

平成21年 4月 30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592119

研究課題名（和文）Hox9 による骨形成と骨格パターンの新たな制御経路の解析

研究課題名（英文）Regulation of osteogenesis and skeletal patterning by Hox9

研究代表者 柴田恭明

柴田 恭明 (SHIBATA YASUAKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80253673

研究成果の概要：Hoxc9 の発現は rhBMP-2 によって正に、smad-2 によって負に制御されており、かつ Hoxc9 はアルカリフォスファターゼ(ALP) の発現を正に制御した。すなわち Hoxc9 は骨分化に促進的に関与することが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	105,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）

1. 研究開始当初の背景

Hox ホメオドメインファミリーは体軸のパターンを決定する転写因子群であり、Runx2 は骨芽細胞分化を促進するマスター遺伝子である。体軸のパターンと骨形成は異なる経路で制御されると考えられていたが、最近、nuclear matrix protein Satb2 が Hoxa2 を抑制することにより骨形成を促進する一方、骨分化マーカーの発現を直接促進することが報告されるにおよび

(Dobrev G, et al. Cell,125:971-986,2006)、両経路のクロストークがにわかにクローズアップされてきた。

これまでにわれわれは、GeneChip を用いて、骨再生時早期に上昇する遺伝子群を解析し、報告してきた (Shibata Y, et al. Biochem Biophys Res Commun. 325:1194-200, 2004, Nobta M, et al. J Biol Chem. 280:15842-8, 2005)。今回、早期骨再生時に発現が上昇する遺伝子群の中

に、Hoxc9 があることを見いだした。ホメオドメインタンパクは他の転写因子との複合体として、標的遺伝子のプロモーター領域で働く。その複合体は単独のホメオドメインタンパク質よりも高度な標的特異性を持つと報告されている。これを勘案すると、Hoxc9 が rhBMP2 で誘導される Runx2, Osterix 等、骨芽細胞分化を制御する転写因子と協調して、骨芽細胞分化を促進していることが強く示唆される。

2. 研究の目的

骨芽細胞分化における Hoxc9 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) Hoxc9, d9 の単離、発現ベクターへの組換え:マウス胎児 cDNA より proofreading ポリメラーゼを用いた RT-PCR を利用して Hoxc9, d9 の完全長 cDNA を単離した。単離した cDNA を、クローニングベクター pCR-BluntII-TOPO に組み替えた後、シークエンスを確認し、p3xflag-CMV-14 に組み替えた。
- 2) Hox9 パラログの骨発生過程での発現: マウス胎児 (E13.5-新生仔マウス) のパラフィンブロックを作製し、薄切した。PCR-BluntII-TOPO-Hoxc9, d9 を制限酵素で切断し、Sp9 または T7 ポリメラーゼ を用いてジゴキシゲニン(Dig)標識し、Dig 標識センス、またはアンチセンス RNA プローブを作製、これらプローブを用いて ISH を施行した。
- 3) 未分化間葉系細胞 C3H10T1/2 (10T1/2)、筋芽細胞 C2C12、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1(E1)における Hox9 パラログの発現: 10T1/2、E1、C2C12

を rhBMP-2 添加 (500ng/ml)・無添加群として4日間培養し、RNA を Trizol を用いて回収した。回収した RNA から逆転写反応によって cDNA を作製し、Real-Time PCR によって、骨芽細胞分化における Hoxc9、d9 の発現を確認した。

- 4) Hoxc9, d9 が骨芽細胞分化に与える影響: Hoxc9, d9 を 10T1/2、C2C12、E1 細胞に一過性に発現させ、rhBMP-2 添加・無添加群での骨芽細胞分化マーカー (オステオカルシン、アルカリフォスファターゼ、オステオポンチン等) の発現を Real-time PCR で検索した。
- 5) Hoxc9, d9 と runx2 の物理的相互作用の検索: 293 細胞に Hox c9 と runx2 をトランスフェクションし、免疫沈降反応を用いて両者の結合を検索した。
- 6) プロモーターアッセイ: ALP と OCN プロモーター下流にルシフェラーゼレポーターをつないだコンストラクトを形成し、Hoxc9 を一過性にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を計測する。
- 7) siRNA を用いた Hoxc9, d9 の骨分化促進機能の検: 10T1/2、E1、C2C12 に Hox9 パラログ siRNA を単独で、または同時に一過性にトランスフェクションし、rhBMP-2 添加 (500ng/ml)・無添加群として4日間培養し、骨分化マーカーの発現を Real-Time PCR によって検出し、骨芽細胞分化における Hox9 パラログの機能を確認した。
- 8) 7. Hoxc9, d9 の骨形成促進作用
Pantropic Retroviral Expression System (クロンテック) を用いて

Hoxc9 パラログ発現レトロウイルスを作製した。骨折3-4日目にレトロウイルスをマウス個体に感染させ、骨再生に及ぼす影響を *in vivo* で検索した。

4. 研究成果

E1 細胞への rhBMP-2 添加により、Hoxc9 mRNA の発現は上昇した。しかしながら骨分化のマスター遺伝子である runx2 の強制発現では Hoxc9 mRNA の発現に変化は見られなかった。一方、Hoxc9 を E1 細胞株に一過性に発現させることにより、runx2 および ALP の発現が上昇した。これらの結果は、Hoxc9 が骨芽細胞分化に促進的に働き、かつ runx2 の発現を制御していることを示唆している。そこで次に、runx2 の上流で働く smad ファミリーを E1 細胞株に一過性に強制発現させ、Hoxc9 mRNA 量の相対的变化を検索したところ、Hoxc9 の発現は、TGF β シグナルの伝達を制御する smad2 により顕著に抑制されることが明らかになった。一方、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 に rhBMP-2 を添加し、RT-PCR を用いて HoxD9 の発現を検索したが、HoxD9 の発現は見られなかった。293 細胞に Hoxc9 と runx2 を一過性にトランスフェクションし、免疫沈降反応を用いて両者の物理的結合を検索したが、両者の結合は検出されなかった。COS 細胞に ALP プロモーター下流にルシフェラーゼレポーターをつないだコンストラクトと Hoxc9 を一過性にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を計測したところ、Hoxc9 はルシフェラーゼ活性を上昇させた。一方、オステオカルシン(OCN) のプロモーター活性上昇は見られなかった。siRNA を

retroviral expression system を用いて E1 細胞に発現させ、Hoxc9 発現を抑制したところ、rhBMP-2 による ALP 上昇は有意に抑制された。これらの結果は、Hoxc9 の発現は rhBMP-2 によって正に、smad-2 によって負に制御されており、かつアルカリフォスファターゼ(ALP) の発現を正に制御することが明らかになった。

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6件)

1. Okuda T, Ioku K, Yonezawa I, Minagi H, Kawachi G, Gonda Y, Murayama H, Shibata Y, Minami S, Kamihira S, Kurosawa H, Ikeda T: The effect of the microstructure of b-tricalcium phosphate on the metabolism of subsequently formed bone tissue. *Biomaterials* 28: 2612-22621, 2007 査読有
2. Jimbo R, Sawase T, Shibata Y, Hirata K, Hishikawa Y, Tanaka Y, Bessho K, Ikeda T, Atsuta M: Enhanced osseointegration by the chemotactic activity of plasma fibronectin for cellular fibronectin positive cells. *Biomaterials* 28:3469-3477, 2007 査読有
3. Liu T, Gao Y, Sakamoto K, Minamizato T, Furukawa K, Tsukazaki T, Shibata Y, Bessho K, Komori T, Yamaguchi A: BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx2-deficient cell lines. *J Cell Physiol.* 211:728-735, 2007 査読有

4. Sawase, T., Jimbo, R., Baba, K., Shibata, Y., Ikeda, T., Atsuta, M. Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. Clin. Oral Impl. Res. 19:491-496. 2008. 査読有
5. Okuda, T., Ioku, K., Yonezawa, I., Minagi, H., Gonda, Y., Kawachi, G., Kamitakahara, M., Shibata, Y., Murayama, H., Kurosawa, H., Ikeda, T. The slow resorption with replacement by bone of a hydrothermally synthesized pure calcium-deficient hydroxyapatite. Biomaterials 29:2719-2728. 2008. 査読有
6. Jimbo, R., Sawase, T., Baba, K., Kurogi, T., Shibata, Y., Atsuta, M. Enhanced initial cell responses to chemically modified anodized titanium. Clin Implant Dent Relat Res. 10:55-61. 2008 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 奥田貴俊, 井奥洪二, 米澤郁穂, 権田芳範, 柴田恭明, 黒澤 尚, 池田通: 骨代替材料の吸収性と新生骨形成の関係に対する評価, 第 25 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 7 月 {抄録集 演題番号 P1-63, p.254, 2007}
2. 権田芳範, 奥田貴俊, 井奥洪二, 米澤郁穂, 黒澤 尚, 柴田恭明, 池田通: 微細柱状粒子 β -リン酸三カルシウム球状顆粒の開発と骨代替材料としての評価, 第 25 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 7 月 {抄録集 演題番号 P1-67, p.256, 2007}
3. 権田芳範, 柴田恭明, 井奥洪二, 池田通: 柱状粒子ハイドロキシアパタイト

球状顆粒の骨組織への移植による吸収と骨伝導、第 50 回歯科基礎医学会総会、2008 年 9 月 23 日～25 日、東京 {抄録集 演題番号 P-191, p.183, 2008}

4. 権田芳範, 奥田貴俊, 井奥洪二, 柴田恭明, 米澤郁穂, 黒澤 尚, 池田通: 柱状粒子 β -リン酸三カルシウム球状顆粒の不動化骨組織における吸収と骨伝導、第 26 回日本骨代謝学会学術集会、2008 年 10 月 29 日～31 日、大阪 {抄録集 演題番号 P2-26, p.240, 2008}
5. 吉松昌子, 柴田恭明, 関 幸子, 笠井道之, 池田通: 胸腺上皮細胞株及び胎仔胸腺器管培養を用いた AIRE 発現制御機構の検討 第 19 回 Kyoto T Cell Conference, 京都, 6 月, 2008
6. 柴田恭明, 吉松昌子, 関 幸子, 笠井道之, 池田通: デキサメタゾンによる胸腺 AIRE 発現制御 第 49 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 長崎, 10 月, 2008

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

○取得状況（計 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 恭明 (SHIBATA YASUAKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：80253673

(2) 研究分担者

藤田 修一 (FUJITA SHUICHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・準教授

研究者番号：00181355

池田 通 (IKEDA TOHRU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00211029

(3) 連携研究者