

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592703

研究課題名(和文) プロテインホスファターゼ PP2A による新たな骨芽細胞分化機構の解明

研究課題名(英文) The role of protein phosphatase 2A in osteoblast differentiation and function

研究代表者

岡村 裕彦 (OKAMURA, Hirohiko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：20380024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：PP2A は細胞の分化・増殖やアポトーシスに関するセリン/スレオニンプロテインホスファターゼである。PP2Aは触媒サブユニット(PP2A C)を中心に三量体を形成し、様々な蛋白質の脱リン酸化に関与する。本研究では骨芽細胞の分化や機能におけるPP2A C の役割について、主にPP2A C 発現を特異的に抑制した骨芽細胞を樹立し解析を行った。PP2A C は、Osterixを含む骨関連因子の発現を介して骨形成および骨芽細胞の分化・石灰化能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 C は、破骨細胞分化誘導能に関与することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Serine/threonine protein phosphatase 2A (PP2A) regulates several physiological processes such as the cell cycle, cell growth, apoptosis, and signal transduction. PP2A consists of a structural A subunit, a regulatory B subunit, and a catalytic C subunit. In this study, we examined the expression and role of PP2A C in osteoblast differentiation and function. The expression and phosphatase activity of PP2A C was decreased in the initial step of osteoblast differentiation. To clarify the role of PP2A C in osteoblast differentiation, we established PP2A C-knockdown osteoblasts. Silencing of PP2A C dramatically increased osteoblast differentiation. Our study demonstrated that PP2A C plays important roles in the regulation of bone formation and osteoblast differentiation through the bone-related gene expressions. In addition, PP2A C expression in osteoblasts modulates osteoclastogenesis by controlling the expressions of RANKL and OPG.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：骨芽細胞 骨形成 骨代謝 プロテインホスファターゼ PP2A Osterix 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

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。しかし、骨芽細胞の分化における PP2A の役割についてはあまり注目されておらず、その機構はよく分かっていなかった。そのため、PP2A 発現を特異的に抑制または増加した骨芽細胞を作製し、骨芽細胞の分化に関わる因子や石灰化における役割について詳細に検討すること、破骨細胞の分化への影響や PP2A と相互作用する新たな因子の探索を行うことが必要であった。

2. 研究の目的

(1) 骨形成に対する PP2A の役割を *in vivo* において調べる。

生後 3 日目よりマウス頭蓋冠に PP2A 阻害剤であるオカダ酸 (OA) を投与し、マイクロ CT による骨形態・骨密度の解析を行う。また、摘出した頭蓋冠の凍結切片を作製し、各種染色を行う。骨形態・骨密度の変化をコントロールと比較し、骨形成に対する PP2A の機能を評価する。

(2) PP2A が骨関連遺伝子の発現および石灰化能に与える影響について調べる。

PP2A の発現・活性を抑制または増加した骨芽細胞を作製し、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を用いて骨関連因子の発現や転写活性能について調べる。さらに von Kossa 染色・Alizarin red 染色により石灰化に対する PP2A の役割を明らかにする。

(3) 骨芽細胞における PP2A 発現が破骨細胞分化に与える影響について調べる。

PP2A 発現を抑制または増加した骨芽細胞の培養上清を回収し、マウスより採取した血液系幹細胞に作用させる。TRAP 染色や分化マーカーの発現を指標に、破骨細胞分化への影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) 骨形成に対する PP2A の役割を *in vivo* において調べる。

マウス頭蓋冠部への PP2A 阻害剤投与

生後 3 日目からマウス頭蓋冠部皮下に OA (1 nM) を 2 週間連続して投与した。投与終了 6 日前と 2 日前には骨表層のラインをラベルする目的で、カルセインを注入した。カルセインは表層の組織内に取り込まれ、特定の波長の光で励起すると緑色蛍光を発した。

形成された頭蓋骨の骨量・骨密度の測定と評価

麻酔下で頭蓋冠を摘出し、マイクロ CT を用いて骨量・骨密度の測定を行った。さらに凍結切片を作製し、HE 染色とマッソン・トリクローム染色を行い、頭蓋骨の厚さと骨表面の骨芽細胞数を計測した。この結果から OA 処理の影響を調べて、*in vivo* での骨形成に対する PP2A の役割について検討した。蛍光顕微鏡下で凍結切片標本を観察しカルセイン標識された 2 本のライン間の距離を測定し、1 日に生じた骨添加量を評価した。

(2) PP2A が骨関連遺伝子の発現および石灰化能に与える影響について調べる。

PP2A の発現・活性を増加した骨芽細胞の構築

MC3T3-E1 細胞に PP2A 特異的 shRNA 発現ウイルスを用いて、PP2A の発現を恒常的に抑制する骨芽細胞を構築した。対照実験として PP2A の発現を増加させるため、PP2A 発現ウイルスベクターを作製した。薬剤選別で PP2A 発現が恒常的に高い細胞を構築し実験に用いた。

骨芽細胞分化マーカーの発現および石灰化能の評価

構築した細胞株を分化誘導培地で長期培養を行い、ALP 染色、von Kossa 染色および Alizarin red 染色により骨芽細胞の分化能・石灰化能を調べた。細胞から RNA を抽出し、Runx2, Osterix やタイプ I コラーゲンなどの骨分化マーカーの発現を調べ、コントロールの細胞と比較した。

(3) 骨芽細胞における PP2A 発現が破骨細胞分化に与える影響について調べる。

マウス骨髄からの細胞の採取

骨髄中には骨芽細胞と破骨細胞およびそれらの前駆細胞が存在し、互いに発生・分化に影響を与えている。この機構を調べるモデルとして PP2A 発現を抑制あるいは増加した骨芽細胞の培養上清と骨髄由来の血液系幹細胞を使って破骨細胞分化に与える影響について検討した。マウス長管骨より骨髄内の細胞を採取し、浮遊細胞を回収し、細胞を M-CSF 処理してディッシュに定着した細胞を実験に用いた。

破骨細胞分化マーカーの発現の検討

PP2A 発現を抑制または増加した骨芽細胞から回収した培養上清を骨髄由来の細胞に作用させ、TRAP 染色を用いて、破骨細胞分化

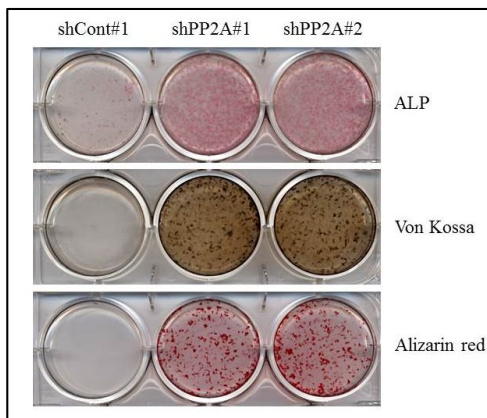
に与える影響について評価した。同様に処理した血液系幹細胞から RNA を回収し、リアルタイム PCR で破骨細胞の分化マーカーを調べた。TRAP 染色の結果と共に骨芽細胞の PP2A 発現と活性が破骨細胞の分化に及ぼす影響について評価した。

4. 研究成果

PP2A は細胞の分化・増殖やアポトーシスに關与する蛋白質脱リン酸化酵素である。PP2A は触媒サブユニット(PP2A C)を中心に三量体を形成し、様々な蛋白質の脱リン酸化に關与する。本研究では骨芽細胞の分化や機能における PP2A C の役割について調べた。その結果、**PP2A C は、Osterix を含む骨関連因子の発現を介して骨形成および骨芽細胞の分化・石灰化能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 C 発現は、破骨細胞分化誘導能に關与することが分かった。**

さらに、骨関連細胞特異的に PP2A C α の活性を抑制するトランスジェニックマウス およびコンディショナルノックアウトマウスを作製し、解析を続けている。得られた結果の詳細について以下に述べる。

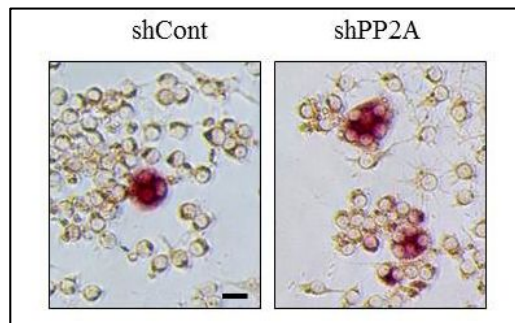
- (1) 生後 3 日よりマウス頭蓋部皮下に PP2A 阻害剤を連続投与し、頭蓋冠の骨密度・骨添加量をマイクロ CT とトリクロム染色により解析したところ、阻害剤投与群では頭蓋冠の骨密度・骨添加量が増加した。
- (2) 骨芽細胞分化の初期段階で PP2A C の発現と PP2A の活性が低下した。
- (3) shRNA により PP2A C の発現を抑制した MC3T3-E1 (shPP2A 細胞)を樹立した。shPP2A 細胞では骨に必須の転写調節因子 Osterix や石灰化に關与する因子 Bone sialoprotein および Osteocalcin 等の骨分化マーカーの発現が増加し、分化・石灰化能が亢進していた。



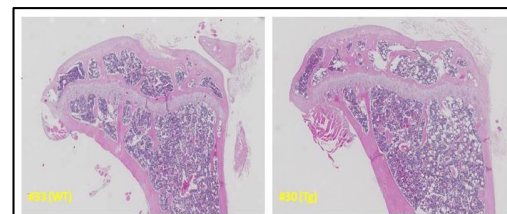
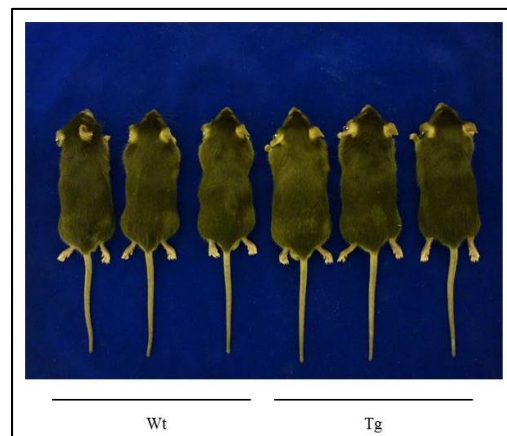
- (4) ルシフェラーゼアッセイの結果、shPP2A 細胞では、Osterix のプロモーター領域の活性が亢進していた。
- (5) shPP2A 細胞に Osterix に対する siRNA 導入を行い、Osterix の発現抑制したと

ころ、shPP2A 細胞の分化・石灰化能亢進が抑制された。

- (6) PP2A C を過剰発現させた骨芽細胞では、Osterix や石灰化に關与する因子 Bone sialoprotein および Osteocalcin 等の骨分化マーカーの発現が低下し、分化・石灰化能が低下していた。
- (7) PP2A C を過剰発現させた骨芽細胞に、Osterix を強発現すると、骨分化マーカーの発現が増加し、骨芽細胞分化能抑制が一部回復された。



- (8) shPP2A 細胞では破骨細胞誘導に重要な RANKL/OPG 発現の比が減少していた。
- (9) 骨髄由来の破骨細胞前駆細胞を shPP2A 細胞由来の上清で処理した群では、コントロールに比べて、分化誘導される破骨細胞数が有意に少なかった。
- (10) 骨芽細胞にドミナントネガティブ PP2A C を発現するトランスジェニックマウス(PP2A-Tg)のマイクロCT解析を行ったところ、PP2A-Tg マウスは、野生型に比べて体重・骨密度および皮質骨厚が増加していた。また、骨髄内の脂肪量の増加も認められた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8件)

Okamura H, Yang D, Yoshida K, Haneji T. Protein phosphatase 2A $C\alpha$ is involved in osteoclastogenesis by regulating RANKL and OPG expression in osteoblasts. 査読有 FEBS Letters, 587(1):48-53, 2013 DOI:

10.1016/j.febslet.2012.10.041.

Okamura H, Yoshida K, Yang D, Haneji T. Protein phosphatase 2A $C\alpha$ regulates osteoblast differentiation and the expressions of bone sialoprotein and osteocalcin via osterix transcription factor. 査読有 Journal of Cellular Physiology, 228(5):1031-1037, 2013 DOI: 10.1002/jcp.24250.

Yang D, Okamura H, Nakashima Y, Haneji T. Histone demethylase Jmjd3 regulates osteoblast differentiation via transcription factors Runx2 and osterix. 査読有 Journal of Biological Chemistry, 288(47):33530-33541, 2013 DOI: 10.1074/jbc.M113.497040.

Ishikawa M, Yoshida K, Okamura H, Ochiai K, Takamura H, Fujiwara N, Ozaki K. Oral porphyromonas gingivalis translocates to the liver and regulates hepatic glycogen synthesis through the Akt/GSK-3 signalling pathway. 査読有 Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1832(12):2035-2043, 2013 DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.07.012.

Yoshida K, Okamura H, Hoshino Y, Shono M, Yoshioka M, Hinode D, Yoshida H. Interaction between PKR and PACT mediated by LPS-inducible NF- κ B in human gingival cells. 査読有 Journal of Cellular Biochemistry 113(1): 165-173, 2012 DOI: 10.1002/jcb.23340.

Yoshida K, Okamura H, Ochiai K, Hoshino Y, Haneji T, Yoshioka M, Hinode D, Yoshida H. PKR plays a positive role in osteoblast differentiation by regulating GSK-3 β activity through a β -catenin-independent pathway. 査読有 Molecular and Cellular Endocrinology, 361(1-2):99-105, 2012 DOI:10.1016/j.mce.2012.03.019.

Okamura H, Yoshida K, Ochiai K, Haneji T. Reduction of Protein Phosphatase 2A $C\alpha$ enhances bone formation and osteoblast differentiation through the expression of bone-specific transcription factor Osterix. 査読有 Bone 49(3):368-375, 2011 DOI: 10.1016/j.bone.2011.06.004.

Susilowati H, Okamura H, Hirota K, Shono M, Yoshida K, Murakami K, Tabata A, Nagamune H, Haneji T, Miyake Y. Intermedilysin induces EGR-1 expression through calcineurin/ NFAT pathway in human cholangiocellular carcinoma cells. 査読有 Biochem Biophys Res Commun 404(1):57-61, 2011 DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.057.

〔学会発表〕(計 17件)

岡村裕彦, プロテインホスファターゼ PP2A は骨肉腫細胞の増殖を制御する 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014年3月27-29日, 自治医科大学キャンパス(栃木県)

楊諦, 他 Jumonji domain-containing 3 regulates osteoblast differentiation via Runx2 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014年3月27-29日, 自治医科大学キャンパス(栃木県)

岡村裕彦, プロテインホスファターゼ PP2A は骨芽細胞の分化と機能を調節する 日本解剖学会第68回中国・四国支部学術集会, 2013年10月19-20日, 鳥取大学医学部米子キャンパス(鳥取県)

Yang D, 他 Histone demethylase Jmjd3 regulates osteoblast differentiation via transcription factor Osterix. 日本解剖学会第68回中国・四国支部学術集会, 2013年10月19-20日, 鳥取大学医学部米子キャンパス(鳥取県)

阿久津純一, 他 骨芽細胞におけるプロテインホスファターゼ PP2A の新規標的因子的探索 日本解剖学会第68回中国・四国支部学術集会, 2013年10月19-20日, 鳥取大学医学部米子キャンパス(鳥取県)

岡村裕彦, PP2A C は Osterix を介して骨芽細胞分化を調節する 第55回歯科基礎医学会学術大会, 2013年9月20-22日, 岡山コンベンションセンター(岡山県)

Okamura H, PP2A $C\alpha$ regulates osteoblast differentiation and osteoclastogenesis through the expression of bone-related genes. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, 2013年5月28日-6月1日, Kobe International Conference Center & Kobe Portopia Hotel, (兵庫県)

岡村裕彦, 骨肉腫細胞の増殖における Protein phosphatase 2A の役割 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013年3月28-30日, サポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県)

Yang D, 他 The regulation of osteoblast differentiation by Jmjd3.

第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013 年 3 月 28-30 日, サポートホール高松・かがわ国際会議場 (香川県)
阿久津純一, 他 骨芽細胞におけるプロテインホスファターゼ PP2A の新たな標的因子の探索 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013 年 3 月 28-30 日, サポートホール高松・かがわ国際会議場 (香川県)

岡村裕彦, Protein phosphatase 2A は骨肉腫細胞の形態および増殖能を制御する。日本解剖学会第 67 回中国・四国支部学術集会, 2012 年 10 月 20-21 日, 山口大学医学部講義棟 C 第 3 講義室 (山口県)

Yang D, 他 Involvement of Jmjd3 in osteoblast differentiation. 日本解剖学会第 67 回中国・四国支部学術集会, 2012 年 10 月 20-21 日, 宇部市宇部市山口大学医学部講義棟 C 第 3 講義室 (山口県)

Okamura H, PP2A regulates osteoblast differentiation through the expression of bone-specific transcription factor Osterix. Cold Spring Harbor Asia Conference, 2012 年 6 月 11 日~15 日, Suzhou Dushu Lake Conference Center (China)

Yang D, 他 Involvement of Jmjd3 in osteoblast differentiation. Cold Spring Harbor Asia Conference, 2012 年 6 月 11 日-15 日, Suzhou Dushu Lake Conference Center (China)

岡村裕彦, Calcineurin regulates phosphorylation status of Osterix at Serine 73 site. 116th International Congress on Japanese association of Anatomists, 2011 年 東日本大震災のため、Web 上での発表

岡村裕彦, 骨芽細胞の分化における PP2A C α の新たな役割, 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 2011 年 10 月 2 日, 長良川国際会議場 (岐阜県)

吉田賀弥, ヒト歯肉において LPS は NF- κ B 経路依存的に PACT と PKR の結合を促進する。第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 2011 年 10 月 2 日, 長良川国際会議場 (岐阜県)

羽地 達次 (HANEJI, Tatsuji)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号: 50156379

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 裕彦 (OKAMURA, Hirohiko)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号: 20380024

(2) 研究分担者

吉田 賀弥 (YOSHIDA, Kaya)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師
研究者番号: 60363157