

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09502

研究課題名（和文）ホメオティック遺伝子HoxBの骨形成における機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of the homeotic gene HoxB in bone formation

研究代表者

名井 陽（Myoui, Akira）

大阪大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：10263261

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）：本研究では、iPS細胞の骨分化誘導過程で高発現しているHoxb5転写因子に着目し、骨芽細胞の分化制御機構におけるHoxb5遺伝子の発現や機能の解明を試みた。骨芽細胞様細胞や間葉系幹細胞でHoxb5遺伝子の発現を制御すると、骨分化能が抑制された。また、CXCL12/CXCR4軸とHoxb5の関連性について検討した結果、骨分化誘導過程では、CXCL12の発現によりHoxB5転写因子が活性化され、骨モデリングを調節する可能性が示唆された。

Hoxb5転写因子が骨分化過程で重要な役割を担っている可能性が明らかになったことから、再生医療における骨分化の効率的な誘導法の確立に寄与すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞を用いた骨分化誘導法の確立は、骨再生医療の発展に寄与すると考えられる。これまで、HoxB転写遺伝子の骨形成における役割について機能解析を行った報告はなく、本研究の結果から、Hoxb5遺伝子が骨分化過程で発現しており、骨基質産生能に影響を与えることが明らかになった。Hoxb5は骨分化誘導に関連する因子として、重要な役割を担っており、また、Hoxb5が既知のシグナル伝達経路を介して骨分化を制御している可能性が示唆されたことから、Hoxb5遺伝子の発現を調節することで効率的な骨再生を誘導できる可能性がある。新規の骨関連調節因子として、骨再生医療分野への応用が期待できると考えた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the Hoxb5 transcription factor which is highly expressed in the process of inducing bone differentiation in iPS cells, and we attempted to elucidate expression and function of Hoxb5 regarding its role in the regulatory mechanisms of osteoblast differentiation. Down regulation of Hoxb5 gene expression in osteoblast like cells and mesenchymal cells resulted in suppression of bone differentiation. We also examined the relationship between CXCL12/CXCR4 axis and HoxB5, and it was suggested that exogenous CXCL12 activates Hoxb5 gene expression and regulates bone remodeling processes in total.

In conclusion, we found that Hoxb5 gene may play an important role in the bone cell differentiation, which may contribute the establishment of an efficient method of inducing bone cell differentiation in regenerative medicine.

研究分野：再生医療研究

キーワード：骨形成 ホメオティック遺伝子 再生医療

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

次世代の骨再生治療において、iPS 細胞から安全で効率的な骨芽細胞系細胞を作製するための分化誘導法の確立と最適化は非常に重要な課題である。申請者らはこれまで、iPS 細胞から高い分化能と増殖能を有する骨芽細胞系細胞の作製に成功しているが、他組織由来間葉系幹細胞と比較して、iPS 細胞由来骨芽細胞系細胞は、HoxB 遺伝子群をはじめとした特定の遺伝子を高発現していることを見出しており (Miyamoto, Myoui et al, JSBMR, 2016)、HoxB 遺伝子が骨芽細胞分化や石灰化基質の産生に重要な機能を担っているのではないかと考察した。Hox 転写因子群は、動物の胚初期発生において体節を決定する重要な遺伝子群であり、これまで、四肢の骨格再生や骨折修復過程において、一部の HoxA や HoxD 遺伝子の関与が示唆されているものの、骨分化過程における Hox 遺伝子の経時的発現や機能については明らかにされていない。骨分化誘導 iPS 細胞を用いた最適骨分化誘導法を確立する上で、HoxB 遺伝子群をはじめとした未知の骨形成制御メカニズムの関与が解明できれば、骨再生医療への応用が期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、マイクロアレイ解析による予備検討の結果から、iPS 細胞からの骨芽細胞分化過程において、HoxB 転写遺伝子群の中でも特に発現の上昇変化が顕著であった Hoxb5 遺伝子に着目し、骨芽細胞分化の分化制御機構における Hoxb5 遺伝子の経時的発現変化や機能の解明を試みた。

具体的には、マウス骨芽細胞様細胞やヒト由来間葉系幹細胞を用いて骨分化を誘導し、その過程で Hoxb5 遺伝子の発現機構や骨基質産生へ与える影響について検討を行った。また、骨分化過程は Smad や MAPK、Wnt などのシグナル伝達経路によって複雑に制御されていることが知られているが、CXCL12/CXCR4 軸が骨形成遺伝子の発現に関与するという報告 (Wei Zhu et al, J Biol Chem, 2007) があることから、骨分化過程における CXCL12/CXCR4 軸と Hoxb5 転写因子の発現機構の関連性についても検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨分化過程における HoxB 遺伝子の経時的発現解析

マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞 MC3T3 およびマウス胚由来間葉系幹細胞 C3H10T1/2 は 10%FBS 添加  $\alpha$ MEM で通常培養を行い、95%コンフルドで骨分化誘導因子 (MC3T3: Ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate, C3H10T1/2: Ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate, BMP2) を添加し、骨分化を誘導した。分化誘導 0 日、1 日、3 日、7 日、14 日後の細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法により、骨分化マーカー (Alp, Runx2, Osterix) と Hoxb5 遺伝子発現について検討を行った。分化した骨芽細胞の骨基質産生の機能評価のため、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色とアリザリンレッド (ARS) 染色を行った。また、各細胞からタンパク質を抽出し、Western Blot により、Hoxb5 タンパク質の発現を確認した。

#### (2) siRNA による Hoxb5 遺伝子発現制御下における骨分化誘導能についての検討

Transfection により細胞に Hoxb5 siRNA を導入し、Hoxb5 遺伝子をノックダウンした細胞 (Hoxb5-KD) の骨分化能について検討を行った。MC3T3 細胞および C3H10T1/2 細胞を 10%FBS 添加  $\alpha$ MEM で通常培養を行い、骨分化誘導 3 日前、骨分化誘導開始日、誘導 3 日後に、Hoxb5 siRNA を導入後 (図 1)、誘導 0 日後、7 日後、14 日後の各分化段階の細胞における Hoxb5 および骨分化マーカー (Alp, Sp7, DMP-1, Ibsp) の遺伝子発現を確認した。また、骨基質産生の機能評価として、分化誘導 3 日後、7 日後の細胞の Alp 活性、21 日後、28 日後の細胞の ARS 染色を行った。

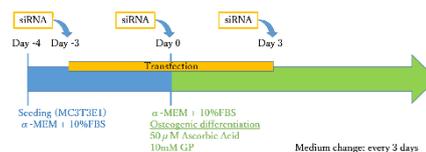


図 1 siRNA による Hoxb5 KD

#### (3) CXCL12/CXCR4 軸と Hoxb5 遺伝子発現の関連性についての検討

マウス由来骨格筋細胞を用いて、外因性の CXCL12 刺激が Hoxb5 の発現に与える影響について検討を行った。マウス横紋筋細胞 C2C12 を 10%FBS 添加  $\alpha$ MEM で通常培養し、0.1-1  $\mu$ g/mL CXCL12 で刺激 3 日後の細胞から RNA を抽出し、RT-PCR で内因性 CXCL12, CXCR4, Hoxb5 遺伝子の発現について調べた。また、内因性 CXCL12 の発現は、BMP2 刺激により抑制されるという報告があることから、C2C12 細胞を 10%FBS 添加  $\alpha$ MEM で通常培養し、7 日間 BMP2 存在下で培養することで内因性 CXCL12 の発現を制御した。その後、0.5-10  $\mu$ g/mL の外因性 CXCL12 で刺激し、3 日後の細胞における内因性 CXCL12, CXCR4, Hoxb5 の遺伝子発現を調べた。

さらに、ヒト組織由来間葉系幹細胞の骨分化誘導過程における CXCL12/CXCR4 軸と Hoxb5 遺伝子発現の関連性について検討を行った。無血清培地で培養したヒト骨髄由来間葉系幹細胞を用いて骨分化誘導を行い、誘導 0 日、7 日、10 日後の各分化段階の細胞の Hoxb5, CXCR4, CXCL12 の遺伝子発現を Real Time PCR 法で確認し、骨分化誘導過程における Hoxb5 遺伝子と内因性の

CXCL12/CXCR4 遺伝子発現の変化について検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 骨分化過程における Hoxb 遺伝子の経時的発現解析

MC3T3 細胞を骨分化誘導培地で培養すると、誘導 3 日後から 7 日後にかけて、骨分化マーカー遺伝子 (Alp, Runx2, Osterix) の発現上昇が認められた (図 2)。また、3 日後に ALP 活性が陽性になり、7 日後に ARS 染色により基質が石灰化することを確認した (図 3)。

骨分化過程における Hoxb5 遺伝子発現を確認したところ、分化誘導 3 日から 7 日後の比較的早期の段階で発現していることが明らかになった。また、Western blot の結果から、誘導後、比較的早期の 1 日後から 3 日後に Hoxb5 タンパク質の発現が確認できた (図 4) ことから、骨分化マーカーと Hoxb5 の発現の関連性が示唆された。

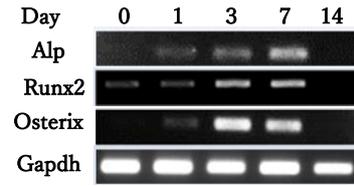


図 2 骨分化マーカーの遺伝子発現

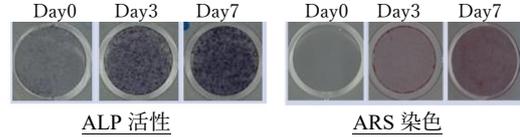


図 3 骨産生マーカーの評価

##### (2) Hoxb5 遺伝子制御下における骨分化誘導能についての検討

MC3T3 細胞の骨分化過程において、Hoxb5 発現の関与が示唆されたことから、siRNA を用いて Hoxb5 遺伝子をノックダウンさせ、MC3T3 細胞の骨分化誘導能に与える影響について検討を行った。骨分化誘導後、7 日後、14 日後の各細胞における Alp, Osterix, DMP-1, Ibsp の遺伝子発現について調べたところ、Hoxb5-KD\_MC3T3 細胞では、コントロールと比較して、分化誘導 7 日後に Hoxb5 の遺伝子発現が抑制され、Alp や骨関連遺伝子 DMP-1 の発現も抑制されることが明らかになった (図 5)。また、ALP 染色および ARS

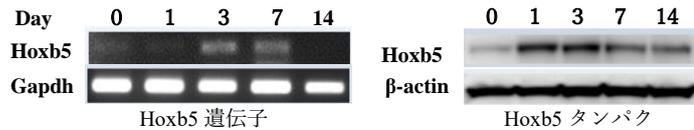


図 4 骨分化誘導過程における Hoxb5 の発現

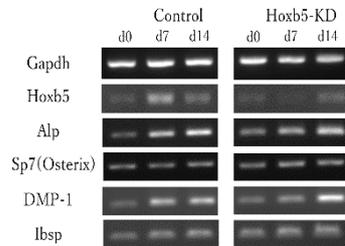


図 5 Hoxb5-KD\_MC3T3 細胞における遺伝子発現

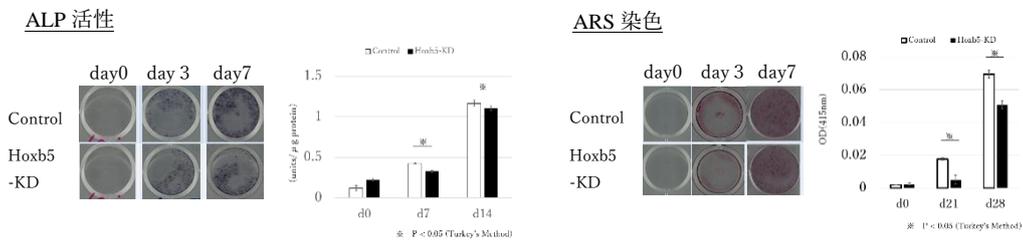


図 6 Hoxb5-KD\_MC3T3 細胞における骨基質産生マーカーの評価

染色の定量解析を行った結果、骨分化誘導 7 日後、14 日後の Hoxb5-KD 細胞では、コントロールと比較して、ALP 活性が低下しており、骨分化誘導 21 日後、28 日後の石灰化も有意に抑制されることが明らかになった (図 6)。

さらに、C3H10T1/2 を用いて同様の検討を行った結果、Hoxb5-KD\_C3H10T1/2 細胞では、分化誘導 7 日後に Hoxb5 の遺伝子発現が抑制されており、骨関連遺伝子 Sp7, Alp, Ibsp, Id1, Bglap,  $\beta$ -catenin の遺伝子発現が優位に抑制された (図 7)。また、ALP 活性および石灰化も抑制された (図 8)。

以上から、Hoxb5 遺伝子をノックダウンさせた MC3T3 および C3H10T1/2 のいずれの細胞においても骨関連マーカー遺伝子の発現が低下し、ALP 活性や石灰化が抑制されたことから、Hoxb5 遺伝子は骨分化に重要な因子である可能性が示唆された。

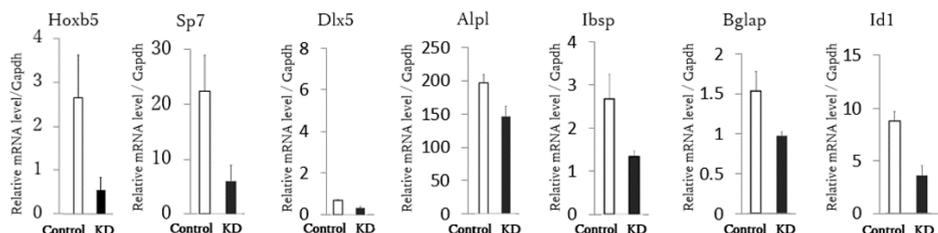


図 7 Hoxb5-KD\_C3H10T1/2 における骨関連遺伝子の発現

(3) CXCL12/CXCR4 軸と Hoxb5 遺伝子発現の関連性についての検討

C2C12 細胞を 0.1-1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$  CXCL12 で刺激すると、培養 3 日後の細胞における内因性の CXCL12 および CXCR4 遺伝子は外因性 CXCL12 濃度依存的に発現が増強し、Hoxb5 遺伝子についても 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の CXCL12 刺激で発現が上昇した(図 9)。また、内因性の CXCL12 の発現を抑制するため 7 日間 BMP2 存在下で培養後、外因性 CXCL12 で 3 日間刺激を行った結果、内因性 CXCL12, Hoxb5, CXCR4 の発現はいずれも抑制されたが、3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$  CXCL12 刺激下では、Hoxb5 の発現量が増強することを確認した(図 10)。

Hoxb5 の発現は、BMP2 非存在下では外因性の CXCL12 の刺激により増強されること、また BMP2 刺激により内因性の CXCL12/CXCR4 の発現と共に Hoxb5 の発現が抑制されたにもかかわらず、外因性の 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$  CXCL12 添加により発現が増強したことから、Hoxb5 は、CXCL12/CXCR4 軸を介して発現が調節されている可能性が示唆された。

また、ヒト組織由来間葉系幹細胞を骨分化誘導培地で培養し、3, 7, 10 日後の各細胞における CXCL12, Hoxb5, CXCR4 を調べたところ、Hoxb5 は骨分化誘導 7 日後、hCXCR4 は 10 日後に発現が上昇した。一方で、内因性の CXCL12 遺伝子は、骨分化誘導後、発現が低下していた(図 11)。

以上から、骨分化誘導過程では、造血幹細胞ニッチにおいて、間葉系間質細胞などの支持細胞から分泌される外因性の CXCL12 によって、Hoxb5 転写因子が活性化されて CXCR4 の発現が促進される可能性が示唆された。一方で、骨分化過程において、内因性の CXCL12 の発現は分化と共に低下した。CXCL12 は、破骨細胞の活性にも影響することが報告されていることから、骨分化の過程で内因性の CXCL12 の発現を抑制することで破骨細胞分化を制御し、骨モデリングを調節している仮説が示唆された。

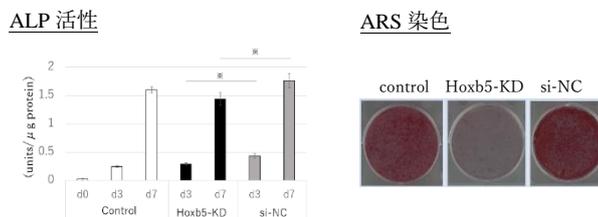


図 8 Hoxb5-KD\_C3H10T1/2 における骨基質産生マーカーの評価

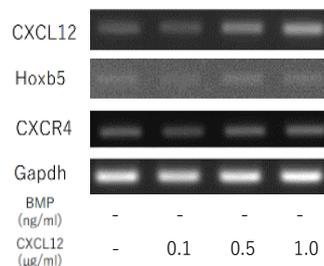


図 9 C2C12 の培養 3 日後の遺伝子発現

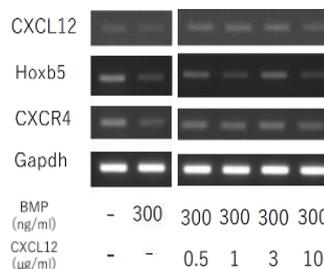


図 10 C2C12 の培養 10 日後の遺伝子発現

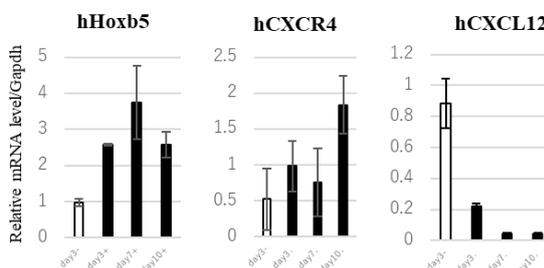


図 11 MSC の骨分化誘導過程における Hoxb5, CXCR4, CXCL12 の遺伝子発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 折戸 良, 宮本 諭, 吉田 清志, 名井 陽
2. 発表標題 Hoxb5を介したERK経路の不活性化は骨芽細胞分化初期の誘導に必要である
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	吉田 清志  (Yoshida Kiyoshi)  (50645570)	大阪大学・医学系研究科・助教   (14401)	
研究分担者	岡本 美奈  (Okamoto Mina)  (50457008)	大阪大学・医学部附属病院・助教   (14401)	
研究分担者	宮本 諭  (Miyamoto Satoshi)  (40239439)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教   (32612)	

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
---------	---------