

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890060
 研究課題名（和文） 加齢に伴う骨芽細胞・脂肪細胞分化スイッチにおける転写因子 Maf の役割
 研究課題名（英文） Role of Maf in osteoblast and adipocytes differentiation

研究代表者
 西川 恵三（NISIKAWA KEIZO）
 東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・特任助教
 研究者番号：30516290

研究成果の概要（和文）：骨粗鬆症患者の病態である脂肪髄を伴う骨量減少の原因である、老化がもたらす骨芽細胞と脂肪細胞の分化振り分け機構の破綻に関わるメカニズムは未だに不明な点が多い。本研究によって、転写因子 Maf が両細胞分化の振り分けに関与することが明らかとなった。老化に伴い Maf の発現量が低下することが、骨老化を促進する原因の一つとなることが示唆され、骨老化への分子スイッチとしての Maf の新たな役割が示された。

研究成果の概要（英文）： Mesenchymal stem cells have a multipotent differentiation capacity into osteoblasts and adipocytes. Aging tips this balance in favor of the latter, thus inducing bone loss accompanied by fatty marrow, but the mechanism remains elusive.

Here we show that Maf play an important role in bone aging.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：骨芽細胞、脂肪細胞、間葉系細胞、転写因子、c-Maf、骨粗鬆症、脂肪髄、老化

1. 研究開始当初の背景

加齢がもたらす骨疾患である骨粗鬆症では、骨の構成細胞の特徴的な変化が観察されている。即ち、骨形成を担う骨芽細胞が減少する

一方で、骨髄腔内には脂肪細胞の増加が見られる。骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化するが、細胞の起源は脂肪細胞とも同じであり、骨組織における両細胞の発生は、一定のバランスの下

で制御されている。加齢は両細胞の分化に偏りを生じ、脂肪髄を伴う骨の粗鬆化を導く。この原因として、成長ホルモンや性ホルモンの低下による全身性の異常が関係することが明らかにされているものの、細胞自律的影響については不明な点が多い。近年、骨芽細胞分化を制御する転写因子Runx2、脂肪細胞分化の運命決定に必須である転写因子CebpあるいはPpar γ が同定されている研究背景の中で、両転写因子群の活性あるいは発現量がいかんして調節されることで、骨芽細胞・脂肪細胞への分化の振り分けが制御され、加齢がどのようにしてこの調節機構の破綻を導くかの分子機序は、明らかではない。これらのメカニズムを解き明かすことで、細胞分化の制御機構と老化との関係性の一端が明らかになるばかりでなく、骨疾患に対する新規創薬・治療法の開発のための分子基盤の確立につながる事が期待される。

2. 研究の目的

骨芽細胞・脂肪細胞への分化の振り分けに関わる転写制御機構を明らかにするために、骨芽細胞分化に伴い発現上昇し、脂肪細胞分化および加齢に伴い発現低下する転写因子が、骨の老化に関与する有力な候補になると考えた。そこで、初代培養によって得られた骨芽細胞、および若齢マウスと老齢マウスから単離した骨髄間質細胞から網羅的なトランスクリプトーム情報を収集し、転写因子 1470 遺伝子の発現情報を解析した結果、52 個の候補転写因子を同定した。申請者は、この転写因子群の中で、最も大きな発現変動を示す転写因子 Maf に注目し、骨代謝及び脂質代謝に対する転写因子 Maf の新規役割を詳細に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

以下の 5 点の研究計画を実施した。

- (1) Maf 遺伝子改変マウスの骨組織における形態学的影響を、 μ CT、全骨格標本、病理標本などの手法を用いて解析する。
- (2) Maf 遺伝子改変マウスの脂肪組織における形態学的影響を、解剖学、病理標本などの手法を用いて解析する。
- (3) 遺伝子改変マウス由来の細胞の初代培養や骨芽細胞および脂肪細胞分化能を有する細胞株を用いて、骨芽細胞および脂肪細胞分化に対する Maf の役割を、過剰発現等の手法を用いて明らかにする。
- (4) 骨芽細胞および脂肪細胞における Maf 転写複合体の実体を同定し、Maf が関る転写制御機構の分子メカニズムを明らかにする。
- (5) 老化に伴う Maf 遺伝子の発現低下のメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

初代培養によって得られた骨芽細胞、および若齢マウスと老齢マウスから単離した骨髄間質細胞から網羅的な

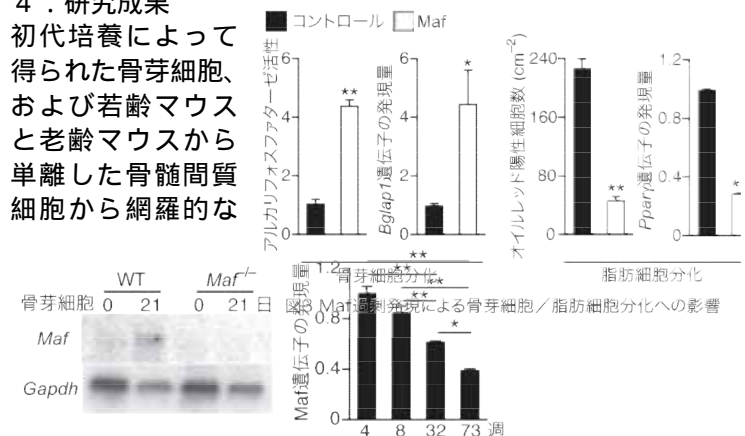


図1 骨芽細胞分化並びに若齢/老齢由来の骨髄間質細胞におけるMafの遺伝子発現変化

トランスクリプトーム情報を解析した結果、骨芽細胞分化に伴い発現誘導し、加齢に伴い発現低下する転写因子としてMafが同定された(図1)。Maf遺伝子欠失に伴う骨形成への影響を検討するために、 μ CT解析並びに全骨格標本や病理標本を作製し、Maf欠損マウスの骨組織を詳細に解析した結果、骨量の低下及び骨芽細胞数の低下が観察された(図2)。Mafの骨芽細胞自律的な役割を検討するために、Maf遺伝子欠損マウス由来の骨芽細胞の初代培養を試みたところ、骨芽細胞分化が低下することから、生体レベルでの骨形成の低下は、骨芽細胞自律的な効果に起因することが示唆される。初代培養を実施した時、骨芽細胞分化

の低下とともに、脂肪細胞分化の著しい亢進も観察された。これらの結果は、Maf遺伝子の欠損に伴い脂肪細胞分化優位に、分化系譜が変化したことを示している。そこで、骨芽細胞と脂肪細胞分化の振り分けにおけるMafの役割をさらに検証するために、骨芽細胞と脂肪細胞への分化能を有する細胞株ST2におけるMaf過剰発現解析を実施した。その結果、Maf過剰発現に伴い骨芽細胞分化が亢進する一方で、脂肪細胞分化が抑制されることから(図3)、Mafは骨芽細胞と脂肪細胞の分化振り分けを制御する転写因子であることが示唆される。Maf遺伝子欠失に伴う脂肪組織への生体レベルでの影響を検討した。Maf欠損マウスは、出生後すぐに死亡するために、新生児の骨組織の病理標本によって検討を行ったところ、野生型マウスとMaf欠損マウスの間に、脂肪細胞数に差異は観察されなかったが、in situ hybridizationによって、遺伝子発現の影響を検討した結果、Maf欠損マウスにおいては、骨芽細胞発現遺伝子オステオカルシンの発現が低下する一方で、脂肪細胞分化の制御因子であるPpar γ の発現が亢進していた。これらの結果は、Mafが生体レベルにおいても、骨芽細胞と脂肪細胞の分化振り分けを制御する転写因子であることを示唆している。

システムズバイオロジー的アプローチを用いたタンパク質-タンパク質間相互作用解析の結果、Mafは骨芽細胞分化制御因子Runx2を構成因子とする転写因子ネットワークを形成することが明らかとなった。実際に、免疫沈降実験の結果から、MafとRunx2は直接相互作用し、標的遺伝子オステオカルシンや骨シアロ蛋白質の発現を正に制御することが明らかとなった。一方、Mafは、Ppar γ の遺伝子発現を直接負に制御する作用をもつことも明らかとなった。

個体の老化は、DNA 障害の蓄積による細胞の増殖能の低下が主因とされるが、このメカニズムでは分化振り分けの異常を説明することは難しい。DNA 障害を惹起する要因の一つとして

酸化ストレスが知られていることから、Maf 遺伝子発現に対する酸化ストレスの影響を検討したところ、過酸化水素の添加に伴い、Maf 遺伝子の発現量は大きく低下した。この結果は、骨芽細胞と脂肪細胞の分化振り分け機構の破綻には、加齢に伴い増加した酸化ストレスによる Maf の発現量の低下が関係していることが示唆される。骨形成に対する Maf の量的効果を生体レベルでさらに検証するために、Maf ヘテロ接合型マウスの骨組織を解析したところ、Maf ヘテロ接合型マウスでは骨形成が低下するとともに、骨髓腔内の脂肪細胞数が増加し、骨粗鬆症様の病態が観察されることが明らかとなった(図4)。

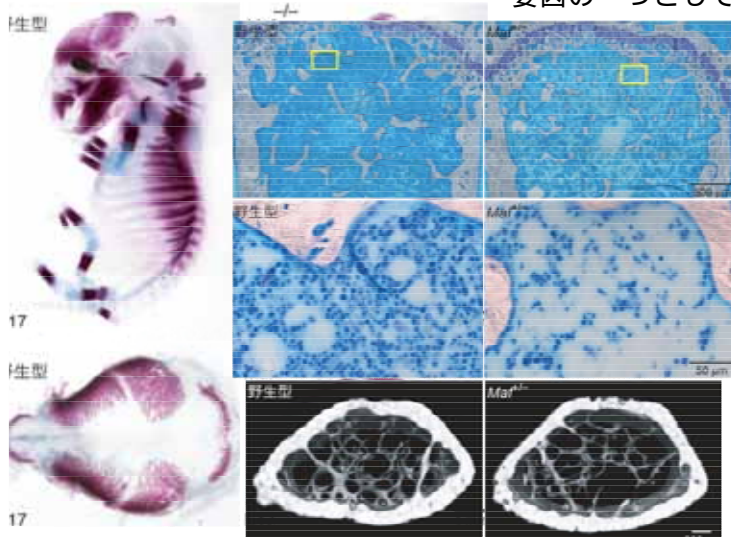
骨老化に關与する細胞自律的な分子メカニズムは長らく不明であった。本研究によって、Runx2 と協調的に作用することで骨芽細胞を正に制御する一方で、Ppar γ の発現を抑制することで脂肪細胞分化を抑制する機能を有する転写因子 Maf が同定されたことで、加齢に伴い Maf の発現量が低下することで、骨芽細胞から脂肪細胞分化優位に分化転換し、骨粗鬆症様の病態が惹起されることが、骨老化のメカニズムの一端であることを初めて明らかにした。今後、Maf の発現量の低下を人為的に調節することが、骨粗鬆症治療の臨床的戦略の一つとして位置づけられることが期待され、本研究の成果は、基礎医学ばかりでなく臨床医学の面でも意義が大きいと考えられる。

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 件)

- Takeuchi M, Kaneko H, Nishikawa K, Kawakami K, Yamamoto M, Kobayashi M
Efficient Transient rescue of hematopoietic mutant phenotypes in zebrafish using *Toi2*-mediated transgenesis, *Development growth and differentiation*, 52, 245-50, 2010.
- Nishikawa K, Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kato S, Kodama T, Takahashi S, Calame K, Takayanagi H
Blimp1-mediated repression of negative regulators is required for osteoclast differentiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*



17

17

United States of America 107, 3117-22,
2010.

[学会発表](計5件)

西川 恵三、竹田秀、山口朗、高柳広、
加齢に伴う骨量減少の原因となる転写
メカニズムの探索、第26回日本骨代謝
学会学術集会 大阪 2008年10月
29~31日

西川 恵三、高橋智、高柳広、加齢に
伴い発現変動する転写因子 Maf の細胞
分化に及ぼす影響、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 神戸 2008年12月9~12日

西川 恵三、骨芽細胞分化を司る転写
制御機構の老化に伴う変化のメカニズ
ム、第1定量生物研究会 東京 2009
年1月10~12日

西川 恵三、骨髄間葉系細胞の運命決
定機構と老化、第6回Osteoimmunology
forum (武田薬品工業株式会社・ワイス
株式会社共催) 東京 2009年2月21
日

西川 恵三、加齢に伴う骨量減少を制
御する転写メカニズムの探索、第3回
Bone Research Seminar (中外製薬株式
会社) 東京 2009年2月27~28日 発
表(2月27日)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 恵三 (NISIKAWA KEIZO)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・特
任助教

研究者番号：30516290

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし