

論 文 要 旨

CCAAT/Enhancer-binding Protein β Promotes Osteoblast Differentiation by Enhancing Runx2 Activity with ATF4
(C/EBP β は ATF4 と協調して Runx2 の活性を増強させることで骨芽細胞分化を促進する)

富 永 博 之

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

CCAAT/Enhancer-binding protein β (以下 C/EBP β)はロイシンジッパー構造を有し C/EBP family に属する転写因子である。ノックアウト(KO)マウスの解析からマクロファージにおける細胞内寄生菌の感染の排除に必須の役割を果たしている事や、脂肪細胞分化に不可欠な因子である事も今までに報告されている。また C/EBP β は in vitro で骨芽細胞、象牙芽細胞の特異的マーカーであるオステオカルシン (以下 OC) の発現と骨芽細胞分化を促進する事がすでに報告されている。しかしながら C/EBP β の in vivo での骨形成における生理学的な役割や分子メカニズムは解明されていない。そこで我々は、C/EBP β KO マウスの骨表現型を詳細に解析し報告した。

【材料および方法】

C/EBP β KO マウスを用いて骨格標本作製、in situ hybridization (以下 ISH)、骨芽細胞培養を行い骨表現型を検討した。また免疫沈降実験、PCR、ルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降法を用いて C/EBP β が骨芽細胞分化においてどのような働きがあるのかその分子メカニズムについて検討した。

【結 果】

まず胎仔の骨原基での C/EBP β の発現を確認したところ、成熟した肥大軟骨細胞と骨芽細胞で発現していた。骨格標本において KO マウスでは野生型と比べて内軟骨性骨化を呈する四肢の石灰化が有意に遅延しており、軟骨成熟遅延が疑われた。軟骨細胞分化マーカーの ISH を行ったところ、肥大軟骨細胞マーカーである X 型コラーゲン(Col10a1)とマトリックスメタロペプチダーゼ 13(Mmp13)の発現が KO マウスで減少していた。骨芽細胞マーカーを検証すると、KO マウスではオステオポンチン(Opn)や骨シアロプロテイン(Bsp)の発現が減弱していて、骨芽細胞分化成熟が野生型より遅延しており、その中でも成熟骨芽細胞のマーカーである OC の発現が著明に減弱していた。新生マウスでは、骨量が減少しており骨細胞マーカーである Mepe や Phex の発現も減弱していた。このことから C/EBP β KO マウスでは成熟骨芽細胞から骨細胞への分化が特に遅延しているのでは

ないかと考えられ、OC発現制御に着目してC/EBP β が関わる分子メカニズムを検証した。OCプロモーター領域にはOSE1とOSE2の二つの重要な転写因子結合エレメントがあり、それぞれATF4とRunx2が結合する。Runx2は骨形成に必要不可欠な因子であり、ATF4は骨芽細胞の成熟に重要である。Runx2とATF4はOCのプロモーター上で協調的に働きOCプロモーター活性を上昇させることが既に報告されているが、両者の直接結合はないとされている。C/EBP β とRunx2の結合、C/EBP β とATF4の結合は既に報告されていたので、我々はC/EBP β が2者の間を橋渡ししてOCプロモーターを活性化させるのではないかと仮説を立てて検討したところ、1)骨芽細胞においてATF4とC/EBP β がヘテロダイマーを形成しRunx2と複合体を形成することで、OCプロモーターの活性を協調的に上げる事、2)C/EBP β はこの時ATF4のRunx2との複合体形成と協調効果に必要で、ATF4の機能をサポートする重要な役割がある事が分かった。

【結論及び考察】

今回我々はC/EBP β KOマウスで軟骨細胞肥大化と骨芽細胞分化の遅延が起こる事を初めて報告した。そのメカニズムの一つとして骨芽細胞においてATF4とC/EBP β がヘテロダイマーを形成しRunx2と複合体を形成することで、OCプロモーターの活性を協調的に上げることがわかった。またこの時ATF4のRunx2との複合体形成と協調効果に必要で、ATF4の機能をサポートする重要な役割がある事も分かった。骨芽細胞分化成熟過程でC/EBP β はRunx2とATF4の重要な共役因子である。しかしながら軟骨肥大化へのC/EBP β の影響については検討しきれず、更なる検討が必要である。

(Molecular Biology of the Cell Vol. 19, 2008年 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 80 号	学位申請者	富永 博之
審査委員	主査	岸田 昭世	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	丸山 征郎	副査 宮田 篤郎
	副査	桑木 共之	副査 橋口 照人

CCAAT/Enhancer-binding Protein β Promotes Osteoblast Differentiation by Enhancing Runx2 Activity with ATF4

(C/EBP β は ATF4 と協調して Runx2 の活性を増強させることで骨芽細胞分化を促進する)

富永 博之

Runx2 は骨芽細胞の分化を開始させる master regulator であり、骨形成において中心的役割の転写因子だが、その骨芽細胞分化の成熟期における役割には不明な点が多い。Runx2 は、分化の最終段階のマーカー osteocalcin(OC) 遺伝子のプロモーター上の OSE2 site に直接結合して、プロモーター活性を上昇させる事が報告されているが、Runx2 と OC の発現時期には数日から数週間の開きがある。この事は骨芽細胞の成熟に Runx2 以外の他の転写因子の関与を示唆している。

近年、OC プロモーター上で OSE2 site と同様に重要な OSE1 site に転写因子 ATF4 が結合し、ATF4 のノックアウト (KO) マウスでは骨芽細胞の分化が遅延し OC の発現が減弱する事が報告された。

しかし、OSE1 site 上での ATF4 による転写制御機構には不明な点があり、我々は2つの仮説を立てた。

1)ATF4 が結合するとされる OSE1 site は、ATF4 の consensus 配列と比べると mismatch があるので、ATF4 は他の蛋白質を介して、OSE1 site に結合するのではないか？

2)Runx2 と ATF4 は複合体を形成すると言われているが、直接結合しないので両者の仲介因子があるのではないか？

そこで我々は、CCAAT/Enhancer-binding protein (C/EBP β)に着目した。C/EBP β はロイシンジッパー (LZ)構造を持つ転写因子である。C/EBP β KO マウスの解析から C/EBP β はマクロファージでの細胞内寄生菌の感染排除に必須である事や、脂肪細胞の分化に不可欠である事、炎症サイトカインと関連する事が知られている。これまでに、C/EBP β は Runx2 と結合して協調的に OC promoter 活性を上げる事と、ATF4 とヘテロダイマーを形成する事が報告されていたが、これらの転写因子が三者複合体を作るか否かや、複合体形成により OC の遺伝子発現が変化するか否かは不明であった。

本論文では、培養細胞を用いて免疫沈降やルシフェラーゼアッセイ、リアルタイム PCR、ゲルシフトアッセイ、クロマチン IP、DNA アフィニティ沈降を行い、C/EBP β による OC 転写調節機構について解析し、以下の知見を得た。

1) C/EBP β は ATF4 が OC プロモーター OSE1 site に結合するのを促進する。

2) C/EBP β と ATF4、Runx2 の三者複合体形成が OC プロモーター上での相乗的なプロモーター活性化を促進する。

したがって、C/EBP β が ATF4 と Runx2 と複合体を形成し、骨芽細胞の成熟を促進する可能性が示されたが、*in vivo* において C/EBP β が骨形成の過程で果たす役割は明らかになっていなかった。

そこで我々は、C/EBP β の KO マウスの骨形成に関連する表現型を解析した。KO マウスでは内軟骨性骨化と膜性骨化が遅延し、OC やオステオポンチン(Opn)などの成熟期の骨芽細胞分化マーカーの発現が減弱し、骨芽細胞の成熟が遅延していた。さらに、KO マウスでは骨細胞の分化の遅延や、生後の骨量の減少、軟骨成熟の遅延が認められ、C/EBP β が骨芽細胞分化、軟骨細胞分化に必要であることが明らかとなった。

本研究により、C/EBP β が炎症や脂肪細胞、造血細胞の分化のみならず、骨芽細胞の分化にも関与していることが *in vivo* で初めて示された。

よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 80 号	学位申請者	富永 博之
審査委員	主査	岸田 昭世	学位 博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	丸山 征郎	副査 宮田 篤郎
	副査	桑木 共之	副査 橋口 照人

主査および副査の5名は、平成21年10月26日、学位申請者 富永 博之 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) Runx2 と ATF4 の複合体形成が C/EBP β の存在下で劇的に増強する事を強制発現系の免疫沈降実験で示したが、生理的な骨芽細胞での内因性の三者複合体を確認できたか。

(回答) まず ATF4 と C/EBP β は共にターンオーバーが早く、骨芽細胞における蛋白検出にはプロテアソーム阻害剤を要する。その条件の核抽出液を用いた2段階の免疫沈降実験を施行したが、二者の結合を出すのが限界で三者の結合を示す事はできなかった。しかしながら強制発現の系で示した Runx2 と ATF4 の結合は、C/EBP β の LZ deletion mutant ではみられなかったことから、Runx2 と ATF4 の結合における C/EBP β の橋渡し機能は LZ domain 特異的であると考えられる。

質問2) C/EBP β の KO でも骨が短いながらも形成されるのはなぜか。Runx2 や ATF4 は OC だけに関与しているのか。他のマーカーには関与しないのか。

(回答) *In vivo* の骨芽細胞分化マーカー発現解析から、C/EBP β は未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞への commitment の段階ではなく骨芽細胞の成熟段階で作用しているようだった。C/EBP β がなくても Runx2 と ATF4 のみである程度の OC プロモーター活性が残存している事、また C/EBP β 等のファミリー分子の redundancy も十分に予想される事から、C/EBP β がなくても骨は形成されると考える。Runx2 KO マウスでは骨ができないので骨芽細胞分化マーカーはすべて発現しない。また ATF4 は I 型コラーゲンの遺伝子発現には関与しない様だが、蛋白合成レベルに関与している。

質問3) 内軟骨性骨化を観察するステージとしてどの時期が適当なのか。

(回答) 骨芽細胞分化は胎生 14.5 日から開始し骨化が進んでいく。OC 発現と石灰化をみるステージとしては胎生 16.5 日からの時期が適切であると考えられる。

質問4) 論文での成熟と分化の言葉の使い分けはどのようにしたのか。

(回答) "分化"は多分化能を持つ未分化間葉系細胞から前骨芽細胞、成熟骨芽細胞、骨細胞に分化していく段階を、"成熟"は骨芽細胞分化中~後期の過程という意味で使い分けている。

質問5) *In vitro* の骨芽細胞分化実験で WT と KO の細胞増殖に差がみられないと論文で記しているが、他の増殖マーカーはみたのか。BrdU assay は注射後どのくらいの時間を置いたものか。

(回答) 軟骨細胞で BrdU assay を行い WT と KO 両者に差はみられなかった。BrdU は産仔をとりだす2時間前に母親マウスの腹腔内に投与した。

質問6) 成熟マーカーとして OC や Mepe, Phex を使い分けている理由はなにか。

(回答) OC は骨芽細胞の成熟マーカーで Mepe, Phex は骨細胞のマーカーである。

質問7) C/EBP β KO マウスでは、長管骨のみに影響がみられるのか、あるいは頭蓋骨にも影響があるのか。

また成獣での骨格の野生型との差異はどのようなものであったのか。

(回答) 胎生期、新生マウスで長管骨、頭蓋骨ともに影響がみられ内軟骨性骨化、膜性骨化いずれも KO マウスで遅延している。C/EBP β KO マウスは離乳前に死亡する為、生後数ヶ月経過してからの骨表現型をみる事ができなかった。

最終試験の結果の要旨

質問 8) 破骨細胞において全く影響はみられなかったのか。

(回答) 我々のデータでは破骨細胞の発現は検証していない。しかし近年 C/EBP β の isoform である LAP と LIP の発現比が破骨細胞分化に関与していると報告された。

質問 9) 骨芽細胞分化で重要なアルカリホスファターゼ遺伝子の発現を検討しているかどうか。

(回答) 骨芽細胞の *in vitro* での培養実験で KO マウスの ALP の発現は有意に減少している。

質問 10) Fig.1,2 で C/EBP β +/-マウスの骨の表現型はどうだったのか。特にヘテロ型で加齢が進んだ場合アミノ酸の摂取、あるいは運動させなかった場合に骨の異常は観察されないか。

(回答)) +/-と +/-マウスからの骨芽細胞を用いた分化実験で、*in vitro* での石灰化をみたところ明らかな差はみられなかった。これに伴う骨芽細胞の分化マーカーの発現にも明らかな差はなかった。 +/-マウスを飼育してアミノ酸を含む餌とそうでない餌を与えて骨の表現型を確認すれば判明するものと思われる。

質問 11) OSE1 での C/EBP β と ATF4, Runx2 の複合体形成は何によって制御されているか。また複合体はプロテアソームで分解されているのか。もしそうだとするとプロテアソーム阻害剤 Bortezomib が多発性骨髄腫に効果を示すことの一端を説明しうるのではないか。

(回答) 複合体形成を制御するファクターは不明である。Runx2 は Smurf1 によりユビキチン化をうけており、Bortezomib が多発性骨髄腫に効果を示している理由の一つと考える。三者の複合体がプロテアソームで分解されているかどうかは不明だが、Runx2、ATF4、C/EBP β の 3 者を発現させユビキチン化されるか否かを判定することは可能と思われる。

質問 12) ATF4 は RSK2 によりリン酸化され骨芽細胞内へのアミノ酸の取り込みを促進して、コラーゲンなどの合成が促進されることが言われているが、C/EBP β と結合した ATF4 にはこのような作用はないか。あるいは細胞質で C/EBP β が ATF4 と結合することで、フリーの ATF4 が減少して逆にアミノ酸の取り込みが抑制されることはないか。

(回答) ATF4 KO マウスで I 型コラーゲン蛋白質の発現に差がありそれはアミノ酸合成障害によるものだと報告されている。もし上記仮説が成り立つならば C/EBP β KO マウスではフリーの ATF4 が増加してアミノ酸の取り込みが促進し I 型コラーゲン蛋白質の発現が上昇するはずである。C/EBP β KO マウスでは I 型コラーゲンの mRNA 発現に差は見られなかったが、タンパク発現は検証していないので、I 型コラーゲンの免疫染色を行うか、van Gieson 染色を行うと判明すると思われる。

質問 13) C/EBP β KO マウスが離乳までに死亡してしまう原因はなにか。

(回答) C/EBP β は造血幹細胞分化や糖新生に関与しており、そのためその KO マウスでは感染や低血糖により死亡してしまうのではないかと考えられているが、はっきりとした死因は不明である。

質問 14) Runx2, ATF4, C/EBP β が原因遺伝子である病気はあるのか。

(回答) Runx2 の変異は常染色体優性遺伝形式をとり、鎖骨の欠損、低形成や縫合解離を伴う四角い頭蓋骨、歯の欠損を特徴とする鎖骨頭蓋異型性症を起こす。これまでに ATF4 を原因遺伝子とするヒトの疾患は報告されて無いが、X 連鎖劣性遺伝を示し低身長や細い手指、骨格の異常をきたす Coffin-Lowry 症候群は ATF4 を基質とする RSK2 の変異が原因とされる。

質問 15) 結合実験などで MG132 を使用している理由はなにか。

(回答) Runx2 や ATF4 はユビキチン・プロテアソーム系の分解を受けて蛋白質量が少ない転写因子なのでプロテアソーム阻害剤 MG132 を使用しないと通常感度の Western blot での検出が困難であったからである。

質問 16) Fig. 7 の Western blot で overexpression の ATF4 のバンドが 2 本なのはなぜか。

(回答) 上のバンドは(RSK2 による)リン酸化による shift band と思われる。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。