

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07077

研究課題名(和文) 骨系細胞分化と炎症性疾患でのリソソーム転写因子の役割

研究課題名(英文) Roles of a lysosomal transcription factor in osteoblast differentiation and inflammatory diseases

研究代表者

米嶋 枝里香 (YONESHIMA, Erika)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：20779566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞は骨基質合成を活発に行うため、分解系であるリソソームの機能は殆ど解析されていなかった。そこで本研究ではTFEB発現変化による骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化への影響を解析した。TFEBをノックダウンすると骨芽細胞の分化は抑制され、逆にTFEBを過剰に発現させると骨芽細胞の分化は促進した。その際に、小胞体ストレス応答に關与するATF4及びCHOPが負の制御を行っていることも見出した。これらの知見からTFEBは骨芽細胞分化で発生する小胞体ストレスの緩和に必要な因子と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Since osteoblasts actively synthesize bone matrix, the function of lysosome, which is a degradation system, has hardly been analyzed. Therefore, in this study, the effects of TFEB expression change on osteoblast, adipocyte and chondrocyte differentiation was analyzed. Knock down of TFEB suppressed osteoblast differentiation, whereas overexpression of TFEB promoted it. We also found that ATF4 and CHOP involved in the endoplasmic reticulum stress response undergo the negative control of the differentiation. From these findings, TFEB is considered to be a necessary factor for alleviating endoplasmic reticulum stress caused by osteoblast differentiation.

研究分野：歯学矯正学

キーワード：骨系細胞分化 リソソーム転写因子

1. 研究開始当初の背景

骨組織は骨分解に關与する破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞が存在する。破骨細胞はマクロファージ系の細胞から分化してリソソーム酵素を分泌して骨吸収する。一方、骨芽細胞は未分化間葉系細胞から分化し、骨基質を形成するのに必要なタンパク質合成を活発に行う。骨芽細胞に關する研究は、Runx2 や Osterix など分化因子同定や分泌タンパク質などに焦点が置かれてきた。骨芽細胞においてタンパク質合成にのみ焦点が当てられ、タンパク質分解系であるリソソームの機能は殆ど解析されていなかった。

我々はこれまで長年に亘り、エンドソーム・リソソーム機能を解析している経験から、骨芽細胞にもリソソーム機能が必要不可欠なのではないかと考えた。そして骨芽細胞の分化にも關与する可能性について検討した。

2. 研究の目的

骨芽細胞は骨基質合成を活発に行うため、分解系であるリソソームの機能は殆ど解析されていなかった。最近我々の研究グループは骨芽細胞分化にはリソソーム機能のマスター転写因子 TFEB の発現増大が必要不可欠であることを見出した。そこで本研究ではリソソーム機能と細胞分化との關連について詳細に解析し、さらに細胞分化過程における炎症機構について解析する。細胞分化過程で炎症が惹起すると細胞分化を促進するという説と細胞死を誘導する説があり、結論が出ていない。このように本研究は細胞分化と炎症という2つのイベントを統合的にリソソームという新しい切り口から解析する。この分子機構の解明は骨代謝疾患と生活習慣病など、これまで研究されなかった新しい分子基盤の構築に繋がる可能性がある。

3. 研究の方法

TFEB は骨芽細胞、脂肪細胞や軟骨細胞の分化にも關与する可能性がある

最近リソソームの新しい機能として、低栄養状態と富栄養状態を認識して、種々のシグナルを発することが知られている。リソソーム内の低いアミノ酸レベルを認識する V-ATPase は、Rag タンパク質を経由して、栄養センサーである mTORC1 へとシグナルが伝達し遊離状態となる。この時に TFEB が遊離して核内で転写され活性化する。しかし、富栄養状態では mTORC1 は活性化したままで Rag と複合体を形成する。この状態では TFEB の転写は起こらない。未分化間葉系細胞は骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞へ分化すること、さらに富栄養状態が続くと骨芽細胞が減少し、脂肪細胞が増加することを考えれば、TFEB が制御するリソソームの富栄養と低栄養状態の認識機構が直接的に骨芽細胞と脂肪細胞の分化誘導に關与するのではないかと考えられた。栄養センサーとして機能するリソソームは、骨芽細胞と脂肪細胞の分化の

運命を決定する可能性がある。

(1) TFEB 発現変化による骨芽細胞への分化への影響

骨芽細胞前駆細胞であるマウス頭蓋冠由来の MC3T3-E1 cell に分化誘導試薬を添加し、骨芽細胞様細胞へと分化させた。分化成熟過程においてリソソームの關連遺伝子群が発現上昇しているか、同時にリソソーム機能を促進する転写因子 TFEB についても分化誘導時からの発現レベルの変化を定量した。分化誘導時に TFEB の発現の上昇を認めれば、分化誘導前から TFEB に対する低分子干渉 RNA (siRNA) 法を用いた遺伝子ノックダウン実験により発現レベルを低下させた後、正常細胞と比較した。また TFEB にベクターを発現させて、過剰発現細胞を作製し、正常細胞と比較した。

解析方法として、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性染色法、定量性 real-time PCR 解析、蛍光顕微鏡解析、Western blot 解析を行った。

(2) TFEB 発現変化による脂肪細胞への分化への影響

TFEB の過剰発現細胞を用いてマウス胎仔由来の線維芽細胞 3T3-L1 あるいは骨髄細胞を脂肪細胞と分化誘導した。分化誘導試薬 (インシュリン・3- イソブチル-1- メチルキサンチン・デキサメタゾン) および分化培地を用意した。(血清を含む DMEM 培地 10 ml に対し添加試薬 インシュリン 100 μ l とデキサメタゾン 50 μ l と イソブチルメチルキサンチン 10 μ l を添加した) 2. 100 % コンフルエンス状態になった 2 日後に分化培地に交換し、48 時間 (2 日) 培養した。3. 分化培地を除去した後、必要であれば維持培地 (血清を含む DMEM 培地 10 ml に対し添加試薬 (4) インシュリン 100 μ l 添加) に交換して 5 ~ 10 日間培養した。

(3) TFEB 発現変化による軟骨細胞への分化への影響

ラット鼻中隔軟骨から分離した初代軟骨細胞を用いた。本細胞にアデノウイルスベクターを用いて TFEB を発現させる実験系を確立した。成熟軟骨細胞は、コラーゲン Type II、IX、XI やプロテオグリカンなどの細胞外マトリクスを産生した。軟骨細胞の細胞外マトリクスを染色する Alcian Blue によって分化の程度を比較した。またリアルタイム PCR 法によって軟骨細胞分化マーカーである ALP、Col2、Col10、1、VEGF、MMPs を用いて過剰発現細胞はマーカー遺伝子のレベルが増大していることを確認した。

4. 研究成果

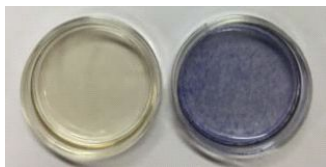
(1) TFEB 過剰発現による骨芽細胞への分化への影響

骨芽細胞前駆細胞 (MC3T3-E1) に骨芽細胞への分化誘導刺激を行ったところ、リソソーム

の関連遺伝子群（カテプシン B, カテプシン D, Rab5 及び Rab 7）および TFEB の発現上昇を認めた。

TFEB に対する遺伝子ノックダウン実験により、TFEB 発現レベルが 13%にまで低下していることを確認した。正常細胞と比較したところ、TFEB 遺伝子ノックダウン細胞では、アルカリフォスファターゼ（ALP）活性染色では活性の低下を呈した。また real-time PCR 解析により、骨芽細胞分化マーカー（ALP、Osteocalcin, Collagen 1A, Runx2, Osterix, Osteopontin, RANKL）の発現レベルの有意な減少を認めた。

TFEB の過剰発現細胞の実験により、TFEB の発現レベルはコントロールと比べ約 1.8 倍に上昇していた。コントロール細胞と過剰発現細胞に分化誘導試薬を添加したところ、TFEB 過剰発現細胞では ALP 活性染色では強い活性を示し、real time PCR で各種骨芽分化マーカーにおいても発現の有意な増加を認めた。



コントロール TFEB遺伝子発現

図1：コントロール細胞と TFEB 過剰発現による ALP 活性染色

興味深いことに、分化誘導試薬を添加せずに分化成熟度を比較したところ、TFEB 過剰発現群はコントロール群に比べ、ALP 活性染色で強い活性を示し（図1参照）、real-time PCR で各種分化マーカーにおいても発現の有意な増加を認めた（図2参照）。

分化誘導が遅延した TFEB 遺伝子ノックダウン群では細胞にどのような変化が起きているのかを調べるために活性酸素種（ROS）の吸光度測定、細胞内のミトコンドリアにおける活性酸素種の生成(MitoSOX)・アポトーシスの有無(AnnexinV: 細胞膜におけるアポトーシスの指標)について蛍光染色を行った。TFEB 遺伝子ノックダウン群ではROSの産生は増加し、ミトコンドリアの酸化ストレスは増大し、アポトーシスの初期段階が起きていることが示された。

TFEB 遺伝子ノックダウン群において、各種ストレス応答因子について解析したところ、小胞体ストレス応答に關与する ATF4 および CHOP の発現の増大を認めた。分化誘導試薬未使用下において、TFEB 遺伝子ノックダウン群および TFEB 過剰発現群における ATF4, CHOP の発現をコントロール群と比較すると、TFEB 遺伝子ノックダウン群では ATF4, CHOP の発現は有意に増加し、TFEB 過剰発現群では ATF4, CHOP の発現は有意に減少していた。

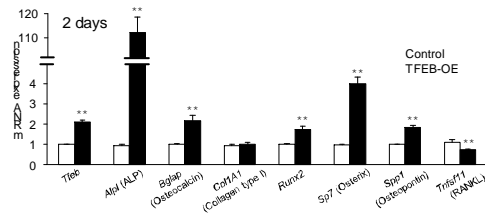


図2：骨芽細胞誘導後2日後による各種分化マーカーの発現変化

これらの結果からリソソーム遺伝子群を制御する TFEB は骨芽細胞の分化過程に必要不可欠であることを見出した。実際 TFEB をノックダウンすると骨芽細胞の分化は抑制され、逆に TFEB を過剰に発現させると骨芽細胞の分化は促進した。その際に、小胞体ストレス応答に關与する ATF4 及び CHOP が負の制御を行っていることも見出した。これらの知見から、TFEB は骨芽細胞分化で発生する小胞体ストレスの緩和に必要な因子と考えられる。骨芽細胞は、分化過程で多量のタンパク質合成を行うが、その過程で凝集したタンパク質の蓄積も起こす。骨芽細胞の分化成熟には、この凝集タンパク質をオートファジー・リソソーム系で分解する必要がある。従って、この分解系を阻害すれば、ATF4/CHOP が關与する小胞体ストレスが発生し、これが骨芽細胞分化を遅延する可能性が考えられる。逆にこの分解系を促進すると、小胞体ストレスの軽減と分化成熟の促進に繋がると予想される。（図3参照）本研究により、骨芽細胞分化を制御する因子としての TFEB の同定は、骨疾患の新たな治療法の開発の一助となると思われる。

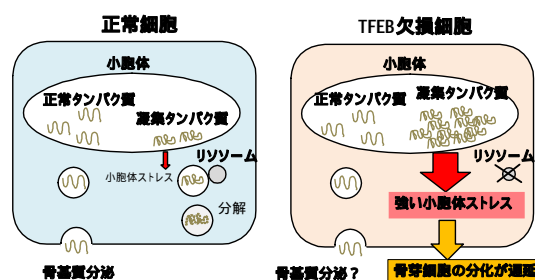


図3：TFEB と骨芽細胞分化の作業仮説

(2) TFEB 過剰発現による脂肪細胞への分化への影響

3T3-L1 を用いて 10 日後、オイルレッド O を用いて脂肪細胞へ誘導した。コントロール細胞と比較して、TFEB 過剰発現細胞はより早く脂肪細胞へ分化することが分かった。逆に TFEB ノックダウン細胞は脂肪細胞へ分化する速度は遅くなることが分かった。また real time PCR で脂肪細胞の各種分化マーカーにおいても発現の有意な増加を認めた。現在、siRNA による TFEB ノックダウン細胞の樹立と

マウス胎仔由来の線維芽細胞でも同様の実験を行っている。

(3)TFEB 発現変化による軟骨細胞への分化への影響

アデノウイルスベクターを用いたコントロール細胞と TFEB を発現させた細胞とを比較した。Alcian Blue によって分化の程度を比較したところ、TFEB 過剰発現細胞では強い活性を示した。さらに過剰発現細胞では分化後のコラーゲン Ⅱ型、硫酸化プロテオグリカンの産生量も増大していた。今後は更に詳細なメカニズムを解析する予定である。

本研究を遂行するために長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・歯科矯正学分野の吉田教明教授にご指導とご援助を頂きました。さらに実際の研究では歯科薬理学分野の筑波隆幸教授、坂井詠子助教並びに岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・歯科薬理学分野の岡元邦彰教授にご指導いただきました。以上の先生方に深く感謝いたします。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Yoneshima E, Okamoto K, Sakai E, Nishishita K, Yoshida N, Tsukuba T.: The transcription factor EB (TFEB) regulates osteoblast differentiation through ATF4/CHOP-dependent pathway. J Cell. Physiol. (2016) 231, 1321-1333 査読有

〔学会発表〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

米嶋 枝里香 (YONESHIMA, Erika)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：20779566

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし