

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：32710

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670784

研究課題名(和文) MyoD転写活性化ドメインを付加したRunx2による骨芽細胞への分化転換機構

研究課題名(英文) Cellular conversion from non- skeletal to skeletal cells by using transactivation MyoD domain

研究代表者

二藤 彰(Nifuji, Akira)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：00240747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：分化特異的な転写因子による、ある組織細胞から別の分化系列へ分化転換現象が知られる。間葉系組織では転写因子MyoDによる筋肉細胞への分化転換や、Sox9と複数の遺伝子の組み合わせで、軟骨細胞への分化転換が起きると報告されている。MyoD以外では頻度が高く安定した効率の分化転換条件はまだ示されていない。MyoDの転写活性化能に着目し、その転写活性化ドメイン(TAD)を他の転写因子と共同的に作用させて、安定した分化転換が可能になるか否かを検討した。Runx2やsox9とTADを作用させると、転写活性化能は格段に上昇した。一方で安定かつ十分な分化転換には更なる条件が必要である事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sets of specific transcription factors may induce cellular conversion from one committed cell to another. In the mesenchymal cell lineages, the transcription factor MyoD can induce non-muscle cells to muscle cells. It is also reported that co-transfection of Sox9 with other sets of transcription factors may induce chondrocytes from non- chondrocytes. However reproducible and highly efficient cellular conversion from non- skeletal to skeletal cells is still challenging. In this study, we examined whether cellular conversion from non- skeletal to skeletal cells can be improved by using transactivation domain (TAD) of MyoD. Addition of TAD to Runx2 and sox9 enhanced activity of transcriptional transactivation. Cellular conversion rates by those factors did not change significantly, suggesting that additional factors or improvement of experimental condition are required for the cellular conversion of non- skeletal cells.

研究分野：発生学 薬理学

キーワード：遺伝子 分化 転写因子

1. 研究開始当初の背景

分化特異的な転写因子を発現することで、ある分化系列から別の分化系列へ分化転換を起こすことが知られる。間葉系では転写因子 MyoD による筋肉細胞への分化転換や、最近では Sox9 と他の複数の遺伝子の組み合わせで、軟骨細胞への分化転換が起きることが報告されている。骨芽細胞については、Runx2 単独で骨芽細胞へ分化転換が起きると報告がなされているが、間葉系細胞の一部に限られ、他の細胞については頻度が高く安定した効率の分化転換条件はまだ示されていない。細胞の背景が異なるか、あるいは他の因子が必要であると想定されているが詳細は不明である。

2. 研究の目的

初期化や分化転換が極めて低い効率でしか起きないが、その理由はほとんどわかっていない。非骨格系細胞から骨格系細胞への分化転換の条件を探求するアプローチのひとつとして、骨格系細胞特異的な転写因子と MyoD の転写活性化能の協調作用が有効なのではないか、と仮説を立てそれを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨格系細胞分化に關与する重要な転写因子 runx2、sox9、Osterix についてそれぞれ fusion タンパクを作成しその機能を解析した。runx2 の機能解析のモニターとしては runx2 binding site を持つ osteocalcin プロモーターの OG-2 Luc に対しての転写活性化能を用いた。sox9 については type II collagen promoter sox9 binding site を持つ col12 sox9BD-Luc に対しての転写活性化能を指標とした。

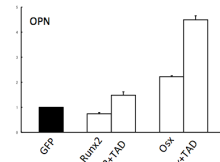
(2) 分化転換モデルの検討

分化転換モデルとしては O_{sox}-cre-GFP マウス由来の細胞を用いた。これは the osterix (*Sp7*) promoter の直下に tTA tetracycline transactivator があり、その直下に tetracycline responsive element (TRE; tetO)-controlled GFP/Cre fusion protein が存在する。tetracycline analog doxycycline の非存在下では O_{sox} が発現している細胞でオンになっており、GFP もプラスになる。また野生型マウスの皮膚由来細胞も用いそれらについて、遺伝子導入後の骨芽細胞、軟骨細胞への分化誘導後の形態的变化の解析ならびに遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) runx2 については MyoD TAD をつけたものが、付けないものに対して 20 倍以上転写活性化が見られた。興味深いことに、2 コピーの MyoD TAD fusion と 1 コピーのもの比べると前者のほうが若干低く、コピー数と活性化能には相関性は必ずしも高くは無く、

至適な量が存在する可能性が示された。



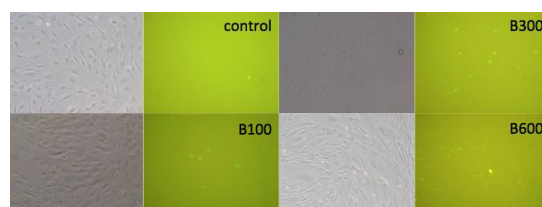
また頻度は十分ではないものの、皮膚線維芽細胞に対して発現させた場合に石灰化を伴う分化をすることも確認された。



活性化するメカニズムとさらなる活性化を得る可能性を追求する目的で fusion タンパクによる活性化能とリンカータイプのもの (glycin linker) とを比べ、それも挿入部位が異なるものを用意した。glycin linker を付与することによって若干の活性化の向上が認められたが、顕著なものではなかった。TAD の挿入位置を上流、下流、スペースを取るなど様々な部位のものを調べた。しかしながら、位置そのものの影響は少なかった。Osterix については活性化能をモニターできるプロモーターが無いため、下記の 2) の方法によりその機能を調べた。

さらに、TAD fusion と協調して働く分子を探し、その候補としてヒストン修飾タンパクに着目した。ヒストンメチル化修飾酵素が骨芽細胞や軟骨細胞の分化に伴って発現が認められること、骨格系細胞において機能を持つことを我々が見いだしておりその結果から、それらの TAD fusion タンパク機能への影響を調べた。本来、抑制型のメチル化修飾を示すヒストンメチル化修飾酵素が、TAD fusion 転写因子の機能に対しさらに促進的に働く結果が得られた。現在、直接あるいは間接的にヒストンメチル化修飾酵素が影響を与える可能性について検討している。

(2) 分化転換については、O_{sox}-cre-GFP mice 由来の皮膚線維芽細胞を培養し、GFP の状態と O_{sox} の発現状態を調べた。定常状態ではほとんど GFP は発現していないが、BMP 処理することにより、GFP が発現することを確認した。内在性の遺伝子発現を調べて見たところ、O_{sox}、Id-1、ALP の遺伝子発現が上昇しており、分化誘導が非骨芽細胞においてもモニターできることを確認できた。下記は BMP 処理後の皮膚線維芽細胞における GFP の発現を示す。



しかし上記の細胞に対して、TAD fusion を強制発現させても、GFP は安定してはオンならず、分化転換については、更なる条件検討が必要であることが示唆された。

以上のことから TAD fusion は有効である可能性は示されたが、安定した分化転換を行うにはエピジェネティック調節の制御を含む転写活性化メカニズムのさらなる追求が必要であることも強く示唆された。

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9件)

Wada S, Ideno H, Shimada A, Kamiunten T, Nakamura Y, Nakashima K, Kimura H, Shinkai Y, Tachibana M, Nifuji A. H3K9MTase G9a is essential for the differentiation and growth of tenocytes in vitro. *Histochemistry and Cell Biology*. 査読有り, 144, 2015,13-20
DOI 10.1007/s00418-015-1318-2

Kamiunten T, Ideno H, Shimada A, Nakamura Y, Kimura H, Nakashima K, Nifuji A. Coordinated expression of H3K9 histone methyltransferases during tooth development in mice. *Histochemistry and Cell Biology*. 査読有り, 143, 2015, 259-66.
doi: 10.1007/s00418-014-1284-0.

Zhang R, Liu TY, Senju S, Haruta M, Hirotsawa N, Suzuki M, Tatsumi M, Ueda N, Maki H, Nakatsuka R, Matsuoka Y, Sasaki Y, Tsuzuki S, Nakanishi H, Araki R, Abe M, Akatsuka Y, Sakamoto Y, Sonoda Y, Nishimura Y, Kuzushima K, Uemura Y. Generation of mouse pluripotent stem cell-derived proliferating myeloid cells as an unlimited source of functional antigen-presenting cells. *Cancer Immunol Res*. 査読有り,3, 2015 , 668-77.
doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0117.

u

Ideno H, Shimada A, Kamiunten T, Imaizumi K, Nakamura Y, Kimura H, Araki R, Abe M, Nakashima K, and Nifuji A Search for Conditions to Detect Epigenetic Marks and Nuclear Proteins in Immunostaining of the Testis and Cartilage *Journal of Histology*, 査読有り, 2014 , 2014, Article ID 658293, 8 pages
dx.doi.org/10.1155/2014/658293

Sugiura M, Kasama Y, Araki R, Hoki Y, Sunayama M, Uda M, Nakamura M, Ando S, Abe M.

Induced pluripotent stem cell generation-associated point mutations arise during the initial stages of the conversion of these cells. *Stem Cell Reports*., 査読有り,2, 2014 52-63. doi:10.1016/j.stemcr.2013.11.006.

Raita Y, Komatsu K, Nifuji A, Sato M, Morito M, Hayakawa T Promotion of bone formation around alendronate-immobilized screw-type titanium implants after implantation into rat molar tooth sockets *Journal of Hard Tissue Biology*, 査読有り, 23 , 2014, 177-186
http://doi.org/10.2485/jhtb.23.177

Nifuji A

Molecular mechanisms of skeletal tissue formation. *J Physical Fitness and Sports Medicine*, 査読有り,2, 2013, 1-8.
doi:10.7600/jpfsm.2.1

Shimada A, Wada S, Inoue K, Ideno H, Kamiunten T, Komatsu K, Kudo A, Nakamura Y, Sato T, Nakashima K, Nifuji A. Efficient expansion of mouse primary tenocytes using a novel collagen gel culture method. *Histochemistry and Cell Biology*, 査読有り,142 , 2014, 205-15.
doi:10.1007/s00418-014-1191-4

Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Wada S, Ideno H, Nakashima K, Amizuka N, Noda M, Nifuji A. Alendronate promotes bone formation by inhibiting protein prenylation in osteoblasts in rat tooth replantation model. *J Endocrinology*, 査読有り, 219, 2013, 145-158.
doi: 10.1530/JOE-13-0040

[学会発表](計18件)

Annexin A5 null mice show masticatory muscle hypertrophy, hyper tooth attrition and bony outgrowth in the orofacial region Shimada A, Arai Y, Komatsu K, Nakashima K, Yamashita T, Takahashi N, Pöschl E, Nifuji A 第37回日本分子生物学会年会、平成26年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Functions of histone methyltransferase

G9a during growth and differentiation of mesenchymal cells

Ideno H, Shimada A, Kamiunten T, Wada S, Komatsu K, Tachibana M, Araki R, Nakamura Y, Abe M, Nakashima K, Nifuji A

第 37 回日本分子生物学会年会、平成 26 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

The functions of histone methyltransferase G9a during growth and differentiation of mesenchymal cells
出野 尚, 島田明美, 上運天太一, 和田悟史, 小松浩一郎, 立花 誠, 荒木良子, 中村芳樹, 安倍真澄, 中島和久, 二藤 彰
第 56 回歯科基礎医学会、平成 26 年 9 月 26 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

Functions of the histone methyltransferase G9a during tenocyte differentiation
和田悟史, 出野 尚, 島田明美, 上運天太一, 中島和久, 中村芳樹, 二藤 彰
第 56 回歯科基礎医学会、平成 26 年 9 月 26 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

Expression and functions of histone methyltransferases during tooth development
上運天太一, 出野尚, 島田明美, 中島和久, 中村芳樹, 二藤 彰
第 56 回歯科基礎医学会、平成 26 年 9 月 26 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

ヒストンメチル化酵素 G9a による腱細胞の分化制御
和田悟史, 島田明美, 出野 尚, 中村芳樹, 中島和久, 二藤 彰
第 32 回 日本骨代謝学会、平成 26 年 7 月 26 日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）

効率的で安定的なマウス腱細胞の初代培養法 島田明美, 和田悟史, 出野 尚, 上運天太一, 小松浩一郎, 工藤明, 中村芳樹, 中島和久, 二藤 彰
第 32 回 日本骨代謝学会、平成 26 年 7 月 26 日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）

ヒストン 3 リジン 9 メチル化酵素群 (G9a, Glp, Suv39h1, Prdm2) のマウス歯牙発生における発現と機能
上運天太一, 島田明美, 出野 尚, 中村芳樹, 中島和久, 二藤 彰
第 32 回 日本骨代謝学会、平成 26 年 7 月 24 日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）

間葉系細胞の増殖・分化過程におけるヒストンメチル化酵素 G9a の機能
出野 尚, 島田明美, 上運天太一, 和田悟史, 小松浩一郎, 中島和久, 荒木良子, 安倍真澄, 二藤 彰

第 32 回 日本骨代謝学会、平成 26 年 7 月 24 日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）

Regulations of osteoblastic survival at entheses.
Wada S, Shimada A, Ideno H, Nakamura Y, Nakashima K, Nifuji A
第 36 回日本分子生物学会、平成 25 年 12 月 5 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

MyoD mediated myogenic conversion from fibroblasts into myoblasts is blocked by cell cycle inhibition
Ideno H, Nakashima K, Ohkawa Y, Kimura H, Araki R, Abe M, Nifuji A
第 36 回日本分子生物学会、平成 25 年 12 月 4 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

Histone 3 lysine 9 methyltransferases , G9a, GLP, SUV39h1, and PRDM2, are expressed during mouse tooth development.
Kamiunten T, Ideno H, Shimada A, Nakamura Y, Nakashima K, Kimura H, Nifuji A
第 36 回日本分子生物学会、平成 25 年 12 月 3 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

Annexin A5 regulates bony outgrowth at tendon/ligament insertion sites.
Shimada A, Arai Y, Ideno H, Kamiunten T Komatsu K, Yamashita T, Ezura Y , Amizuka N, Takahashi N, Pöschl E, Nifuji A
第 36 回日本分子生物学会、平成 25 年 12 月 3 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

発生の骨格組織分化における H3K9 メチル化酵素群の発現局在
二藤 彰, 島田明美, 中島和久
第 55 回歯科基礎医学会学術大会、平成 25 年 9 月 22 日、岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）

Endocytic incorporation of alendronate promotes bone formation
Komatsu K, Shimada A, Ideno H, Shibata T, Nakashima K, Amizuka N, Noda M, Nifuji A
The International Bone and Mineral Society (IBMS) and the Japanese Society for Bone and Mineral Research (JSBMR), 平成 25 年 5 月 29 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

Tenocytes Regulate Cell Survival Of Osteoblasts In Vitro
Wada S, Shimada A, Ideno H, Nakamura Y, Nakashima K, Nifuji A
The International Bone and Mineral Society (IBMS) and the Japanese Society for Bone and Mineral Research (JSBMR), 平成 25 年 5 月 29 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

Predominant expression of Histone 3 lysine 9 methyltransferases in the prehypertrophic chondrocytes during the growth plate chondrocyte development
Ideno H, Shimada A, Kamiunten T, Imaizumi K, Kimura H, Nakashima K, Nifuji A
The International Bone and Mineral Society (IBMS) and the Japanese Society for Bone and Mineral Research (JSBMR),
平成 25 年 5 月 28 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

Methyltransferases, G9a, GLP, and SETDB1, are Expressed During Mouse Tooth Development
Kamiunten T, Shimada A, Ideno H, Nakamura Y, Nakashima K, Nifuji A
The International Bone and Mineral Society (IBMS) and the Japanese Society for Bone and Mineral Research (JSBMR),
平成 25 年 5 月 28 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二藤 彰 (NIFUJI, Akira)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：00240747

(2) 研究分担者

荒木良子 (ARAKI, Ryoko)
国立研究開発法人放射線医学総合研究所・研究基盤センター・室長
研究者番号：40392211

研究分担者

中島和久 (NAKASHIMA, Kazuhisa)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：90252692

研究分担者

出野尚 (HISASHI, Ideno)
鶴見大学・歯学部・学部助手
研究者番号：40435699