

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09047

研究課題名(和文)細胞核構造の変遷に基づく骨芽細胞特異的遺伝子発現制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Organization of nuclear architecture and gene expression during osteoblast differentiation

研究代表者

中村 貴(Nakamura, Takashi)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80431948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Runx2による骨芽細胞分化の詳細なメカニズムについて検討した結果、これまで石灰化に重要であるとされてきたアルカリホスファターゼが骨芽細胞分化促進因子として機能している事を明らかにした。さらに骨細胞分化はアルカリホスファターゼによって産生されたリン酸が重要であり、骨芽細胞分化のマスター転写因子であるRunx2は必要とされない可能性が示唆された。また、その過程で頭蓋骨の直下に存在する硬膜細胞が骨芽細胞前駆細胞である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎えた我が国では骨粗鬆症などの骨疾患患者数の増加が問題となっており、これに対する新たな予防法・治療法の開発が求められている。本研究ではアルカリホスファターゼが骨形成を直接促進する因子である事が明らかとなったことから、アルカリホスファターゼを標的とした硬組織疾患に対する新規予防法・治療法の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) promotes hydroxyapatite crystal formation by degrading inorganic pyrophosphate (PPi) and increasing inorganic phosphate (Pi) concentration. However, abnormalities in Alpl KO mouse-derived osteoblasts are poorly understood. Therefore, in this study, we aimed to investigate the precise role of TNAP in osteoblast differentiation. TNAP inhibition by levamisole, a reversible TNAP inhibitor, suppressed the osteoblast differentiation. Alpl overexpression increased the expression of Runx2, Sp7, Bglap2 and Dmp1 in Alpl KO cells. TNAP regulated Runx2 expression, which in turn regulated the expression of all other osteoblast markers, except Dmp1. Dmp1 expression was independent of RUNX2 but was dependent on extracellular Pi concentration in Runx2-deficient osteogenic cells. These results suggest that TNAP functions as an osteogenic differentiation regulator either by regulating Runx2 expression or by controlling extracellular Pi concentration.

研究分野：骨代謝

キーワード：Runx2 アルカリホスファターゼ 骨芽細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 鎖骨頭蓋骨異形成症 (CCD) は転写因子 RUNX2 の遺伝子突然変異に起因する骨芽細胞分化異常を伴う骨形成異常疾患である。RUNX2 は骨芽細胞特異的遺伝子群の発現制御を司ることから、骨芽細胞分化のマスター転写因子であると考えられている。しかしながら RUNX2 が骨芽細胞分化の具体的になにに対して重要であるか? という疑問に対する答えは十分に明らかとなっていない。これは RUNX2 ノックアウトマウスでは骨芽細胞分化や石灰化骨形成が全く起さない為に、骨芽細胞前駆細胞の単離・解析が困難であることに起因する。即ち RUNX2 欠損による骨芽細胞分化異常とされている現象が本当に間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が行われない事によるのか、或いは骨芽細胞へ運命決定された細胞が増殖出来ない為に成熟骨芽細胞が存在しないのかが不明である。

(2) 我々は骨芽細胞への運命決定が行われる前段階の RUNX2 欠損細胞を得る為に CCD 患者由来 iPS 細胞を樹立し、iPS 細胞から骨芽細胞への段階的分化条件の確立を行なうことで、未分化幹細胞から骨芽細胞に至るまでの分化過程を対象に RUNX2 機能を解明すべく重点的に解析を進めてきた。その結果、RUNX2 ヘテロ欠損細胞が骨芽細胞分化刺激に応じて核溝と呼ばれる核形態異常を示すこと、さらに RUNX2 ホモ欠損細胞ではこの異常が重篤化し、分葉核となることを世界で初めて発見するに至った。

2. 研究の目的

(1) 核形態に関連する遺伝子群の発現を調べたところ、RUNX2 欠損細胞では Lamin に代表される複数の核膜タンパク質の著しい発現低下が観察され、培養骨芽細胞の ChIP-seq 解析を行ったところ、RUNX2 がこれらの核膜タンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域に結合していることを見出した。加えて、RUNX2 が Lamin と相互作用するとの報告もあることから、RUNX2 は核膜タンパク質の発現を介して、ストレス耐性獲得など骨芽細胞分化に適した核構造へと変化させるとともに、RUNX2 や Osterix などの転写因子と相互作用することで骨芽細胞特異的遺伝子発現の場を構築するのではないかと仮説に至った。このような経緯により、本研究では細胞種特異的な遺伝子発現制御に関わる分子機構の解明を目的とする。

(2)(1)に加えて、Runx2 の役割をより明確にする目的で、Runx2 非存在下におけるドラッグスクリーニングを行い、Runx2 非存在下においても骨芽細胞分化を進める事ができる薬剤の探索を試みると共に、骨芽細胞分化に与える影響について詳細を調べる。

(3) 核膜タンパク質のうち Runx2 KO 細胞で発現が低下する Lamin A および Nesprin-1 に着目し、これらの遺伝子破壊マウスを作成することで骨芽細胞分化における核膜タンパク質の役割を明らかにする。

(4) Runx2 野生型細胞では骨芽細胞分化に伴い様々な骨芽細胞マーカーが発現するのに対して、Runx2 ノックアウト細胞ではこれらのマーカー遺伝子の発現が観察されない。この事から骨芽細胞分化は Runx2 を頂点とした遺伝子発現カスケードにより段階的に進むと考えられる。Runx2 野生型細胞で高発現する因子のひとつに組織特異的アルカリホスファターゼが存在するが、我々は研究を進める過程で、アルカリホスファターゼ阻害剤のひとつ、レバミゾールが骨芽細胞分化を阻害する事を見出した。アルカリホスファターゼは骨芽細胞分化に伴い発現が上昇し、骨石灰化に重要な役割を担う事が知られているが、アルカリホスファターゼの骨芽細胞分化に対する役割について詳細な報告はない。そこでアルカリホスファターゼを介した細胞自律的な骨芽細胞分化機構について調べる。

3. 研究の方法

(1) これら核膜タンパク質のウイルスベクターを作成し、Runx2 KO 細胞に導入し、骨芽細胞分化に与える影響を調べる。具体的には骨芽細胞から調整した cDNA を用いて Lamin A および Nesprin-1 遺伝子のクローニングを行い、レンチウイルスベクターを作成、野生型マウスおよび Runx2 KO マウス頭蓋冠由来骨芽細胞に導入し、骨芽細胞分化誘導培地を用いて分化誘導を行った。

(2) 核膜タンパク質の制御等に関与する可能性が示唆されると考えられたある幾つかの低分子化合物存在下で骨芽細胞分化誘導を行い、Runx2 KO 細胞で骨芽細胞分化を促進する分子の探索を行った。

(3) Lamin A ノックアウトマウスは米国ジャクソン研究所から購入した floxed Lmna マウスと大阪大学・岡部勝名誉教授、伊川正人教授から供与頂いた全身性 Cre リコンビナーゼ発現マ

ウスである GAC-Cre と交配する事で全身性 Lmna KO マウスを得た。Nesprin-1 KO マウスに関しては新たに floxed マウスを樹立し、Lmna KO 同様に CAG-Cre マウスとの交配により全身性 Nesprin-1 KO マウスを得る事とした。これらのマウスの骨組織の解析を行うとともに、特に頭蓋冠由来骨芽細胞を用いてこれら遺伝子が骨芽細胞分化に与える影響を主に in vitro で観察することとした。

4. 研究成果

(1) 作成したウイルスベクターを用いて Lamin A および Nesprin-1 遺伝子を Runx2 KO マウス由来骨芽細胞に導入し、骨芽細胞分化誘導を行い、アルカリホスファターゼ染色による骨芽細胞分化の確認と、von Kossa 染色による石灰可能の獲得について検証を行った。しかしながらこれらの遺伝子を導入した場合でも明確な骨芽細胞分化の回復や石灰可能の獲得は認められなかった。このことから、これらの核膜タンパク質は Runx2 存在下において骨芽細胞分化をサポートする因子であると考えられた。今後は骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を指標に用いて、寄り詳細に解析を進める予定である。

(2) 複数の市販されている低分子化合物を購入し、これらの薬剤存在下において野生型マウス頭蓋冠由来骨芽細胞と Runx2 KO マウス頭蓋部由来細胞に骨芽細胞分化誘導刺激を与え、アルカリホスファターゼ染色および von Kossa 染色の結果を指標としてスコリーニングを行った。その結果、このうち 2 種類の薬剤が Runx2 KO 細胞における骨芽細胞分化能を回復させる事が確認できた。

(3) floxed Lmna マウスと GAC-Cre と交配する事で全身性 Lmna KO マウスを得た、全身性 Lmna KO マウスは既に報告があるように成長遅延を示した。全身性 Lmna KO マウス頭蓋冠から得た骨芽細胞を用いて骨芽細胞分化について調べた結果、アルカリホスファターゼ染色、von Kossa 染色の結果は野生型に比べて弱いシグナルを示した。さらに骨芽細胞マーカー遺伝子の発現について調べたところ、Lmna KO 細胞におけるこれらの遺伝子発現は野生型のそれと比べて著しく発現レベルが低い事が明らかとなった。これらの結果から、Lamin A は骨芽細胞分化に重要な因子である事が明らかとなった。引き続き骨芽細胞分化における Lamin A 機能について詳細を調べていく。

(4) 骨芽細胞分化系に対して様々なタイムコースでアルカリホスファターゼ阻害剤であるレバミゾールを添加し、アルカリホスファターゼ染色を行った結果、短期間のレバミゾール添加はアルカリホスファターゼ活性に影響を与えなかったが、分化初期からレバミゾール添加を行った場合はアルカリホスファターゼ活性の著しい低下が観察された。そこでアルカリホスファターゼ遺伝子の発現について qPCR およびウェスタンブロッティングを用いて調べたところ、レバミゾールはアルカリホスファターゼ遺伝子の発現を強く抑制する事が明らかとなった。さらにレバミゾール存在下で骨芽細胞分化誘導を行った場合、骨芽細胞分化マーカーおよび骨細胞前期マーカーである Dmp1 の発現も低下する事が分かった。このことからアルカリホスファターゼには骨芽細胞/骨細胞分化を促進する働きがあると考えて実験を進めた。そこでアルカリホスファターゼノックアウトマウス (Akp2 KO マウス) を用いて解析を行ったところ、Akp2 KO 細胞では野生が多細胞に対して骨芽細胞分化マーカーの発現が低いものの、アルカリホスファターゼ遺伝子の導入によりマーカー遺伝子の回復が観察された。さらに Runx2 遺伝子を導入した場合、野生型細胞は骨芽細胞分化マーカーの著しい発現上昇を示したのに対して、Akp2 KO 細胞におけるその効果は限定的であった。この事からアルカリホスファターゼには Runx2 依存的な骨芽細胞分化を促進する役割があることがわかった。次に Runx2 KO 細胞を用いて解析を進める事とした。Runx2 KO マウスは骨芽細胞分化が起こらず、石灰化した頭蓋骨も存在しないため、頭蓋冠由来骨芽細胞を得る事もできない。そこで Runx2 KO マウスより硬膜を採取し、骨芽細胞前駆細胞としての機能があるかどうか調べた。レンチウイルスベクターを用いて Runx2 KO マウス由来硬膜細胞に Runx2 遺伝子を導入し、骨芽細胞分化誘導を行ったところ、アルカリホスファターゼ染色、von Kossa 染色ともに強いシグナルを示し、各種骨芽細胞分化マーカーの発現も上昇した。この事から、硬膜細胞は骨芽細胞の前駆細胞であると考えられた。そこで Runx2 KO 硬膜細胞に対してアルカリホスファターゼ遺伝子の導入を行い、骨芽細胞分化に与える影響について調べた。その結果アルカリホスファターゼ遺伝子を導入した場合でもほとんどの骨芽細胞分化マーカーの発現上昇は観察されなかったことから、アルカリホスファターゼは Runx2 存在下において骨芽細胞分化を促進する因子であることが分かった。一方、骨細胞マーカーである Dmp1 の発現は著しい上昇を示した。さらにリン酸の添加もまた Dmp1 の発現を上昇された。これらの結果は、骨細胞分化には Runx2 は必須の因子ではなく、アルカリホスファターゼによって産生されたリン酸が骨細胞分化促進因子としてはたらく可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamura Takashi, Nakamura-Takahashi Aki, Kasahara Masataka, Yamaguchi Akira, Azuma Toshifumi	4. 巻 524
2. 論文標題 Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 702 ~ 709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mitomo K, Matsunaga S, Kitamura K, Nakamura T, Saito A, Komori T, Muramatsu T, Yamaguchi A.	4. 巻 120
2. 論文標題 Sphenoid bone hypoplasia is a skeletal phenotype of cleidocranial dysplasia in a mouse model and patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 176-186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2018.10.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato Masahiro, Aoki Hideto, Nakamura Takashi, Onodera Shoko, Yamaguchi Akira, Saito Atsushi, Azuma Toshifumi	4. 巻 55
2. 論文標題 Effects of intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) on osteoblastic differentiation and mineralization of mouse induced pluripotent stem cells in a 3D culture model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 734 ~ 743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12762	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohno Tatsukuni, Nakamura Takashi, Nakae Susumu, Morita Hideaki, Matsumoto Kenji, Saito Hirohisa, Takeda Kazuyoshi, Okumura Ko, Azuma Toshifumi	4. 巻 530
2. 論文標題 TSLP is a negative regulator of RANKL-induced osteoclastogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 508 ~ 512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takashi Nakamura
2. 発表標題 Molecular mechanisms of craniosynostosis in Apert syndrome
3. 学会等名 68th Annual meeting of Japanese association for dental research (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 RUNX2機能低下疾患の治療剤	発明者 中村貴、東俊文、山口朗	権利者 学校法人東京歯科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-108013	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小野寺 晶子 (onodera shoko) (90637662)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------