

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870785

研究課題名(和文) 転写抑制因子PLZFによる骨芽細胞と軟骨細胞分化制御機構の解析

研究課題名(英文) The roles of PLZF transcription factor in osteogenesis and chondrogenesis.

研究代表者

内藤 昌子 (NAITO, Masako)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：40436803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：PLZF転写因子は様々な細胞の分化や増殖に重要な役割を果たす。しかしながら軟骨細胞の分化における機能に関して多くのことが明らかにされていない。そこで本研究では軟骨細胞分化におけるPLZF転写因子の機能について軟骨前駆細胞株(ATDC5)を用いて解析を行った。PLZF遺伝子はATDC5細胞の軟骨細胞分化の進行に関連して発現量が増加した。ATDC5細胞でPLZF遺伝子を過剰発現させると、分化が促進し増殖が抑制された。逆にPLZF shRNAを導入すると増殖が亢進し分化が抑制された。以上の結果からPLZF遺伝子は軟骨細胞分化の増殖を抑制し分化成熟を促す作用を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor PLZF is involved in various biological processes, including cell proliferation and differentiation. However, the role of PLZF in chondrogenesis is not well understood. In this study, we investigated PLZF expression during chondrocyte differentiation by using a chondrogenic progenitor cell line ATDC5. Our results indicated that PLZF expression was upregulated during chondrocyte differentiation. To elucidate the role of PLZF in chondrogenesis, we transfected ATDC5 cells with the gene encoding PLZF or a shRNA against the gene encoding PLZF. PLZF overexpression suppressed the proliferation and promoted the differentiation of ATDC5 cells into hypertrophic chondrocytes. In contrast, transfection of ATDC5 cells with the shRNA against the gene encoding PLZF suppressed their differentiation into hypertrophic chondrocytes and promoted cell cycle progression. These results suggested that PLZF promoted hypertrophic phenotypes by regulating cell cycle progression.

研究分野：細胞生物学

キーワード：軟骨細胞分化 骨芽細胞分化 脂肪細胞分化 転写因子 グルコルチコイド

1. 研究開始当初の背景

Glucocorticoids (GC)は、糖・タンパク質・脂質代謝に加えて、抗炎症作用や免疫抑制作用など様々な生理作用を有するステロイドホルモンに分類される。受容体である GC receptor (GR)は、GC との結合により、細胞核内に移行し直接 DNA と結合して転写を制御する転写因子として機能する。長期的な GC 投与は骨量減少や骨粗鬆症を引き起こす。また、成長期の GC 投与により、成長板軟骨の増殖が抑制されることで骨の成長を抑制することが明らかにされている。

近年の報告で、骨芽細胞前駆細胞株 (MC3T3-E1) に GC 刺激を与えると、骨芽細胞分化やその生存を抑制することが示された (Smith E et al. J Biol Chem 280: 2388-2394, 2005)。また、間葉系前駆細胞株 (ROB-C26) において、GC 刺激が脂肪細胞分化を誘導する (Naito M et al. Histochem Cell Biol. 138:833-45, 2012)。同様に、軟骨前駆細胞 (ATDC5) では GC が軟骨基質の産生と細胞の生存を抑制する (Fujita T et al. J Cell Biochem. 93:374-383, 2004)。これらの報告から、高濃度の GC 刺激は、骨芽細胞や軟骨細胞に直接作用を示し、その分化や生存を抑制することが推察された。しかしながら軟骨形成を GC が抑制するメカニズムは多くのことが不明である。

転写因子である Promyelocytic Leukemia Zinc Finger (PLZF) は POZ/zinc-finger family に属し、細胞質内と核内(核顆粒と核質内)に局在を示す分子である。PLZF の発現は、間葉系前駆細胞株、白血病細胞株や子宮内膜間質細胞など様々な細胞種で共通して GC シグナルにより誘導されることから、PLZF は GC 応答性遺伝子の一つと考えられている。ノックアウトマウスの解析から、PLZF は四肢の形態形成や生殖系列の幹細胞の維持に関与することが報告された。また PLZF の変異は Acute promyelocytic leukemia (APL) を引き起こすことが示され、細胞の増殖や分化に重要な役割を果たすことが推察される (Kolensnichenko M et al. Cell Cycle. 10:771-775, 2011)。しかしながら、骨芽細胞分化や軟骨細胞分化における PLZF の発現変化やその機能に関して多くのことがまだ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は、GC による骨形成抑制機構や軟骨組織の抑制機構を明らかにすることを主な目的とする。そこで、GC 応答性遺伝子である PLZF に着目し、PLZF 遺伝子発現の制御を介して、GC がどのように骨芽細胞と軟骨細胞の分化や機能を制御しているのか明らかにするものである。

3. 研究の方法

(1) マウス長管骨組織における PLZF の発現

と局在の解析:6週齢のマウス長管骨切片と抗 PLZF 抗体を用いて免疫染色法により解析した。成長板軟骨組織における局在を詳細に解析するため、type 10 collagen 抗体と抗 GR 抗体を用いた二重染色を行った。

(2) Dexamethasone (Dex) 刺激による PLZF 遺伝子発現変化の解析:間葉系前駆細胞株 (C3H10T1/2)、骨芽細胞前駆細胞株 (MC3T3-E1)、および軟骨前駆細胞株 (ATDC5) を、GC analog である Dex あるいは prednisone 存在下または非存在下で 72 時間培養した。次に Dex による PLZF の発現誘導における GR の関与を検討するため GR antagonist である RU486 存在下または非存在下で 72 時間培養した。培養後 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法または Western blot 法により PLZF 遺伝子発現の変化を定量的に解析した。

(3) PLZF 過剰発現細胞株および PLZF short hairpin RNA (shRNA) 発現細胞株の樹立: PLZF の機能を解析するため、PLZF 遺伝子が発現するプラスミドベクターを利用し過剰発現細胞を樹立した。また PLZF 遺伝子に対する short hairpin RNA (shRNA) が発現するレトロウイルスベクターを利用し機能阻害細胞株を樹立した。

(4) PLZF による分化制御機構の解析: 上記実験により樹立した PLZF 過剰発現または PLZF shRNA を導入した機能阻害細胞株を用いて、リアルタイム RT-PCR により PLZF 遺伝子発現レベルを、Western blot 法により PLZF タンパク発現レベルを確認した。細胞増殖の評価は、BrdU 存在下で 60 分間培養し BrdU 抗体を用いて解析した。脂肪細胞分化は、脂肪細胞分化誘導培地を用いて培養し、Oil Red O 染色により細胞質内の脂肪滴を染色することで評価を行った。

軟骨細胞分化はインスリンを含む軟骨細胞分化誘導培地を用いて培養し、軟骨基質の染色としてアルシアンブルー染色を行ない分化能の評価を行った。次に、リアルタイム PCR により軟骨基質 (aggrecan, type 2 collagen) および type 10 collagen) と基質分解酵素である MMP13、細胞周期制御因子 (p21, p57 および p53) の遺伝子発現を解析した。

4. 研究成果

(1) マウス長管骨組織における PLZF の発現と局在の解析

PLZF タンパク質は皮質骨や海綿骨の骨細胞や骨芽細胞に発現することが観察された。関節軟骨において、PLZF の発現は主に中間層および深層の軟骨細胞で観察された。成長板軟骨組織における PLZF の発現は主に肥大軟骨細胞の核内に局在を示した (図 1)。肥大軟骨細胞のマーカーである type 10 collagen 陽性細胞に PLZF タンパク質が局在することが観

察された。GR の局在は PLZF の局在と同様に肥大軟骨層の核内に観察された。

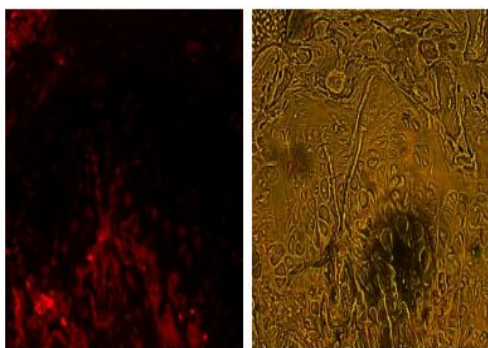


図1 長管骨切片の軟骨組織におけるPLZFの発現と局在。成長板軟骨組織においてPLZF(赤)の発現は主に肥大軟骨細胞で観察された。

(2) Dexamethasone (Dex)刺激による PLZF 遺伝子発現変化の解析

間葉系前駆細胞株(C3H10T1/2)、骨芽細胞前駆細胞株(MC3T3-E1)、および軟骨前駆細胞株(ATDC5)を Dex で刺激すると PLZF mRNA の発現が増加することが観察された。つぎに GC による PLZF の発現制御メカニズムを解析するため ATDC5 細胞を用いて実験を行った。ATDC5 細胞における Dex による PLZF mRNA およびタンパク質の発現増加は濃度依存的に増加することが観察された。GR の antagonist である RU486 存在下では Dex による PLZF mRNA の発現増加が抑制されることから GR 依存的に発現を誘導することが考えられた。また抗炎症剤として用いられる GC analog である predonisone 刺激も高濃度で PLZF mRNA の発現を誘導することが観察された。これらの結果から、間葉系細胞において PLZF の発現は GC シグナルにより制御されることが考えられた。

(3) PLZF 過剰発現細胞株および PLZF short hairpin RNA(shRNA)発現細胞株の樹立

これまでの報告により脂肪細胞前駆細胞株(3T3-L1)に PLZF を過剰発現させると脂肪細胞分化が抑制され、PLZF shRNA を導入することで発現を抑制し機能を阻害すると脂肪細胞分化が促進することが報告されている。(Mikkelsen et al., Cell 143:156-169. 2010) 我々のグループで構築した過剰発現ベクターを 3T3-L1 細胞に遺伝子導入すると脂肪細胞分化が抑制された。また PLZF shRNA を導入すると逆に脂肪細胞分化が亢進した。これらの結果から、PLZF の過剰発現ベクターや PLZF shRNA 発現ベクターが機能していることが確認できた。

ATDC5 細胞を用いて PLZF を過剰発現する細胞を樹立した。Western Blot 法により導入した PLZF 遺伝子によるタンパク質発現が有意に高く観察された。PLZF shRNA を発現し

た細胞では、リアルタイム PCR および Western Blot 法により PLZF mRNA およびタンパク質発現レベルが有意に減少することが観察された。

(4) PLZF による分化制御機構の解析

PLZF を ATDC5 細胞に過剰発現させた細胞は細胞の増殖が顕著に抑制されることを見出した。BrdU 存在下で細胞を 60 分間培養し、抗 BrdU 抗体を用いて増殖能を評価した。その結果 PLZF 過剰発現細胞ではコントロールに比較すると BrdU 陽性細胞の頻度が減少していた(図2)。インスリンを含む軟骨細胞分化誘導培地で分化を誘導すると PLZF 過剰発現させた細胞で軟骨基質の染色性が有意に増加した。遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR により解析した結果、PLZF 過剰発現細胞では軟骨基質遺伝子である aggrecan と type 2 collagen, 肥大軟骨細胞マーカーである ALP と MMP13 の遺伝子発現が高く観察された。また Cyclin dependent kinase (CDK)インヒビターである p21 の発現が PLZF 過剰発現細胞で高く観察された。

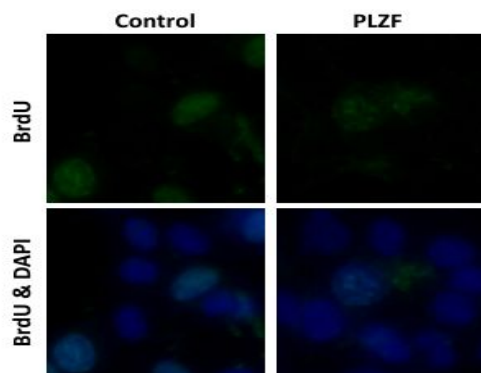


図2 PLZFを過剰発現したATDC5細胞ではBrdU(緑)の取り込みが減少した。

PLZF shRNA を導入した細胞ではコントロールと比較すると、軟骨細胞分化や細胞増殖抑制に関連する上記遺伝子発現レベルの減少が認められた。BrdU ラベル実験の結果、PLZF shRNA を導入した細胞で BrdU 陽性細胞の頻度が高く観察され、増殖が亢進していることが明らかになった(図3)。これらの結果から、PLZF は p21 の発現を誘導し細胞増殖を抑制することで軟骨細胞分化を促進しているのではないかと考えられた。

我々は、Dex で ATDC5 細胞を刺激すると、増殖が抑制し、軟骨基質の産生が抑制されることを確認した。GC による軟骨細胞の増殖や分化を抑制するメカニズムとして、GC 応答性を示す PLZF が関与するか、PLZF shRNA を導入した ATDC5 細胞を用いて解析した。Dex 刺激による軟骨基質遺伝子(aggrecan と type 2 collagen)の mRNA 発現レベルの減少は PLZF shRNA を導入した細胞でも同様に観察されたことから、Dex 刺激による軟骨基質遺

伝子発現の抑制メカニズムには関与しないことが示唆された。次に BrdU の取り込み実験により細胞増殖を評価したところ、PLZF shRNA を導入した細胞ではコントロールと比較すると Dex 存在下においても BrdU 陽性細胞の頻度が高く観察された(図3)。リアルタイム PCR 解析の結果、Dex 刺激は p53 や CDK inhibitor の p21, p57 の発現を誘導するが、PLZF shRNA を導入した細胞ではこれらの遺伝子発現レベルがコントロールと比較すると低く観察された。これらの結果から、GC 刺激により発現が誘導される PLZF は p53 や CDK インヒビター(p21, p57)の発現を調節することで軟骨前駆細胞の増殖を抑制することが考えられた。

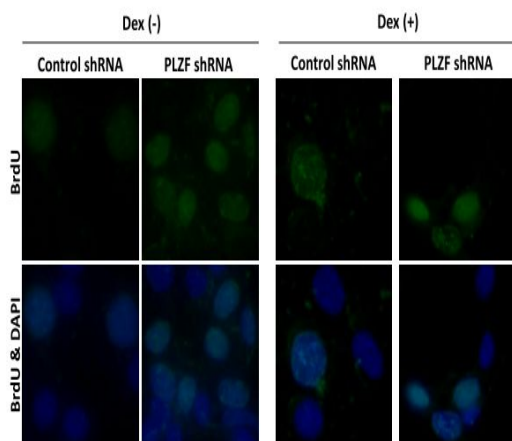


図3 PLZF shRNAを導入した細胞では、BrdU (緑)陽性細胞が多く観察された。一方、DexはBrdUラベルの取り込みを抑制するが、PLZFshRNAを導入した細胞ではDex存在下でもBrdUの取り込みが部分的に維持された。

本研究課題を通じて、GC により発現が誘導される PLZF が軟骨細胞の増殖を抑制し軟骨細胞分化・成熟を促す働きを示すことが明らかになった(図4)。また GC による軟骨細胞の増殖抑制メカニズムとして、PLZF による p53 遺伝子や CDK インヒビター(p21, p57)の遺伝子発現制御が関与していることが推察された。骨芽細胞においても高濃度あるいは長期的な GC 刺激が分化や増殖を抑制するが、GC により発現が誘導される PLZF が骨芽細胞の分化や増殖にどのような働きを示すのか現在解析を進めている。

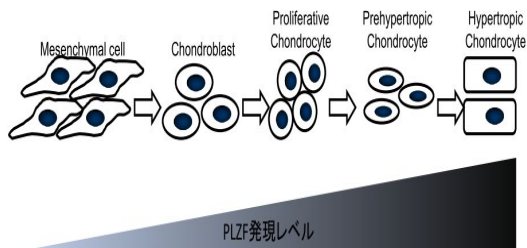


図4 軟骨細胞分化におけるPLZFの発現

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)

Naito M, Vongsa S, Tsukune N, Ohashi A, Takahashi T. Promyelocytic leukemia zinc finger mediates glucocorticoid-induced cell cycle arrest in the chondrogenic cell line ATDC5. *Mol Cell Endocrinol*. 査読有、417,2015:114-23. doi: 10.1016/j.mce.2015.09.026.

Naito M, Ohashi A, Takahashi T. Dexamethasone inhibits chondrocyte differentiation by suppression of Wnt/ β -catenin signaling in the chondrogenic cell line ATDC5. *Histochem Cell Biol*. 査読有、144(3):261-72. 2015 doi: 10.1007/s00418-015-1334-2.

Naito M, Mikami Y, Takagi M, Takahashi T. Up-regulation of Axin2 by dexamethasone promotes adipocyte differentiation in ROB-C26 mesenchymal progenitor cells. *Cell Tissue Res*. 査読有、354(3):761-70. 2013 doi: 10.1007/s00441-013-1696-5.

〔学会発表〕(計 3件)

内藤昌子, 大橋晶子, 高橋富久 軟骨細胞分化における Lamin A/C の発現と局在について 第 121 回日本解剖学会全国学術集会総会 2016 年 3 月 29 日「ビッグパレットふくしま (福島県・郡山市)」

Naito Masako, Ohashi Akiko and Takahashi Tomihisa The roles of promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) in Glucocorticoid-induced cell cycle arrest in a chondrogenic progenitor cells, ATDC5. 第 120 回 日本解剖学会全国学術集会総会 2015 年 3 月 22 日「神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)」

内藤昌子, 高橋富久 軟骨細胞分化における PLZF 転写因子の役割について 第 119 回日本解剖学会全国学術集会総会 2014 年 3 月 28 日「自治医科大学キャンパス (栃木県・下野市)」

6. 研究組織

(1)研究代表者

内藤 昌子 (NAITO, Masako)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号:

40436803