンした条件で細胞の成長を促進した。Cdc5l ノックダウンによる Wee1 の増加が細胞増殖にどのように関与しているかを調べるために、Wee1 siRNA を siCdc5l と共導入して ATDC5 細胞に投与した。AAV-CDC5L の効果と同様に、Wee1 の共同ノックダウンは、siCdc5l による細胞増殖抑制を部分的に回復させた。最後に、Cdc5l の siRNA は、ATDC5 細胞と初代軟骨細胞の両方において、Sox9 と Col2a1 遺伝子の mRNA スプライシング効率を低下させ、遺伝子の発現を抑制した。逆に、Cdc5l を欠損させると、Wee1 の mRNA のスプライシング効率が向上した。このように、Cdc5l は、軟骨内骨化プロセスを開始するために、軟骨形成遺伝子と Wee1 の mRNA のスプライシングを微調整することで、少なくとも部分的には、初期の軟骨形成と軟骨の成長の両方を促進することがわかった。

これらのことにより CDC5L は OPLL 骨化過程においてその最初の靭帯軟骨変性、または間質細胞や血管細胞の軟骨細胞分化に重要な役割を果たす骨化 initiator の可能性が示唆された。今回明らかになった CDC5L の機能に CTNBL1 がどのように関与していくかを、今後明らかにしていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yahiro Y, Maeda S, Morikawa M, Koinuma D, Jokoji G, Ijuin T, Komiya S, Kageyama R, Miyazono K, Taniguchi N.	4. 巻 8;32
2. 論文標題 BMP-induced Atoh8 attenuates osteoclastogenesis by suppressing Runx2 transcriptional activity and reducing the Rankl/Opg expression ratio in osteoblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone Research	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41413-020-00106-0.	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 城光寺豪、前田真吾、中島正宏、河村一郎、八尋雄平、富永博之、武富榮二、池川志郎、谷口昇
2. 発表標題 脊椎後縦靭帯骨化症原因候補遺伝子CDC5Lの機能解析
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城光寺豪、前田真吾、中島正宏、河村一郎、八尋雄平、富永博之、武富榮二、池川志郎、谷口昇
2. 発表標題 Role of a candidate causal gene of ossification of the posterior longitudinal ligament, CDC5L, in chondrocyte differentiation.
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城光寺豪、前田真吾、中島正宏、河村一郎、八尋雄平、富永博之、武富榮二、池川志郎、谷口昇
2. 発表標題 脊椎後縦靭帯骨化症原因候補遺伝子CDC5Lの機能解析.
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jokoji G, Maeda S, Nakajima M, Kawamura I, Yahiro Y, Tominaga H, Taketomi E, Taniguchi N.
2. 発表標題 Functional analysis of a candidate causal gene of ossification of the posterior longitudinal ligament, CDC5L.
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research 2019 Annual Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jokoji G, Maeda S, Nakajima M, Kawamura I, Yahiro Y, Tominaga H, Taketomi E, Taniguchi N.
2. 発表標題 CDC5L, a genetically associated gene of the Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament (OPLL), is expressed in OPLL to inhibit osteogenesis and promote chondrogenesis
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2020 Annual meeting. (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田真吾.
2. 発表標題 Examining cartilage metabolism in regard to TGF- /BMP signaling and spinal ligament ossification.
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Okawa A, Matsumoto M, Iwasaki M, Kawaguchi Y, Editors(pp39-46: Maeda S, Kawamura I, Tominaga H, Taniguchi N.)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 278
3. 書名 OPLL Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament. 3rd edition.	

〔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
研究分担者	前田 真吾 (Maeda Shingo) (60353463)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授 (17701)	
研究分担者	永野 聡 (Nagano Satoshi) (50373139)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	瀬戸口 啓夫 (Setoguchi Takao) (40423727)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	

	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
研究協力者	城光寺 豪 (Jokoji Go)	鹿児島大学整形外科	
研究協力者	八尋 雄平 (Yahiro Yuhei)	鹿児島大学整形外科	

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