

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870543

研究課題名(和文) TLE3に着目した新規骨再生療法の分子基盤形成

研究課題名(英文) The molecular basis of novel bone regeneration methods by regulating TLE3

研究代表者

古株 彰一郎 (Shoichiro, Kokabu)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：30448899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はこれまでに転写コファクターのTLE3が PPAR に作用して脂肪細胞分化を促進し、それとは逆にRunx2の転写活性を抑制して骨芽細胞分化を抑制することを報告した(Kokabu S et al., 2013)。今回、生理的条件下で脂肪細胞分化を抑制し、さらに骨芽細胞分化を促進することで骨量を増加させるWntシグナルによって TLE3の発現が調節されることを見出した(Kokabu S et al., 2014)。さらにTLE3は骨格筋の組織幹細胞であるサテライト細胞に発現し、骨格筋分化のマスターレギュレーターであるMyoDの転写活性を抑制することで筋分化を制御する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Groucho/TLE family members are transcriptional co-factors in metazoans that play critical roles during development and cell fate determination. We recently reported that TLE3, one of the Groucho/TLE family members, regulates the balance between osteoblast and adipocyte formation from mesenchymal stem cells (Kokabu S et al., 2013).

Here, we reported that canonical Wnt signaling increases the expression levels of TLE3 while TLE3 suppresses canonical Wnt signaling in bone marrow mesenchymal stem cells (Kokabu S et al., 2014). We also suggested the possibility that TLE expresses by satellite cells, skeletal muscle stem cells, and interacts with the bHLH domain of MyoD and interferes with the formation of a complex between MyoD and E-protein, which consequently results in repression of MyoD transcriptional activity and myogenesis.

研究分野：骨・骨格筋代謝

キーワード：再生医学 運動器 骨 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

加齢性の骨粗しょう症やサルコペニアではそれぞれ骨髄の脂肪化および骨格筋内への脂肪浸潤が認められる。その結果、機能性の骨や骨格筋量が減少し、ロコモティブシンドローム、ひいては要支援、要介護の原因となる。そのため超高齢社会のわが国ではこの骨髄の脂肪化および骨格筋への脂肪浸潤は解決すべき問題であるが、その詳しい病態メカニズムは明らかでない。

われわれはこれまでに転写共役因子 TLE3 が骨髄の間葉系幹細胞に発現し脂肪細胞と骨芽細胞分化を制御することを見出した。その制御メカニズムとして脂肪細胞分化と骨芽細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ と Runx2 に対して TLE3 がその転写活性をそれぞれ亢進と抑制することによって考えられた(Kokabu S et al., 2013)。

2. 研究の目的

脂肪細胞、骨芽細胞そして筋芽細胞はいずれも間葉系幹細胞から分化する (図 1)。

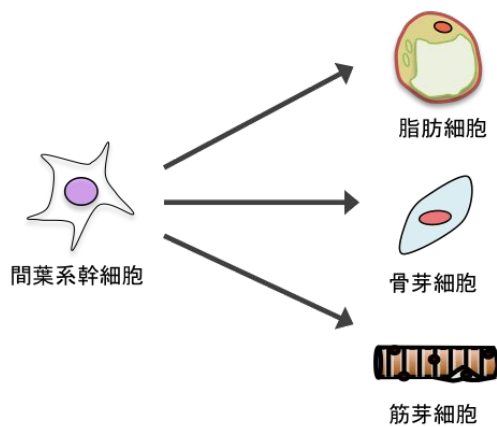


図 1 間葉系幹細胞の分化

さらに TLE3 は発生期の骨格筋に発現し、また、TLE3 は様々な転写因子に作用して細胞分化を制御することが知られていることから、TLE3 は骨格筋の分化にも関与するのではないかと仮説を立案した。

そこで、本研究では まず TLE3 の発現調節機構を明らかにし、さらに 骨格筋分化に対する TLE3 の役割を検討することとした。

3. 研究の方法

Single Fiber は 8 週齢雄マウス長指伸筋より採取して免疫染色を行った。筋芽細胞 C2C12 と線維芽細胞 10T1/2 細胞を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。mRNA の発現量は real-timePCR 法で定量した。cDNA のクローニングは、通常の RT-PCR 法で行い、DNA の塩基配列を確認した。タンパク質の発現量はウエスタンブロット法で行った。

4. 研究成果

TLE3 のプロモーター領域を含むルシフェラーゼレポーターを作製し、TLE3 の発現制御因子をスクリーニングしたところ、生理的条件下で脂肪分化を抑制し骨芽細胞分化を促進する古典的 Wnt シグナルが TLE3 の発現を誘導することを突き止めた。さらに間葉系幹細胞において TLE3 の過剰発現は Wnt シグナルを抑制することも明らかにした(Kokabu S et al., 2014)。

これまでの知見を総合すると TLE3 は Runx2 や PPAR γ に直接作用するだけでなく、Wnt シグナルを介した経路でも脂肪分化促進と骨芽細胞分化を抑制し黄色骨髄化に関与している可能性がある (Kokabu S et al., 2016; 図 2)。

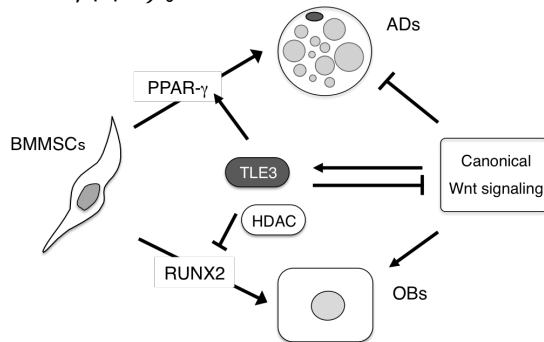


図 2 TLE3 の発現調節機構

次に骨格筋分化に対する TLE3 の役割を検討するために、まず免疫染色法で TLE3 は前脛骨筋筋線維の周囲にある細胞で発現することを確認した。筋線維周囲にあるサテライト細胞は筋肉の組織幹細胞である。そして Fiber 染色により TLE3 は静止期のサテライト細胞では TLE3 は発現していないが、活性化し増殖・分化している TLE3 で発現することが明らかになり、TLE3 は骨格筋細胞の増加や分化に影響を与えている可能性があることが明らかとなった (図 3)。

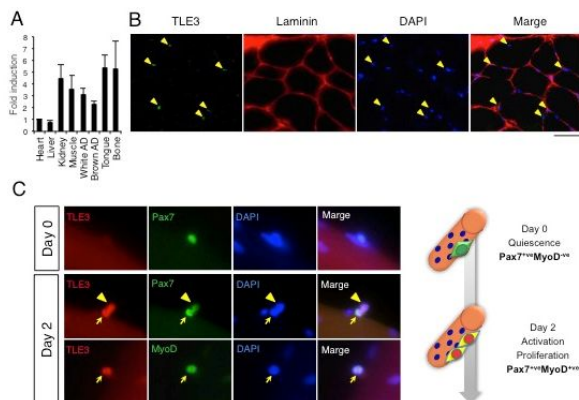


図 3 TLE3 はサテライト細胞に発現する

C2C12 細胞はサテライト細胞由来の細胞株である。そこで shRNA を用いて C2C12 細胞の内在性の TLE3 をノックダウンしたところ、TLE3 がノックダウンされた細胞では C2C12 細胞の筋分化が亢進した。そして骨格筋分化のマスターレギュレーターである MyoD の発現レベルが変化しなかったことから TLE3 は MyoD に転写活性に作用して筋分化を制御するのではないかと考えた。そして C2C12 細胞において内在性の MyoD と TLE3 が会合することが免疫沈降法で明らかとなった (図 4)。

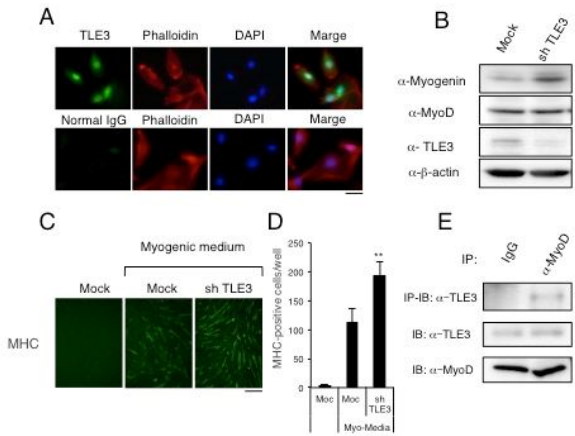


図 4 TLE3 は C2C12 細胞の筋細胞分化を抑制する

線維芽細胞株 10T1/2 細胞は筋細胞分化能を有するが、C2C12 細胞に比べ内在性の TLE3 と MyoD の発現量が少ない。そこで 10T1/2 細胞を用いて、TLE3 が MyoD および MyoD が誘導する筋細胞分化に対する分子メカニズムの解明を試みた。すると TLE3 の過剰発現は MyoD の過剰発現が誘導する MG185-Luc 活性を抑制し、さらに MyoD の過剰発現が誘導する筋細胞分化を抑制した (図 5)。

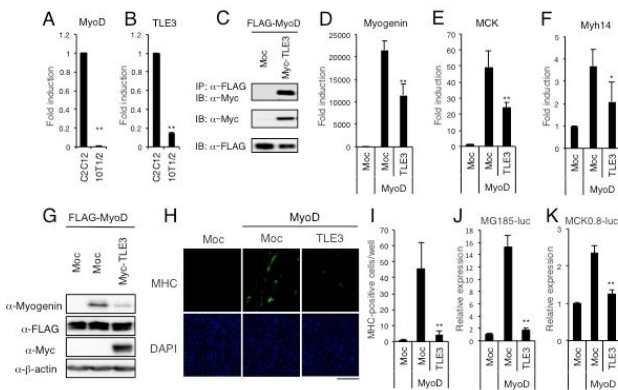


図 5 TLE3 は MyoD の転写活性を抑制する

つぎに、TLE3 のどの部分が MyoD に会合し転写活性を制御するかを検討するために、様々な TLE3 の欠失変異体を作製して実験をおこなったところ、TLE3 の Q ドメインと SP ドメインが MyoD との会合と転写制御に必須であることが明らかとなった (図 6)。

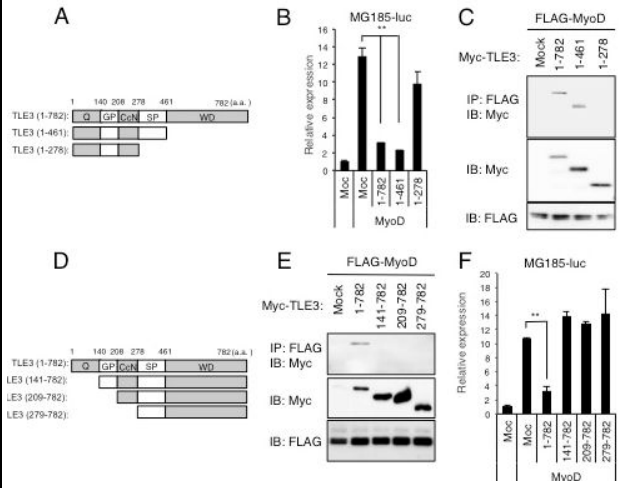


図 6. MyoD の抑制には TLE3 の Q ドメインと SP ドメインが重要である

つぎに、MyoD のどの部分が TLE3 と会合し、制御を受けるのか検討するために 3 種類の MyoD 欠失変異体を作製し、ルシフェラーゼアッセイと免疫沈降実験を行った。すると、TLE3 は MyoD の bHLH ドメインと会合し、転写制御することが明らかとなった (図 7)。

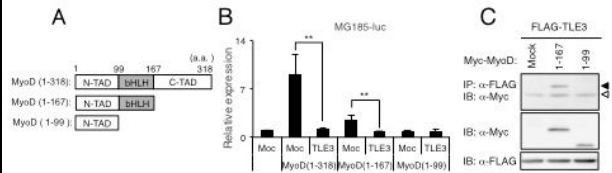


図 7 TLE3 は MyoD の転写活性を抑制する

最後に TLE3 が MyoD の転写活性を抑制し、筋細胞分化を抑制するメカニズムを解明するために、生理的に MyoD の bHLH ドメインと会合し、ヘテロダイマーを形成することで MyoD の標的遺伝子の転写を制御する E protein に着目した。すると TLE3 の過剰発現は MyoD と E-protein との会合を阻害し、MyoD の転写活性を抑制することが明らかとな

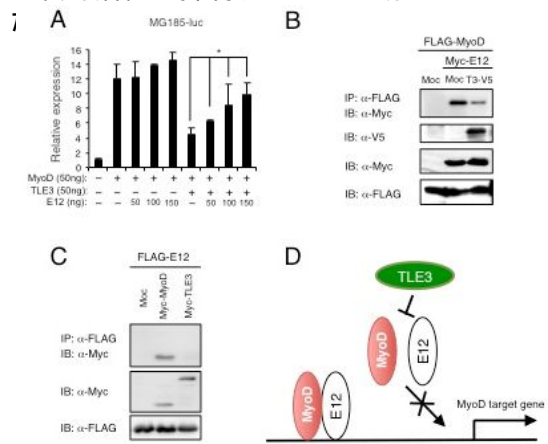


図 8 TLE3 は MyoD と E-protein の会合を阻害して転写活性を阻害する

以上より、TLE3 は MyoD の転写活性を制御し筋細胞分化を抑制することが明らかとなった。TLE3 は骨格筋の組織幹細胞であるサテライト細胞に発現しているため、TLE3 は生理的な筋再生に関与しているかもしれない。上記内容は現在、論文投稿準備中である。

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 3 件)

1. Kokabu S, Lowery JW, Eijiro Jimi. (2016) Cell Fate and Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International* Article ID 3753581 (査読有)
2. 古株彰一郎. (2015) 骨髄間葉系幹細胞の運命決定メカニズムの研究. *九州歯科学会雑誌* 7 (査読有)
3. Kokabu S, Sato T, Ohte S, Enoki Y, Okubo M, Hayashi N, Nojima J, Tsukamoto S, Fukushima Y, Sakata Y, Katagiri T, Rosen V, Yoda T. (2014) Expression of TLE3 by bone marrow stromal cells is regulated by canonical Wnt signaling. *FEBS Lett* 14: 614-619. (査読有)

[学会発表](計 6 件)

1. 古株彰一郎、中富千尋、浦田真梨子、松原琢磨、片桐岳信、自見英治郎：TLE3 による筋分化調節機構、第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会、新潟、平成 27 年 9 月 11 日-13 日
2. 古株彰一郎、佐藤 毅、榎木祐一郎、片桐岳信、自見英治郎：TLE3 は MyoD の転写活性を調節する、第 33 回日本骨代謝学会学術集会、東京、平成 27 年 7 月 23 日-25 日
3. 古株彰一郎、杉山悟郎、浦田真梨子、中富千尋、自見英治郎：TLE3 結合因子の探索とその機能解析、第 75 回九州歯科学会総会・学術大会、北九州、平成 27 年 5 月 23, 24 日
4. Kokabu S, Sugiyama G, Urata M, Tada Y, Nakatomi C, Jimi E: TLE3 regulates the differentiation of Mesenchymal stem cells. Asia-Pacific Conference 2015, Kitakyusyu January 24th, 2015.
5. Kokabu S, Sugiyama G, Jimi E: TLE3 regulates transcriptional activity of myogenic regulatory factors. The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kitakyusyu, November 5-7th 2014.
6. 古株彰一郎、杉山悟郎、佐藤毅、依田哲也、片桐岳信、自見英治郎：Groucho/TLE は MyoD の転写活性を調節し筋分化を制御する、第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、

福岡、平成 26 年 9 月 26 日

[その他]

ホームページ等

http://www.kyu-dent.ac.jp/research/lecture/molecular_information

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

古株彰一郎 (KOKABU SHOICHIRO)

九州歯科大学・歯学部・准教

研究者番号：30448899