

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890110

研究課題名（和文） 骨芽細胞分化における転写因子 KLF4 の作用解析

研究課題名（英文） Role of KLF4 during skeletal development

研究代表者

道上 郁美 (Michikami Ikumi)

大阪大学・大学院歯学研究科・リサーチアシスタント

研究者番号：80589771

研究成果の概要（和文）：Krüppel-Like Factor 4 (KLF4) は Krüppel ファミリーに属し、C 末端近傍に 3 つの Zinc finger モチーフをもつ転写因子である。皮膚・腸管・精巣・肺・および骨に発現することが知られているが、骨における機能はいまだ不明である。骨芽細胞分化および骨の発生における Klf4 の作用を検討するため、骨芽細胞特異的に Klf4 を発現するトランスジェニックマウス (TG) を作製し、表現型の解析をおこなった。その結果、TG では、膜性骨化の遅延が生じ、同様に、in vitro において、初代骨芽細胞に KLF4 を過剰発現させると石灰化が抑制された。また、TG では長管骨においても、一次骨化中心の形成が遅延していた。これは、Klf4 により Mmp9、Mmp13 の発現抑制、および、骨膜におけるオステオカルシンの発現上昇によるものと考えられた。以上の結果から、厳密な発現制御によって、Klf4 は骨芽細胞、血管内皮細胞および破骨細胞の分化と遊走を調整し、正常な骨格の発生を制御していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Krüppel-like factor 4 (KLF4/GKLF/EZF) is a zinc finger type of transcription factor highly expressed in the skin, intestine, testis, lung and bone. Its role in bone cells is unknown. To investigate the possible roles played by Klf4 during skeletal development, we generated transgenic mice expressing Klf4 under mouse type I collagen regulatory sequence. Transgenic mice showed delayed formation of the calvarial bones; and over-expressing Klf4 in primary mouse calvarial osteoblasts in culture resulted in repression of mineralization indicating that this regulation of Klf4 is through an osteoblast-autonomous effect. Surprisingly, long bones of the transgenic mice exhibited delayed marrow cavity formation. Our results demonstrate that Klf4 regulates normal skeletal development through coordinating the differentiation and migration of osteoblasts, chondrocytes, vascular endothelial cells and osteoclasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,090,000	327,000	1,417,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,290,000	687,000	2,977,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：骨芽細胞、転写因子、ジンクフィンガー、マウス

1. 研究開始当初の背景

内軟骨骨化、膜内骨化のいずれにおいても、多くの因子が相互のシグナル経路や転写作用に影響しつつ正常発生に寄与している。特に骨芽細胞分化において Runx2 が中心的役割を持つことは 1) 骨芽細胞に発現する因子の大部分が Runx2 により誘導されること、2) Runx2 のノックアウトマウスにおいて骨芽細胞の分化が初期に停止していること、3) RUNX2 の変異によりヒト骨格に異常を呈する鎖骨頭蓋異骨症が発症すること、4) 持続的な Runx2 の発現が骨の成熟を逆に抑制すること、などから間違いないと思われる (Komori et al., 1997, Cell; Otto et al., 1997, Cell)。

骨芽細胞分化に関与する分子の探索するため、骨芽細胞に発現するオステオカルシン (Ocn)、および Mmp-13 の転写開始部位上流の遺伝子配列を様々な種間で比較解析し、脊椎動物間で高度に保存された部位に結合可能な転写因子を解析ソフトで検索したところ、Kruppel Like Factor 4 (KLF4) を含めた少数の因子が候補として得られた。KLF4 は Kruppel ファミリーに属する因子で、C 端近傍に 3 つの zinc finger モチーフをもつ、転写因子である。発見当初より Klf4 遺伝が骨芽細胞に発現することは報告されていた (Garrett-Sinha et al., 1996, J. Biol. Chem)。しかし、骨芽細胞における作用は検討されていなかった。

2. 研究の目的

骨格系は単に身体の力学的支柱としての機能だけでなく、ミネラルの貯蔵、骨髄における造血のほか、分泌因子を介する内分泌器官としての作用も有している。このことは、正常な骨の発生・維持のメカニズム、ならびに骨に関連する分泌因子の転写制御機構の解明が、骨関連疾患の診断、治療および予防において重要であることを示している。

転写因子 Runx2 は骨芽細胞の分化を制御する因子群のなかでも中心的役割を担い、厳密に発現および活性が制御される。我々はこれまでに、in vitro において Kruppel Like Factor 4 (KLF4) が Runx2 の活性制御因子として骨芽細胞分化に重要な作用を持つことを明らかにしており、本研究では、KLF4 の骨芽細胞分化および骨形成に対する vivo での作用の解明を目的とした。さらに Runx2 依存的に骨芽細胞に発現誘導される因子の調節機構の分子メカニズムに対する KLF4 の作用についても検討した。本研究より得られる知見は複雑な組織間相互作用により形成される全身骨格のシグナリングを一層理解するのみならず、未だ原因不明の先天性骨格形成異常が起こるメカニズム解明の一助となりえ

る。

3. 研究の方法

KLF4 の骨芽細胞に発現する遺伝子の転写調節の様式をより詳細に解析する目的で、骨芽細胞特異的に野生型 KLF4 を発現させるため、マウス I 型コラーゲン (Col I (a1)) の転写開始部位上流 2.3kb の領域を用いた。このプロモーター領域は骨芽細胞特異的発現のためのエンハンサーを含んでいる。KLF4 が異所性に発現していることは KLF4CDS をプライマーとした genotyping、および KLF4CDS をプローブとした In situ hybridization により確認した。骨格 (およびそれに付随する軟組織) に生じる表現型を詳細に解析した。

4. 研究成果

Klf4 は扁平骨の未熟な骨芽細胞に発現しており、成熟するに従って発現が減弱していくことが報告されている (Garrett-Sinha ら, 1996)。本研究では、長管骨において、Klf4 は軟骨膜の未熟な骨芽細胞には発現していたが、骨膜の成熟した骨芽細胞には発現していないことを示した (図 1)。

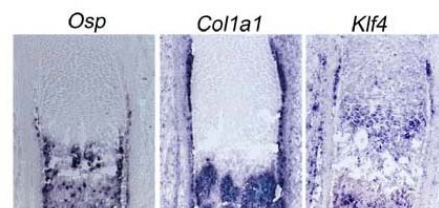


図 1 胎生 18.5 日齢野生型マウス橈骨における遺伝子発現

これらの結果は、正常な骨芽細胞の分化には、骨膜における Klf4 の発現の低下が必要であるということを示唆している。また in vivo において、骨芽細胞に Klf4 を発現させると、膜性骨化により生じる頭蓋冠の形成が遅延した (図 2)。

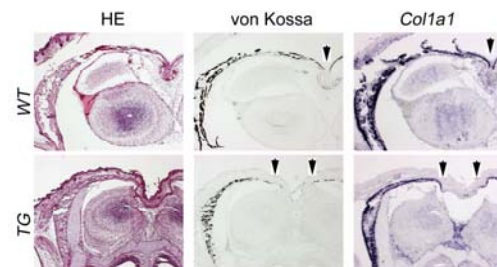


図 2 胎生 18.5 日齢マウス前頭骨前頭断における HE 染色, von Kossa 染色 および 1 型コラーゲンの発現

さらに in vitro において、初代骨芽細胞に

Klf4 を過剰発現させると、骨芽細胞の分化 (図 3) と多くの骨芽細胞関連遺伝子の発現が抑制された (図 4)。

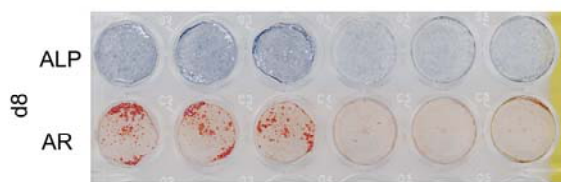


図 3 Klf4 の過剰発現による初代骨芽細胞の分化への影響

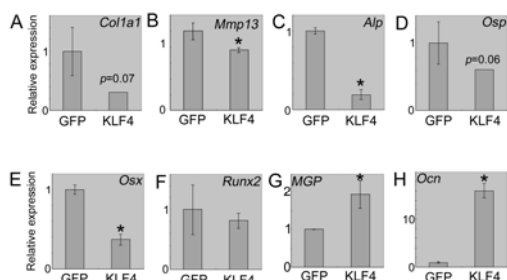


図 4 Klf4 過剰発現による骨芽細胞関連遺伝子の発現量の変化

これらの結果は、Klf4 が前骨芽細胞を比較的未分化で、増殖が活発な状態で維持していることを示唆している。

長管骨においては、軟骨に分化は正常であったが、Klf4 が骨膜に持続的に発現することにより、長管骨の一次骨化中心の形成が顕著に遅延した (図 5)。

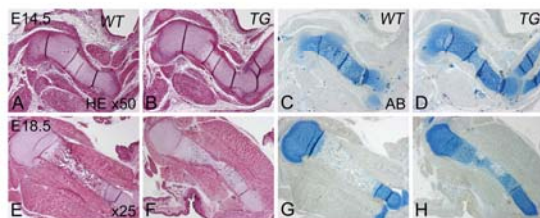


図 5 マウス上腕骨の HE 染色および AB 染色

破骨細胞浸潤および血管進入は、骨髄の形成に必須である。胎生 15.5 日齢において WT では、破骨細胞の石灰化軟骨細胞層への浸潤が認められ、これに付随して、骨幹内部での血管進入と骨芽細胞の誘導が確認された。これに対して、TG では、破骨細胞が骨膜および軟骨膜に停滞しており、骨幹内部への浸潤は認められなかった (図 6)。

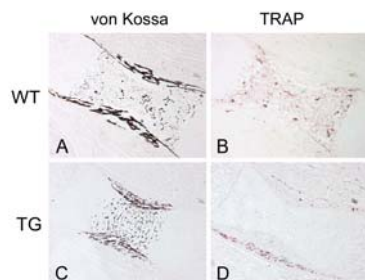


図 6 マウス長管骨の von Kossa 染色と TRAP 染色

Mmp ファミリー因子は石灰化軟骨への破骨細胞浸潤に必須であり、Mmp13 がまずコラーゲン線維を切断し、Mmp9 が切断されたコラーゲン線維をさらに分解する (Ortega ら, 1996). Chm-1 は軟骨への血管進入を阻害し、それまでの無血管状態の維持に作用しているが (Hiraki ら, 2005), Mmp によりコラーゲン線維が分解され、肥大化軟骨細胞より分泌された Vegf が破骨細胞の遊走に作用し (Engsig ら, 2000), 破骨細胞浸潤により血管形成および血管進入が促進される (Gerber ら, 1999; Cackowski ら, 2010)。本研究では、TG マウスと WT マウスの上腕骨における qPCR の結果、Vegf と Chm-1 の発現量に差は認められなかったが、Mmp9 と Mmp13 の発現が TG マウスにおいて顕著に低下していた (図 7)。

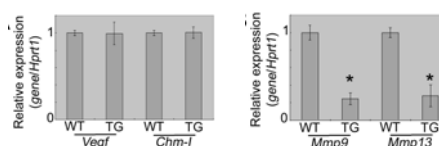


図 7 マウス上腕骨における遺伝子発現

TG の長管骨の骨髓腔形成予定領域における Mmp9 と Mmp13 の発現が低下していたことから、本研究の TG マウスでは、Klf4 が骨膜および軟骨膜において発現しているため、Klf4 が間接的に Mmp の発現を抑制していることが示唆された。

in vitro において、Klf4 がオステオカルシン (Ocn) の発現を強力に誘導し、さらに破骨細胞の走化性にオステオカルシンが関与しているという報告があることから、in vivo においても Klf4 が Ocn の発現を誘導する可能性、さらに Ocn が誘導されることによって破骨細胞の局在が影響をうける可能性について検討した。その結果、TG においてより早期に強力に Ocn が発現しており、Klf4 は in vivo においても Ocn の発現を誘導することが示唆された (図 8)。

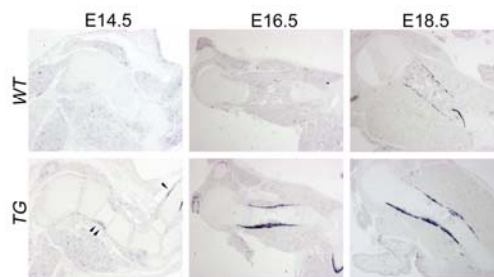


図 8 オステオカルシンの発現

また、Klf4 は in vivo においても in vitro においても石灰化を抑制したが、MGP と Ocn の発現は顕著に増加した。Ocn も MGP も石灰化を抑制することが知られている (Ducy ら, 1996; Luo ら, 1997)。このこと

から、Klf4 によってオステオカルシンと MGP が過剰に誘導されたために、石灰化が阻害された可能性がある。MGP による石灰化抑制は BMP2 を介するが、Klf4 によって Noggin、Chordin、Smad6 の発現への影響は認められなかった。このため本研究では、Klf4 による Ocn の転写誘導メカニズムについて詳細に検討した。

1. 3kb マウスオステオカルシンプロモーター (1.3 OG2-luc) を、Klf4 発現ベクターとともにマウス未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞に遺伝子導入すると、コントロールである LacZ と比較して約 5 倍の転写活性を認め、Klf4 発現ベクターとともに Runx2 発現ベクターを導入すると 26 倍の転写活性が認められ、Klf4 は Runx2 と協調的に作用し、Ocn の発現誘導を惹起している可能性が考えられる。(図 9)

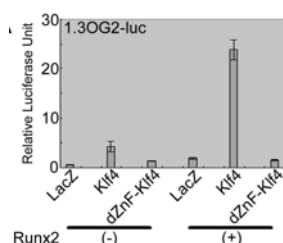


図 8 Klf4 によるオステオカルシンプロモーターへの作用

また、オステオカルシンプロモーターに対する Klf4 の作用部位の同定のため Ocn 転写開始部位上流 1.3Kb において、Klf4 が結合する可能性のある 3 つの site (site 1, site 2, site 3) を検出し (Shields ら, 1998)、site 1, 2, 3 それぞれに変異を導入した変異体 (M1, M2, M3) を作成し、Klf4 の作用を検討した。Klf4 は、マウス OG2 配列の site 2 に直接結合し、Ocn の転写を誘導した。site 2 に変異を導入すると、オステオカルシンの転写は活性化されなかった (図 9)。

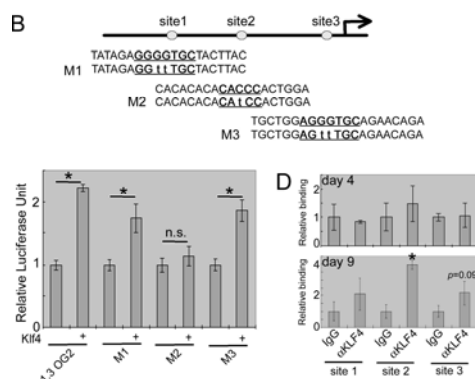


図 10 オステオカルシンプロモーターに対する Klf4 の作用と作用部位の同定

TG における Ocn の誘導部位と破骨細胞の局在が一致しており、また、in vitro の結果より Klf4 がオステオカルシンを転写レベルで制御していることから、軟骨膜における Ocn の発現上昇と軟骨細胞における Mmp の発現低下により、破骨細胞浸潤および血管進入が阻害されたと考えられた (図 11)。以上の in vivo および in vitro で得られた結果は、Klf4 が骨形成において、Klf4 自体の発現が組織特異的かつ時期特異的に制御されることによって、骨芽細胞の分化だけでなく、内軟骨性骨化に関与する血管内皮細胞や破骨細胞の遊走をも制御することを示唆している。

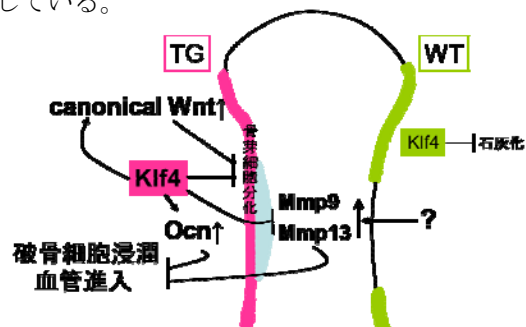


図 11 Klf4 による骨格発生の制御機構

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 3 件)

- ① Michikami I, Fukushi T, Honma S, Yoshioka S, Itoh S, Muragaki Y, Kurisu K, Ooshima T, Wakisaka S, Abe M. Trps1 is necessary for normal temporomandibular joint development. Cell Tissue Res. 2012 Apr;348(1):131-40. (査読有)
- ② Michikami I, Fukushi T, Tanaka M, Egusa H, Maeda Y, Ooshima T, Wakisaka S, Abe M. Kruppel-like factor 4 regulates membranous and endochondral ossification. Exp Cell Res. 2012 Feb 15;318(4):311-25. (査読有)
- ③ Abe M, Michikami I, Fukushi T, Abe A, Maeda Y, Ooshima T, Wakisaka S. Hand2 regulates chondrogenesis in vitro and in vivo. Bone. 2010 May;46(5):1359-68. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 田中真理子, 道上郁美, 阿部真土, 転写因子 Klf4 の骨芽細胞における生理的な発現減弱は破骨細胞の硬組織内への進入、生存に必須である, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日~16 日 パシフ

イコ横浜

- ②道上郁美, 大嶋隆, Klf4 は骨芽細胞特異的な遺伝子の発現を制御し骨芽細胞の分化を抑制する, 第 49 回小児歯科学会大会, 2011 年 11 月 28 日 29 日 いわて県民情報交流センターアイーナ
- ③道上郁美, 大嶋隆, Klf4 は骨芽細胞の分化を制御する, 第 30 回日本小児歯科学会近畿地方会記念大会, 2011 年 10 月 30 日 大阪大学中ノ島センター
- ④Michikami I, Abe M , Klf4 Regulates Osteoblast Differentiation , the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2011 Annual Meeting, the San Diego Convention Center September 16-20, 2011
- ⑤道上郁美, 福士暁也, 栗栖浩二郎, 阿部真士, Klf4 の厳密な発現制御は骨芽細胞分化に重要である, 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 19 日(木)~21 日(土) 大阪国際会議
- ⑥Abe M, Itho S, Muragaki Y, Michikami I, Trps1 contributes to normal temporomandibular joint formation., 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学学会大会 合同大会, 2010 年 12 月 7 日~10 日 神戸ポートアイランド
- ⑦Michikami I, Abe M, Kruppel-Like Factor 4 represses osteoblast differentiation by inducing beta-catenin signaling in primary calvarial osteoblast and directly regulates osteocalcin expression by interacting Runx2, 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学学会大会 合同大会, 2010 年 12 月 7 日~10 日 神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

道上 郁美 (Ikumi Michikami)

大阪大学・歯学研究科・リサーチアシスタント

研究者番号: 80589771