

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17322

研究課題名(和文)内軟骨骨化の過程におけるKLF4の役割の解析

研究課題名(英文)Analysis of the role of KLF4 in the process of endochondral osteogenesis

研究代表者

竹内 優斗 (Takeuchi, Yuto)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60721454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本申請では、骨格系の正常発生、恒常性の維持に関与することが最近報告された転写因子であるKLF4が正常な内軟骨骨化に重要な役割を持つと仮説を立てて研究を行った。内軟骨骨化の過程では、軟骨成長板の肥大化軟骨細胞層で強く発現するMMP13がその進行に必須の役割を持つ。本研究では、KLF4によりMMP13のmRNAの分解が抑制されることでMMP13の発現レベルが上昇し、正常な内軟骨骨化を進行させることが示唆された。さらに、骨芽細胞での新たなKLF4による分化制御メカニズムとして、KLF4が一次繊毛におけるヘッジホッグシグナルを抑制し、そしてそのことを介して骨芽細胞の分化を抑制している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの骨格の大部分は、内軟骨骨化の過程で発生する。骨格に形態・性状異常を認める疾患は比較的多く、先天的な発生異常を示すものや後天的に骨の恒常性維持機構の破綻によるものなど多岐にわたる。手足の骨や関節は日常生活で最も使用される部位の一つであり、その異常は日々の動作に対して著しく大きな影響を与えることが容易に想定される。KLF4が内軟骨骨化の過程において果たす役割を解明することで、KLF4は骨格に異常をきたす疾患に対する創薬のターゲットとなりえる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Based on various preliminary observations, I hypothesized that, a transcription factor, KLF4, play important roles during chondrocyte development and homeostasis. I initially precisely determined the protein localization site of KLF4 during endochondral ossification. KLF4 localized to the cells of prehypertrophic and hypertrophic zone. At embryonic stage, KLF4 was localized to articular chondrocytes but its expression diminished as joint matured. We showed that KLF4 strongly induces Mmp13 expression and protein level in chondrocytes. This upregulation of Mmp13 mRNA level was not due to increased rate of transcription, but due to decreased mRNA decay. We further found that KLF4 regulates primary cilia function in osteoblasts, another skeletal cells those play important roles for skeletal development and homeostasis. Through regulation of the primary cilium function, KLF4 modulated the Hedgehog signaling, and consequently osteoblast differentiation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：骨・軟骨 シグナル伝達

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

1. 研究開始当初の背景

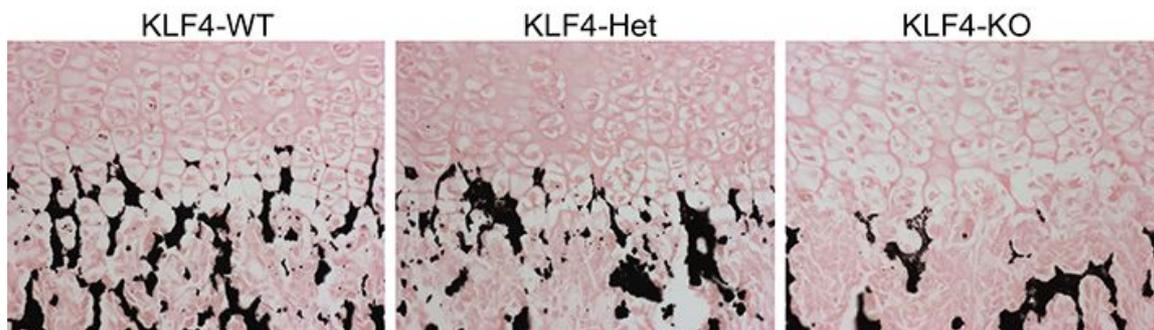
四肢、頭蓋底、椎骨など大部分のヒトの骨は内軟骨骨化の過程で発生する。この過程ではまず未分化な間葉系細胞の一部が周囲の細胞外基質や分泌因子の作用を受けて、間葉系細胞とは組織学的に全く異なる形態の軟骨細胞に分化する。この時の軟骨細胞は隣り合う軟骨細胞同士がまるで上皮の細胞のように隙間なく近接し、軟骨のテリトリーを確保する。次に軟骨細胞は増殖すると同時に大量の軟骨特有の細胞外基質（型コラーゲン、プロテオグリカン）を産生する。この軟骨の鑄型中には、はじめ血管の侵入は見られず低酸素状態であるため、拡散してくる栄養もしくは細胞自身の解糖系によりエネルギーを確保している。軟骨の鑄型の中央部分の細胞が肥大化の過程に入り、肥大化した軟骨細胞の周囲の基質が石灰化する。その後、血管とともに破骨細胞が石灰化した軟骨の鑄型に侵入し、骨芽細胞とともに一次骨化中心を形成する。軟骨の鑄型内にできた一次骨化中心は骨髄となり、造血やリンパ器官として重要な役割を担うことになる。この一連の内軟骨骨化の過程はアクセルとブレーキを担う多くの分子の協力のもと遂行されることになるが、いまだに完全な分子メカニズムの解明には至っていない。特に、軟骨鑄型内の細胞が10倍以上に肥大化する過程の開始するメカニズムに関する分子の同定はいまだ数少ない。

KLF4はzinc fingerタイプの転写因子で体表や腸管上皮で顕著に発現が見られることが知られていた(Shields et al., 1996, Ton-That et al., 1997)。また、最近骨芽細胞に発現するKLF4が骨芽細胞を未分化な状態に維持することや、間接的に破骨細胞分化を制御することが報告された(Michikami et al., 2012, Kim et al., 2014, Fujikawa et al., 2014)。申請者は内軟骨骨化の過程でKLF4の発現する可能性を検討し、軟骨発生初期から軟骨細胞に局在することを見出した(データ示さず)。また、軟骨成長板において前肥大化~肥大化軟骨細胞にKLF4の局在を見出した(右図: 生後6日齢マウス上腕骨近位部の軟骨成長板の組織切片を抗KLF4抗体で免疫染色した像)。KLF4は細胞周期を停止する働きをもつp21を発現誘導することが報告されており(Zhang et al., 2000)、軟骨成長板においても増殖層には発現が認められず、肥大化細胞層において認められることは、KLF4が「増殖の停止」を促す役割を有している可能性を示唆していると考えられた。



KLF4のノックアウトマウスは上皮のバリア機能が未熟なため、生後すぐに急激な脱水を示し、24時間以内に致死をきたすことが知られている。しかし、通常のマウスでは胎生18.5日齢で骨格の形態形成を見ることが可能である。そこで、米国のStony Brook大学のAmr Ghaleb、Vincent Yang博士の協力のもとKLF4ノックアウトマウスの骨格表現型の解析を開始した。胎生18.5日齢マウスの上腕骨近位部軟骨成長板の組織切片をヘマトキシリン・エオジン染色、破骨細胞を検出するTRAP染色(データ示さず)および石灰化部位を検出するコッサ染色を行った(下図)。野生型(KLF4-WT)、ヘテロ接合体(KLF4-Het)、遺伝子ノックアウト(KLF4-KO)マウスで組織像を比較すると肥大化軟骨の石灰化の程度がノックアウトマウスで著しく貧弱であることを見出した。

過去の報告や申請者の予備実験の結果から、KLF4は正常な内軟骨骨化の過程に必須の転写因子



子であるという仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

KLF4は骨格系の正常発生、恒常性の維持に関与することが最近報告された転写因子である。しかしながら、以前までの報告では未分化間葉細胞が直接骨芽細胞に分化する、つまりは膜内骨化の過程における解析結果であった。大部分のヒトの骨は内軟骨骨化の過程で発生する。骨格の形態・性状異常を認める疾患は多く、その原因は先天的な発生異常を示すものや後天的な骨の恒常性維持機構の破綻によるものなど多岐にわたる。本申請ではKLF4が正常な内軟骨骨化に重要な役割を持つと仮説を立てて、MMPに着目し研究を行った。

基質を分解する酵素は骨格系の正常発生過程においても、また基質の破壊により発症・重症化する疾患においても中心的な役割を担っており、骨や軟骨の基質の大部分を占めているコラーゲンを分解するMMPの作用は厳密に制御される必要がある。申請者はKLF4が複数のMMPファミ

リー分子を軟骨細胞において誘導することをこれまでに報告しており、本研究では KLF4 による MMP 発現誘導の詳細なメカニズムを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 生後 2~4 日齢の ICR マウスの膝関節から採取した軟骨細胞を培養し、レトロウイルスシステムを用いて GFP, KLF4 の産生を促し、リアルタイム PCR を用いて MMP13 の発現量の解析を行った。また、それらの細胞を 48 時間の培養し、MMP13 が培養馴化培地に分泌されているかどうかについてイムノプロットングを用いて調べた。

(2) 7 週齢のラットを用いて、外科的に内側半月板を摘出し、膝関節を不安定化したラットを変形性関節症モデルとして使用した。手術後 1 ヶ月における偽手術膝関節と手術膝関節とで、マイクロ CT 画像による骨構造状態の比較、また切片画像を用いた成熟関節軟骨細胞にける KLF4 の発現レベルの比較を行った。

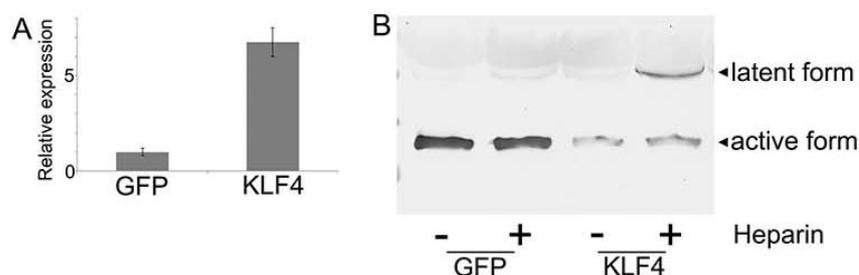
(3) KLF4 による MMP13 発現の制御機構を調べるために RNAPol-ChIP を行い、MMP13 の経時的な転写割合を調べた。クロマチン免疫沈降は SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit (Cell Signaling Technology (CST)) を使用して行った。また、MMP13 に対する阻害剤について、リアルタイム PCR を用いて MMP13 の発現をスクリーニング的に解析した。見出された阻害剤を使用した際の MMP13 転写割合への影響、MMP13 の mRNA の分解速度への影響を調べた。

(4) 生後 2~4 日齢の ICR マウスの頭蓋冠から採取した骨芽細胞を培養し、レトロウイルスシステムを用いて GFP, KLF4 の産生を促し、リアルタイム PCR を用いて KLF4 の下流因子である Gli1 の発現について解析を行った。また KLF4 を過剰発現させた状態で、IFT タンパクをノックダウンさせ、一次繊毛の形成を阻害した状態での Gli1 の発現について調べた。

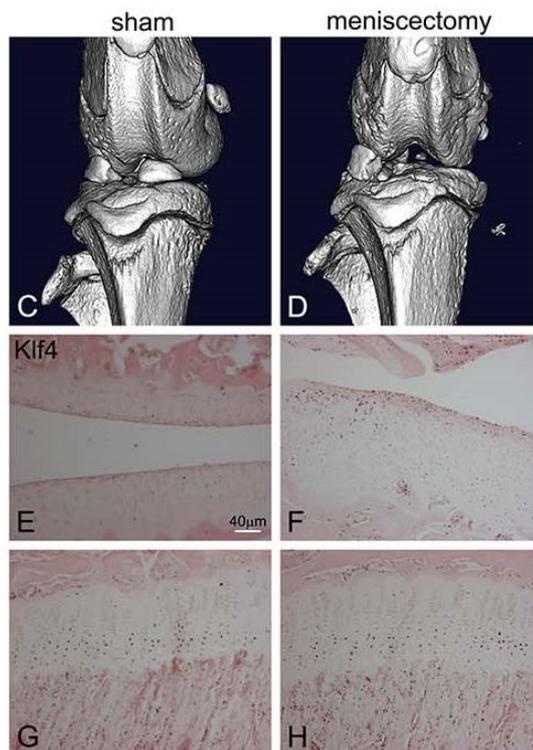
(5) マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞を用いて、Smo アゴニストを投与し、アリザリンレッドを用いて染色を行い、石灰化の程度の回復度合いについて解析を行った。

4. 研究成果

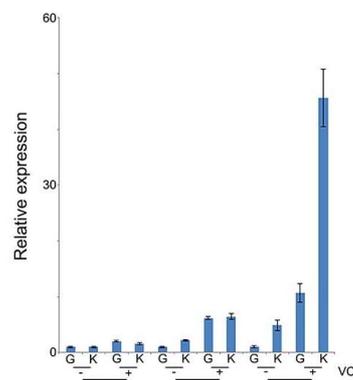
(1) 初代マウス培養軟骨細胞に KLF4 を産生するレトロウイルスを導入し、リアルタイム PCR によって MMP13 の発現を解析したところ、KLF4 は MMP13 を含むいくつかの MMP 遺伝子の発現を誘導した (Fig. A)。また、イムノプロットングを用いて、MMP13 が培養馴化培地に分泌されているかどうかを調べた。コントロール (GFP) および KLF4 誘導細胞を 500ug/ml ヘパリン (ヘパリンは、細胞培養システムに MMP13 が急速にエンドサイトーシスされることが知られている) の存在下または非存在下で処理し、48 時間の培養を行ったところ、コントロールの培養培地は強い低分子量バンドを示したが、KLF4 誘導細胞の培養培地は弱い低分子量を示した。またヘパリン処理した KLF4 誘導細胞のみが、潜在型の MMP13 である高分子量バンドを示した。



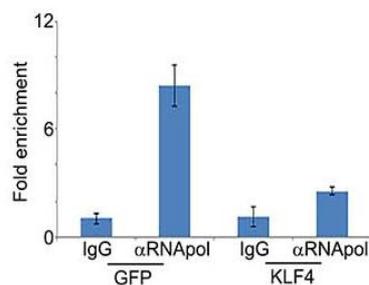
(2) MMP13 は、変形性関節症(OA)および生理学的軟骨内骨化中の関節破壊において重要な役割を果たすため、KLF4 タンパク質が OA 動物モデルの関節領域の罹患部に見出されるかどうかを調べた。本研究では、関節を不安定化させたラットの膝関節を OA モデルとして使用した。Fig.C および Fig.D は、それぞれ偽手術膝関節と手術膝関節のマイクロ CT 画像を表しており、Fig.D では膝関節部の骨構造が損傷していることが示されている。これらの膝関節部において、免疫染色を行ったところ、成熟関節軟骨細胞は KLF4 の発現レベルが非常に低かった(Fig.E)が、罹患部の関節軟骨細胞は KLF4 の発現レベルが強かった(Fig.F)。続いて、近位脛骨の骨端成長板における KLF4 の局在化を調べたところ、コントロール(Fig.G)および罹患部の切片(Fig.H)の両方において、成長板の前肥大化から肥大化軟骨細胞層に局在が認められた。



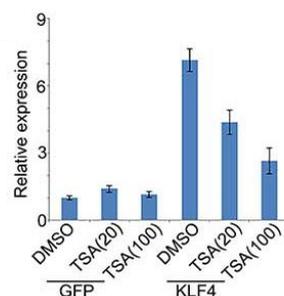
(3) KLF4 による MMP13 発現の制御機構を調べるためにリアルタイム PCR を行い、MMP13 の経日的な発現を調べたところ、KLF4 が誘導されてから約 4 日後に MMP13 の発現量が徐々に上がってくることを示された。また、アスコルビン酸(ビタミン C)を添加すると、6 日後では MMP13 の発現量が著しく上昇していることが見出された。



(4) MMP13 のゲノム領域に対するプライマーを設計して、RNApol III に対する抗体でクロマチン免疫沈降を行った結果、コントロールと KLF4 発現を誘導した細胞の両方の MMP13 ゲノム領域において、RNApol III が見出されたものの、RNApol III により MMP13 の転写割合は変化していないことが分かった。

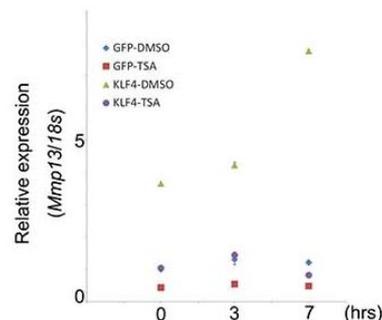


(5) KLF4 による MMP13 の誘導に關与するシグナル伝達カスケードを特定するために、本研究では 400 種類におよぶ MMP13 に対する阻害剤に対して、リアルタイム PCR を使用した MMP13 の発現についてスクリーニング的に解析を行った。同定された阻害剤の中で、Trichostatin A (TSA) は MMP13 に対して強い抑制作用を示した。



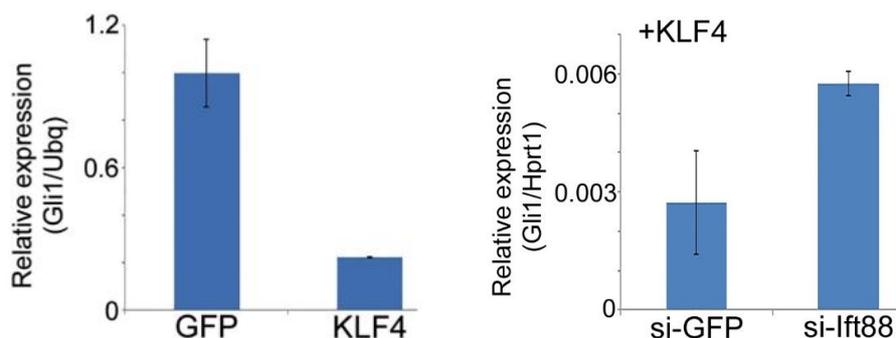
(6) RNApol III に対する抗体を用いた ChIP 分析によって、TSA 処理が MMP13 の転写割合に影響を及ぼすか実験を行ったところ、コントロールと KLF4 発現を誘導した細胞の両方において、MMP13 遺伝子座の豊富な領域が TSA 処理を行った場合に見出された。

(7) MMP13 の mRNA の分解速度を調べたところ、Actinomycin D により転写を抑制したときに、KLF4 の発現を誘導した軟骨細胞では MMP13 の mRNA の分解速度が有意に低下していることが分かった。TSA 処理を行った場合、KLF4 の発現を誘導した細胞ではコントロールと同程度の mRNA レベルを示した。

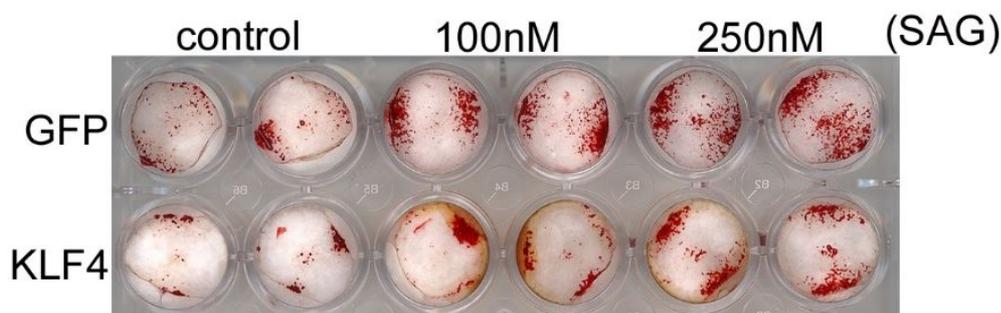


続いて、申請者は骨芽細胞での新たな KLF4 による分化制御メカニズムも見出した。一次繊毛は、ほとんどの細胞が有しており、細胞周囲の外部環境もしくは他の細胞からのシグナルを受信するためのアンテナとして機能する細胞小器官である。一次繊毛の機能障害は骨・軟骨の異常だけでなく、広範囲の臓器に及ぶ疾患に関与しており、それらは繊毛病と呼ばれている。ヘッジホッグシグナルは骨や軟骨の発生に必須であり、その伝達は一次繊毛を介して行われている。今回、我々は Kruppel-Like Factor 4 (KLF4) が一次繊毛におけるヘッジホッグシグナルを抑制し、そしてそのことを介して骨芽細胞の分化を抑制している可能性を見出したため、以下のその研究結果を示す。

(8) KLF4 の下流因子である Gli1 の発現について、リアルタイム PCR を用いて確認したところ、KLF4 を過剰発現させたマウス頭蓋冠由来の初代骨芽細胞では、コントロールに対して Gli1 の発現が優位に低下した。また KLF4 を過剰発現させた状態で、IFT タンパクをノックダウンさせ、一次繊毛の形成を阻害すると、コントロールに対して、Gli1 の発現が増加した。



(9) ヘッジホッグシグナルを活性化させることで、マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞の石灰化の程度がどの程度回復するかを調べるために、Smo アゴニストを投与し、アリザリンレッドを用いて染色を行ったところ、Smo アゴニストの濃度を増加させるにつれて、KLF4 を過剰発現させた骨芽細胞では石灰化の程度が上昇した。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Takeuchi Yuto, Kito Akiyoshi, Itoh Shousaku, Naruse Haruna, Fujikawa Junji, Sadek Kadry Mahamed, Akiyama Shigehisa, Yamashiro Takashi, Wakisaka Satoshi, Abe Makoto,

Kruppel-Like Factor 4 represses osteoblast differentiation via ciliary Hedgehog signaling, Experimental Cell Research, Refereed Papers, 371, 2018, 417-425, DOI:10.1016/j.yexcr.2018.09.002

6 . 研究組織

(1)研究分担者：該当者なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：阿部 真土

ローマ字氏名：(ABE, makoto)

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。