

令和元年6月27日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11027

研究課題名(和文) 頭蓋顔面領域の硬組織形成に関わる多能性幹細胞系譜の解析

研究課題名(英文) Multiple regulation of skeletal formation

研究代表者

中島 和久 (Nakashima, Kazuhisa)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：90252692

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)：以下の3つの研究を行った。

1) Annexin5による骨筋結合部形成機構の解明：頭蓋骨と長管骨の靭帯・腱結合部は軟骨組織、骨組織が層状に重なる組織enthesesを形成する。Anxa5機能欠損マウスではenthesesの増大が認められた。2) Osterix(Osx)の転写活性化に関与する制御因子の解明：Sirt7が骨芽細胞分化に必須の転写因子Osxの活性化に関与することが判明した。この活性化はOsterix分子の化学修飾を介して行われていた。3) 破骨細胞の骨吸収を担当する多核細胞である。破骨細胞の前駆細胞にアデノウイルスでタンパク質を強制発現すると、前駆細胞の融合が阻害することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物の骨形成過程には内軟骨性骨形成と内膜性骨形成の2つの異なる過程がある。両過程において骨芽細胞が骨基質の産生と石灰化と骨基質を溶解する破骨細胞の分化を制御する。骨芽細胞と破骨細胞の機能的平衡状態が破綻すると、骨粗鬆症、骨硬化症あるいは癌細胞の骨転移などの骨格病変を引き起こす。加えて、骨組織は靭帯と腱組織により筋肉組織と結合することにより機能的な動きを獲得して生理的な役割を果たす。本研究では骨芽細胞分化とenthesesの発達、並びに破骨細胞分化の制御機構に焦点を当てており、新たな知見を得た。この応用を目指すことによって、骨格と筋組織の調和のとれた成長とその障害が解明されると期待できる。

研究成果の概要(英文)：1) Annexin A5 (Anxa5) plays a critical role in the regulation of bone ridge outgrowth at entheses. The sizes of bone ridges at the entheses of the long bones were increased in Anxa5 null mice. 8 weeks after hindlimb unloading, Anxa5 null mice showed a decrease in bone overgrowth to similar extents to wild-type mice, suggesting that Anxa5 regulates biological responses to mechanical forces. 2) Osterix (Osx) is a transcription factor that is necessary for osteoblast differentiation. Sirt7 null mice developed osteopenia characterized by decreased bone formation. Interaction of SIRT7 with OSX through C-terminal region results in activation of OSX activity. 3) Adenovirus-mediated gene transduction to osteoclast precursors inhibited osteoclast formation in vitro. Adenoviruses without a protein coding cDNA did not affect osteoclast formation, suggesting that modification protein production in osteoclast precursors has a negative impact on osteoclast formation.

研究分野：分子生物学

キーワード：骨芽細胞 破骨細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の骨形成過程には内軟骨性骨形成と内膜性骨形成の2つの異なる過程がある。両過程において骨芽細胞が骨基質の産生と石灰化を担う。加えて骨芽細胞は骨基質を溶解する破骨細胞の分化を制御する。骨芽細胞と破骨細胞の機能的平衡状態が破綻すると、骨粗鬆症、骨硬化症あるいは癌細胞の骨転移などの骨格病変を引き起こす。従って、骨芽細胞は脊椎動物の骨形成と骨代謝の制御に中心的な役割を果たす細胞である。加えて、骨は靭帯・腱組織を介して筋肉組織に結合して運動が可能となることにより生理機能を発揮できる。この骨格組織と靭帯・腱組織との結合のメカニズムの全貌は明らかではない。

2. 研究の目的

当初は骨格組織形成に関わる神経組織の関与を追求する研究計画を立てていたが、骨格組織形成過程での神経組織侵入過程と、グリア細胞での *Osx* の発現を同定することが困難であった。そこで骨格組織形成の過程における、靭帯・腱組織との結合部位の解析、*Osx* の活性調節機構、並びに破骨細胞分化機構の解析を行った。

(1) Annexin はカルシウム依存性のリン脂質結合タンパクで、フォスファチジルセリンと高い親和性で結合する。細胞死に際してはフォスファチジルセリンが細胞表面に露出するために、annexin の結合は細胞死の目安として用いられるが、その生理的機能は不明な点が多い。*Anxa5*^{-/-}マウスでは長管骨の表現系は軽微であると報告されているが、*enthesis* での表現系を追求した。

(2) マウス *Osx* は N 末端に転写活性化領域を持ち、*Osx* の転写活性化能は Sp3 や Klf4 などと比べて弱い。骨芽細胞の分化制御には *Osx* の機能が質的に変動することが必要であり、その質的変動は *Osx* の N 末端転写活性化領域を介したタンパク質相互作用に依存すると考えられる。*Osx* の活性化機構を追求する。

(3) 破骨細胞は血球系の単核前駆細胞の融合によって分化する。この分化の過程でアデノウイルスによる遺伝子導入を行うと、細胞分化と融合が阻害することを見出した。この遺伝子導入による破骨細胞分化の阻害機構を追求する。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスと *Anxa5* 欠損マウスを飼育して、長管骨と頭蓋骨の形態を μ CT で解析した。*Enthesis* の形成に対する筋肉活動の影響を観察するために、マウスを尾部懸垂状態で飼育したのちに μ CT で解析した。

(2) 野生型マウスと *Sirt7* 欠損マウスを飼育して、長管骨と頭蓋骨の形態を μ CT で解析した。*Osx* の転写活性化領域の Gal4 融合タンパク質と Gal4 結合領域を持つレポーターを作成して転写活性を測定した。*Osx* の変異転写活性化領域を持つ Gal4 融合タンパク質の共発現により *Sirt7* による活性化能を解析した。

(3) 単離したマウス骨髄細胞を M-CSF 存在下で維持した。RANKL で刺激し分化誘導する 2 4 時間前あるいは 2 4 時間後にアデノウイルスを感染させた。外来性 cDNA を含まないアデノウイルス (Ad-null)、Cre-recombinase (Ad-Cre)、GFP (Ad-GFP)、beta-galactosidase (Ad-LacZ) を細胞培養液に添加して 3 時間培養したのちに培地を交換した。

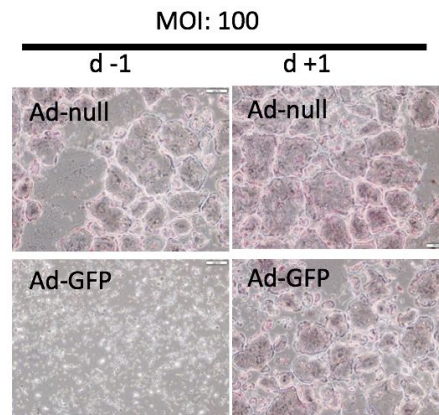
4. 研究成果

(1) *Anxa5*^{-/-}の骨と腱・靭帯付着部において野生型に比べて特異的に皮質骨面積が増大した。*Enthesis* は、腱と骨の間に線維軟骨が介在する線維軟骨性の付着と、これらが介在しない線維性の付着に分類される。線維軟骨性 *enthesis* では、野生型に比べて特異的な皮質骨の増大が認められた。一方、線維性 *enthesis* では皮質骨の増大は顕著ではなかった。組織学的解析の結果、腓腹筋と脛骨の付着部において線維軟骨層の増大を認めた。この軟骨層には、野生型と比べてアルカリフォスファターゼ活性の強い細胞がより多く観察された。また、カルセイン標識の結果、これらの細胞が *enthesis* における石灰化に寄与することが示された。一方、TRAP 陽性細胞の数や分布に顕著な差は認められなかった。これらの結果は、*Anxa5* が腱・靭帯付着部の石灰化に対し抑制的に調節する可能性を示唆する。

(2) Sirtuin は、NAD 依存性の脱アセチル化酵素である。Sirtuin ファミリーの1つである *Sirt7* を欠損したマウスでは骨形成が低下し、骨粗鬆症様の病態を示した。*Sirt7* の機能を追求するために、*Osx* と Gal4 融合タンパク質と Gal4 結合領域を持つレポーターを作成して転写活性を利用した。全長 *Osx* を含む Gal4 融合タンパク質の転写活性は *Sirt7* 欠損骨芽細胞より野生型細胞で優位に亢進した。*Osx* 転写活性化領域を含む Gal4 融合タンパク質に比べて転写活性化能は弱い、*Sirt7* はこの転写活性を促進した。*Sirt7* と *Osx* は直接に結合して、その結合は *Osx* の

zinc finger 領域を介していた。骨芽細胞の分化に必須な遺伝子の働きを調節する因子 Osx の活性化には、脱アセチル化酵素 SIRT7 が必要であることが判明した。

(3) 単離したマウス骨髄細胞を M-CSF 存在下で維持したのちに、アデノウイルスを感染させた。外来性 cDNA を含まないアデノウイルス(Ad-null)、Cre-recombinase(Ad-Cre)、GFP(Ad-GFP)、beta-galactosidase (Ad-LacZ)をそれぞれ感染させ、ウイルス感染から 24 時間後に RANKL で刺激し分化誘導した。非感染細胞と、Ad-null 感染細胞は TRAP 陽性細胞に分化した後に細胞融合を示した(右図)。Ad-Cre、Ad-GFP、Ad-LacZ 感染では、いずれも TRAP 陽性細胞は出現するものの、感染ウイルス量の増加に伴い細胞融合が阻害されて、多核細胞数は減少した。一方、より後のステージすなわち RANKL 刺激 24 時間後にアデノウイルスを感染させると、どのウイルス感染細胞も細胞融合を示して、TRAP 陽性の多核細胞が出現した(右図)。破骨細胞分化を抑制する IRF8 の発現はウイルス感染で変化しなかった。以上の結果は、細胞融合が始まる以前にタンパク質合成が促進すると破骨細胞の細胞融合阻害が起こること、しかも外来性タンパク質の種類には関係なくタンパク質合成の量に依存して抑制が起きることを示している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Fukuda M, Yoshizawa T, Karim MF, Sobuz SU, Korogi W, Kobayasi D, Okanishi H, Tasaki M, Ono K, Sawa T, Sato Y, Chirifu M, Masuda T, Nakamura T, Tanoue H1, Nakashima K, Kobashigawa Y, Morioka H, Bober E, Ohtsuki S, Yamagata Y, Ando Y, Oike Y, Araki N, Takeda S, Mizuta H, Yamagata K. SIRT7 has a critical role in bone formation by regulating lysine acylation of SP7/Osterix. *Nat Commun.* 2018 Jul 19;9(1):2833. DOI: 10.1038/s41467-018-05187-4. (査読あり)

Shimada A, Ideno H, Arai Y, Komatsu K, Wada S, Yamashita T, Amizuka N, Pöschl E, Brachvogel B, Nakamura Y, Nakashima K, Mizukami H, Ezura Y, Nifuji A. Annexin A5 involvement in bone overgrowth at the enthesis. *J Bone Miner Res.* 2018 Apr 25. doi: 10.1002/jbmr.3453. (査読あり)

Kamiunten T, Ideno H, Shimada A, Arai Y, Terashima T, Tomooka Y, Nakamura Y, Nakashima K, Kimura H, Shinkai Y, Tachibana M, Nifuji A. Essential roles of G9a in cell proliferation and differentiation during tooth development. *Exp Cell Res.* 2017 Aug 15;357(2):202-210. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.05.016. (査読あり)

Komatsu K, Shibata T, Shimada A, Ideno H, Nakashima K, Tabata Y, Nifuji A. Cationized gelatin hydrogels mixed with plasmid DNA induce stronger and more sustained gene expression than atelocollagen at calvarial bone defects in vivo. *J Biomater Sci Polym Ed.* 27(5) 419-430, (2016) DOI: 10.1080/09205063.2016.1139486. (査読あり)

Ideno H, Nakashima K, and Nifuji A. Roles of the histone methyltransferase G9a in the development and differentiation of mesenchymal tissues. *J Phys Fitness Sports Med.* 4(5): 357-362 (2015) DOI: 10.7600/jpfsm.4.357JPFSM. (査読あり)

〔学会発表〕(計31件)

中島和久、小松浩一郎、出野 尚、山下照仁、宇田川信之、二藤 彰 タンパク質の過剰発現は破骨細胞前駆細胞の融合を抑制する 第41回日本分子生物学会年会、2018年11月30日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

出野 尚、小松浩一郎、中島和久、新井嘉則、立花 誠、木村 宏、二藤 彰 ヒストンメチル化酵素 G9a による骨芽細胞分化における Runx2 の転写活性化能の制御 Regulation of Runx2 function by the histone methyltransferase G9a during osteoblastic differentiation 第41回日本分子生物学会年会、2018年11月30日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市) Hisashi Ideno, Yoshinori Arai, Koichiro Komatsu, Kazuhisa Nakashima, Satoshi Wada, Teruhito Yamashita, Ernst Pöschl, Bent Brachvogel, Yoichi Ezura, Akira Nifuji Annexin A5 prevents force-mediated bone ridge overgrowth at the enthesis ASBMR2018 annual meeting, September 28 - October 1 2018, Montreal, Quebec, Canada

小松浩一郎、出野 尚、中島和久、山下照仁、宇田川信之、二藤 彰 ヒストンメチル化酵素 G9a の破骨細胞分化制御への関与 第60回歯科基礎医学会学術大会、平成30年(2018年)9月6日、九州大学病院キャンパス 百年講堂

Hisashi Ideno, Koichiro Komatsu, Kazuhisa Nakashima, Yoshinori Arai, Yoichi Ezura, and Akira Nifuji Annexin A5 は細胞特異的な pyrophosphate 制御分子の調節を介し、筋張力

誘導性の腱・靭帯付着部 (enthesis) 石灰化を抑制する 第 36 回日本骨代謝学会学術集会
2018 年 7 月 26 日 (木) ~ 7 月 28 日 (土) 長崎ブリックホール (長崎県、長崎市)

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：二藤 彰
ローマ字氏名：NIFUJI, Akira
所属研究機関名：鶴見大学
部局名：歯学部
職名：教授
研究者番号 (8 桁)：00240747

研究分担者氏名：出野 尚
ローマ字氏名：IDENO, Hisashi
所属研究機関名：鶴見大学
部局名：歯学部
職名：助教
研究者番号 (8 桁)：40435699

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。