

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293378

研究課題名(和文) 骨格形成過程における転写因子Osterixの機能的役割と制御機構の解明

研究課題名(英文) Functional role and regulatory mechanism of transcription factor Osterix in skeletal development

研究代表者

西村 理行(Nishimura, Riko)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60294112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子Osterixは骨および軟骨の形成に必須であるとされているが、Osterix遺伝子欠損マウスは胎生18.5日齢以降で膜性骨形成および内軟骨性骨形成を開始する。そこでOsterixの機能を代償する転写因子を探索し、Sp1ファミリー遺伝子が同定した。このSp1ファミリー遺伝子は、BMP2により発現誘導され、in vitroではOsterixと同様の作用を示した。Osterix/Sp1ファミリー遺伝子ダブルノックアウトマウスを作製し、表現型を解析した結果、胎生18.5日齢で膜性および内軟骨性骨形成を認めた。したがってin vivoではSp1ファミリー遺伝子以外の分子が関与すると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although Osterix is an essential transcription factor for membranous and endochondral ossification, Osterix knockout mice show both membranous and endochondral ossification at E18.5 days. We attempted to identify transcription factor that compensate osteogenic action of Osterix, and isolated a Sp1 family member transcription factor as a candidate. This Sp1 family member transcription factor was induced by BMP2 treatment. In addition, the Sp1 family member transcription factor showed similar function to Osterix in vitro. To understand the role of the Sp1 family member transcription factor in bone formation, we generated double knockout mice of Osterix and the Sp1 family member transcription factor, and examined the mice. The double knockout mice showed both membranous and endochondral ossification at E18.5 days. The data suggest that other molecule is involved in membranous and endochondral ossification.

研究分野：分子生物学

キーワード：骨 軟骨 転写因子 Osterix

#### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の骨格は、膜性骨化と内軟骨性骨化の異なる二つの様式によって形成されている。骨格形成の制御過程においては、転写因子がマスター遺伝子として重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。Osterix は、骨形成因子 BMP2 により誘導される転写因子としてクローニングされ、膜性骨化ならびに骨芽細胞分化に必須であることが明らかにされた。Osterix が Runx2 の下流で機能していることを示唆されている。また Osterix の発現制御機構には、BMP2 シグナル伝達分子である Smad 経路の活性化が必須であること、Runx2 ならびにホメオボックス遺伝子 Msx2 が重要な役割を果たしていることを明らかになっている。近年、Osterix のノックアウト(KO)マウス及び軟骨特異的コンディショナルノックアウト(cKO)マウスの解析により、Osterix が骨芽細胞分化および膜性骨化のみならず、軟骨細胞分化ならびに内軟骨性骨化においても極めて重要な役割を果たしていることを明らかになっている。特に Osterix が、コラゲナーゼ MMP13 の発現誘導、軟骨基質の石灰化ならびに基質小胞の形成に必須であることを見出されている。以上のように Osterix の発現制御機構の詳細が明らかになるとともに、骨格形成過程において、Osterix が多岐にわたる機能的役割を有していることが判明しつつある。しかしその一方で、骨格形成過程における Osterix の機能に関しては未だ不明な点が多々残されている。第一に、Osterix ノックアウト (KO)マウスで認められる骨欠失の機序を説明できる Osterix の標的遺伝子は未だ明らかにされていない。第二に、内軟骨形成過程における基質小胞の形成メカニズムと Osterix の機能との関連も不明である。第三に、Osterix KO マウスを詳細に解析すると、E18.5 日齢頃から膜性骨化ならびに内軟骨性骨化が遅延しているものの、部分的に骨化が起こっていることが観察される。すなわち Osterix の機能を部分的に代償する転写因子の存在が示唆される。これらの課題を解決するために、本研究を開始した。

#### 2. 研究の目的

骨格形成過程における Osterix の機能的役割を解明し、その発現あるいは機能の制御機構を明らかにするとともに、Osterix の機能に関わる分子の同定と機能解析を目指した。

#### 3. 研究の方法

(1) 野生型および Osterix KO マウスより骨組織あるいは軟骨組織を採取し、RNA を抽出後、Microarray 解析を行い、Osterix KO マウスで発現が低下している分子を Osterix の標的遺伝子として探索した。

(2) Osterix の骨形成および軟骨形成機能を代償する分子を同定するために、骨芽細胞ならびに軟骨細胞の前駆細胞に BMP2 を作

用させ、Microarray 解析に供した。

(3) MMP13 遺伝子プロモーターシフェラーゼ活性、RT-qPCR による MMP13 mRNA 発現解析を指標に、Osterix 様活性を評価した。

(4) アデノウイルスシステムを用いた過剰発現実験を行い、骨芽細胞あるいは軟骨細胞の分化に対する効果を検討した。骨芽細胞および軟骨細胞への分化は、各々のマーカー遺伝子の発現または活性を指標に検索を行った。

(5) Sp1 ファミリー分子の KO マウスを入手し、同ヘテロマウスと Osterix 遺伝子ヘテロ欠損マウスを交配の後に、ダブルヘテロマウスを作製した。その後、ダブルヘテロマウス同士を交配し、Osterix/Sp1 ファミリー分子ダブル KO マウスの作製を行った。ダブル KO マウスの表現型の解析は、病理組織学的検索とアリザリン=アルシアンブルー二重染色による骨格標本作製して行った。

(6) Osterix との相互関係は、免疫共沈降法ならびに蛍光標識したタンパク質の細胞内局在により評価した。

(7) 内軟骨性骨形成の評価は、病理組織学的検索、軟骨マーカー遺伝子による in situ hybridization、アリザリン=アルシアンブルー二重染色による骨格標本により検討した。

#### 4. 研究成果

(1) Microarray 解析の結果、Ennp1、Ennp6 をはじめとする骨および軟骨の石灰化に関与する分子が、Osterix の標的遺伝子の後方であることが示唆された。

(2) BMP2 の添加により、骨芽細胞あるいは軟骨細胞の前駆細胞で、Sp1 ファミリー分子の発現が著明に誘導されることを見出した。したがって、この Sp1 ファミリー分子が Osterix の機能を代償しうる可能性が示唆された。

(3) 上記で同定された、Sp1 ファミリー分子が、in vitro において Osterix 様の転写機能を有していることを明らかにした。

(4) Sp1 ファミリー分子は、Osterix より弱いものの骨芽細胞分化および軟骨細胞分化活性を有していることが認められた。

(5) Osterix / Sp1 ファミリーダブルノックアウトマウスは、生下時頃に死亡し、その産仔の比率は、メンデルの法則より低かった。胎生 14.5 日齢、胎生 18.5 日齢でもダブルノックアウトマウスの存在する比率は、1/16 より低かったが、その原因は、不明であった。Osterix / Sp1 ファミリーダブルノックアウトマウスの骨化を検索したところ、コントロールマウスに比べて、アリザリンレッド陽性の骨化部分は、顕著に減少していたが、Osterix 遺伝子ノックアウトマウスの骨化と同程度であった。さらに病理組織学的に Osterix / Sp1 ファミリーダブルノックアウトマウスを検索したが、Osterix / Sp1 ファミリーダブルノックア

ウトマウスにおいても、Osterix 遺伝子欠損マウスと同程度の膜性骨形成および内軟骨性骨形成を認め、軽微に Osterix KO マウスより遅延していた(図)。したがって、Osterix 遺伝子欠損マウスで観察される、膜性骨形成ならびに内軟骨性骨形成には、同定している Sp1 ファミリー以外の分子あるいはメカニズムが関与していると考えられた。

**図 Osterix KO (左) と Osterix/Sp1 ファミリー DKO マウス (右) の上肢の骨格標本**



(6) マウス肢芽細胞に高発現する転写因子 Zfhx4 のノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析した結果、膜性骨形成には異常は認めなかったが、内軟骨性骨形成が傷害されていた。特に、軟骨細胞の肥大化以降のステップが障害されており、Osterix KO マウスと近似した表現型を示した。また分子生物学的解析の結果、Zfhx4 は、Osterix と連携していることが明らかとなった。したがって、Zfhx4 は、内軟骨性骨形成過程において、Osterix の転写パートナーとして機能していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

(1) Nishimura R, Hata K, Ikeda F, Matsubara T, Amano K, Ono K, Takigawa Y, Takashima R, Yoshida M, Nakamura E, Yoneda T. (2015) Regulation of transcriptional network system during bone and cartilage development. *J Oral Bioscience* 57: 165-170 URL: <http://www.journaloforalbiosciences.org> 査読あり

(2) Yoshida M, Hata K, Takashima R, Ono K, Nakamura E, Takahata Y, Murakami T, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R, Yoneda T. (2015) The transcription factor Foxc1 is necessary for Ihh-Gli2-regulated endochondral ossification. *Nature Communications* 6. DOI: 10.1038/ncomms7653. 査読あり

(3) Amano K, Densmore M, Nishimura R, Lanske B. (2014) Indian Hedgehog Signaling Regulates Transcription and Expression of Collagen Type X via Runx2/Smads Interactions. *J Biol Chem* 289:24898-24910 DOI: 10.1074/jbc.M114.570507. 査読あり

(4) Kawane T, Komori H, Liu W, Moriishi T, Miyazaki T, Mori M, Matsuo Y, Takada Y, Izumi S, Jiang Q, Nishimura R, Kawai Y, Komori T. (2014) Dlx5 and Mef2 Regulate a Novel Runx2 Enhancer for Osteoblast-Specific Expression. *J Bone Miner Res.* 29: 1960-1969. DOI: 10.1002/jbmr.2240. 査読あり

(5) Chudnovsky Y, Kim D, Zheng S, Whyte WA, Bansal M, Bray M, Gopal S, Theisen MA, Bilodeau S, Thiru P, Muffat J, Yilmaz OH, Mitalipova M, Woolard K, Lee J, Nishimura R, Sakata N, Fine HA, Carpenter AE, Silver SJ, Verhaak RGW, Califano A, Young RA, Ligon KL, Mellinghoff IK, Root DE, Sabatini DM, Hahn WC, Chheda MG (2013) ZFHx4 interacts with the NuRD core member CHD4 and regulates the glioblastoma tumor initiating cell state. *Cell Reports* 6:1-12 DOI: [org/10.1016/j.celrep.2013.12.032](http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.032). 査読あり

(6) Hata K, Takashima R, Amano K, Ono K, Nakanishi M, Yoshida M, Wakabayashi M, Matsuda A, Maeda Y, Suzuki Y, Sugano S, Whitson R, Nishimura R, Yoneda Y (2013) Arid5b facilitates chondrogenesis by recruiting the histone demethylase Phf2 to Sox9-regulated genes. *Nature Communications*. 4: 2850 DOI: 10.1038/ncomms3850 査読あり

(7) Masuda K, Ripley B, Nishimura R, Mino T, Takeuchi O, Kiyonari H, Shioi G, Kishimoto T. (2013) Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110: 9409-9413. DOI: 10.1073/pnas.1307419111 査読あり

[学会発表](計 30 件)

(1) Riko Nishimura. Regulation of endochondral ossification by transcription factors 2015 年 12 月 11 日 International Symposium Oral and Craniofacial Development and Diseases. 大阪大学大学院歯学研究科(大阪府・吹田市)

(2) 西村 理行. 骨形成過程における転写

制御プログラムの統合的理解の解明：第 56 回歯科基礎医学会学術大会 2014 年 9 月 26 日 福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

（ 3 ）西村 理行．転写ネットワークによる内軟骨性骨形成の制御機構 第 55 回歯科基礎医学会学術大会 2013 年 9 月 22 日 岡山コンベンションセンター（岡山県・岡山市）

（ 4 ）Riko Nishimura. Regulation of Endochondral Ossification by Transcription Factor 10th Bone Biology Forum, 2013 年 8 月 23 日 富士教育研修所（静岡県・裾野市）

〔図書〕(計 2 件)

（ 1 ）西村 理行 (2015) Osterix . 骨ペディア：骨疾患・骨代謝キーワード事典 分担執筆 p84-85 , 羊土社

（ 2 ）西村 理行 (2015) ヘッジホッグ . 骨ペディア：骨疾患・骨代謝キーワード事典 分担執筆 p61-63 , 羊土社

〔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  
[http://www.dent.osaka-u.ac.jp/admission/admission\\_000294.html](http://www.dent.osaka-u.ac.jp/admission/admission_000294.html)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

西村 理行 (NISHIMURA RIKO)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：60294112

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

波多 賢二 (HATA KENJI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：80444496