

平成23年6月3日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008-2010

課題番号：20592184

研究課題名（和文）硬組織再建への応用を目的とした新規 BMP 活性制御因子の同定

研究課題名（英文）Identification of regulatory molecules for osteogenic activity of BMP.

## 研究代表者

上條 竜太郎 (KAMIJO RYUTARO)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：70233939

研究成果の概要（和文）：骨誘導因子 BMP (bone morphogenetic protein) は TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する生理活性物質である。BMP は骨芽細胞、軟骨細胞の分化および骨形成作用を増強し、また異所性の石灰化を誘導することが知られている。BMP ファミリー分子は十数種類存在しており、なかでも BMP-2 は強力な骨形成促進作用を有する。我々は、BMP-2 の骨芽細胞分化促進作用を調節する遺伝子を探索するため、BMP-2 による骨芽細胞分化誘導過程において発現の変化する遺伝子の網羅的解析を行った結果、Alx3 (aristaless like homeobox 3) が骨芽細胞分化に伴い発現が増加することを見出した。Alx3 はホメオボックス遺伝子に属する転写因子であり、顔面頭蓋の形成に重要な遺伝子であることが知られている。そこで本研究ではさらに、BMP-2 による骨芽細胞分化誘導における Alx3 の発現制御機構ならびにその作用機序について検討した。

研究成果の概要（英文）：Bone morphogenetic proteins (BMPs) regulate many aspects of skeletal development, including osteoblast and chondrocyte differentiation, cartilage and bone formation, and cranial and limb development. Among them, BMP-2, one of the most potent osteogenic signaling molecules, stimulates osteoblast differentiation, but inhibits myogenic differentiation in C2C12 cells. To evaluate important genes for BMP-2-induced osteoblast differentiation, we performed cDNA microarray analysis between BMP-2 treated and untreated C2C12 cells, and identified Alx3 (aristaless like homeobox 3) as a gene that was clearly induced during osteoblast differentiation. Alx3 is a homeobox gene related to the *Drosophila* aristaless gene and a group of vertebrate genes that includes Prx1/2, Cart1 and Alx4. Alx3 is expressed in frontonasal head mesenchyme and the first and second pharyngeal arches. Alx3 has been linked to developmental functions in craniofacial structures and limb development. Little is known about its direct relationship with bone formation. In the present study, we also focused on the mechanisms of Alx3 gene expression and function during osteoblast differentiation induced by BMP-2.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：BMP、マイクロアレイ、再生、硬組織

## 1. 研究開始当初の背景

骨誘導因子 (bone morphogenetic protein, BMP) は骨芽細胞の分化を誘導し、異所性の石灰化を誘導する生理活性物質であり、以前より硬組織再生への応用が期待されてきた。しかし BMP に対する細胞の感受性は、細胞によって大きく異なり、特にヒト細胞は BMP 感受性が低く、臨床応用のためには BMP 活性を促進する方法の開発が必要である。生体内で BMP の活性は、様々な促進因子と阻害因子により制御されているが、それらの発現制御機構、作用機序には不明な点も多く存在する。さらにいまだ明らかにされていない制御因子も存在すると考えられており、これらの因子の発現パターン、発現レベルが細胞の BMP 感受性を規定している可能性がある。そこで本研究では、新たな BMP 活性制御因子を検索すると共に、既存の制御因子を含めてこれらの因子が細胞の BMP 感受性に及ぼす影響を解析する。さらにこれらの結果を基盤に、BMP 活性制御因子を応用した BMP 活性促進法の実験を試みる。

### (1) 高齢化社会において増加傾向を示す硬組織疾患

高齢化の進む我が国では、加齢に伴う骨量の低下による骨の脆弱化と、それにより起こる骨折が増加傾向にある。骨の脆弱化はまた、歯槽骨の吸収促進などによる顎口腔機能障害を引き起こし、高齢者の QOL 低下の主たる要因の一つになっている。高齢化が急速に進行している我が国では、この傾向は今後も更に進むものと予測され、骨量の低下を抑制する方策が模索されると共に、骨折その他で生じた骨欠損部の修復を促進する治療法の実験が急務とされている。

### (2) 骨誘導因子 (bone morphogenetic protein, BMP)

骨誘導因子 (bone morphogenetic protein, BMP) は、筋組織中で異所性骨形成を誘導する生理活性物質として骨基質から発見された成長因子であるが、今日では、生理的な骨形成にきわめて重要な役割を果たしていることが明らかとなり、医学、歯学の幅広い分野で、BMP を用いた骨組織再建の可能性が検

討されている。しかし、ヒトは BMP に対する感受性が低く、実際の臨床応用には至っていない。従って、今後 BMP による骨組織再建を実現するためには、BMP に対する感受性がヒトで低下している原因を明らかにすると共に、BMP 活性を促進する方法を開発しなくてはならない。

### (3) BMP 活性の調節因子

これまでの研究で、BMP に結合してその作用を抑制するアンタゴニストが存在することが示されている。これらは大きく 4 種類 (Noggin、Chordin、DAN ファミリー、Follistatin) に分類され、負のフィードバックシステムによって BMP の作用を押さえていることが示唆されている。一方、BMP の活性を促進する因子の報告は少ない。我々は、BMP の骨芽細胞分化誘導活性がヘパリンやヘパラン硫酸などの硫酸化多糖によって促進されることを明らかにし、その増強効果を *in vivo* における異所性骨形成でも確認した (J. Biol. Chem. 278:43229-43235, 2003; J. Biol. Chem., 281:23246-23253, 2006)。

### (4) 本研究課題に至った背景

以上の通り BMP の生理作用は、BMP の作用を阻害する因子と促進する因子により調節を受けていると考えられ、これらの因子の存在が、細胞の BMP 感受性を全体として制御している可能性が考えられる。しかし、BMP 制御因子に関してこれまでに得られた知見は断片的で、これまで報告されている因子以外にも、BMP の活性を促進あるいは抑制する因子が存在し、これらの因子が全体として細胞の BMP 感受性が制御されている可能性が高い。また、BMP 活性抑制因子と促進因子の間に共通のモチーフが存在することが示唆され、このモチーフを用いて、BMP の作用を阻害、あるいは促進する因子の検索が可能であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、BMP の生理活性を生体内で調節している阻害因子・促進因子を解明し、その発現制御機構を明らかにする。

①BMP が骨芽細胞に分化誘導されるときに、

早期に発現が変化する遺伝子群を同定する。  
②構造活性相関と発現変動パターンをもとに、BMP活性に影響を及ぼす可能性のある遺伝子を選択し、それらがBMP活性へ及ぼす影響を骨芽細胞分化誘導能を指標に確認する。

③同定した遺伝子産物の発現制御機構とBMP活性制御機構を解析する。

④同定した遺伝子の発現レベルをBMP感受性の異なる複数の細胞株で比較し、細胞のBMP感受性との関連を検討し、これらの遺伝子が細胞のBMP感受性に及ぼしている影響を解析する。

上記の成果をもとに、BMP 活性調節因子の発現制御に基づく BMP 活性促進法を体系化する。

### 3. 研究の方法

#### 1. BMPによる骨芽細胞分化誘導時の遺伝子発現パターンの網羅的解析

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞に BMP-2 (300ng/ml) を添加して骨芽細胞への分化を誘導し、経時的 (処理後 1、24、72 時間後) に total RNA を抽出し、マイクロアレイ (GeneChip, Affymetrics 社) により、遺伝子発現パターンの変化を網羅的に解析した。

#### 2. BMP 活性制御因子の候補遺伝子選択

上記 1. に続いて BMP 活性を制御する可能性のある候補遺伝子を以下の基準で選択を試みた。

①既存の BMP 阻害因子、促進因子の特徴的なアミノ酸配列と相同性のある領域を含む遺伝子。BMP を含む、既存の TGF- $\beta$ スーパーファミリーの受容体を調節する因子の多くは、その構造内に cysteine 残基を豊富に持ち、S-S 結合で安定なコンフォメーションを保つシステイン・ノットモチーフ (cysteine knot motif) の繰り返し構造、システイン・リッチ領域を持つ (Genes & Dev. 14: 627-644, 2000)。Ensembl (<http://www.ensembl.org>) もしくは MOTIF (<http://motif.genome.ad.jp>) などのタンパク質配列解析ソフトを用い、システイン・リッチ領域を持つ遺伝子を検索する (例えば、BMP アンタゴニストの 1 つ Chordin はその構造内に CXXCXC もしくは CCXXC [C: Cysteine] が存在する)。

②BMP 処理後、急速に (原則として 1 時間以内) 発現レベルが下降、または上昇する遺伝子を選択した。

#### 3. 選択した候補遺伝子群の発現変化の確認および発現パターンの詳細な解析

Real-time PCR 法を用いて、2. で選択した候補遺伝子群の発現変化を確認すると共に、

経時的発現変化、BMP-2 に対する容量依存性を詳細に検討した。

#### 4. 決定した候補遺伝子の発現抑制系および高発現系を構築する

決定した候補遺伝子の BMP 活性への影響を検討するために、siRNA およびリコンビナントタンパク質を作る発現ベクターを作製した。

### 4. 研究成果

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を BMP-2 処理の有無により骨芽細胞および筋管細胞へ分化誘導させ、各分化段階における遺伝子の発現様式をマイクロアレイ法により網羅的解析を行った結果、BMP-2 の濃度および処理時間依存的に発現が誘導される遺伝子として Alx3 を抽出した。

BMP-2 のシグナル伝達経路の一つである Smad 経路において、Smad4 に対する siRNA により BMP-2/Smad 経路を阻害したところ、Alx3 の発現誘導が有意に抑制された。

BMP-2 による骨芽細胞分化誘導における Alx3 の作用機序を検討するために、Alx3 に対する siRNA によりその発現を抑制したところ、骨芽細胞分化の指標とされる Alkaline phosphatase 活性が有意に低下していることが認められた。また骨芽細胞マーカー遺伝子である Osteocalcin や、骨芽細胞分化に重要な転写因子である Osterix の発現も Alx3 発現抑制により有意に減少した。また、細胞内で Alx3 を高発現させる発現ベクターを作製し、導入したところ ALP 活性の有為な上昇が認められた。

以上の結果から BMP-2 による Alx3 の発現誘導は Smad 経路を介して行われる。また Alx3 は C2C12 細胞の筋管細胞への分化に対して抑制的に、骨芽細胞への分化に対して促進的に作用している因子であることが示唆された。

#### 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 2 1 件)

- (1) Anada T, Kumagai T, Honda Y, Masuda T, Kamijo R, Kamakura S, Yoshihara N, Kuriyagawa T, Shimauchi H, Suzuki O: Dose-dependent osteogenic effect of

- octacalcium phosphate on mouse bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A*, **14**:965-978, 2008.
- (2) Yamada A, Suzuki D, Miyazono A, Oshima K, Kamiya A, Zhao B, Takami M, Donnelly RP, Itabe H, Yamamoto M, Kimura S, Kamijo R: IFN- $\gamma$  down-regulates Secretoglobin 3A1 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **379**:964-968, 2009.
- (3) 趙 宝紅, 高見正道, 上條竜太郎: Toll-like receptor (TLR)による破骨細胞の分化制御. *口腔組織培養学会誌*, **17**:27-33, 2008.
- (4) Odaira M, Aoki T, Miyamoto Y, Yasuhara R, Jin Z, Yu J, Nishino N, Yamada K, Kusano T, Hayashi K, Yasuda D, Koizumi T, Mitamura K, Enami Y, Niiya T, Murai N, Kato H, Shimizu Y, Kamijyo R, Kusano M: Cold preservation of the liver with oxygenation by a two-layer method. *J Surg Res*, **152**:209-217, 2009.
- (5) Takami M, Mochizuki A, Yamada A, Tachi K, Zhao B, Miyamoto Y, Anada T, Honda Y, Inoue T, Nakamura M, Suzuki O, Kamijo R: Osteoclast differentiation induced by synthetic octacalcium phosphate through receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand expression in osteoblasts. *Tissue Eng Part A*, **15**:3991-4000, 2009.
- (6) Okano A, Miyamoto Y, Asari J, Kamijo R, Inoue M: Change in salivary levels of chromogranin A in children by hearing dental air turbine noise. *Pediatr Dent J*, **19**:220-227, 2009.
- (7) Suzuki D, Yamada A, Amano T, Yasuhara R, Kimura A, Sakahara M, Tsumaki N, Takeda S, Tamura M, Nakamura M, Wada N, Nohno T, Shiroishi T, Aida A, Kamijo R: Essential mesenchymal role of small GTPase Rac1 in interdigital programmed cell death during limb development. *Dev Biol*, **335**:396-406, 2009.
- (8) Zhao B, Takami M, Yamada A, Wang X, Koga T, Hu X, Tamura T, Ozato K, Choi Y, Ivashkiv B. L, Takayanagi H, Kamijo R: Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nat Med*, **15**:1066-1071, 2009.
- (9) Yasuhara R, Miyamoto Y, Takami M, Imamura T, Potempa J, Yoshimura K, Kamijo R: Lysine-specific gingipain promotes lipo-polysaccharide- and active-vitamin D<sub>3</sub>-induced osteoclast differentiation by degrading osteoprotegerin. *Biochem J*, **419**:159-166, 2009.
- (10) Miyamoto Y, Kamijo R: Overview: molecular regulation of mineralization and its failure –from disclosure of mechanisms to clinical implications– *J Oral Biosci*, **52**:1-5, 2010.
- (11) 鈴木 大, 安原理佳, 山田 篤: 四肢・骨格形成における低分子量Gタンパク質 Rac1 の役割. *口腔組織培養学会誌*, **18**:21-27, 2009.
- (12) Tachi K, Takami M, Sato H, Mochizuki A, Zhao B, Miyamoto Y, Tsukasaki H, Inoue T, Shintani S, Koike T, Honda Y, Suzuki O, Baba K, Kamijo R: Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced ectopic bone formation by transforming growth factor- $\beta$ 1. *Tissue Eng Part A*, **17**:597-606, 2011.
- (13) Tachi K, Takami M, Zhao B, Mochizuki A, Yamada A, Miyamoto Y, Inoue T, Baba K, Kamijo R: Bone morphogenetic protein 2 enhances mouse osteoclast differentiation via increased levels of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand expression in osteoblasts. *Cell Tissue Res* **342**:213-220, 2010.
- (14) Shibata Y, Suzuki D, Omori S, Tanaka R, Murakami A, Kataoka Y, Baba K, Kamijo R, Miyazaki T: The characteristics of in vitro biological activity of titanium surfaces anodically oxidized in chloride solutions. *Biomaterials* **31**:8546-8555, 2010.
- (15) Wang X, Suzawa T, Ohtsuka H, Zhao B, Miyamoto Y, Miyauchi T, Nishimura R, Inoue T, Nakamura M, Baba K, Kamijo R: Carbonic anhydrase II regulates differentiation of ameloblasts via intracellular pH-dependent JNK signaling pathway. *J Cell Physiol* **225**:709-719, 2010.
- (16) Nojima J, Kanomata K, Takada Y, Fukuda T, Kokabu S, Ohte S, Takada T, Yamamoto TS, Sasanuma H, Yoneyama K, Ueno N,

- Okazaki Y, Kamijo R, Yoda T, Katagiri T: Dual roles of SMAD proteins in the conversion from myoblasts to osteoblastic cells by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem*, **285**:15577-15586, 2010.
- (17) Miyauchi T, Yamada M, Yamamoto A, Iwasa F, Suzawa T, Kamijo R, Baba K, Ogawa T: The enhanced characteristics of osteoblast adhesion to photofunctionalized nanoscale TiO<sub>2</sub> layers on biomaterials surfaces. *Biomaterials*, **31**:3827-3839, 2010.
- (18) 増田宜子, 大場崇史, 山田嘉重, 藤島昭宏, 宮本洋一, 木村祐一, 上條竜太郎: 磁場下プログラムフリーザーを用いた歯髄細胞の凍結保存に関する研究. *日本歯科保存学雑誌*, **53**: 274-280, 2010
- (19) Hasegawa S, Yonezawa T, Ahn JY, Cha BY, Teruya T, Takami M, Yagasaki K, Nagai K, Woo JT. Honokiol inhibits osteoclast differentiation and function in vitro. *Biol Pharm Bull*, 33(3):487-92, 2010.
- (20) 高見正道, 上條竜太郎:破骨細胞分化の制御機構. *生化学*, **83**:110-114, 2011.
- (21) Dranovsky A, Picchini AM, Moadel T, Yamada A, Kimura S, Leonardo ED, Hen R: Experience dictates stem cell fate in the adult hippocampus. *Neuron*, 2011 (in press).
- [学会発表] (計 15 件)
- (1) Suzuki D, Yamada A, Yasuhara R, Tsumaki N, Nakamura M, Kamijo R: Rac1 controls interdigital programmed cell death in limb buds. Abstracts, p33-34, 2008. (The 1st Showa International Symposium for Life Science 5<sup>th</sup> Annual Meeting, Tokyo, Japan, September 2008).
- (2) 舘 慶太, 高見正道, 馬場一美, 山田 篤, 望月文子, 井上富雄, 上條竜太郎: BMP-2 とヘパリンによる破骨細胞分化促進作用. 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会 講演要旨集, p627, 2008 (第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会 2008 年 11 月).
- (3) Matsumoto T, Yamada A, Suzuki D, Takami M, Suzawa T, Miyamoto Y, Baba K, Kamijo R: BMP-2 regulates expression of Gas6 during osteoblast differentiation. *Yokosuka Science Festa Program & Proceedings*, p67, 2009 (Yokosuka Science Festa 2009, Yokosuka, June 2009).
- (4) Maruyama T, Miyamoto Y, Yoshimura K, Yamada A, Suzawa T, Takami M, Baba K, Kamijo R: Role of carbonic anhydrase IX in chondrocyte differentiation. *Yokosuka Science Festa 2009 Program & Proceedings*, p68, 2009 (Yokosuka Science Festa 2009, Yokosuka, Japan, June 2009) .
- (5) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 高見正道, 須澤徹夫, 宮本洋一, 馬場一美, 上條竜太郎: Gas6 は BMP-2 による骨芽細胞分化過程で発現が誘導される. 第 27 回日本骨代謝学会学術集会プログラム抄録集, p265, 2009 (第 27 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2009 年 7 月) .
- (6) Suzuki D, Yamada A, Amano T, Yasuhara R, Kimura A, Sakahara M, Tsumaki N, Takeda S, Tamura M, Nakamura M, Shiroishi T, Aiba A, Kamijo R : Essential role of Rac1 during limb development. *American Society for Bone & Mineral Research 31<sup>st</sup> Annual Meeting Onsite Program*, p291, 2009 (American Society for Bone & Mineral Research 31<sup>st</sup> Annual Meeting, Denver Colorado, USA, September 2009).
- (7) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 高見正道, 須澤徹夫, 宮本洋一, 馬場一美, 上條竜太郎: Alx3 は C2C12 細胞において BMP-2 による骨芽細胞分化を抑制する. 第 32 回日本分子生物学会年会プログラム, p279, 2009 (第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月).
- (8) Kamijo R : Novel molecular mechanisms of bone metabolism. — Bone resorption by IRF-8 and bone formation by TGF-β and BMP-2 (Riken Seminar, Wako, Japan, November 2009).
- (9) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 高見正道, 須澤徹夫, 宮本洋一, 馬場一美, 上條竜太郎: Alx3 による骨芽細胞分化制御機構の解明. 第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2010 年 6 月 25-26 日, 北九州.
- (10) 松本貴志, 山田 篤, 鈴木 大, 高見正道, 須澤徹夫, 宮本洋一, 馬場一美, 上條竜太郎: ホメオボックス遺伝子 Alx3 は BMP-2 による骨芽細胞分化を制御する. 第 26 回日本骨代謝学会学術集会 2010 年

- 7月21-23日, 東京.
- (11) Maruyama T, Miyamoto Y, Yamada A, Yamamoto G, Yoshimura K, Akiyama T, Suzawa T, Takami M, Tachikawa T, Baba K, Kamijo R: Carbonic anhydrase IX suppresses hypertrophic differentiation of chondrocytes. The 32nd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research October 15-19, 2010, Toronto, Canada.
- (12) Matsumoto T, Yamada A, Suzuki D, Takami M, Suzawa T, Miyamoto Y, Baba K, Kamijo R : Alx3, a Paired-type Homeodomain Containing Transcription Factor, Regulates Osteoblast Differentiation Induced by BMP-2. The 32nd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research October 15-19, 2010, Toronto, Canada.
- (13) Tsukasaki M, Yamada A, Miyazono A, Suzuki D, Yoshimura K, Aizawa R, Miyamoto Y, Takami M, Suzawa T, Morimura N, Aruga J, Yamamoto M, Kamijo R : TNF- $\alpha$  Suppresses POEM Expression in Osteoblasts. 89<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR) March 16-19, 2011, San Diego, California, USA.
- (14) 舘 慶太, 高見正道, 上條竜太郎, 馬場一美 : TGF- $\beta$  は異所性骨形成を強力に促進する. 第9回松本ボーンフォーラム 2010年5月22日, 塩尻.
- (15) 上條竜太郎 : 硬組織構成細胞の分化・増殖制御とそれに基づく硬組織の誘導 第10回東京骨軟骨フォーラム プログラム・抄録集, p. 6, 2010年7月24日, 東京.

[図書] (計2件)

- (1) Suzuki D, Yamada A, Amano T, Kimura A, Yasuhara R, Sakahara M, Tamura M, Tsumaki N, Takeda S, Nakamura M, Shiroishi T, Aiba A, Kamijo R (分担執筆) : Generation of Rac1 conditional mutant mice by Cre/loxP system. Shioda S, Homma I, Kato N (Eds.) Transmitters and Modulators in Health and Disease. New

- Frontiers in Neuroscience. Tokyo, 2009, Springer, pp175-178..
- (2) Kamijo R, Zhao B, Mochizuki A, Inoue T, Takami M: Involvement of transcription factor IRF-8 in bone metastasis of cancer. The Waksman Foundation of Japan, 43-47, 2010.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上條 竜太郎 (KAMIJO RYUTARO)  
昭和大学・歯学部・教授  
研究者番号: 70233939

### (2) 研究協力者

片桐岳信 (KATAGIRI TAKENONU)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 80245802  
宮本 洋一 (MIYAMOTO YOUICHI)  
昭和大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 20295132  
高見 正道 (TAKAMI MASAMICHI)  
昭和大学・歯学部・講師  
研究者番号: 80307058  
山田 篤 (YAMADA ATSUSHI)  
昭和大学・歯学部・講師  
研究者番号: 50407558