

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592222

研究課題名(和文)骨量規定転写因子シュニユリ3の新規標的遺伝子同定と機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the novel target gene of bone volume-regulating transcription factor Schnurri-3.

研究代表者

石堂 康弘(Ishidou, Yasuhiro)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：10300740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症は成人の骨の骨形成と骨吸収のバランスが崩れた結果である。シュニユリ3(Shn3)は成熟個体の骨量を負に制御するが、その分子メカニズムについて不明な点も残っている。我々は、Shn3の下流で発現が制御される遺伝子をマイクロアレイによって網羅的に検索し、Alg2という蛋白糖化酵素を同定した。機能を解析すると、これが骨形成に重要なRunx2の転写活性を抑制する事、また軟骨細胞においては、生理的小胞体ストレス関連分子Creb3l2の発現に重要で、したがって軟骨細胞成熟を正に制御する事も分かった。本研究は骨軟骨組織において、蛋白糖転移酵素が遺伝子発現や転写調節に関わる新しい可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Osteoporosis is a result of unbalanced bone formation and resorption in adult bone. Although Schnurri 3 (Shn3) negatively regulates bone volume in adult mice, the underlying molecular mechanism are not fully understood. We searched for genes which expression level were affected by knockdown of Shn3 in osteoblasts by microarray approach, and found that Alg2 was induced by Shn3. Alg2 physically interacted with the osteoblast differentiation master regulator Runx2 to interfere its nuclear localization, which resulted in its suppressed transcriptional activity. In chondrocytes, Alg2 induced Creb3l2, which is a crucial gene in the important physiological endoplasmic reticulum stress during chondrogenesis, to support chondrocyte maturation. Our findings revealed a novel possibility that mannosyltransferase genes play crucial roles in gene transcription and expression in cells of bone and cartilage.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：Shn3 Hivep3 Alg2 骨芽細胞分化 軟骨細胞分化 Runx2

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスが崩れて、骨の量と質が低下して易骨折性となり、患者の活動性と生活の質を著しく低下させる。骨発生の骨形成を司る分子メカニズムは比較的良好に分かっているが、成人における骨形成の制御についての知見は決して多くない。近年、ノックアウトマウスの解析から、adult の骨形成を負に制御するシュニャリ (Schnurri, Shn)3/Hivep3 が同定・解析され、その作用機序が骨芽細胞分化マスター因子 Runx2 の分解誘導による事が報告された。しかし元来 Shn/Hivep ファミリーは足場蛋白として転写に関わる事で知られていたため、我々はその観点から、Shn3 の骨形成における新たな分子作用点の存在を予想した。また、Shn3 ノックアウトマウスでは軟骨細胞の成熟が抑制されていたため、Shn3 が軟骨細胞分化後期に促進的にはたらき可能性が示唆されていたが、その分子メカニズムは全く不明であった。

2. 研究の目的

Shn3 の発現パターン、特に組織特異性を、ファミリー分子である Shn1、Shn2 と比較しながら調べる。また、骨芽細胞系細胞の分化における時間的発現パターンについても検討する。

最も重視するのは、転写関連因子としての Shn3 の、下流で誘導される遺伝子であり、その機能である。この下流遺伝子について、gain-of-function と loss-of-function の骨芽細胞分化への影響を調べる。

Shn3 の軟骨細胞分化への影響を、骨芽細胞と同様の手法で検討する。この際、やはり、下流の誘導因子の同定と機能解析を中心に行う。

いずれも適宜、骨や軟骨の組織培養系を用いて、*in vivo* を mimic した実験検討を行う。

3. 研究の方法

細胞は、骨芽細胞分化系としてマウス MC3T3-E1 と ST-2 細胞、軟骨細胞系としてマウス ATDC5 細胞、C3H10T1/2 細胞、初代軟骨細胞を用いた。骨芽細胞分化は、ALP 染色と分化マーカーの定量的 RT-PCR、及びウエスタン・ブロットで評価した。軟骨細胞分化は、alcian blue 染色と、分化マーカーの定量的 RT-PCR、及びウエスタン・ブロットで評価した。

マイクロアレイは、Affymetrix 社の

Mouse Gene 2.0 ST Array にて解析した。下流遺伝子の検索は、Shn3 のノックダウンを行って、発現レベルが減少した遺伝子を抽出した。

Runx2 と Shn3 の物理的接触を免疫沈降ウエスタン・ブロット法で検討し、それぞれの細胞内局在は、免疫蛍光法とコンフォーカル顕微鏡を用いて評価した。また、Runx2 の転写活性に与える Shn3 の影響を、Runx2 活性レポーター・ルシフェラーゼ・アッセイを用いて解析した。

4. 研究成果

間葉系前駆細胞 ST2 における BMP-2 添加による骨芽細胞分化誘導系で、Shn3 ノックダウンは、期待通り骨芽細胞分化を促進したが、Shn1、または Shn2 の siRNA は逆に ALP 活性を抑制した。ST2 と骨芽細胞株 MC3T3-E1 で、Shn3 siRNA でのみ発現が低下する遺伝子をマイクロアレイで検索し、Asparagine-linked glycosylation 2 (Alg2) を抽出した。Alg2 ノックダウンは、ST2 において Runx2 蛋白量に影響を与えずに Osx 以降の骨芽細胞分化マーカーの発現を亢進させ、逆に過剰発現は骨芽細胞分化を抑制し、この効果はマウス胎子の頭蓋骨器官培養の骨形成系に対する Alg2 ウイルス感染実験で確認出来た。Alg2 は Runx2 活性レポーター-*OSE2 luc* の活性を抑制し、Runx2 と共に免疫沈降した。細胞免疫蛍光染色では、Alg2 過剰発現により Runx2 は小胞体局在パターンをとり核局在が阻害され、その結果として転写機能が抑制されたと示唆された。

Shn3 の軟骨形成促進効果の分子メカニズムは全く不明であるが、軟骨細胞株 ATDC5 では Shn3 ノックダウンにより軟骨細胞分化が抑制され、同時に Alg2 も減少した。Alg2 siRNA により軟骨細胞分化に重要な小胞体ストレス伝達分子 Creb3l2 の発現が減少し、分化マーカー Col2a1 の発現も抑制された。マウス胎子中足骨軟骨器官培養系に Alg2 発現ウイルスを感染させると、肥大軟骨基質の石灰化領域が増大し、Shn3 から Alg2-Creb3l2 へのシグナル軸が、軟骨細胞成熟に一定の役割を演じると考えられた。

従って、Shn3 の骨軟骨における機能の少なくとも一部は、Alg2 の誘導を介したものであり、Alg2 が骨や軟骨代謝疾患の新たな分子標的になる可能性が示唆された。重要な事は、Alg2 は蛋白糖化酵素であるが、蛋白糖化酵素が糖化以外の機能によって細胞分化に関わるという報告はなく、本研究はその観点からもインパクトがある。この研究結果は、論文に発表した (Imamura K *et al.*, *J Biol Chem*

289: 9865-9879, 2014)。

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. Human Immunodeficiency Virus Type I Enhancer Binding Protein 3 is Essential for the Expression of Asparagine-linked Glycosylation 2 in the Regulation of Osteoblast and Chondrocyte Differentiation. Imamura K, Maeda S, Kawamura I, Matsuyama K, Shinohara N, Yahiro Y, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S. *J Biol Chem* 289: 9865-9879, 2014 査読あり
2. BMP signaling upregulates neutral sphingomyelinase 2 to suppress chondrocyte maturation via the Akt signaling pathway as a negative feedback mechanism. Kakoi H, Maeda S, Shinohara N, Matsuyama K, Imamura K, Kawamura I, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S. *J Biol Chem* 289: 8135-8150, 2014 査読あり
3. SnoN suppresses maturation of chondrocytes by mediating signal cross-talk between transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein pathways. Kawamura I, Maeda S, Imamura K, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S. *J Biol Chem* 287 : 29101-29113, 2012 査読あり

〔学会発表〕(計16件)

(国際)

Australian and New Zealand Bone and Mineral Society 23rd ANNUAL SCIENTIFIC MEETING 【Melbourne, Australia】September 8-11, 2013

1. The roles of Schnurri family in differentiation of osteoblasts and chondrocytes
Katsuyuki Imamura, Shingo Maeda, Ishidou Yasuhiro, Masahiro Yokouchi, Seturo Komiya

ESCEO13-IOF Rome 2013 【Rome, Italy】
April 17-20, 2013

2. Alg2 is induced by Schnurri-3 to inhibit transcriptional activity of Runx2 and osteoblast differentiation
Imamura K^{1,2}, Maeda S¹, Kawamura I^{1,2}, Ishidou Y¹, Yokouchi M² and Komiya S^{1,2}
¹Department of Medical Joint Materials, Kagoshima University and ²Department of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University

Orthopaedic Research Society 2013 Annual Meeting 【San Antonio, TX, USA】
January 26-29, 2013

3. Asparagine-linked glycosylation 2 homolog, identified as a downstream target of Schnurri-3, cell-autonomously regulates differentiation of osteoblasts and chondrocytes.
Imamura, Katsuyuki^{1, 2}; Maeda, Shingo¹; Kawamura, Ichiro^{1,2}; Yokouchi, Masahiro²; Ishidou, Yasuhiro¹; Komiya, Setsuro^{1,2}
¹Dept of Medical joint Materials, Kagoshima University, Kagoshima, Japan.
²Dept of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University, Kagoshima, Japan.

1st Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting with Australian and New Zealand Bone and Mineral Society (ANZBMS) 22nd Annual Scientific Meeting 【Perth, Australia】September 2-5, 2012

4. Alg2, identified as a downstream mediator of Schnurri 3, inhibits function of Runx2 and osteoblast differentiation.
Department of Medical Joint Materials, Kagoshima University, Kagoshima, Japan
Imamura K, Maeda S, Kawamura I, Ishidou Y, Komiya S
Department of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University, Kagoshima, Japan
Imamura K, Kawamura I, Yokouchi M, Komiya S

57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 【Long Beach, CA, USA】
January 13-16, 2011

5. Chondrocyte differentiation is suppressed by knock-down of Schnurri-3 gene *in vitro*
Maeda S, Kawamura I, Ishidou Y,
Setoguchi T, Yamamoto T, Zenmyo M, Ijiri K, Komiya S

(国内)

- 第 27 回日本軟骨代謝学会【京都市】**
2014 年 2 月 28 日 ~ 3 日 1 日
6. Human immunodeficiency virus type enhancer binding protein 3 (Hivep3)の下流として同定した Asparagine-linked glycosylation 2 (Alg2)は骨芽細胞と軟骨細胞の分化を調節する
今村勝行^{1,2}、前田真吾¹、篠原直弘^{1,2}、松山金寛^{1,2}、河村一郎²、横内雅博²、石堂康弘¹、小宮節郎^{1,2}
¹ 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座、
² 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学
- 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会【千葉市】**2013 年 10 月 17 日 ~ 18 日
7. Schnurri ファミリーによる骨芽細胞分化調節の多様性
今村勝行^{1,2}、前田真吾¹、河村一郎²、石堂康弘¹、横内雅博²、小宮節郎^{1,2}
¹ 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座
² 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科整形外科学
- 国際骨代謝学会・日本骨代謝学会 第 2 回合同国際会議【神戸市】**2013 年 5 月 28 日 ~ 6 月 1 日
8. The role of Schnurri family in differentiation of osteoblasts and chondrocytes
Katsuyuki Imamura^{1,2}, Shingo Maeda¹, Ichiro Kawamura², Yasuhiro Ishidou¹, Masahiro Yokouchi², Setsuro Komiya^{1,2}
¹Department of Medical Joint Materials,
²Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University
- 第 26 回日本軟骨代謝学会【豊中市】**
2013 年 3 月 1 日 ~ 2 日
9. 骨軟骨細胞分化における Schnurri family の役割
今村勝行^{1,2}、前田真吾¹、河村一郎²、石堂康弘¹、横内雅博²、小宮節郎^{1,2}
¹ 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座、
² 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学
- 第 35 回日本分子生物学会年会【福岡市】**
2012 年 12 月 11 日 ~ 14 日
10. Schnurri-3 の下流で誘導される Alg2 は

骨芽細胞と軟骨細胞の分化を調節する
鹿児島大学大学院医療関節材料開発講座

今村勝行、前田真吾、河村一郎、石堂康弘、小宮節郎

鹿児島大学大学院運動機能修復学講座整形外科学

今村勝行、河村一郎、横内雅博、小宮節郎

第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会【名古屋市】2012 年 10 月 26 日 ~ 27 日

11. Schnurri-3 の下流因子として同定した糖転移酵素 Alg2 は骨芽細胞分化を抑制する

鹿児島大学大学院医療関節材料開発講座

今村勝行、前田真吾、河村一郎、石堂康弘

鹿児島大学大学院整形外科学
横内雅博、小宮節郎

第 30 回日本骨代謝学会学術集会【東京都】2012 年 7 月 19 日 ~ 21 日

12. Schnurri-3 の下流因子として同定した Alg2 は Runx2 機能を阻害し骨芽細胞分化を抑制する

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座

今村勝行、前田真吾、河村一郎、石堂康弘

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学

横内雅博、小宮節郎

第 25 回日本軟骨代謝学会【名古屋市】
2012 年 3 月 9 日 ~ 10 日

13. Schnurri-3 の下流因子として同定した糖転移酵素 Alg2 の骨芽細胞分化と軟骨細胞分化における役割

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座

今村勝行、河村一郎、石堂康弘、前田真吾、小宮節郎

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学

今村勝行、河村一郎、横内雅博、小宮節郎

第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会【群馬県前橋市】2011 年 10 月 20 日 ~ 21 日

14. 骨芽細胞分化を抑制する Schnurri-3 は軟骨細胞分化を促進する

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座/

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学

今村勝行、河村一郎、小宮節郎

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座
石堂康弘, 前田真吾
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学
横内雅博

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：60353463

小宮 節郎 (Komiya Setsuro)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30178371

15. **第12回運動器科学研究会【高知県安芸郡】** 2011年9月2日~3日
骨芽細胞と軟骨細胞の分化におけるSchnurri-3の役割
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座
前田真吾, 今村勝行, 石堂康弘, 河村一郎, 横内雅博, 小宮節郎

(3)連携研究者

なし

16. **第29回日本骨代謝学会学術集会【大阪市】** 2011年7月28日~30日
Schnurri-3の下流因子として同定した糖転移酵素 Alg2 は骨芽細胞分化を抑制する
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座/
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学
今村勝行, 河村一郎, 横内雅博, 小宮節郎
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座
石堂康弘, 前田真吾

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.orthop-kagoshima-u.com/>

6. 研究組織
(1)研究代表者

石堂 康弘 (Ishidou Yasuhiro)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：10300740

(2)研究分担者

前田 真吾 (Maeda Shingo)