Osaka University Knowledge Archive

Title	骨格系細胞における転写因子Krüppel-Like Factor 4の作用解析
Author(s)	藤川, 順司
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52348
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（藤川　順司）	
論文題名	「骨格系細胞における転写因子Krüppel-Like Factor 4の作用解析」

【緒言】

正常な骨格の発生・維持には骨芽細胞，破骨細胞，骨細胞，軟骨細胞，血管内皮細胞をはじめとした種々の細胞間での絶妙な相互作用が必須である．近年では筋肉，神経，腸管などが骨形成・骨吸収に関与する知見も報告され，骨格系細胞が想像以上に他の器官系の作用を受けることがわかってきた．一旦形作られた骨は動的な平衡を保つが，骨形成と骨吸収のバランスが崩れると骨硬化症や骨粗鬆症などの病態が発症する．また，骨端部の関節軟骨においてもゆっくりではあるが，軟骨基質の分解・新生が繰り返されている．しかし，変形性関節症やリウマチ性関節炎ではこの動的平衡が崩れ，軟骨破壊が進行し，ほぼ摩擦のない滑らかな関節運動を行うことが困難になる．正常骨格発生，恒常性維持には多くの要素が含まれ，いまだに分子メカニズムは不明な点が多い．以前我々は，骨芽細胞におけるKrüppel-Like Factor 4（KLF4）が骨芽細胞分化を抑制することを報告した．KLF4はzinc fingerモチーフを持つ転写因子であり，骨芽細胞に発現する細胞外基質（ECM）の発現を抑制する．このことは，KLF4が初期段階の骨芽細胞を未分化な状態に保つ役割のみならず，骨芽細胞の様々な分化ステージでECM産生のブレーキ役として働く重要な因子である可能性を示している．今回KLF4が関与する骨格系における分子メカニズム解明の次なる一歩として，骨芽細胞，軟骨細胞における KLF4の発現や，そのECM産生への関与の解析を行い，KLF4が及ぼす破骨細胞分化・成熟への影響ならびに軟骨細胞における作用を調べた．

【方法と結果】

① <u>骨芽細胞におけるKLF4は破骨細胞成熟を抑制する</u>

骨芽細胞特異的にKlf4を発現するトランスジェニックマウス（TG）マウスを用い解析した．胎生14.5～18.5日齢の野生型およびTGマウス頭部組織に対し，HE染色，TRAP染色，von Kossa染色，van Gieson染色を通法に従い行った．その結果，TGマウスの下顎骨は異常な石灰化像を示し，石灰化部位からやや離れた類骨周囲に小型の単核TRAP陽性細胞が観察された．初代骨芽細胞とマウス骨髄由来マクロファージとの共培養系において，KLF4を過剰発現させた骨芽細胞ではコントロールに比べ多核のTRAP陽性細胞形成能が有意に低下した．

② <u>骨芽細胞におけるKLF4は骨の細胞外基質発現を抑制する．Runx2はこの抑制を解除し，破骨細胞成熟の抑制から回復させる</u>

KLF4を過剰発現させた骨芽細胞におけるECMの発現をリアルタイムPCR法で検索すると，既に報告しているECMに加えて*Spp-1*，*Tenascin-C*，*Fibronectin 1*，*Ibsp*などで有意な発現抑制が見られた．さらに，野生型およびTGマウス切片においてin situ hybridizationを行ったところ，培養細胞における結果と同様にTGマウスでは野生型に比べ各ECMの発現抑制が確認できた．前述したように初代骨芽細胞にKLF4を過剰発現すると骨芽細胞分化は抑制されるが，Runx2との共発現ではこの抑制からの完全な回復が見られ，Sp7との共発現ではほとんど回復は見られなかった．また，Runx2との共発現では KLF4によるECMの発現抑制からの有意な回復も見られた．さらに，KLF4とRunx2を共発現させた骨芽細胞を使用し骨髄細胞と共培養を行うと，KLF4の単独発現で観察された多核のTRAP陽性細胞数の低下からの有意な回復が見られた．

③ <u>KLF4は関節軟骨に発現し，軟骨細胞におけるECM発現に影響を与える</u>

生後0日，2か月，6か月野生型マウス膝関節におけるKlf4の局在を免疫染色法により検索した．いずれの時期においても関節軟骨表層に発現を認めたが，月齢がすすむにつれKlf4の発現を認める範囲が限定された．KLF4を過剰発現させた軟骨細胞におけるECMの発現を調べると，関節軟骨全体で基質の大部

分を占めるⅡ型コラーゲン，アグリカンでは発現が低下し，関節表層に発現の多い基質ではⅨ型コラーゲンは発現が低下したが，デコリンや*Prg4*の発現は上昇した．特に*Prg4*はコントロールと比べ100倍以上発現が上昇した．また、KLF4を過剰発現させた軟骨細胞ではアルシアンブルー染色によりプロテオグリカン蓄積の低下が認められたが，この抑制はMmp阻害剤を培養液に添加することで部分的に回復した．このことから，KLF4によるプロテオグリカン蓄積量低下にプロテアーゼが関与していることが示唆された．

④ KLF4は軟骨破壊の病態に関与し，軟骨細胞でのプロテアーゼの発現を制御する

病的な軟骨破壊が見られるリウマチ性関節炎発症モデルマウス指関節では，パンヌスによる軟骨破壊部近傍の軟骨細胞にKlf4の強い発現を認めた．これらの結果は，KLF4がコラーゲンやプロテオグリカンなどの軟骨基質を分解するプロテアーゼの産生を促進している可能性を示唆している．実際にKLF4を過剰発現させた軟骨細胞において*Mmp3, 10, 13, ADAMTS5* など多くのプロテアーゼで発現上昇が見られた．KLF4により発現誘導が見られなかったMmp2もその活性をKLF4が促進することをgelatin zymographyにより確認できた．

【考察】

骨芽細胞でKLF4を過剰発現させるとin vivo，in vitro 両方で多核の破骨細胞形成の抑制が見られた．また，①骨芽細胞特異的にKlf4を発現するTGマウスで小型のTRAP陽性細胞が類骨上でとどまること，②KLF4が多くのECMの発現を抑制すること，③KLF4発現下の骨芽細胞であってもRunx2によるECM発現回復により多核の破骨細胞誘導能が回復することなどから，骨芽細胞におけるKLF4は類骨を構成するECMをはじめとした前駆破骨細胞を取り巻く環境に大いに作用することが分かった．また，KLF4とRunx2の関連ではKLF4はRunx2の転写活性に作用することが示唆された．軟骨細胞においても，KLF4はECMの発現を制御しており，加えて各種プロテアーゼの発現を制御した．さらに，関節軟骨破壊を示す病的なリウマチ性関節炎モデルマウスで深層の関節軟骨細胞がKLF4を強く発現していたことから，軟骨細胞におけるKLF4はプロテアーゼの発現を上昇させ，軟骨基質分解をおこし病的な軟骨破壊に関与していることが示唆された．

【結論】

KLF4は細胞外基質の発現や分解等様々な段階に作用することで、骨格系での生理的状態の維持・病的状態の進行に関与することが示唆された．

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　藤川　順司　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　大阪大学　教授	脇坂　聡
	副 査　大阪大学　教授	川端　重忠
	副 査　大阪大学　講師	村上　智彦
	副 査　大阪大学　講師	岩井　聡一

論文審査の結果の要旨

本研究では骨芽細胞および軟骨細胞における転写因子 Krüppel-Like Factor 4（KLF4）の作用を調べた。その結果、骨芽細胞における KLF4 は細胞外基質（ECM）発現制御を通じて間接的に破骨細胞成熟を抑制し、軟骨細胞における KLF4 は ECMの発現制御やプロテアーゼの発現・活性制御を通じて病的な軟骨破壊に関与する可能性が明らかになった。このことは、KLF4 の正常骨格発生，恒常性維持への関与を理解する上で重要な知見を得るものであり、博士（歯学）の学位として価値のあるものと認める。