

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25670846

研究課題名(和文)細胞周期制御の観点から骨吸収・骨形成を同時に制御する分子を探る

研究課題名(英文) Investigation of factors which simultaneously regulate bone formation and bone resorption in terms of cell cycle regulation.

研究代表者

小笠原 徹 (OGASAWARA, TORU)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20359623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞周期制御との関連が強いRunx2と同じruntファミリーに属するRunx1とRunx3が間葉系細胞の骨分化能促進機能を有すること、ならびに、高分化能を有する間葉系細胞において古典的Wnt経路の抑制によってサイクリンD1発現が抑制されており、サイクリンD1が骨軟骨分化の振り分け機能を有すること、を明らかとした。さらに細胞周期制御において重要な機能を果たしていると想定された分子の中から、破骨細胞分化の際に発現が上昇する一方で骨芽細胞分化の際に発現が低下する分子、逆に破骨細胞分化の際に発現が低下する一方で骨芽細胞分化の際に発現が上昇するという発現変動パターンを示す分子を複数同定した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to discover factors which simultaneously regulate bone formation and bone resorption, in terms of cell cycle regulation. DNA microarray analysis and Real time quantitative PCR analysis etc. revealed that Runx1, Runx3, Cyclin D1 regulate different cellular processes simultaneously, including bone and cartilage metabolism. In addition, we discovered factors which were up-regulated in osteoclast differentiation, while down-regulated in osteoblast differentiation. We also discovered factors which were down-regulated in osteoclast differentiation, while up-regulated in osteoblast differentiation. In conclusion, the results of this study suggested that some of the cell cycle factors simultaneously regulate genes involving in bone and cartilage metabolism.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：再生医学 骨代謝学 細胞周期 細胞分化 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

従来、骨代謝研究の世界では、破骨細胞分化を制御する因子あるいは骨芽細胞分化を制御する因子、それぞれについて別々に研究が行われてきた。そして、その成果として破骨細胞分化に関しては RANKL、NFATc1 等の重要分子が、骨芽細胞分化に関しては Runx2 や Osterix 等の重要分子が発見され、骨代謝研究のブレイクスルーとなってきた。一方、骨吸収・骨形成の両方を制御する因子に関する解析はほとんど進んでおらず、高柳らの研究グループによって Semaphorin 3A が骨吸収・骨形成の両者を制御する機能を有することが報告された (Hayashi M, Takayanagi H et al. Nature 2012) 以外には、画期的な成果は報告されていなかった。こうした背景から、効率的な治療法あるいは治療薬の開発につながる、骨形成・骨吸収の両者を制御する分子の同定が望まれていた。

2. 研究の目的

骨代謝は、破骨細胞による骨吸収、骨芽細胞による骨形成、この両者のバランスによって成立している。そこで、骨形成と骨吸収を同時にコントロールして骨形成に有利な骨代謝条件をもたらす分子を同定することが出来れば、その分子を利用した治療法あるいは治療薬の開発が可能となり、顎顔面骨折や腫瘍摘出後の骨移植等、骨再生が必要な口腔疾患の治療において優れた効果が期待できる。また、細胞周期関連因子が骨吸収・骨形成を制御しているという研究結果は、われわれの研究グループのみならず、他の研究グループからも複数報告されており、細胞周期制御の骨代謝における重要性は明らかであった。そこで、本研究は細胞周期制御と骨代謝制御の観点から、骨吸収・骨形成を同時に制御する分子を検索・同定し、さらにその機能メカニズムを解明するとともに、その結果を利用した新規骨再生治療法開発に向けた基礎的検討を行うことを目的として計画・遂行された。

3. 研究の方法

(1) 細胞周期制御において重要な機能が報告されている遺伝子を実験した遺伝子操作マウス由来の骨系統細胞(この細胞は分化が時期特異的に促進あるいは抑制されるという特殊な形質を持っていることを我々が独自に確認済)と対照細胞(同胞野生型マウス由来骨系統細胞)を用いて、その遺伝子操作に関連して発現が変動する分子を網羅的に探索した。

(2) 骨軟骨分化能が促進している細胞株(この細胞株は、間葉系細胞に特定の遺伝子を導入することで、われわれが独自に樹立した細胞株である)と対照細胞を用いて、遺伝子操

作によってもたらされた骨軟骨分化能促進に伴って、細胞内の発現が変動する分子を網羅的に探索した。

(3) (1)(2)の両実験から得られたデータをバイオインフォマティクス解析に供して、細胞周期制御と骨代謝制御の両者において重要な機能を果たしていると想定される有力な候補因子の絞込みを行った。

次いで、絞込み作業で選択された複数の分子に関しては、それらの分子の過剰発現実験・発現抑制実験を通じた細胞内機能解析を実施した。また、いくつかの分子に関しては、その分子作用メカニズムを探る目的で、シグナル伝達経路解析、相互作用分子の探索を実施した。

4. 研究成果

(1) ES 細胞に必須の転写因子である Nanog を恒常発現させることによって高い骨分化能を獲得した間葉系細胞においては、骨形成におけるマスター遺伝子であり、細胞周期制御メカニズムへの関与が指摘されている Runx2 が属する runt ファミリー転写因子である Runx1 と Runx3 の発現が上昇していることを見出した。次いで、siRNA を用いた遺伝子ノックアウト実験によって、通常培養条件では Runx1 が初期の骨分化ならびに後期の骨分化の両方を促進すること、分化刺激培養条件においては、Runx1 と Runx3 の両者が初期の骨分化を促進するが後期の骨分化には関与しないことを確認した。以上、Runx1 と Runx3 が間葉系細胞の骨分化能促進に関係していることを報告した (Saito T., Ogasawara T. et al. Cell Reprogram. 2015)。

(2) 遺伝子操作によって、非常に高い骨軟骨分化能を獲得させた間葉系細胞においては、Runx3 と β -Catenin のタンパクレベルが上昇し、この両者が協調的に機能して古典的 Wnt 経路を抑制することで、細胞周期制御因子のひとつであるサイクリン D1 の発現が mRNA レベルならびにタンパクレベルの両方で抑制されていることを発見した。また、この間葉系細胞に対してサイクリン D1 導入を行った場合には、軟骨肥大化～骨化のプロセスに関わる遺伝子の発現が上昇することが確認された。その一方、対照細胞に対してサイクリン D1 を導入した際には同様の遺伝子発現変動は観察されなかったことから、高骨軟骨分化能を有する間葉系細胞では、サイクリン D1 が細胞の骨方向への分化と軟骨方向への分化振り分け機能を有していること、その機能の一部は Runx2、Osterix、Sox9 等の骨軟骨分化において中心的役割を果たす転写因子群の発現をコントロールすることで発揮されていることを見出した。なお、本研究で用いた細胞は骨軟骨再生医学研究や骨軟骨発生研究等におけるモデル細胞としての価

値が高いと想定される(論文投稿中)

(3) 細胞周期制御と骨代謝制御の両者において重要な機能を果たしていると想定された候補分子の中から、破骨細胞分化の際には発現レベルが上昇する一方で、骨芽細胞分化の際には発現レベルが低下する分子、またそれとは反対に、破骨細胞分化の際には発現レベルが低下する一方で、骨芽細胞分化の際には発現レベルが上昇する分子をそれぞれ複数同定した。さらに、同定した分子が軟骨細胞分化あるいは間葉系細胞の骨軟骨分化に伴って発現変動を示すかについても検討し、一部の分子に関しては機能解析に着手したが、その詳細については研究期間内に明らかとすることは出来なかった。

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1件)

Saito T, Ohba S, Yano F, Seto I, Yonehara Y, Takato T, Ogasawara T (Corresponding author). Runx1 and Runx3 are downstream effectors of Nanog in the promoted osteogenic differentiation of the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2. Cell Reprogram. 2015 Jun;17(3):227-34.(査読有) DOI: 10.1089/cell.2014.0059.

[学会発表](計4件)

小笠原 徹 : CyclinD1 は Nanog が有する間葉系細胞骨軟骨分化能促進効果のバランスを制御する。
第16回再生医療学会総会 仙台国際センター(宮城県仙台市) 2017年3月7-9日

Ogasawara T, Imamura J, Fujii Y. : CyclinD1 regulates the balance between the osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal cells that constitutively express Nanog. ASBMR 2016 Annual Meeting, September 16-19, 2016, Atlanta, Georgia, USA, Georgia World Congress Center

小笠原 徹 : Nanog の間葉系細胞骨分化能促進効果における Runx ファミリー(Runx1/2/3)の関与。
第68回NPO法人日本口腔科学会学術大会 京王プラザホテル(東京都新宿区) 2014年5月7-9日

Ogasawara T, Saito T, Ohba S, Abe T, Yonehara Y, Takato T. :Runx1 and Runx3 are downstream effectors of Nanog in the promoted osteogenic differentiation of mesenchymal cells.

2013 annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Baltimore, Maryland, USA, Baltimore Convention Center, October 6, 2013.

[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]

ホームページ等
東京大学医学部附属病院口腔顎顔面外科・矯正歯科ホームページ
<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小笠原 徹 (OGASAWARA, Toru)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20359623

(2)研究分担者

緒方 直史 (OGATA, Naoshi)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号: 10361495

阿部 雅修 (ABE, Masanobu)
東京大学・医学部附属病院・保健・健康推進部・講師
研究者番号: 10392333

安部 貴大 (ABE, Takahiro)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20383250

筑田 博隆 (CHIKUDA, hirotaka)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30345219

井口 隆人 (INOKUCHI, Takato)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80587775