

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791662

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞における BMP2 / PPAR シグナルクロストークの解析

研究課題名(英文) Signaling Crosstalk between PPARgamma and BMP2 in Mesenchymal Stem Cells.

研究代表者

高田 伊知郎 (Takada, Ichiro)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50361655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は間葉系幹細胞を用いて、脂肪細胞分化促進因子PPAR と骨芽細胞促進因子BMP2シグナルの相互作用に関し、検討を行った。BMP2はPPAR 依存的な脂肪細胞分化を抑制しなかったものの、PPAR リガンド(トログリタゾン；TRO)を投与した後にBMP2を添加すると、TRO単独投与よりもPPAR 標的遺伝子mRNAの発現が促進される現象が観察された。さらに転写に関係する修飾ヒストンの分布に関しても変化が見られた。このようにPPAR とBMP2に関し、エピジェネティック制御依存的な調節機構の存在を見出す事に成功した。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have revealed that PPARgamma's transactivation function is regulated by extracellular signals. Among these factors, BMP2 strongly induces bone formation, but the effect of BMP2 on PPARgamma function remains unclear. We examined the effect of BMP2 and PPARgamma in ST2 cells and found that PPARgamma activation affected BMP2's signaling pathway through epigenetic regulation. Although BMP2 did not interfere with PPARgamma-mediated adipogenesis, BMP2 increased mRNA expression levels of PPARgamma target genes (such as Fabp4 and Nr1h3) when cells were first treated with troglitazone (TRO). Moreover, PPARgamma activation affected BMP2 through enhancement of histone activation markers (acetylated histone H3 and trimethylated Lys4 of histone H3) on the Runx2 promoter. These results suggest that the order of treatment with BMP2 and a PPARgamma ligand is critical for adipogenesis and osteoblastogenesis switching in MSCs.

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：転写 間葉系幹細胞 PPAR BMP2

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は骨芽細胞や軟骨細胞に加え、脂肪細胞や筋芽細胞等多様な細胞種に分化可能である。この細胞は骨髄や脂肪組織中に大量に含まれ培養も簡便であることから、再生医療の材料としても有用視されている。近年各細胞分化を制御する多数の転写因子やシグナル群が同定されたが、興味深い事にこれらの多くは一方の分化を促進すると同時に他方の分化に対しても促進あるいは抑制等の制御を示す。

脂肪細胞分化を促進する転写因子 PPAR (ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体) は核内レセプター型転写因子の一つであり、脂肪酸代謝産物や 2 型糖尿病改善薬であるチアゾリジン誘導体などをリガンドとして直接結合する事で特異的 DNA 配列に結合し、標的遺伝子の mRNA 転写を活性化する。更に PPAR は骨芽細胞分化抑制や破骨細胞分化促進にも機能するため、骨代謝における調節因子としての側面もある。

一方、既知の骨芽細胞分化促進因子として BMP/TGF シグナル、Wnt シグナルやサイトカインシグナルが存在する。これらは 3T3-L1 等の前駆脂肪細胞を用いた分化実験では抑制機能が報告されているが、間葉系幹細胞における機能は不明であった。そこで申請者は間葉系幹細胞の培養細胞株で脂肪細胞および骨芽細胞に分化可能である ST2 細胞を用い、主に PPAR 活性制御シグナル解明の観点から脂肪細胞・骨芽細胞分化振り分けの分子機構に関する研究を遂行して来た。

その結果 IL1, TNF が NF- κ B 活性化を介した PPAR DNA 結合阻害により脂肪細胞分化抑制と骨芽細胞分化促進に作用する事、Wnt5a シグナルが抑制型ヒストンメチル化酵素 SETDB1 の活性制御を介し脂肪細胞分化抑制、骨芽細胞分化促進に作用する事を見出した。

更に BMP2 シグナルと PPAR リガンドを用いた間葉系幹細胞における分化実験を行った結果、BMP2 は PPAR リガンド依存的な脂肪細胞分化を抑制せず、骨芽細胞・脂肪細胞分化を同時に促進する現象を見出した。しかしながら BMP2 を 3 時間処理後 PPAR リガンドを 3 時間添加したところ PPAR リガンド単独と比較して脂肪細胞分化マーカー遺伝子 Fabp4 の発現が低下した。更に PPAR リガンド処理後 BMP2 を添加すると BMP2 単独と比較して Fabp4, に加え、骨芽細胞分化促進因子である Runx2 の発現が上昇した。この現象は BMP2 と PPAR リガンドが同時投与と経時的投与では異なる効果を示し、前述の Wnt や IL1 シグナルとは違う、新たな分子機構の存在が予想された。そこで本研究ではこの分子機構解明のため、間葉系幹細胞を用いた分化実験、ChIP アッセイを用いたエピジェネティック制御機構の実験を行った。

またプロテオミクス手法から PPAR と同様に脂肪細胞や免疫系細胞の機能制御を担う核内レセプター ROR と相互作用する、新

規機能未知遺伝子 X の単離に成功した。この遺伝子は ROR や PPAR の機能を正に制御するが、その分子機構や生体内での機能は不明である。そこで生体内での機能解明を目指し、ノックアウトマウスの作出を試みた。

2. 研究の目的

骨芽細胞や軟骨細胞、筋芽細胞、脂肪細胞等に分化可能な間葉系幹細胞における分化バランス制御機構の解明は、骨量維持や再生医療、代謝疾患と関連し極めて重要な課題である。申請者は骨芽細胞誘導因子 BMP2 と脂肪細胞誘導因子 PPAR が間葉系幹細胞において、標的遺伝子の mRNA レベルで相互に制御する可能性を見出した。近年、DNA に巻き付いたヒストン八量体の修飾が mRNA 発現制御と密接に関わっている事が知られている。そのようなエピジェネティクス制御を介した BMP2 と PPAR のシグナルクロストークの分子機構解明を目指し、幹細胞分化、生体内の骨量維持機構への新たな分子基盤の確立を目指す。

また、核内レセプターと相互作用因子として新たな遺伝子を見出した。この遺伝子 X は PPAR のリガンド依存的な転写活性化能を促進するが、構造からは機能が類推出来ない。そこでこの遺伝子 X のノックアウトマウス作出および機能解析を行う事にした。

3. 研究の方法

間葉系幹細胞における BMP2 と PPAR シグナルクロストークに関し、以下の群条件で RT-qPCR、ChIP アッセイを行った。(1) 無処理、(2) 1 μ M の PPAR リガンド(トログリタゾン;TRO)処理 3 時間、(3) 50 ng/mL の BMP2 処理 3 時間、(4) 1 μ M TRO 処理 3 時間後に 50 ng/mL BMP2 処理 3 時間、(5) 50 ng/mL BMP2 処理 3 時間後に 1 μ M TRO 処理 3 時間。検討する遺伝子として、骨芽細胞分化に関わるアルカリホスファターゼ(Alp1)、転写因子 Runx2、脂肪細胞分化マーカー Fabp4、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(Gpd1)、脂肪細胞にて PPAR 標的遺伝子である Nr1h3。

更に上記(1)から(5)の条件で、間葉系幹細胞 ST2 細胞を用いたマイクロアレイで網羅的な探索を行い、他の遺伝子の発現変動に関しても検討をおこなう。

以上の結果から新規エピジェネティック制御の可能性を見出せば、プロテオミクス手法も駆使して両シグナル依存的な転写因子と転写共役因子相互作用の様式を解明する。

また PPAR 機能を促進する機能未知遺伝子 X に関しては、ターゲティングベクターを騒動組換えで導入した ES 細胞からノックアウトマウスの作出を行った。

4. 研究成果

培養細胞レベルの解析として ST2 細胞に 50 ng/mL の BMP2、1 μ M の TRO を添加し 7 日間

培養を行ったが、TRO 依存的な脂肪細胞分化に対して BMP2 は抑制作用を示さなかった。

また研究方法に示した 5 群のサンプルに関して RNA を回収し、RT-qPCR をおこなった結果、Fabp4 や Gpd1 は (4) 1 μ M TRO 処理 3 時間後に 50 ng/mL BMP2 処理 3 時間のほうが (2) 1 μ M TRO 処理 3 時間よりも発現量が高かった。また (5) 50 ng/mL BMP2 処理 3 時間後に 1 μ M TRO 処理 3 時間の条件においては Fabp4 や Nr1h3 の発現量が (2) 条件よりも低下した。この結果は、TRO を前処理すると BMP2 を添加する事で脂肪細胞分化が促進される可能性を示し、BMP2 前処理は脂肪細胞分化を抑制的に作用する可能性を示している。

興味深い事に骨芽細胞分化促進に機能する Runx2 や Alpl の mRNA 量は、(2) の BMP2 単独処理条件よりも (4) の TRO 前処理後に BMP2 添加した方が上昇する事を見出した。この結果は、TRO の前処理が脂肪細胞・骨芽細胞分化の双方に正に作用する可能性を示している。

次にこれらと同じ条件のサンプルでアセチル化ヒストン H3(H3KAc)、4 番目のリジンがトリメチル化されたヒストン H3(H3K3me3) の抗体を用い、Fabp4 と Runx2 のプロモーター近傍で ChIP アッセイを遂行した。このヒストン抗体はいずれも転写の活性化を表す指標となる。その結果、(4) 条件の 1 μ M TRO 処理 3 時間後に 50 ng/mL BMP2 処理 3 時間が、いずれのヒストン修飾も促進する事を見出した。また PPAR 抗体を用いた ChIP アッセイで Fabp4 プロモーターの検出も試みたが、PPAR の DNA 結合配列へのリクルートは、子の条件で特に強まる事はなかった。

以上の結果を本研究の研究代表者である高田が責任著者として PPAR Research に投稿し、受理された [Takada I, Yogiashi Y, Kato S. PPAR Res. 2012;2012:607141. 発表論文 (3)]。

更にマイクロアレイを同じ条件 2 サンプルずつ検討した所、(4) 条件の 1 μ M TRO 処理 3 時間後に 50 ng/mL BMP2 処理 3 時間において、(2) 条件の 1 μ M TRO 処理 3 時間よりも Fabp4 が高発現する結果を得られた。そのためこの実験系が適切であると判断し、発現変動に差のある標的遺伝子に関し、広くデータベースサーチなども含めて機能因子を探索中である。仮説であるが、これらの結果はまず PPAR が染色体上に結合する事で幾つかの領域が弛緩し、BMP2 シグナルが入りやすくなるものと思われる。その為他の変動因子も探索する事で、弛緩する領域の同定が可能であると考えている。これら仮説の検証のためには、ChIP-seq などのよりゲノム網羅的な解析が必要とされる。

また PPAR 転写活性化能に作用する機能未知遺伝子 X に関しては、ES 細胞からのキメラマウスの作出、及び BL6 マウスへの交配維持に成功した。この遺伝子ノックアウトマウスベクターは Flp 配列をはさんでスプライシングアクセプターを伴う Gal 遺伝子と IRES

を挟んだ Neo 耐性遺伝子をコードしている。そこで FRT マウスと掛け合わせることで loxP 配列のみを有するコンディショナルノックアウト用の作出にも成功した。現在、この遺伝子をクローニングした免疫系細胞における機能を確認するため、CD4-Cre トランスジェニックマウスと掛け合わせ、CD4 陽性 T 細胞におけるノックアウトマウスの作出にもヘテロの段階まで成功している。また Total ノックアウトマウスは 4 回交配してもホモは産まれず、胎生致死である可能性が高くなった。

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 10 件)

(1) Okuno Y, Ohtake F, Igarashi K, Kanno J, Matsumoto T, Takada I, Kato S, Imai Y. "Epigenetic regulation of adipogenesis by PHF2 histone demethylase." *Diabetes*. 2013 May;62(5):1426-34. doi: 10.2337/db12-0628. 査読あり

(2) Imai Y, Youn MY, Inoue K, Takada I, Kouzmenko A, Kato S. "Nuclear receptors in bone physiology and diseases." *Physiol Rev*. 2013 Apr;93(2):481-523. doi: 10.1152/physrev.00008.2012. 査読あり

(3) Takada I, Kobayashi M. "Structural Features and Transcriptional Activity of Chicken PPARs (, , and)." *PPAR Res*. 2013;2013:186312. doi: 10.1155/2013/186312. 査読あり

(4) 高田伊知郎、加藤茂明 「PPAR 系核内受容体と分子標的」 *日本臨床* 2012 年増刊号 11 月;70 Suppl 8:251-5. 日本語総説、査読なし

(5) Takada I, Yogiashi Y, Kato S. "Signaling Crosstalk between PPAR and BMP2 in Mesenchymal Stem Cells." *PPAR Res*. 2012;2012:607141. doi: 10.1155/2012/607141. 査読あり

(6) Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M, Kuroda K, Akira S, Miyake K, Yoshimura A. "Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain." *Nat Med*. 2012 Jun;18(6):911-7. doi: 10.1038/nm.2749. 査読あり

(7) 高田伊知郎 「骨芽細胞・脂肪細胞分化スイッチング」 Clin Calcium. 2012 May;22(5):629-36. doi: CliCa1205629636. 日本語総説、査読なし

(8) Sugiyama Y, Kakoi K, Kimura A, Takada I, Kashiwagi I, Wakabayashi Y, Morita R, Nomura M, Yoshimura A. "Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the suppression of iNOS synthesis in macrophages by regulating IRF3 and STAT1 pathways." Int Immunol. 2012 Apr;24(4):253-65. doi: 10.1093/intimm/dxr126. 査読あり

(9) Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S, Nishita M, Marumo K, Martin TJ, Minami Y, Takahashi N. "Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis." Nat Med. 2012 Feb 19;18(3):405-12. doi: 10.1038/nm.2653. 査読あり

(10) Wakabayashi Y, Tamiya T, Takada I, Fukaya T, Sugiyama Y, Inoue N, Kimura A, Morita R, Kashiwagi I, Takimoto T, Nomura M, Yoshimura A. "Histone 3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase recruitment to the interleukin-2 (IL-2) promoter is a mechanism of suppression of IL-2 transcription by the transforming growth factor-β-Smad pathway." J Biol Chem. 2011 Oct 14;286(41):35456-65. doi: 10.1074/jbc.M111.236794. 査読あり

〔学会発表〕(計 6件)

(1) Ichiro Takada, et al. 「Pericapillary Bone Formation by Mural Osteoblasts during Endochondral Ossification」 ASBMR, 2013 10/5, Baltimore (USA) [ポスター発表]

(2) 高田伊知郎 「骨芽細胞の可視化で見えたもの」 第3回超異分野学会、2013年2月16日、東京 [口頭発表]

(3) 高田伊知郎 「間葉系幹細胞における核内レセプターPPAR 活性制御シグナルの解析」 第二回奈良先端未来開拓コロキウム「シグナルの破綻による疾患の生物学」 2012年12月4日、奈良(生駒) [口頭発表]

(4) 高田伊知郎 「Th17 細胞分化を制御する ROR γ t 転写共役因子 RgAF の解析。」 第22回レチノイド研究会 2011年11月11日、東京 [口頭発表]

(5) 高田伊知郎 「肥満における PPAR 活性制御シグナル Wnt5a の機能解析」 第32回日本肥満学会 2011年9月23日、兵庫(淡路) [口頭発表]

(6) Ichiro Takada, et al. 「Epigenetic control by TCR and TGF- β in T cell differentiation」 TNF 2011 2011年5月6日、兵庫(淡路) [口頭発表]

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者 高田 伊知郎
(Takada Ichiro)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：50361655