

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：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893286

研究課題名(和文) 骨芽細胞および骨細胞による間葉系幹細胞の分化制御機構の解明

研究課題名(英文) A study to resolve the mechanism by which osteoblasts and osteocytes regulate the differentiation of mesenchymal stem cells

研究代表者

秋山 祐子 (AKIYAMA, Yuko)

日本大学・歯学部・ポスト・ドクトラル・フェロー

研究者番号：90735622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*in vitro*共培養システムを用いて、骨芽細胞による間葉系幹細胞の遺伝子発現制御機構について検討した。骨芽細胞および間葉系幹細胞として、マウスMLO-A5およびC3H10T1/2を用いた。骨芽細胞はgap junctionを介して、間葉系幹細胞の骨芽細胞マーカー因子であるALPおよびBSPの発現を誘導することが明らかになった。この発現誘導は分化誘導は、従来から骨芽細胞分化を誘導することが知られているRunx2やOsterixなどの骨芽細胞転写因子とは異なる因子を介したものであり、ヒストンのアセチル化が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：An analytical study of cell-cell communications between murine osteoblast-like MLO-A5 cells and mesenchymal stem cell (MSCs)-like C3H10T1/2 cells was performed. The mRNA expression levels of several osteogenic transcription factors did not differ between the co-cultured and mono-cultured C3H10T1/2 cells, but those of ALP and BSP were approximately 400-fold higher in the co-cultured cells. Patch clamp and biocytin transfer assays revealed gap junction-mediated communication between co-cultured C3H10T1/2 and MLO-A5 cells. A gap junction inhibitor suppressed the increases in the ALP and BSP mRNA expressions in co-cultured C3H10T1/2 cells. Furthermore, the histone acetylation levels were higher in co-cultured 10T-GFP cells than mono-cultured 10T-GFP cells. These results suggest that osteoblasts and BMSCs associate via gap junctions, and that gap junction-mediated signaling induces histone acetylation that leads to elevated transcription of the genes encoding ALP and BSP in MSCs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：骨芽細胞 間葉系幹細胞 ギャップジャンクション

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物では、各細胞系譜への分化において、結合細胞間あるいは近傍に存在する細胞間のコミュニケーションが重要な役割を果たす。したがって、骨芽細胞分化においても、これらが重要な役割を担っていると考えられる。すなわち、骨芽細胞や骨細胞とそのままの間葉系幹細胞との間に何らかのシグナル伝達経路が存在し、骨芽細胞分化を制御していることが予想される。一方、細胞間の情報伝達には、①電気的シグナル伝達、②ホルモン・サイトカインなどの液性因子による伝達、③細胞同士の細胞質が直接つながるギャップジャンクションを介した伝達がある。骨芽細胞分化においては、これまでに、②について多くの研究が行われてきた。しかし、近年、マウス頭蓋骨において、骨芽細胞の間や骨細胞の間、また骨芽細胞と骨細胞の間にギャップジャンクションが存在することが報告され、骨芽細胞分化における③のシグナル伝達様式の関与が示唆されている。しかし、骨芽細胞や骨細胞と間葉系幹細胞の間における③のシグナル伝達様式については、十分な検討はされておらず、不明である。

2. 研究の目的

高齢者人口の増加が進行するなかで骨粗鬆症や変形性骨関節疾患などの罹患者が増加しており、長期化する高・老年期のクオリティ・オブ・ライフの向上を目指す上で深刻な問題となっている。健康な骨を維持するためには、骨代謝を高め、骨質を改善する薬剤の開発が求められる。そのためには、骨形成において主要な役割を担う骨芽細胞の分化機構を理解し、その制御因子を同定することが急務である。本研究では、従来から多くの研究が行われてきたサイトカインやホルモンなどの液性因子による骨芽細胞分化制御機構ではなく、骨芽細胞と間葉系幹細胞の間の直接的な結合によるシグナル伝達機構に着目し、骨芽細胞分化に関与する新規転写制御ネットワークの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞

骨芽細胞および間葉系幹細胞として、マウス ML0-A5 および C3H10T1/2 をそれぞれ用いた。

(2) 共培養

蛍光タンパク質 (GFP) を安定発現する C3H10T1/2 (10T-GFP) を樹立し、この細胞と ML0-A5 を培養ディッシュ上で共培養した。Control として、単独で培養した 10T-GFP を用いた。

(3) 遺伝子発現解析

共培養後にセルソーター (FACS) を用いて GFP 発現細胞 (10T-GFP) を単離し、遺伝子発現解析 (real-time RT PCR およびマイクロアレイ) を行った。

(4) gap junction 解析

10T-GFP/ML0-A5 間の gap junction の存在は、パッチクランプアッセイおよび biocytin インジェクション法を用いて確認した。さらに、gap junction を介した細胞間コミュニケーションが遺伝子発現に与える影響を gap junction 形成阻害剤を用いて検討した。

(5) エピジェネティックイベント解析

共培養した細胞と単独培養した細胞について、ゲノム DNA のメチル化を抗メチル化シトシン抗体を用いた South-Western Dot-blot 法および Bisulfite Sequencing 法を用いて解析した。また、ヒストンのアセチル化については、抗アセチル化ヒストン抗体を用いた Western blot 法によって解析した。

(6) 標的因子のスクリーニング

マイクロアレイ解析の結果、発現量の変動が著しい遺伝子について、そのプロモーター領域の配列を比較し、共通する転写因子結合配列を検索した。さらに、共通結合配列について、ルシフェラーゼアッセイを用いて、共培養に対する応答性を検討した。

(7) 統計解析：結果は3回の独立した実験から得られたデータの平均値と標準偏差で示した。2群間の比較には Student's t 検定を行い、有意水準は $p < 0.05$ とし、*で示した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現解析

ML0-A5 と 10T-GFP を 24 時間共培養した後に FACS を用いて 10T-GFP を単離し (Fig. 1A)、骨芽細胞マーカー因子の発現量を real-time RT-PCR 法を用いて解析した (Fig. 1B)。その結果、単独で培養した 10T-GFP と比較して共培養した 10T-GFP では、骨芽細胞分化への指標とされる Alkaline Phosphatase (ALP) および Bone Sialoprotein (BSP) の発現量が顕著に増加していた (約 300~400 倍)。一方、ALP および BSP の発現を誘導することが知られている骨芽細胞分化関連転写因子である Runx2、Osterix、Dlx5、Msx2 の発現量に変化は認められなかった (Fig. 1B)。

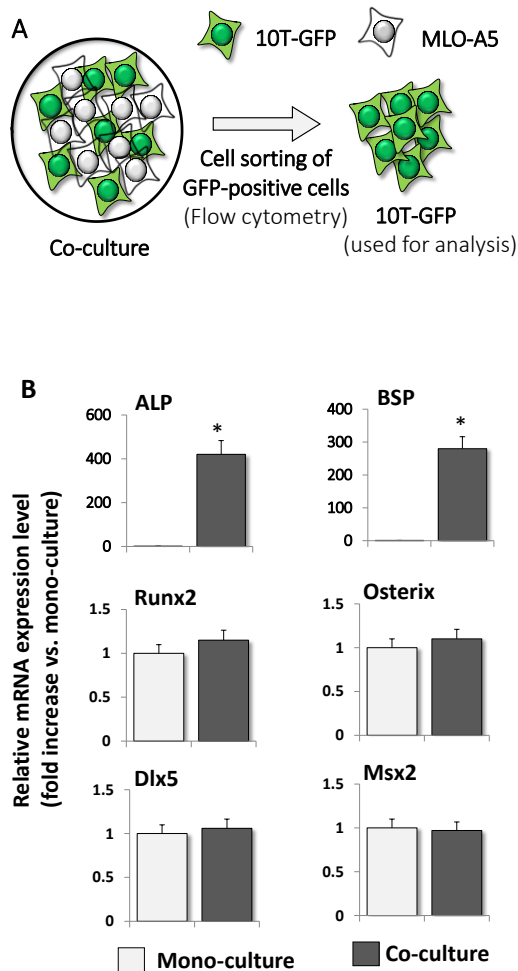


Fig. 1. The expression levels of the osteogenic markers in the co-cultured 10T-GFP.

(A) Schematic illustration of the co-culture system used in this study. Equal numbers of 10T-GFP and MLO-A5 cells were mixed, plated onto culture dishes, and co-cultured in growth medium. (B) Real-time RT-PCR analyses of the mRNA expression levels of osteogenic transcription factors (Runx2, Osterix, Dlx5, and Msx2) and osteoblast markers (ALP and BSP) in 10T-GFP cells that were mono-cultured or co-cultured with MLO-A5 cells for 24 h. The expression level of each mRNA was normalized to that in the corresponding mono-cultured cells and the data are represented as the mean \pm SD of $n = 3$ replicates. * $P < 0.05$.

(2) gap junction 解析

パッチクランプアッセイから、共培養ディッシュ内において、隣接する 10T-GFP/MLO-A5 間に通電が確認された。一方、単独で培養した 10T-GFP/10T-GFP 間には通電は認められなかった (Fig. 2A)。また、biocytin インジェクション法による解析では、共培養した 10T-GFP および MLO-A5 には細胞間に biocytin の拡散を認めたが、単独培養した 10T-GFP では、biocytin はインジェクションした細胞にとどまっており、周辺細胞への拡散は認められなかった (Fig. 2B)。これらの結果から共培養した 10T-GFP/MLO-A5 間に gap junction の存在が示された。

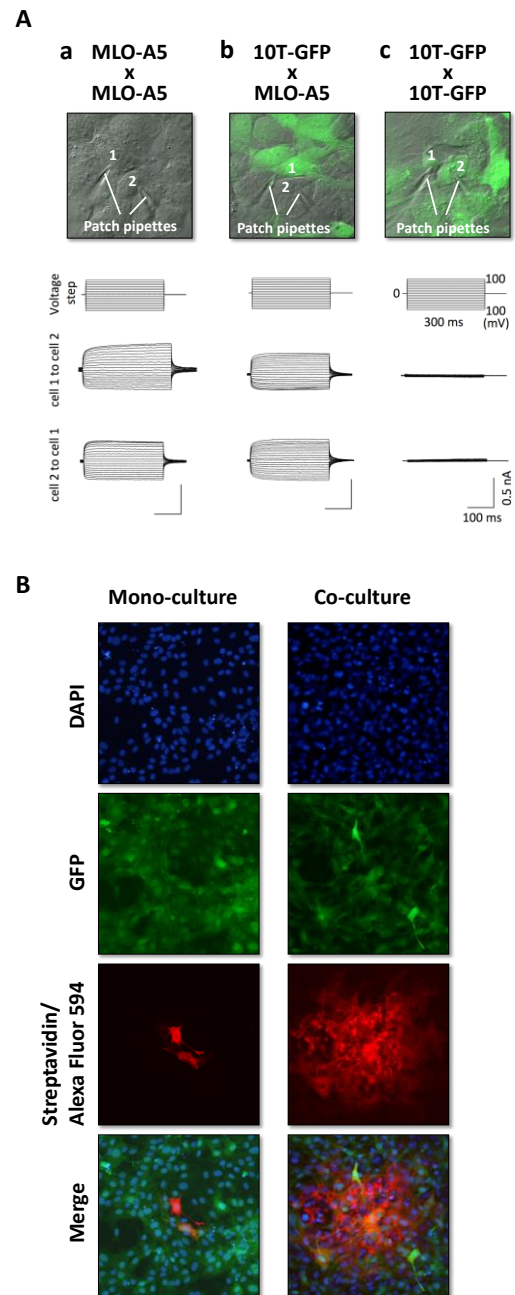


Fig. 2. Gap junctions between 10T-GFP and MLO-A5.

(A) Patch clamp assays showing the passage of electrical current between pairs of MLO-A5 and MLO-A5 cells (a), 10T-GFP and MLO-A5 cells (b), and 10T-GFP and 10T-GFP cells (c) that were cultured for 24 h prior to analysis. The cells with the attached patch pipettes are numbered. (B) Fluorescence microscopy images of biocytin-injected 10T-GFP and MLO-A5 cells. 10T-GFP cells were mono-cultured or co-cultured with MLO-A5 cells 24 h and then biocytin was injected into a pair of adjacent 10T-GFP and MLO-A5 cells, or a pair of adjacent mono-cultured 10T-GFP cells. The cells were cultured for another 6 h, fixed, and then stained with DAPI to detect the nuclei (blue). Biocytin transfer between neighboring cells was detected using Alexa Fluor 594-conjugated streptavidin (red).

次に、共培養による ALP および BSP の発現誘導が、gap junction を介したシグナル伝達

によるものかどうかを検討するために、gap junction 形成阻害剤である Carbenoxolone (CBX)あるいは INI-0602 を培養液中に添加し、10T-GFP を MLO-A5 と共培養し、ALP および BSP の発現量を解析した。その結果、これらの遺伝子の共培養による発現誘導が抑制された (Fig. 3)。一方、Runx2 や Osterix などの骨芽細胞転写因子の発現量に変化は見られなかった (data not shown)。以上の結果から、MLO-A5 は、gap junction を介したシグナル伝達によって、10T-GFP の ALP および BSP の発現を強力に誘導することが示された。

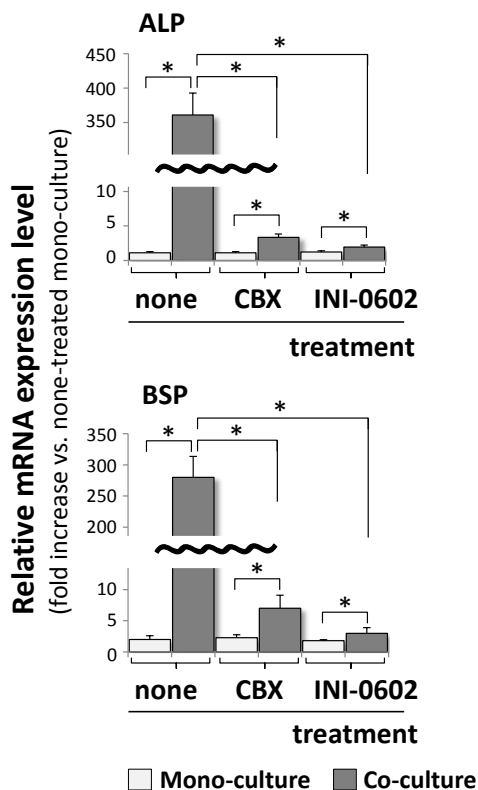


Fig. 3. Effect of gap junction inhibitors on ALP and BSP mRNA expression in co-cultured 10T-GFP cells. Real-time RT-PCR analyses of the expression levels of the ALP and BSP mRNAs in 10T-GFP cells that were incubated in the presence or absence of CBX (100 μ M) or INI-0602 (100 μ M) for 1 h and mono-cultured or co-cultured with MLO-A5 cells for 12 h. The expression level of each mRNA was normalized to that in the non-treated mono-cultured cells and the data are represented as the mean \pm SD of $n = 3$ replicates. * $P < 0.05$.

(3) エピジェネティックイベント解析

ゲノム DNA のメチル化やヒストンのアセチル化などによるクロマチンリモデリング (エピジェネティックイベント) は、細胞の分化や遺伝子発現に密接に関与する。そこで、共培養した細胞と単独培養した細胞について、これを検討した。South-Western Dot-blot 法による解析から、共培養した 10T-GFP では、単独で培養した 10T-GFP と比較して、ゲノム全体のメチル化レベルが低下していた (Fig

4A)。しかし、Bisulfite Sequencing 法による解析では、ALP および BSP のプロモーター領域におけるゲノム DNA のメチル化レベルに顕著な差は認められなかった (Fig. 4B)。

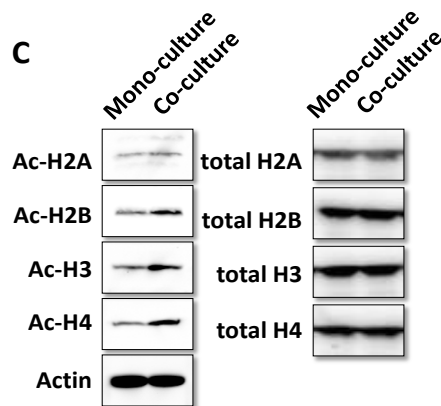
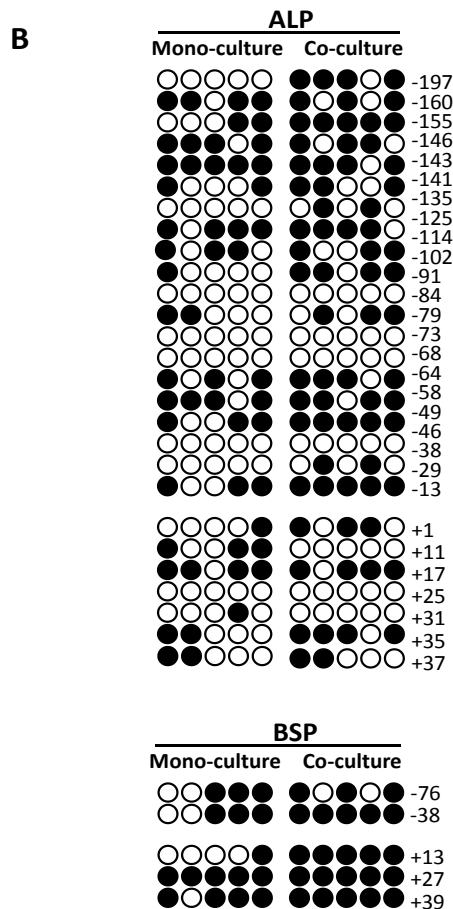
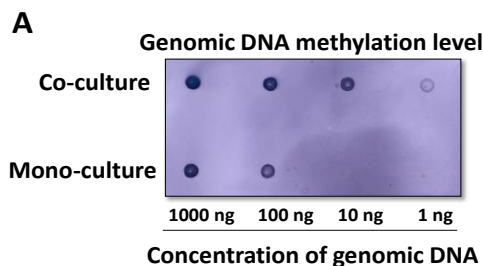


Fig. 4. Chromatin remodeling in co-cultured

10T-GFP cells.

(A) Southwestern dot blot analyses of 10T-GFP cells that were mono-cultured or co-cultured with MLO-A5 cells for 24 h. Genomic DNA was extracted from the 10T-GFP cells and subjected to Southwestern dot blot analysis with a primary antibody against methylcytosine residues. (B) Bisulfite sequencing analyses of the ALP and BSP genes in 10T-GFP cells that were mono-cultured or co-cultured with MLO-A5 cells for 24 h. Genomic DNA was extracted from 10T-GFP cells and examined at positions -197 to +37 and -176 to +39 of the 5' promoter region of the ALP and BSP gene, respectively (relative to the transcription initiation site). Methylated and unmethylated CpG sites are shown as filled and open circles, respectively. The sequences of five bacterial clones per genomic region examined are shown. (C) Immunoblot analyses of the levels of histone acetylation in 10T-GFP cells that were mono-cultured or co-cultured with MLO-A5 cells for 24 h. Immunoblotting was performed using primary antibodies against acetylated and total core histones (H2A, H2B, H3, and H4). The expression levels of actin was used as an internal standard.

また、Western blot 法による解析から、クロマチン構成タンパク質であるコアヒストン H2B、H3、および H4 のアセチル化レベルが共培養した 10T-GFP で亢進していた (Fig. 4C)。一般に、遺伝子の転写においては、ゲノム DNA のメチル化は転写因子のゲノム DNA への結合を阻害することから、「負」に働き、コアヒストンのアセチル化は、クロマチンの凝縮を緩め、転写因子のゲノム DNA への結合を促進することから、「正」に働く。本研究の結果から、共培養による ALP および BSP の発現誘導では、そのプロモーター領域の脱メチル化よりも、コアヒストンのアセチル化が重要な役割を果たすことが示唆された。

(4) マイクロアレイ解析

マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析の結果、最も発現量が増加した上位 5 遺伝子は、発現量増加の大きかったものから順に、Tenascin N, Heat shock protein 1, Ribosomal protein L39-like, ALP, および BSP であった。そこで、共培養による遺伝子発現誘導に重要な役割を担う転写因子の同定を目的に、これらの因子のプロモーター配列の解析を行った。その結果、いずれのプロモーター領域にも、3 種類の転写因子結合配列が共通して存在していた (Table 1)。

Table 1. Conserved transcription factor (TF) binding sequence in the promoter region of the top 5 up-regulated genes in co-cultured 10T-GFP

Transcription factor	Conserved binding sequence
Caudal type homeobox A (CdxA)	TTTAATA
GATA binding protein 1 (GATA1)	GGAGATGGGT
Sex determining region Y (SRY)	AAACACA

次に、これらの共通配列を欠損させた

ALP プロモーター配列をルシフェラーゼ遺伝子にフュージョンさせたレポータープラスミドを作成し、共培養に対する応答を解析した。解析の結果、転写因子 SRY の結合配列には、共培養に対する応答性が認められた (Table 1, Fig. 5)。したがって、この配列に結合する因子が共培養による ALP および BSP の発現誘導に重要な役割を果たしていると考えられる。

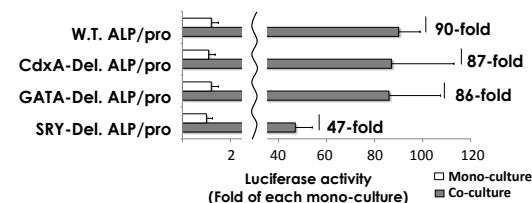


Fig. 5. Effect of co-culture with MLO-A5 on the conserved TF-binding sequence activity in 10T-GFP.

Basal luciferase activity of the wild-type murine ALP promoter construct (W.T.ALP/pro) and of the indicated truncated promoter constructs was determined in 10T-GFP. 10T-GFP stably transfected with each construct were cultured with or without MLO-A5 for 24 h and then their luciferase activities were determined. Mean \pm S.D. (n = 3, P < 0.05)

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 Mikami Y, Tsuda H, Akiyama Y, Honda M, Shimizu N, Suzuki N, Komiyama K. Alkaline phosphatase determines polyphosphate-induced mineralization in a cell-type independent manner. J Bone Miner Metab, 2015, In press. 査読有
DOI:10.1007/s00774-015-0719-6.
- ② Nishikawa Y, Akiyama Y, Yamamoto K, Kobayashi M, Watanabe E, Watanabe N, Shimizu N, Mikami Y, Komiyama K. Osteocytes up-regulate the terminal differentiation of pre-osteoblasts via gap junctions. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 456:1-6. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.10.128.
- ③ Mikami Y, Yamamoto K, Akiyama Y, Kobayashi M, Watanabe E, Watanabe N, Asano M, Shimizu N, Komiyama K. Osteogenic gene transcription is regulated via gap junction-mediated cell-cell communication. Stem Cells Dev, 2015, 24:214-27. 査読有
DOI: 10.1089/scd.2014.0060.

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 秋山祐子, 三上剛和, 田村瑛子, 鶴町仁奈, 清水典佳. 骨芽細胞は gap junction を介して脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化を抑制する. 第 74 回日本矯正歯科学会大会. 2015 年 11 月 18 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ (福岡県・福岡市)
- ② 三上剛和, 秋山祐子, 山本清文, 小林真之, 渡辺恵理, 渡辺信和, 清水典佳, 福島敦史. 骨芽細胞による間葉系幹細胞の遺伝子発現制御機構の検討. 第 1 回日本骨免疫学会. 2015 年 6 月 30 日, ホテルブリーズベイマリーナ (沖縄県・宮古島市)

〔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

秋山 祐子 (AKIYAMA, Yuko)
日本大学・歯学部・ポスト・ドクトラル・フェロー
研究者番号：90735622

(2) 研究協力者

清水典佳 (SHIMIZU, Noriyoshi)

本田雅規 (HONDA, Masaki)

渡辺信和 (WATANABE, Nobukazu)

三上剛和 (MIKAMI, Yoshikazu)