

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861684

研究課題名(和文) 転写因子Alx3による骨芽細胞分化促進作用の解明と骨造成への応用

研究課題名(英文) Effect of transcriptional factor Alx3 during osteoblast differentiation and bone development

研究代表者

松本 貴志(Matsumoto, Takashi)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00635039

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)：本研究は、BMP-2によるAlx3遺伝子の発現制御機構ならびにAlx3の骨芽細胞分化に対する作用機序について解明し、骨造成への応用を視野に検討した。Alx3遺伝子発現は、BMP-2の濃度および処理時間依存的に増加し、その発現誘導にはBMP-2/Smad経路の関与が示された。また、Alx3の発現抑制によりBMP-2による骨芽細胞分化が低下することが明らかとなり、その作用機序として、骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼがAlx3の標的遺伝子であることが示された。しかし、Alx3の骨芽細胞分化における促進効果は著明ではなく、骨造成への応用は困難であることが推察された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated the mechanisms of Alx3 gene expression and function during osteoblast differentiation induced by BMP-2. In C2C12 cells, BMP-2 induced increase of Alx3 gene expression in both time- and dose-dependent manners through the Smad signaling pathway. In addition, silencing of Alx3 by siRNA inhibited osteoblast differentiation induced by BMP-2, as showed by the expressions of Alkaline phosphatase (ALP), Osteocalcin, and Osterix, while overexpression of Alx3 enhanced osteoblast differentiation induced by BMP-2. According to Alx3 CHIP assay, osteoblastic marker gene ALP is the target gene of Alx3 transcriptional factor. These results indicate that Alx3 is a positive regulator of osteoblast differentiation induced by BMP-2. However, we found that effect of osteoblast differentiation by Alx3 is not enough and therefore Alx3 applied bone development is difficult.

研究分野：歯学

キーワード：Alx3 BMP

1. 研究開始当初の背景

(1)高齡化の進む現代では、加齢に伴う骨量の低下による骨の脆弱化、それに起因する骨折が増加傾向にある。顎口腔領域において骨の脆弱化は歯槽骨の吸収促進などによる口腔機能障害を引き起こし、高齡者の Quality of Life (QOL) 低下の主たる要因の一つとされる。高齡化が進行の一途を辿る我が国においてこの傾向は更に加速するものと予測され、骨量低下を抑制する方策が模索されると共に、骨折や吸収により生じた骨欠損部の修復を促進する治療法の開発が急務である。

(2) 骨誘導因子 BMP は、筋組織中で異所性骨形成を誘導する生理活性物質として発見された。近年、BMP は骨形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、BMP を利用した硬組織再建への可能性が検討されてきた。しかし、ヒトは BMP に対する感受性が低く、十分な研究結果が得られていないのが現状である。今後、BMP による硬組織再建の実現には、BMP 活性を制御する因子の探索およびその制御メカニズムの解明が必要である。

2. 研究の目的

骨誘導因子 Bone Morphogenetic Protein (BMP) は骨芽細胞の分化や異所性の石灰化を誘導する生理活性物質である。申請者は、BMP ファミリータンパク質の1つ BMP2 により発現が誘導される遺伝子の中で骨芽細胞分化誘導を促進する因子として、ホメオボックス転写因子 *Aristaless like homeobox 3* (*Alx3*) を見出した。骨芽細胞分化と *Alx3* の関連について、下記の研究を進めることを目的とする。

(1) *Alx3* の発現制御機構を解明する
BMP2 により誘導される *Alx3* の発現制御機構について検討する。BMP2 はその受容体を介し、細胞内で Smad シグナルおよび MAPK シグナルの活性化により標的遺伝子の発現制御が行われている。*Alx3* の発現制御が上記シグナルのいずれを介し行われているか検討するとともに、*Alx3* 遺伝子プロモーター上に存在する、BMP 反応配列 (BMP Responsible Element ; BRE) を同定する。

(2) *Alx3* の骨芽細胞分化促進機構の解明
BMP2 による骨芽細胞分化を促進させる *Alx3* の機能解明を行う。転写因子である *Alx3* が BMP2 を介する骨芽細胞分化を促進させる際、他の転写因子と共役しているかどうか検討する。また、*Alx3* が BMP2 を介する骨芽細胞分化を促進させる際の *Alx3* の直接の標的遺伝子を同定する。

(3) *Alx3* の BMP 活性促進因子としての臨床応用への可能性の検討する
多能性幹細胞 Bone Mesenchymal Stem Cells (BMSC) に Hypoxia Induced Factor1 (HIF1) を導入した細胞をインプラント体

および補填剤とともに犬に埋入した際、優れた新生骨の形成が認められたとの報告がある。そこで、*Alx3* および *Alx3* と共役する転写因子を導入した多能性幹細胞を用い、骨形成の増加を目的とした臨床応用への可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) *Alx3* の発現制御シグナルの解明

BMP により活性化される細胞内シグナル伝達経路には主に、Smad シグナルと MAPK シグナルが存在する。Smad シグナルはリン酸化により活性化された Smad1, 5, 8 と Smad4 が共役し、核へ移行後、標的遺伝子の発現を制御する。また、MAPK シグナルは ERK1/2, p38 MAPK, JNK の3つの MAPKs が活性化され、標的遺伝子の発現を制御する。そこで、これらの細胞内シグナル伝達経路の中でいずれの経路を介し *Alx3* の発現が誘導されるのか、それぞれのシグナル伝達に対する特異的阻害剤を用いることにより検討する。

遺伝子の発現制御を解析する上で、遺伝子プロモーターの応答配列を同定することは、今後、*Alx3* 遺伝子の発現を制御する創薬開発などにとって重要であると考えられる。そこで、*Alx3* 遺伝子プロモーター領域(転写開始点より上流約 3Kbp)をクローニング後、レポーター遺伝子(ルシフェラーゼおよび Green Fluorescent Protein(GFP)を接続したベクターを作成し、その活性を測定することから *Alx3* 遺伝子プロモーター上に存在する、BMP 応答領域を同定する。また、ゲルシフト法もしくはクロマチン免疫沈降法(Chromatin Immunoprecipitation; ChIP)を併用し、BMP 応答配列を同定する。

(2) 骨芽細胞分化を促進させる際、*Alx3* と共役する因子の同定

Alx3 の共役因子の同定は、*Alx3* の機能を増幅させる上で重要である。そこで、免疫沈降法を用いた *Alx3* 結合タンパク質の同定を行う。予想される共役因子として、E47 や骨芽分化にとって重要な転写因子 *Runx2* や *Osterix*、*Alx3* と同じファミリータンパク質である *Cart1* や *Alx4* が考えられる。また、*Alx3* と結合するたんぱく質の網羅的解析として、ペプチドアレイを用いたプロテインチップを用いた解析も検討する予定である。

(3) *Alx3* の標的遺伝子の同定

Alx3 が骨芽細胞を分化促進させる際、その標的遺伝子を同定することは、骨芽細胞分化を促進させる分子メカニズムの解明、さらには将来的に骨形成の促進を目的とした創薬の開発の際に重要であると考えられる。そこで、*Alx3* を高発現することのできる発現ベクターおよび *Alx3* の発現を抑制する siRNA を用い、*Alx3* の発現を促進および抑制した際に変動する遺伝子をマイクロアレイチップにより、網羅的に解析する。再現性に関しては、

定量的 PCR 法を用いる。遺伝子発現様式に変化が認められた遺伝子は、高発現することのできる発現ベクターを作成し、Alx3 と共に高発現させた際の骨芽細胞分化に対する作用を、アルカリホスファターゼ活性測定および活性染色法、石灰化の指標としてアリザリンレッド染色、および各種骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現様式（アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、Runx2 など）により検討する。

(4) Alx3 の BMP 活性促進因子としての臨床応用への可能性の検討

近年、骨造成に關与する遺伝子を導入した多能性幹細胞を硬組織へ移植するなど、オッセオインテグレーションの促進を目的とした骨内インプラントの基礎研究開発が行われている。そこで、Alx3 を導入した多能性幹細胞を用い臨床応用を検討した以下の実験計画を遂行する。

4. 研究成果

(1) BMP による Alx3 遺伝子の発現制御機構の解明として、BMP により活性化される細胞内シグナル伝達経路の中で、いずれの経路を介し Alx3 の発現が誘導されるのか、それぞれのシグナル伝達に対する特異的阻害剤を用いることにより検討した。その結果、BMP 受容体を介するシグナル伝達に特異的な阻害剤である Dorsomorphin、および BMP/Smad 経路の重要因子である Smad4 の発現抑制により Alx3 の発現が有意に低下したことから、Alx3 の発現が BMP/Smad 経路を介することが示された。(図 1)

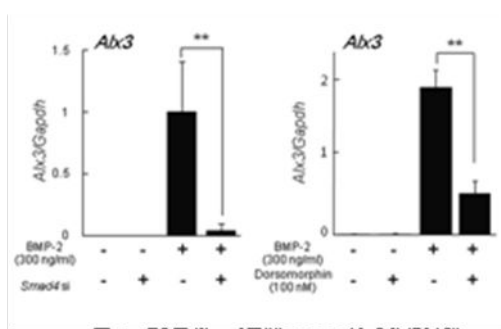


図 1 BMP/Smad 経路による Alx3 発現抑制

発現制御機構の解明は、分子生物学的意義の他、今後の研究活動における研究方法・検討手段としての応用に重要であると考えられる。

(2) Alx3 は脾臓細胞において、インスリンの発現を制御する際、転写因子 E47 と共役して作用する報告がある。Alx3 の共役因子の同定は、Alx3 の機能を増幅させる上で重要である。E47 および Cart1 を共役因子の候補とし、それぞれの強制発現ベクターを作製し、Alx3 と共に遺伝子導入したところ、BMP による骨芽細胞分化誘導能に差異は認められな

った。共役因子の解明に關して、現段階では他の手がかりがなく、今後の進展において困難であると考えられる。

(3) Alx3 が骨芽細胞を分化促進させる際、その標的遺伝子を同定することは、骨芽細胞分化を促進させる分子メカニズムの解明、さらには将来的に骨形成の促進を目的とした創薬の開発の際に重要であると考えられる。Alx3 を高発現することのできるプラスミドベクターを用い、CHIP マイクロアレイを行い、Alx3 と結合するタンパク質を網羅的に解析し、骨芽細胞分化促進に關連した標的遺伝子を探索した。網羅的解析より標的遺伝子として、アルカリホスファターゼを同定した。アルカリホスファターゼは骨芽細胞の前駆細胞に発現する骨気質タンパク質であり、前述したように骨芽細胞分化のマーカー遺伝子とされる遺伝子である。クロマチン免疫沈降法により、アルカリホスファターゼが Alx3 の標的遺伝子であることが明らかとなった。(図 2)

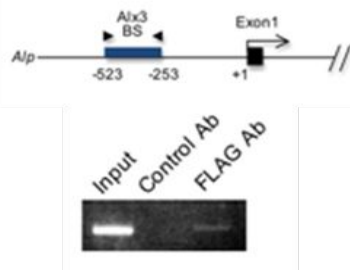


図 2 CHIP 解析による Alx3 標的遺伝子の同定

ここまでの研究成果をまとめとして、科学雑誌 PLoS ONE へ投稿し掲載された。

(4) Alx3 の BMP 活性促進因子としての臨床応用への可能性については、Alx3 単独での骨芽細胞分化促進効果は微弱であり、共役因子の同定が必要不可欠であった。しかし、共役因子の同定は複数の候補因子について検討したが、十分な結果が得られていない。現段階において、Alx3 の骨芽細胞分化促進因子としての骨造成への応用は困難であり、Alx3 の骨芽細胞分化促進効果を増幅する新たな方法の検討が必要である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 貴志 (MATSUMOTO, Takashi)
昭和大学・歯科補綴学講座・助教
研究者番号：00635039

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：