

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390450

研究課題名(和文) Cdk6転写ファクトリーの網羅的解析による骨代謝機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of bone metabolism controlled by Cdk6 transcription factory

研究代表者

小笠原 徹 (OGASAWARA, Toru)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20359623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、Cdk6転写ファクトリーを網羅的に解析することで、新たな視点から骨代謝制御メカニズムを解明し、骨再生医学への応用可能性を探ることを目的として企画された。マイクロアレイ解析ならびに次世代シーケンサーを利用したクロマチン免疫沈降シーケンスを統合したところ、Cdk6に制御されている可能性の高い遺伝子群には、タイプIコラーゲン、アルカリフォスファターゼ、BMPレセプター、Soxファミリー等の骨軟骨代謝関連遺伝子だけでなく、筋分化に関わるMyogeninや神経分化に関わるセマフォリンファミリーなどの多様な細胞プロセスにおいて重要な機能を果たす遺伝子も含まれていることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the mechanism(s) of bone metabolism controlled by Cdk6 transcription factory. DNA microarray analysis and ChIP-sequencing analysis revealed that Cdk6 regulate transcription of Type I collagen, Alkaline phosphatase, BMP receptors, Sox family, Myogenin and Semaphorins etc. In conclusion, the results of this study suggested that Cdk6 transcription factory regulate genes involving in bone metabolism and those functioning in other important cellular processes.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨代謝 細胞周期 クロマチン免疫沈降法 細胞分化 再生医学 ノックアウトマウス

### 1. 研究開始当初の背景

骨再生が必要な疾患を主要な治療対象とする口腔外科分野において、「いかに安全・効率的に骨を再生させるか」という問題はきわめて重要である。しかし、有用な骨粗鬆症治療薬であるビスフォスフォネート (BP) に顎骨壊死 (BRONJ) という深刻な副作用が指摘されるなど、従来行われてきた骨再生治療法にはいくつかの欠点がある。そこで、そうした欠点を改善する一つの方策として、われわれは生体内で自然に起こる骨形成・骨修復機転を再現・促進する治療法を開発することを着想した。そのためには、骨代謝メカニズムの正確な理解が必要であるというコンセプトの下に、われわれが骨代謝分野における重要性を世界に先駆けて報告してきた細胞周期制御分子 Cdk6 による骨関連遺伝子の転写制御解析を重要課題として認識するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究は、Cdk6 転写ファクトリーを網羅的に解析することで、新たな視点から骨代謝制御メカニズムを解明し、骨再生医学への応用可能性を探ることを目的として企画・遂行された。

### 3. 研究の方法

Cdk6 ノックアウトマウス由来骨系統細胞を利用して、Cdk6 欠損によって変動する遺伝子群をワイドスクリーニングした上で、マウス由来骨系統細胞を用いて *in vitro* における Cdk6 転写ファクトリーの構成要素・機能を網羅的に解析した。次いで、Cdk6 転写ファクトリーの骨形成への関与を検討することで、骨代謝メカニズムの解明および新規骨再生治療法開発に向けた基礎的検討を行った。これらの実験に当たっては、DNA マイクロアレイ、ChIP-seq 法、siRNA などの最新の手法を駆使した。

### 4. 研究成果

まず、Cdk6 ノックアウトマウス由来および同胞野生型マウス由来の骨芽細胞を用いて、Cdk6 遺伝子欠損によって変動する遺伝子群の解析を行った。我々の過去の研究成果に基づき、骨芽細胞培養開始 3 日と 21 日の時点で RNA サンプルを回収し、網羅的な解析を行うために同 RNA サンプルを用いたマイクロアレイ解析を実施した。

次に、マイクロアレイ解析によって発現変動が認められた遺伝子群の細胞内発現を定量 RT-PCR 法によって解析した。その結果、Cdk6 遺伝子欠損により、特徴的な変動パターンを示す遺伝子を複数同定した。特に、その変動パターンが二双性であるなど、興味深い変動パターンを呈した遺伝子については細胞内機能解析を行った。

Cdk6 に結合する転写因子群の網羅的探索を目的として、マウス由来骨芽細胞様細胞

MC3T3-E1 細胞を分化誘導する系を用いて、骨芽細胞内で Cdk6 と結合する分子の同定を行った。その結果、通常培養時と分化刺激培養時との間で Cdk6 との結合が変化する複数の分子 (転写因子、Cdk 制御サブユニット等) を同定した。これらの分子については細胞内機能解析に進み、細胞分化を促進する組み合わせだけではなく、逆に細胞分化を抑制する組み合わせがあることを突き止めた。

さらに、骨芽細胞分化過程における Cdk6 結合転写因子群のゲノム上での結合部位の同定を目的に通常培養時と分化刺激培養時の両条件下で、抗 Cdk6 抗体を用いたクロマチン免疫沈降シークエンスを行った。このシークエンスによって得られた塩基配列を参照配列へマッピングし、Cdk6 結合転写因子群が結合する可能性が高いエンリッチ領域数について、通常培養時では約 14000、分化刺激培養時では約 8000 の領域を検出した。このクロマチン免疫沈降シークエンスの結果とマイクロアレイ解析 (Cdk6 ノックアウトマウス由来および同胞野生型マウス由来の骨芽細胞間におけるマイクロアレイ解析) の結果を総合的に分析して、Cdk6 による転写制御を受けていると思われる遺伝子群の抽出作業を進めた。抽出された候補遺伝子としては、タイプ コラーゲン、アルカリフォスファターゼ、BMP レセプター、Sox ファミリー等の骨軟骨代謝関連遺伝子だけではなく、Myogenin やセマフォリンファミリーといった筋分化あるいは神経分化において重要な機能を有する遺伝子が挙げられ、これらの遺伝子が Cdk6 によって転写制御を受けている可能性を見出した。また、Cdk6 と複合体を形成する転写因子 Nanog が Runx1 と Runx3 の発現制御を介して間葉系細胞の骨分化能をコントロールしていることを報告した (Saito, Ogasawara et al. Cell Reprogram. 2015)。

以上の結果から、Cdk6 は骨軟骨分化に関連する遺伝子だけでなく、多様な細胞プロセスに関わる重要遺伝子の転写制御機能を有することが示唆された。今後は本研究の成果を発展させ、骨代謝メカニズムの解明を深めるとともに骨再生医学への臨床応用を実現すべく研究を継続する予定である。

### 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7件)

Saito T, Ohba S, Yano F, Seto I, Yonehara Y, Takato T, Ogasawara T (Corresponding author). Runx1 and Runx3 are downstream effectors of Nanog in the promoted osteogenic differentiation of the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2. Cell Reprogram. 2015 Jun;17(3):227-34.( 査読有)

DOI: 10.1089/cell.2014.0059.

Ogasawara T (Corresponding author).  
Cell cycle control factors and skeletal  
development. Jpn Dent Sci Rev. 2013  
May; 49(2):79-87. (査読有・招待有)  
DOI:10.1016/j.jdsr.2013.03.001

Ogasawara T (Corresponding author).  
Involvements of Runx2 with cell-cycle  
machinery in osteoblasts and skeletal  
development: A review of the literature.  
Hard Tissue. 2013 May ;2(3):29. (査読有・  
招待有)  
DOI:なし  
<http://www.oapublishinglondon.com/article/536>

Ogasawara T (Corresponding author),  
Ohba S, Yano F, Kawaguchi H, Chung UI,  
Saito T, Yonehara Y, Nakatsuka T, Mori Y,  
Takato T, Hoshi K. Nanog promotes  
osteogenic differentiation of the mouse  
mesenchymal cell line C3H10T1/2 by  
modulating bone morphogenetic protein  
(BMP) signaling. J Cell Physiol. 2013  
Jan;228(1):163-71. (査読有)  
DOI: 10.1002/jcp.24116.

[学会発表](計5件)

小笠原 徹 : Nanog の間葉系細胞骨分化  
能促進効果における Runx ファミリー  
(Runx1/2/3) の関与. 第 68 回 NPO 法人日  
本口腔科学会学術大会 京王プラザホテル  
(東京都新宿区) 2014 年 5 月 7 - 9 日

Ogasawara T, Saito T, Ohba S, Abe T,  
Yonehara Y, Takato T. :Runx1 and Runx3  
are downstream effectors of Nanog in the  
promoted osteogenic differentiation of  
mesenchymal cells. 2013 annual meeting of  
the American Society for Bone and Mineral  
Research, Baltimore, Maryland, USA,  
Baltimore Convention Center, October 6,  
2013.

小笠原 徹, 齋藤 忠仁, 大庭 伸介,  
米原 啓之, 星 和人, 高戸 毅 : Nanog  
の間葉系細胞骨分化能促進効果に  
関与する下流分子の網羅的探索. 第 12 回  
日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜  
会議センター (神奈川県横浜市) 2013 年  
3 月 21 - 23 日

小笠原 徹, 大庭 伸介, 矢野 文子,  
齋藤 忠仁, 瀬戸 一郎, 米原 啓之,  
森 良之, 星 和人, 高戸 毅 : Nanog  
の間葉系細胞骨分化能促進効果は  
BMP シグナルとの相互作用と NFATc1  
の誘導を介する. 第 57 回 (公社)  
日本口腔外科学会総会・学術集会パ

シフィコ横浜会議センター (神奈川県横浜  
市) 2012 年 10 月 19-21 日

[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]

アウトリーチ活動  
(招待講演)

小笠原 徹 : 骨系統細胞における細胞周期  
分子 Cdk6 の役割について. 平成 25 年度第 1  
回難治研大学院セミナー 聖マリアンナ  
医科大学 大学院附属研究所 難病治療研  
究センター (神奈川県川崎市) 2013 年 4 月  
12 日

小笠原 徹 : 細胞周期関連分子と骨代謝.  
東京医科大学先端医科学・特別講義 領域別  
講義 東京医科大学 (東京都新宿区)  
2013 年 6 月 13 日

ホームページ等  
東京大学医学部附属病院顎口腔外科・歯科矯  
正歯科ホームページ  
<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小笠原 徹 (OGASAWARA, Toru)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号 : 20359623

### (2) 研究分担者

筑田 博隆 (CHIKUDA, hirotaka)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号 : 30345219

緒方 直史 (OGATA, Naoshi)  
帝京大学・医学部・教授  
研究者番号：10361495

阿部 雅修 (ABE, Masanobu)  
東京大学・医学部附属病院・保健・健康推  
進部・講師  
研究者番号：10392333

藤原 夕子 (FUJIHARA, Yuko)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：50466744

茂呂 徹 (MORO, Toru)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：20302698

安部 貴大 (ABE, Takahiro)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：20383250

井口 隆人 (INOKUCHI, Takato)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80587775

川口 浩 (KAWAGUCHI, Hiroshi)  
東京大学・医学部附属病院・届出診療医  
研究者番号：40282660

(3)連携研究者

高戸 毅 (TAKATO, Tsuyoshi)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：90171454