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

骨格系細胞における転写因子 Krüppel-Like Factor 4 の作用解析

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻　療護歯科保健学講座

（障害者歯科治療部）

藤川 順司

緒言

骨芽細胞は軟骨細胞や脂肪細胞，筋細胞，腱細胞などの多様な細胞に分化する能力を有する未分化間葉系細胞から生じる．一度骨芽細胞への分化が運命づけられると，I 型コラーゲンが 90%以上を占める豊富な細胞外基質（Extracellular Matrix：ECM）の分泌が始まる．この ECM は類骨の基本構造としての役割を持ち，ビトロネクチンやフィブロネクチンなどの非コラーゲン性タンパクと協調し将来の骨の外形を作っていく（Qin et al., 2004）．類骨は規則正しく配列した網状のコラーゲン線維の間に散在するヒドロキシアパタイト結晶の成長を通じて徐々に石灰化する．骨の細胞外基質は破骨細胞のような移動能をもつ多くの細胞に対して接着部位を提供すると同時に遊走のための足場となる．また，これら細胞と ECM の相互作用はインテグリンを介した細胞内シグナリングと細胞骨格のリモデリングを制御する（Alexander et al., 2008）．一度破骨細胞前駆体が骨表面に接着すると，細胞融合により多核破骨細胞に成熟し，sealing zone と呼ばれる接着構造が発達する（Miyamoto et al., 2000）．ECM により作られた環境下におけるこれらの連続的な過程は，正常な骨リモデリングにおける適切な破骨細胞の吸収能獲得にとって重要である（Lee et al., 2006，Yagi et al., 2005）．骨モデリング・リモデリングの際，破骨細胞は骨形成を行う骨芽細胞と呼応しながら骨量と形を制御し，この相互の連関は「カップリング」と呼ばれている（Bucay et al., 1998，Dougall et al., 1999，Negishi-Koga et al., 2011，　Zhao et.al., 2006）．

軟骨細胞は骨芽細胞と同様に豊富に ECM を分泌し，一般的に軟骨の乾燥重量において ECM は約 90%を占めるという報告もある（Knudson et al., 2001）．内軟骨骨化の過程で軟骨細胞は主役を演じ，骨芽細胞と同様に未分化な間葉系細胞から SRY ファミリーに分類される Sox5/6/9 の作用により軟骨細胞に分化する（Lefebvre et al., 1998）．軟骨は基質に存在する線維により硝子軟骨，弾性軟骨，

線維軟骨に分類され，関節軟骨や骨端軟骨は硝子軟骨に分類される．一般的に軟骨は間質成長と付加成長により成長するが，関節軟骨や骨端軟骨は間質成長により成長する．間質成長とは軟骨細胞の分裂や軟骨細胞が分泌する基質により軟骨細胞が互いに押しのけられることで成長する様式である．関節軟骨と骨端軟骨は同じ硝子軟骨であり，成長様式も同じだが，関節軟骨は軟骨のまま留まる永久軟骨であるのに対し，骨端軟骨は成長期終了まで内軟骨骨化がおこる暫間的な軟骨である．関節軟骨は軟骨基質を豊富に含み，軟骨細胞はあまり認めない．一方で，骨端軟骨は軟骨細胞を比較的多く含む．このことは軟骨の物性に影響し，骨端軟骨に比べ関節軟骨は固く，透過性が悪い．熱伝導性も異なるという報告もある（Iwamoto et al., 2013）．永久軟骨である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．

Krüppel-Like Factor 4（KLF4/GKLF）は zinc finger タイプの転写因子で表層外胚葉や腸管内胚葉で顕著に発現が見られる（Shields et al., 1996，Ton-That et al., 1997）．KLF4 は場面によって促進的にも抑制的にも働く因子であり，乳癌において腫瘍抑制因子である p53 の発現を抑制する（Rowland et al.,2005）が，一方で，細胞周期を停止する働きを持つサイクリン依存性キナーゼ阻害因子である p21 を発現誘導することが報告されている（Zhang et al., 2000）．また，Klf4 欠損マウスは周産期致死を示し，Klf4 が正常発生に必須の因子であることが知られている（Segre et al., 1999）．骨格発生期において，Klf4 は未成熟な骨芽細胞に強く発現し, 骨芽細胞の成熟につれこの発現は次第に減弱する（Garrett-Shinha et al., 1996，Ton-That et al., 1997）．以前我々は，全ての骨芽細胞で恒常的に Klf4 を発現するトランスジェニックマウスを作製した（*Col1a1-Klf4* マウス; Michikami et

al., 2012）．この *Col1a1-Klf4* マウスは膜性骨化と軟骨内骨化の異常に起因した骨格発生異常を示した．膜内骨化により生じる頭蓋冠では石灰化不良が，軟骨内骨化により生じる長管骨では石灰化領域の短縮，血管侵入の大幅な遅延が観察された．このことは，胎生後期における一部の骨芽細胞での生理的な Klf4 の発現減弱が正常な骨格発生にとって極めて重要であることを示唆している．

本研究では, 骨格系の正常な発生ならびに恒常性維持に KLF4 が関与する可能性をさらに検討するために KLF4 を発現させた骨芽細胞の影響下での破骨細胞分化の詳細な分析を in vivo，in vitro で行い，さらに軟骨細胞と KLF4 の関連についても検討した．

材料ならびに方法

実験動物

① *Col1a1-Klf4* マウス

大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の審査・承認（承認番号：動歯-21-003-0），　大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会の審査・承認（承認番号：#2715）のもと実験を行った. 我々が以前作成したマウス（Michikami et al., 2012）を用いた．このマウスはマウス I 型コラーゲンの 2.3kb プロモーター配列を利用しており全ての骨芽細胞で恒常的に Klf4 を発現する．1 対 1 交配法を用い，膣栓を認めた日の昼を胎生 0.5 日（E 0.5）とした.

妊娠マウス由来の胎仔の回収は母獣を 4%抱水クロラールを用い安楽死させ，胎生 14.5 日齢から 18.5 日齢の胎仔を摘出した．尾や皮膚を用いて遺伝子型判定を行い，導入遺伝子が認められたマウスを変異型（TG），同腹で導入遺伝子が認められないマウスを野生型（WT）とした．リン酸緩衝生理食塩水（PBS）内で頭部を解剖し, 実体顕微鏡下で後頭部の皮膚を取り除き 4%パラホルムアルデヒド（PFA）溶液を用い 4℃で固定した．メタノールにより脱水，キシレンにより透徹，パラフィン包埋後 7μm 厚の切片を作製した.

② D1CC マウス（関節リウマチモデルマウス）

名古屋市立大学 金澤智先生から生後 16 週の D1CC マウスの正常部位ならびに炎症部位を含む足指関節パラフィン切片の提供をうけた.

③ 生後 0 日，2 か月，6 か月正常マウス

各時期のマウスを 4%抱水クロラールを用いて安楽死させ，PBS 内で実体顕微鏡を用い膝関節を含む脚部を摘出、4%PFA を用い 4℃で固定した．生後 0 日マウスからは 7μm 厚のパラフィン切片を作製した．生後 2 か月，6 か月マウスは脱灰の後，凍結切片を作製した．　固定後 10%EDTA 溶液を使用し 4℃にて 1 週

間脱灰を行った．脱灰液は 3 日に 1 度交換した．脱灰後 20%スクロース溶液に浸漬，OCT compound（サクラ精機，東京）に包埋後 14μm 凍結切片を作製した．

培養細胞

① 骨芽細胞

Michikami らの方法（Michikami et al., 2012）に従い調製した．すなわち，出生後 5 日以内の野生型マウスより頭蓋冠を実体顕微鏡下で採取，1mg/ml コラゲナーゼ（Wako, 大阪），2mg/ml ディスパーゼ（Invitrogen Life Techonologies, Carlsbad, CA，USA）を滅菌 PBS に加え調製したコラゲナーゼ溶液にて 5 回処理し，後半 3 回の処理で得た溶液から細胞を回収した．回収した細胞は 10%ウシ胎仔血清（FBS，Gibco Life Techonologies）および 10mg/ml ペニシリン/ストレプトマイシン（Sigma-Aldrich，St. Louis，MO，USA）添加 10%α-MEM（Invitrogen Life Techonologies）に加え，37℃でインキュベート，サブコンフルエントまで培養後冷凍保存した．

② 軟骨細胞

Gosset（2009）らの方法（Gosset et al., 2008）に従い調製した．出生後 5 日以内の野生型マウスより実体顕微鏡下で採取した膝関節を 3mg/ml コラゲナーゼ溶液にて 2 回処理後，10mg/ml ペニシリン/ストレプトマイシン（Sigma-Aldrich）を加えた 0.5mg/ml コラゲナーゼ溶液を使用し 37℃にて一晩インキュベートした．溶液を BD Falcon Cell Strainers （BD Biosciences，San Jose，CA ，USA）にて濾過，バンバンカー（日本ジェネティックス，東京） を加え-80℃にて保存した．

③ 骨髄由来マクロファージ様細胞（BMMs）

Itoh らの方法（Itoh et al., 2009）に従い調製した．出生後 6~8 週の野生型マウスより大腿骨を実体顕微鏡下で採取，シリンジを用いて PBS 中に大腿骨から骨

髄を排出し BMMs を回収，0.165M NH_4Cl にて赤血球を溶解させた.

組織学的観察

① ヘマトキシリンーエオジン（HE）染色

パラフィン切片をキシレンにて脱パラフィン後，マイヤーヘマトキシリン液（武藤，大阪）で 7 分間染色後，15 分間流水にて水洗，エオシン液（Merck, Darmstradt，Germany）で 1 分間染色した．その後エタノールによる脱水，キシレンによる透徹を行い，封入した.

② von Kossa 染色

パラフィン切片を脱パラフィン後，照明下にて 1%硝酸銀水溶液で 1 時間反応させ染色, 数回の水洗後 5%チオ硫酸ナトリウム水溶液により反応を停止させた. その後脱水，透徹を行い封入した.

③ 酒石酸耐性酸性 フォスファターゼ（TRAP）染色

0.5mg ナフトール AS-MS リン酸と 0.25mg Fast red violet LB salt（Sigma-Aldrich）を 50 μl N,N ジメチルアミドで溶解，50mM 酒石酸ナトリウム添加 0.1M 酢酸ナトリウム緩衝液を加え TRAP 反応液とした．脱パラフィンを行ったパラフィン切片をエタノール・アセトン（1:1）で再固定し，TRAP 反応液にて染色後，脱水，透徹を行い封入した.

TRAP 陽性細胞数と大きさの定量には第一臼歯胚ならびに眼原基を同側に含む切片を使用した. 画像は Axioskop Z plus microscope（Carl Zeiss Meditec，東京）に取り付けた AxioCam HRc デジタルカメラ（Carl Zesiss）で撮影し，解析は，Adobe Photoshop software（Adobe Systems，San Jose,CA，USA）を用いた拡大像で行い（解像度　300dpi），TRAP 陽性細胞の大きさは ImageJ software（NIH, Bethesda，MD，　USA）を用いて計測した．それぞれの切片において染色された

細胞の大きさは area tool を用いて計測した. TRAP 陽性細胞数の計測は野生型ならびに変異型マウスともに各胎生期から少なくとも 4 匹の胎仔を用いた. 核を 3 個以上認める細胞を多核細胞とした. TRAP 陽性細胞の大きさの分析は胎生 15.5 日齢の野生型ならびに変異型マウス胎仔を各 2 匹ずつ用いた.

④ van Gieson 染色

van Gieson F 液（1% 酸性フクシン液）（Wako）と van Gieson P 液（ピクリン酸飽和液）（Wako）を 15:100 で混合調和した反応液を作製し，脱パラフィンしたパラフィン切片を 3 分染色，脱水，透徹し封入した.

⑤ in situ hybridization

55℃で 15 分間温めた後に脱パラフィンしたパラフィン切片を 4%PFA 溶液にて 10 分間前固定， PBS にて数回洗浄後，Tris-HCl と EDTA を加え調製した 1 μg/ml プロテアーゼ K（タカラバイオ，滋賀）で 5 分間処理した．その後 PFA 溶液にて再固定，PBS にて数回洗浄後，HCl と無水酢酸を加え調製したトリエタノールアミンにてアセチル化処理を行い，再び PBS にて数回洗浄した．さらに，ホルムアルデヒド，yeast tRNA（Sigma-Aldrich），ヘパリン（Sigma-Aldrich）を含むハイブリダイゼーションバッファーを用い 55℃にてインキュベートした. 次に Table1 に示す各種 cRNA プローブを用いて，70℃にて一晩ハイブリダイゼーションを行った．ハイブリダイゼーション後， 5 倍濃度クエン酸ナトリウム（5×SSC）溶液，0.2×SSC 中で 70℃にてインキュベーション，室温にて 0.2×SSC，マレイン酸緩衝液（MAB）中でそれぞれ 5 分間静置した．次に，10%ヤギ血清（Vector Laboratories，Burlingame，CA，USA），Blocking 試薬（Roche，Basel，Switzerland）を含むブロッキング溶液にて 1 時間処理し，抗 DIG 抗体（Roche）をブロッキング溶液で 1/4000 に希釈し，4℃で一晩反応させた. その後，Tween20（Wako）を加えた MAB にて数回洗浄後，0.1%Tween20 にて洗浄，0.1%Tween20

を加えた BM Purple（Roche）を反応させ，10%中性緩衝ホルマリンにて固定，50%グリセロールで封入した．

⑥ 免疫染色

パラフィン切片は脱パラフィン，凍結切片は 10%中性緩衝ホルマリン液（NBF; Wako）にて 10 分固定後，クエン酸緩衝液を 60℃にて 30 分間，室温にて 30 分間処理した．その後，0.05%Tween20，5%ヤギ血清を含むブロッキング溶液にて 1 時間ブロッキングを行い，1/50 希釈の抗 Klf4 抗体（H-180; Santa Cruz Biotechnology，CA，USA）を 4℃で一晩反応させた．切片を 0.05%Tween20 添加トリス緩衝生理食塩水（TBS-T）で洗浄後， 1/250 希釈の BIOTINYLATED ANTI-RABBIT IgG（H+L）（Vector Laboratories）を室温にて 2 時間反応させ, PBS, TBS-T にて洗浄後，1/250 希釈の horseradish-peroxidase-conjugated streptavidin（Invitrogen Life Techonologies）を 1 時間反応させた．その後，ジアミノベンジジン（DAB; DOJINDO，熊本）にて発色させ，エオジンで対比染色を行った．

培養細胞実験

① レトロウイルス作製と導入

緑色蛍光タンパク（green fluorecent protein：GFP）および KLF4 タンパクを発現するレトロウイルスは pMXs-GFP ならびに pMx-HuKLF4（Addgene, Cambridge, Mass，USA）を使用した．Runx2 および Sp7/Osterix を発現するレトロウイルスの作製は，pcDNA-3xFLAG Runx2 と image clone no.40054399（ATCC, Manassas, Va，USA）を利用して attB-attached full-length cDNAs を作製し，gateway system（Invitrogen Life Technologies）により pMxs-gw vector（Addgene）にサブクローニングを行った．骨芽細胞および軟骨細胞にポリブレン（4μg/ml）を 4 時間作用させ GFP，KLF4，Runx2 および Sp7 をそれぞれ単独，または組み合わせて感

染させた. 48 時間後, 培養上清を 0.45 μm Millex-HA フィルター（Merck Millipore, Billerica，MA，USA）にて濾過し、ウイルス液として利用した.

② short interfering RNA（siRNA）導入による遺伝子ノックアウト

コントロール siRNA ならびに Klf4 に対する siRNA は Santa Cruzu Biotechonology（Dallas，Tex，USA）より購入した．骨芽細胞への siRNA 導入には Lipofectamine RNAiMAX（Invitrogen Life Techonologies）を用いた．siRNA（60pmol）の導入は 24 穴培養プレートを用い，導入の効率は FITC 標識したコンロトール siRNA でまず確認後, 発現変化はリアルタイム PCR により確認した.

③ 骨芽細胞―BMMs 共培養

Jimi らの方法に従い行った（Jimi et al., 1996）．BMMs（1×10^6/well）と GFP もしくは KLF4（1×10^4/well）を導入した頭蓋冠由来骨芽細胞を 48 穴プレートに播種し，10％ウシ胎仔血清（FBS），プロスタグランジン E2（PGE2; 10^{-6}M）を添加した α-MEM にて培養した．培養 7 日目に細胞を固定し TRAP 反応液にて染色を行い，TRAP 陽性多核細胞数を計測した.

④ アリザリンレッド染色

GFP，KLF4，Runx2，Sp7 をそれぞれ単独もしくは共発現させた培養骨芽細胞を 10%NBF にてプレート上に固定後，2 回蒸留水にて洗浄．2%Alizarin Red S（Wako）を 30 分間反応させ，2 回蒸留水にて洗浄，アルコール脱水後乾燥させた.

⑤ アルシアンブルー染色

GFP, KLF4 をそれぞれ発現させた培養 8 日目の培養軟骨細胞を 10%NBF にてプレート上に固定後，PBS にて洗浄，3%酢酸水溶液にて前処理後，3%酢酸水溶液にて調整した 1% Alcian Blue 8Gx（Sigma-Aldrich）を 2 時間反応させ，3%酢酸水溶液ならびに PBS にて数回洗浄，アルコール脱水後乾燥させた.

また Mmp 阻害剤を用いた実験では，Mmp 阻害剤である GM-6001（FOCUS Biomolecules，Plymouth，PA，USA）を dimethyl sulfoxid（DMSO）にて 10mM に調整した．GFP，KLF4 をそれぞれ発現させた培養軟骨細胞にコンフルエント後 0 日，2 日，4 日，6 日に 10μM GM-6001 ならびにコントロールとして DMSO を加えた．コンフルエント 8 日後にアルシアンブルー染色を行った．

⑥ Gelatin zymography

軟骨細胞はコンフルエント 2 日後もしくは 7 日後に無血清培地に交換した．さらに 24 時間培養後, 培養上清を回収し等量の 2-メルカプトエタノール不含 2x サンプルバッファーを加えたのちに使用するまで-80℃にて保存した．1mg/ml ゼラチンを含む 7.5%，10%のポリアクリルアミドゲルを作製し，GFP，KLF4 を感染させた軟骨細胞上清を等量泳動した. 泳動後, SDS 除去のためにリンス後, プロテアーゼの高次構造をゲル内で復元した．ゲル内でゼラチン消化を行った後に Coomassie Brilliant Blue G250（Bio-Rad）にて染色を行った．脱染色後，ゲルを透過光下で撮影した．泳動タンパク量を比較するために同様に泳動し，通法に従いタンパクの銀染色を行った後，透過光下にてゲルを撮影した．

⑦ リアルタイム PCR

計測ならびに解析は Abe らの方法（Abe et al., 2010）に従い行った. Mini Opticon Real-Time PCR System（BIO-RAD Laboratories，Hercules，CA，USA）を使用し，蛍光検出のために iQ SYBER Green Supermix（BIO-RAD）を用い，PCR 反応後は融解曲線分析を行った．また，本研究で使用したプライマーは Table2 に示す．

統計分析

結果は，平均値±標準誤差として示す．統計学的検定には *Student's t* 検定を用いた．有意水準は $P<0.05$ とした．

結果

Col1a1-Klf4 マウスにおいて破骨細胞成熟の異常が観察される

胎生 15.5 日齢の WT マウス胎仔において広範囲に及ぶ下顎の石灰化が認められ（Fig. 1A，B），形成中の下顎骨内ならびにその周囲の組織に多核の TRAP 陽性細胞が位置していた（Fig. 1C，2A）．それに対して胎生 15.5 日齢の TG マウス胎仔の下顎骨の石灰化部位は密に凝集していた（Fig. 1D, E）．また，単核の TRAP 陽性細胞は形成中の下顎骨周囲に配列し，石灰化部位内部ではほぼ認めなかった（Fig. 1F）．胎生 15.5 日齢の TG マウスの下顎骨において TRAP 陽性細胞を計測すると 173.4±39.3 個認められ，WT マウスの 100.3±5.2 個と比較して有意に多かった（Fig. 2A-C）．しかし，それぞれの細胞の面積は TG マウスのほうが狭い傾向がみられ，胎生 15.5 日齢マウス下顎骨における TRAP 陽性細胞の面積分布は，WT マウスでは 2-10 ピクセルが 30.3%，11-20 ピクセルが 18.9%，21-31 ピクセルが 13.1%，32-61 ピクセルが 14.5%，62-91 ピクセルが 8.1%，92 ピクセル以上が 14.5%を占め，TG マウスでは 2-10 ピクセルが 35.0%，11-20 ピクセルが 26.4%，21-31 ピクセルが 12.1%，32-61 ピクセルが 12.9%，62-91 ピクセルが 7.9%，92 ピクセル以上が 5.7%を占めた（Fig. 2D）．胎生 18.5 日齢 WT マウスでは成熟破骨細胞は下顎骨に広汎に観察されたが（Fig. 1G-I），TG マウスでは TRAP 陽性細胞は形成中の歯胚周囲ならびに異常が見られる下顎骨周囲に認められた（Fig. 1J-L）．また，TRAP 陽性細胞は胎生 17.5 日では WT マウス下顎骨で 164.3±29.0 個，TG マウス下顎骨で 92.2±41.0 個認められ，18.5 日齢では WT マウス下顎骨で 278.0±42.5 個，TG マウス下顎骨で 137.3±19.3 個認められ，両日齢とも TG マウスの下顎骨における TRAP 陽性細胞の数は有意に少なかった（Fig. 2C）．

KLF4 を過剰発現させた骨芽細胞と骨髄間質細胞の共培養において破骨細胞成熟が抑制される

TG マウス胎仔において単核の TRAP 陽性細胞が観察されるが，破骨細胞の成熟は抑制されていることが示唆された．そこで，骨芽細胞と BMMs の in vitro 共培養系を用いて，KLF4 を過剰発現させた骨芽細胞が BMMs の破骨細胞分化を同様に抑制しうるかを検討した．コントロールとして GFP 産生レトロウイルスを感染させた骨芽細胞と野生型マウスの BMMs を 7 日間共培養した後， TRAP 染色を行った（Fig. 3A，B）．KLF4 を過剰発現させた骨芽細胞を野生型マウスの BMMs と共培養させるとコントロールとは対照的に大部分の TRAP 陽性細胞は小さく，多核の TRAP 陽性細胞は有意に少なかった（Fig. 3B，C）．これらの結果から骨芽細胞に発現する KLF4 が非細胞自律的に破骨細胞の成熟を抑制することが in vivo，in vitro 両方で示された．

Klf4 は骨芽細胞における ECM 発現に影響を与える

胎生 15.5 日齢 TG マウスにおいて，小型の TRAP 陽性細胞は石灰化部位から少し離れた場所に位置していた（Fig. 1E, F）. そこで組織の連続切片を van Gieson 液にて染色し，類骨や骨基質に豊富なコラーゲンの局在を検出した．van Gieson 陽性領域は WT マウスおよび TG マウスともに観察された．しかし，染色が濃い領域に関しては，WT マウスでは下顎骨周囲全体で観察されたが（Fig. 4 A），TG マウスでは下顎骨周囲に散在していた（Fig. 4B）．TG マウス下顎骨においてこの van Gieson 強陽性部位と小型の TRAP 陽性細胞が同様な分布を示すことから，未熟な破骨細胞は類骨の表面に留まっていると考えられた．

そこで，初代頭蓋冠骨芽細胞において KLF4 が ECM の遺伝子発現に影響を与えるかを調べた．コンフルエント時，*Secreted phosphoprotein 1* （*Spp-1*），

Tenascin-C（*TnC*），*Fibronectin 1*（*Fn1*），*Integrin-binding sialoprotein*（*Ibsp*）で KLF4 による有意な発現抑制を認めたが， *Vitronectin*（*VN*）では発現の変化を認めなかった（Fig. 5A）．次に siRNA を用いて内因性 Klf4 をノックダウンした時の変化を検討した. コントロール siRNA もしくは Klf4 に対する siRNA を細胞に導入し，48 時間後に遺伝子発現の変化を調べた．内因性の Klf4 は Klf4 siRNA によりおよそ 80%抑制された（Fig. 5B）．*Spp-1*，*Fn1*，*Ibsp* には Klf4 のノックダウンによる変化は見られなかったが，*TnC* ではノックダウンにより有意な発現増加が見られた（Fig. 5B）. In vivo にてこれらの ECM 分子の発現が同様に Klf4 の影響を受けるか調べるため，胎生 15.5 日齢 TG マウスの下顎骨切片において in situ hybridization を行った（Fig. 6）．WT マウスでは *Spp-1*（Fig. 6A），*Ibsp*（Fig. 6C），*TnC*（Fig. 6E）の発現が下顎骨骨芽細胞に認められた．*Fn1* の発現は下顎骨骨芽細胞とメッケル軟骨の軟骨細胞で認められた（Fig. 6G）. TG マウスでは，下顎骨骨芽細胞における *Spp-1*（Fig. 6B），*Ibsp*（Fig. 6D），*TnC*（Fig. 6F）の発現は減少した．変異型の骨芽細胞における *Fn1* の発現も減少したが，メッケル軟骨の軟骨細胞における発現は野生型の切片と同様であった（Fig. 6G,H）.

<u>Runx2 を KLF4 と共培養すると骨芽細胞の石灰化をレスキューし, 破骨細胞成熟を部分的に回復する．</u>

KLF4 を骨芽細胞に過剰発現すると骨芽細胞分化は著しく抑制される（Michikami et al., 2012）．骨芽細胞分化の主要制御因子として Runx2（Komori et al., 1997）ならびに Sp7（Nakashima et al., 2002）が知られており，Runx2 に関しては KLF4 が Runx2 転写活性を抑制することも報告されている（Kim et al., 2014）. 骨芽細胞分化と破骨細胞生成は密接に関与しているという報告もあることから（Samee et al., 2008），Runx2 もしくは Sp7 と KLF4 の共発現による破骨細胞誘導

能の変化を検討した．まずはじめに頭蓋冠由来培養骨芽細胞に KLF4，Runx2，Sp7 をそれぞれ単独か，KLF4 と共に Runx2 もしくは Sp7 を共発現させ，培養 8 日後にアリザリンレッド染色を行った（Fig. 7）． GFP 単独発現（Fig. 7A）に比べ KLF4 の単独発現（Fig. 7B）では石灰化の低下が見られた．Runx2（Fig. 7C），Sp7（Fig. 7E）はそれぞれ石灰化を亢進させたが，Sp7 に比べ Runx2 ではその度合いが顕著であった．KLF4 と Runx2 の共発現（Fig. 7D）では KLF4 による石灰化の低下からの回復が見られ，Runx2 単独（Fig. 7C）と同様の石灰化度合いが観察されたが，Sp7 との共発現（Fig. 7F）では KLF4 単独（Fig. 7B）とほぼ同じであった．このことから，骨芽細胞の分化において KLF4 の作用を Runx2 の作用が上回ることが示唆された.

次に，破骨細胞成熟においても同様な回復が起こるか検討した．つまり KLF4 と共に Runx2 もしくは Sp7 を骨芽細胞に発現させ，これらの共発現が，KLF4 を過剰発現させた骨芽細胞と BMMs の共培養で見られた破骨細胞成熟の低下を回復しうるかを検討した. GFP 単独発現（Fig. 8A）と比べ, KLF4 の単独発現（Fig. 8B）では破骨細胞成熟の低下が見られたが，Runx2（Fig. 8C），Sp7（Fig. 8E）の単独発現では見られなかった． KLF4 と Runx2 の共発現（Fig. 8D）では KLF4 単独発現での破骨細胞成熟低下からの回復が見られたが，Sp7 との共発現（Fig. 8F）では見られなかった．多核の TRAP 陽性細胞を数えると同様の傾向が見られた（Fig. 8G）．つまり，GFP 単独発現と比べ，KLF4 の単独発現では有意に少なく，KLF4 と Runx2 の共発現では KLF4 単独発現での細胞数減少からの有意な回復が見られたが，Sp7 との共発現では見られなかった．さらに，Runx2 との共培養による破骨細胞成熟の回復が RANKL もしくはオステオプロテグリン（OPG/Tnfrsf11b;Wada et al. 2006）の発現量の変化に起因しているか検討した. RANKL/OPG 値の相対発現量は，KLF4 単独では GFP と比べて有意に減少し，

Runx2 あるいは Sp7 を KLF4 と共発現させた場合はともに KLF4 単独と比べ有意な変化は見られなかった（Fig. 9）．次に Runx2 と KLF4 を骨芽細胞に導入した際にコンフルエント後 6 日目における ECM の発現が回復するかどうかを調べた．*TnC*（Fig. 10A），*Fn1*（Fig. 10B），*Ibsp*（Fig. 10C），*Spp-1*（Fig. 10D）の発現は KLF4 によって減少し，Runx2 との共発現でそれら ECM の発現は部分的な回復が見られた. Sp7 と KLF4 との共発現でも一部の ECM 発現の回復が見られたが，Runx2 の場合に比べ Sp7 による回復の程度は低かった.

KLF4 は関節軟骨に発現し，ECM の発現に影響を与える

関節軟骨における KLF4 の局在部位を同定するため生後 0 日（Fig. 11A），2 か月（Fig. 11B），6 か月（Fig. 11C）の正常マウス膝関節において抗 Klf4 抗体を用い，免疫染色を行った．いずれの時期も関節軟骨表層における軟骨細胞の核に陽性反応を認めた（Fig. 11A，B，C）．しかし，月齢がすすむにつれ核に陽性反応を認める軟骨細胞を認める範囲が狭くなっていき，生後 6 か月ではほぼ関節軟骨表層に限局していた（Fig. 11C）.

次に，関節軟骨に Klf4 の局在を認めたことから培養軟骨細胞において KLF4 が ECM に及ぼす影響について調べた．GFP あるいは KLF4 を導入したコンフルエント後 8 日の培養軟骨細胞にアルシアンブルー染色を行った．GFP を導入した培養軟骨細胞に比べ KLF4 を導入した培養軟骨細胞においては染色の低下が認められ（Fig. 12A），KLF4 によりプロテオグリカンの蓄積が抑制されることが示唆された. また関節軟骨基質に最も多く含まれる ECM である II 型コラーゲン，アグリカンの発現量をコンフルエント 8 日の培養軟骨細胞を用いて調べると，KLF4 存在下で共に発現は有意に減少した（Fig. 12B）.

関節軟骨全体では II 型コラーゲン，アグリカンが軟骨基質の大部分を占める

が，関節軟骨表層では IX 型コラーゲン，デコリン，バイクリカンの占める割合が大きいという特徴をもつ．また，関節軟骨表層や滑膜液に特徴的なプロテオグリカン 4（PRG4）の存在を認める（Knudson et al., 2001）．関節軟骨表層に KLF4 の局在を認めたことから，表層で見られる ECM の発現が KLF4 により影響を受けるかどうかをコンフルエント後 8 日の培養軟骨細胞を用いて調べた（Fig. 13）．表層で特徴的な ECM の中では IX 型コラーゲンが KLF4 存在下で発現減少したが，デコリン，バイクリカン，*Prg4* の発現は増加，もしくは増加傾向を示し，特に *Prg4* はコントロールに比べ 100 倍以上の発現増加を認めた（Fig. 13）．他の ECM では XI 型コラーゲン，フィブロモジュリンで有意な発現低下を認めた．これらのことから KLF4 によって関節軟骨基質の大部分を占める ECM の発現は減少するが, 表層に特徴的ないくつかの ECM の発現は増加することがわかった．次に，ECM の発現量低下以外に先述した KLF4 による軟骨培養細胞のアルシアンブルー染色低下の原因があるかどうか調べた（Fig. 14）．Mmp 阻害剤である GM6001 あるいはコントロールとしてジメチルスルホキシド（DMSO）を GFP あるいは KLF4 を導入した培養軟骨細胞にそれぞれ加え, アルシアンブルー染色を行った．GFP を導入した培養軟骨細胞（GFP+DMSO : Fig. 14A）に比べ，KLF4 を導入した培養軟骨細胞（KLF4+DMSO：Fig. 14C）では明らかな染色の低下が見られた．GM6001 を添加すると，GFP を導入した培養軟骨細胞（GFP+GM6001：Fig. 14B）では GM6001 添加による影響は見られなかったが, KLF4 を導入した培養軟骨細胞（KLF4+GM6001：Fig. 14D）では，KLF4 による染色低下からの部分的な回復が見られた．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活性増加が関与していることが示唆された．

KLF4 は軟骨破壊の病態に関与し，軟骨細胞においてプロテアーゼの発現を制御する

軟骨破壊を示す疾患に KLF4 が関与しているか検討するため, 関節リウマチモデルマウス切片を用い Klf4 の局在部位の同定を試みた．D1CC マウスは関節リウマチ様病態の発症・進行ともに緩やかであり，ヒトの疾患の経過と極めて近いことが特徴である（Kanazawa et al., 2006）．生後 16 週の D1CC マウスの足の正常部位ならびに炎症部位を含む指関節切片を用い Klf4 免疫染色を行った．炎症部位では軟骨破壊が起きており，その周囲には滑膜細胞の増殖により形成されたパンヌスが観察された（Fig. 15B，D）．拡大像では正常部位（Fig. 15C），炎症部位（Fig. 15D）ともに関節軟骨表層の軟骨細胞ならびに滑膜細胞に茶褐色の陽性反応を認めた．正常部位では滑膜細胞に比べ軟骨細胞で反応が弱いが（Fig. 15A，C），炎症部位では滑膜細胞，軟骨細胞ともに強い反応を認めた（Fig. 15B，D）．これらのことから軟骨破壊を示す病的な状態に軟骨細胞における KLF4 が関与していることが示唆されたため，KLF4 と各種プロテアーゼの発現との関与について調べた．KLF4 を導入したコンフルエント 0 日，8 日目の軟骨細胞を使用し，リアルタイム PCR により各種プロテアーゼの発現を検討した．培養 8 日では *Mmp3*，*Mmp9*，*Mmp10*，*Mmp11*，*Mmp13*，*Mmp17*，*ADAMTS5* で有意な発現上昇が, *Mmp23*, *ADAMTS9*, *ADAMTS16* で有意な発現減少が見られた（Fig. 16A）．培養 0 日では *Mmp3*，*ADAMTS5* で有意な発現上昇が見られた（Fig. 16B）．これらのプロテアーゼには軟骨破壊の主体となるプロテアーゼが含まれる（Wan et al., 2011）ことから，KLF4 が各種プロテアーゼの発現を制御することで軟骨破壊に関与していることが示唆された．Mmp は潜在型 Mmp（pro Mmp）として分泌され，プロセッシングを受けて活性型 Mmp になることで機能を発揮する（Murphy et al., 1999）．よって，KLF4 がプロテアーゼの活性に及ぼす影響につ

いても，ゼラチンザイモグラフィーによって調べた．Mmp9 は GFP，KLF4 存在下でともに潜在型 Mmp ならびに活性型 Mmp のバンドを認めた. Mmp2 は KLF4 によって発現量に有意な発現上昇がみられなかったが（Fig. 16），活性型 Mmp2 のバンドが KLF4 を導入した細胞で観察された（Fig. 17）.

考察

骨芽細胞の Klf4 は非細胞自律的に破骨細胞の成熟を制御する

破骨細胞は石灰化した骨基質を吸収する能力をもつ唯一の細胞である．膜性骨化では骨芽細胞が豊富な ECM を産生し，その後石灰化構造物の骨組みとして利用される．また，破骨細胞は散在して認められる石灰化部位の隙間に血管，神経，免疫細胞などとともに侵入する．本研究において，骨芽細胞での KLF4 が抑制する成熟破骨細胞の誘導能は, Runx2 の共導入により有意な回復が見られた． KLF4 を過剰発現させた骨芽細胞において Runx2 の発現に有意な変化を認めないことから（Kim et al., 2014，Michikami et al., 2012），Runx2 との共発現による回復は，KLF4 が Runx2 の転写ではなく，その転写活性に作用することに起因すると考えられる．これまでに，Runx2 と Klf4 がオステオカルシンのプロモーター配列において協働し（Michikami et al., 2012），KLF4 による Runx2 の活性抑制が KLF4 を導入した細胞における骨形成抑制の原因となる（Kim et al., 2014）という報告がある．また，マウス Mmp13 プロモーター配列に対して KLF4 は明らかに Runx2 の転写活性を抑制した（データ未発表）．よって KLF4 と Runx2 の相互作用の様式は各々のプロモーター配列特異的と考えられる．Runx2 と KLF4 の関係においては，破骨細胞形成を促進する因子を Runx2 は誘導するが KLF4 がその誘導を抑制し, Runx2 が過剰に発現することで KLF4 による抑制を凌駕するという可能性がある．逆に，KLF4 の発現により誘導される破骨細胞成熟を阻害する因子の発現を Runx2 が抑制している可能性も考えられる．Runx2 による回復の詳細なメカニズムの理解は更なる検討が必要である．一方，Runx2 の下流で作用し骨芽細胞分化に必須の転写因子である Sp7 では KLF4 による破骨細胞誘導能の低下をほとんど回復できなかった．この結果は，Runx2 によっては誘導されるが Sp7 では誘導されない因子の存在を示唆しており，Sp7 が Runx2 の下

流で作用しているという概念をサポートしている．また，Runx2 ノックアウトマウスでは破骨細胞の形成が骨格においてほぼ見られないのに対して（Komori et al., 1997），Sp7 ノックアウトマウスでは破骨細胞が野生型マウスと同様に認められる（Nakashima et al., 2002）．この点も今回の実験で見られた Runx2 と Sp7 の回復能の違いと整合性がある．

Klf4 は ECM の発現を制御する

Col1a1-Klf4 マウスで TRAP 陽性細胞の分布は野生型と大きく異なり，ほとんどが類骨の外縁に存在していた．胎生 15.5 日齢において野生型マウスよりも変異型マウスの下顎骨で TRAP 陽性の前破骨細胞が多く観察されたことから，破骨前駆細胞の下顎骨周囲への遊走異常により成熟破骨細胞が少ないということは考えにくい．前述したとおり，Runx2 ノックアウトマウスでは骨格に TRAP 陽性細胞がほとんど見られない（Komori et al., 1997）．Runx2 欠損マウスに分泌型 RANKL を単独導入しても正常な成熟した破骨細胞は見られず，正常な内軟骨骨化のプロセスは見られない（Enomoto et al., 2003）．これらの結果から破骨細胞の低形成が Runx2 欠損による RANKL の発現の低下よりも ECM を含めた他の分子の発現の変化により起こっている可能性が高いことが示唆される．本研究における *Col1a1-Klf4* マウスでの所見は骨形成に加え正常な破骨細胞形成には十分な類骨の質が必要であり，類骨を構成する各種 ECM が骨芽細胞，破骨細胞成熟のための環境作成に必須であることを示しているといえる．KLF4 により発現の変化を検討した ECM は全てインテグリンにより認識されるアルギニン－グリシン－アスパラギン酸（RGD）配列を含む．インテグリンを介しての接着は破骨細胞の移動（Nakamura et al., 1998），融合（Kim et al., 2006, Nakamura et al., 1999），成熟（Carron et al., 2000， Miyamoto et al., 2000）に必要であることが知られてい

る．このことは大理石骨病の表現型がβ3インテグリンを欠損させた Itgβ3$^{-/-}$マウスで見られる（McHugh et al., 2000）ことからも理解しうる．また，非接着状態の破骨前駆細胞はインテグリンシグナリング依存的に RANKL の受容体である RANK の発現が減弱することが報告されており（Mochizuki et al., 2012），ECM 発現抑制下ではさらに RANKL シグナル受容を低下させている可能性もある．

関節軟骨における Klf4 の局在と ECM の関係

関節軟骨は骨化せずに生涯軟骨のままでとどまる永久軟骨である（Knudson et al., 2001）．これは成長期が終わるまで骨端部に見られる軟骨成長板が内軟骨骨化により骨化するのと対照的である．発生中の関節軟骨は軟骨細胞数を増やす必要があるため ECM を産生するものの，まだその量自体は少ない．したがって組織を観察すると各軟骨細胞間の隙間は狭い．この ECM の割合が少ない環境は出生後もしばらく継続するが，発育の後期になると ECM の産生，蓄積が多くなることで，次第に隣り合う軟骨細胞間の距離は大きくなり基質の中に細胞が点在するようになる．その後は荷重がかかる部位の関節軟骨が次第に薄くなるにつれ，関節の前後，中央部で厚さの差が見られるようになる．関節軟骨の深部の軟骨基質は石灰化し，そのさらに深部にある石灰化した骨と協調的に関節にかかる荷重に対抗する（Schulz et al., 2007）．

関節軟骨は発現する細胞外基質や転写因子，組織学的な性状の違いから大きく 4 層に分けられ，関節表面から表層，中間層，深層，石灰化層と呼ばれる（Havelka et al., 1984）．関節軟骨表層の細胞は扁平で一般的に軟骨細胞として認識されている丸い形態をしていない（Wilusz et al., 2014）．軟骨に特徴的な基質である II 型コラーゲンやアグリカンは中間層に豊富に見られ，表層には少ないが，表層の軟骨細胞はデコリン，IX 型コラーゲン，ルブリシンなどを強く発現

するという特徴をもつ（Knudson et al., 2001）．ルブリシンは PRG4 遺伝子の翻訳産物の一つで，PRG4 の遺伝子変異は若年性の関節疾患の発症を特徴とするヒト Campodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis（CACP）症候群の原因として同定されている（Rhee et al., 2005）.

骨格形成過程において KLF4 は幼若な骨芽細胞に強く発現し種々の ECM の産生を抑制した. 検討した ECM の中で *TnC* は KLF4 の過剰発現で発現が抑制され，逆に KLF4 をノックダウンすると増加した. TnC は発生中に関節軟骨に発現を強く認めるが，生後ほとんど認められなくなり，関節炎発生時に再び認められるようになる（Chockalingam et al., 2012）．また，TnC はアグリカネース等を誘導し基質分解に関与することや関節炎発症時に炎症性サイトカイン産生を誘導することが報告されている（Sofat et al., 2012）．ECM の厳密な発現調節は軟骨など基質が大量に見られる組織においても必須であり，前述した背景をふまえて今回，KLF4 が軟骨細胞にも発現するか免疫組織染色法を用いて検討した．KLF4 は関節軟骨と骨端軟骨成長板に発現しており, このことは KLF4 が骨芽細胞のみならず，大量の基質を産生する軟骨細胞においても何らかの生理的な役割を担うことを示唆している. 今回試料に用いた生後 0 日のマウス関節軟骨において，広い範囲の表層，中間層の細胞に KLF4 のシグナルが見られた．マウスにおいて関節軟骨の基質は断乳後，活発に運動し始めたのちにその占める領域が増加する（Yamauti et al., 2013）．この知見に一致して，生後 2 か月，6 か月齢マウスの関節では表層の軟骨細胞における KLF4 の発現が残り, 中間層における発現は低下した．よって，KLF4 は断乳前の関節軟骨細胞の基質産生を抑え，細胞数を増加させる役割を担っていることが考えられる.

KLF4 によるプロテアーゼ発現制御メカニズム

KLF4 を恒常的に軟骨細胞に発現すると *Mmp3*, *Mmp13*, *ADAMTS4* や *ADAMTS5* などこれまでに生理的，病的な軟骨基質分解に関与することが知られているプロテアーゼの発現が誘導された（Wang et al., 2011）．コンフルエント 0 日と 8 日目でのプロテアーゼの発現を比較するとこれらの発現の誘導は大きく二つのパターンに分けられた．すなわち，KLF4 により早期から発現が誘導される因子（*ADAMTS5*）と培養日数の経過と共に発現が誘導される因子群（*Mmp13*）である．このことは KLF4 によって直接的に近い経路で誘導される経路と，間接的に誘導される経路があることを示唆している．間接的な誘導経路としてプロテアーゼの発現誘導を仲介する分子の発現（もしくはクロマチンの修飾の変化）を KLF4 が誘導することが考えられる．ADAMTS5 はこれまでに関節破壊疾患に深く関与することが報告されているが（Glasson et al., 2005），多くの炎症性サイトカインによりその発現誘導が見られることが知られている．その時，同時に同じファミリーに属する ADAMTS4 の発現も炎症性サイトカインにより誘導されることも知られている（Bondeson et al., 2008）．KLF4 による ADAMTS5 の発現誘導が炎症性サイトカインの発現上昇による間接的な作用であるならば，ADAMTS4 も同様に発現の上昇が見られるはずである．しかし，KLF4 により早期，後期いずれの培養時期でも *ADAMTS4* の発現上昇は見られなかった．今後 KLF4 が直接 ADAMTS5 のプロモーター領域に作用する配列の同定を検討する必要がある．*Mmp13* がやや遅れて発現誘導されるメカニズムとして，まず KLF4 が炎症性サイトカインを誘導することで間接的にプロテアーゼの発現を誘導するという可能性がある．しかし，前述したように *ADAMTS5* が誘導されているにもかかわらず *ADAMTS4* の発現に影響が見られないことから炎症性サイトカインの発現誘導を介する作用である可能性は低いと思われる．他方で，KLF4 によ

りプロテアーゼの発現を制御する遺伝子配列上にエピジェネティックな変化が促される可能性が考えられる．様々なゲノムの修飾が存在する中で KLF4，プロテアーゼとともに関連が深いクロマチン修飾酵素にヒストン脱アセチル化酵素が挙げられ，今後検討を要する．

KLF4 が軟骨基質を分解する *MMP* や *ADAMTS* の発現を上昇させたことから，軟骨破壊性の疾患において KLF4 の異所性の発現が見られるか, 関節リウマチモデルマウスである D1CC マウスを用い検討した．D1CC マウスはラット II 型コラーゲンのプロモーター, エンハンサーに MHC classII の発現制御を行う class II transactivator（CIITA）を導入し，軟骨特異的に MHC classII を発現誘導させたトランスジェニックマウスである．少量の II 型コラーゲンで約 90%という高い確率でパンヌス形成，軟骨破壊，肉芽腫様病変，間質性肺炎などのリウマチ特有の病態が惹起される．それらの進行は段階的であり慢性炎症の様子を呈する（Kanazawa et al., 2006）．今回 D1CC マウスの指関節において，炎症がいまだ見られない部位の関節表層の軟骨細胞の核で KLF4 の反応は認めるもののその反応は弱かった．しかし滑膜細胞の腫瘍のような増殖により実際に軟骨破壊が起こっている部位の残存する軟骨細胞の核では非常に強い KLF4 の反応が見られた．関節表層細胞の消失はパンヌスの形成により既に起こっているので，認められた軟骨細胞での KLF4 の発現は関節深部に相当し, 異所性の KLF4 の発現といえる．KLF4 は核内で転写因子として作用すると考えられるが，様々な因子と物理的に会合することが知られている．サイトカインの細胞内シグナル伝達をつかさどる NF-κB のシグナル強度を KLF4 が制御することも報告されており (Liao et al., 2011)，KLF4 と NF-κB の 3 次元的な接着位置の関係で個々のプロテアーゼの発現制御に違いが出てくる可能性は容易に考えられる．NF-κB 以外でサイトカインの細胞内シグナルをつかさどる因子は AP-1，STAT，CREB，C/EBP

など多岐にわたり（Fanjul-Fernandez et al., 2010），軟骨細胞における KLF4 のパートナーを見出すことが重要である．

培養軟骨細胞を用いた解析では KLF4 により誘導される因子の中で *Prg4* が特徴ある発現を示し, 培養初期から培養期間を通じて KLF4 によりその発現は誘導され，培養 8 日目ではコントロールに比べ 100 倍以上誘導された．リウマチ性関節炎を発症している患者の関節腔内の細胞で変形性関節症を発症している患者と比較して発現が上昇している因子に PRG4 が含まれることが報告されており（Justen et al., 2000），リウマチ性関節炎の関節軟骨で KLF4 が誘導され，その結果 PRG4 の発現が誘導されている可能性が考えられる．また，リウマチ性関節炎が発症した関節軟骨における KLF4 誘導は種を超えた普遍的なものである可能性があり，KLF4 がリウマチ性関節炎の関節破壊を防ぐ新たな創薬のターゲットになりうることを示唆している．

結論

本研究では，Klf4 を発現させた骨芽細胞の影響下での破骨細胞分化の詳細な分析を in vivo，in vitro で行い，また軟骨と KLF4 の関連についても検討したところ以下の結果を得た．

（1） 骨芽細胞における KLF4 は骨芽細胞が分泌する細胞外基質の発現を制御し，間接的に破骨細胞成熟を抑制する．

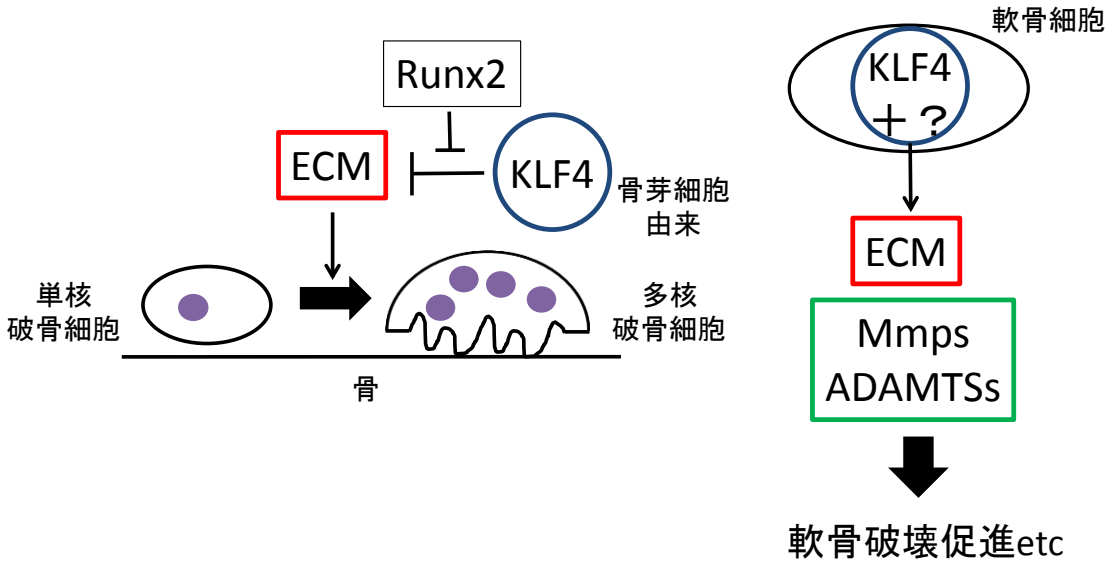
（2） Runx2 は細胞外基質に及ぼす KLF4 の作用を減弱させ，破骨細胞成熟を抑制状態から回復させる．

（3） KLF4 は関節軟骨表層に発現を認め，関節軟骨における各種 ECM の発現を制御する．

（4） KLF4 は軟骨破壊部の軟骨細胞において強い発現を示す．

（5） KLF4 は軟骨細胞においてプロテアーゼの発現，活性を制御する．

以上の結果から 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．



謝辞

本研究を行うにあたり，終始御懇意なる御指導を賜りました　大阪大学大学院歯学研究科　療護歯科保健学講座（障害者歯科治療部）森崎　市治郎　教授に心から敬意を表します．また，本研究を遂行するにあたり，終始様々な御指導と御校閲をいただきました大阪大学大学院歯学研究科　口腔分化発育情報学講座（口腔解剖学第一教室）脇坂　聡　教授，および阿部　真土　博士に厚く御礼申し上げます．最後になりますが，終始研究に対し御理解と御協力をいただいた，障害者歯科治療部ならびに口腔解剖第一教室の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます.

文献

Abe M, Michikami I, Fukushi T, Abe A, Maeda Y, Ooshima T, Wakisaka S (2010) Hand2 regulates chondrogenesis in vitro and in vivo. Bone 46:1359–1368

Alexander NR, Branch KM, Parekh A, Clark ES, Iwueke IC, Guelcher SA, Weaver AM (2008) Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. Curr Biol 18:1295–1299

Bondeson J, Wainwright S, Hughes C, Caterson B (2008) The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis. Clin Exp Rheumatol 26:139-45

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early on-set osteoporosis and arterial calcification. Genes Dev 12:1260–1268

Carron CP, Meyer DM, Engleman VW, Rico JG, Ruminski PG, Ornberg RL, Westlin WF, Nickols GA (2000) Peptidomimetic antagonists ofalphavbeta3 inhibit bone resorption by inhibiting osteoclast bone resorptive activity, not osteoclast adhesion to bone. J Endocrinol 165:587–598

Chockalingam PS, Glasson SS, Lohmander LS (2012) Tenascin-C levels in synovial fluid are elevated after injury to the human and canine joint and correlate with markers of inflammation and matrix degradation. Osteoarthritis Cartilage 21:339-45

Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J (1999) RANK is essential for osteoclast and lymph node development. Genes Dev 13:2412–2424

Enomoto H, Shiojiri S, Hoshi K, Furuichi T, Fukuyama R, Yoshida CA, Kanatani N, Nakamura R, Mizuno A, Zanma A, Yano K, Yasuda H, Higashio K, Takada K, Komori T (2003) Induction of osteoclast differentiation by Runx2 through receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin regulation and partial rescue of osteoclastogenesis in Runx2-/-

mice by RANKL transgene. J Biol Chem 278:23971–23977

Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C (2010) Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. Biochim Biophys Acta 1803:3-19

Garrett-Sinha LA, Eberspaecher H, Seldin MF, Crombrugghe B de (1996) A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. J Biol Chem 271:31384–31390

Glasson S.S, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma H.L, Flannery C.R, Peluso D, Kanki K, Yang Z, Majumdar M.K, Morris E.A (2005) Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. Nature 434:644-648

Gosset M, Berenbaum F, Thirion S, Jacques C (2009) Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes.Nat Protoc 8:1253-60

Havelka S, Horn V, Spohrová D, Valouch P (1984) The calcified-noncalcified cartilage interface: the tidemark. Acta Biol Hung 35:271-9.

Itoh S, Aubin JE (2009) A novel purification method for multipotential skeletal stem cells. J Cell Biochem 108:368–377.

Iwamoto M, Ohta Y, Larmour C, Enomoto-Iwamoto M (2013) Toward regeneration of articular cartilage.Birth Defects Res C Embryo Today 99:192-202

Jimi E, Nakamura I, Amano H, Taguchi Y, Tsurukai T, Tamura M, Takahashi N, Suda T (1996) Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. Endocrinology 137:2187–2190

Jüsten HP, Grünewald E, Totzke G, Gouni-Berthold I, Sachinidis A, Wessinghage D, Vetter H, Schulze-Osthoff K, Ko Y (2000) Differential gene expression in synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Mol Cell Biol Res Commun 3:165-72

Kanazawa S, Ota S, Sekine C, Tada T, Otsuka T, Okamoto T, Sønderstrup G, Peterlin BM (2006) Aberrant MHC class II expression in mouse joints leads to arthritis with extraarticular manifestations similar to rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A 103:14465-70

Kim JH, Kim K, Youn BU, Lee J, Kim I, Shin HI, Akiyama H, Choi Y, Kim N (2014) Kruppel-like factor 4 attenuates osteoblast formation, function, and cross talk with osteoclasts. J Cell Biol 204:1063–1074

Kim YH, Jun JH, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS, Baek JH (2006) Dexamethasone inhibits the formation of multinucleated osteoclasts via down-regulation of beta3 integrin expression. Arch Pharm Res 29:691–698

Knudson CB, Knudson W (2001) Cartilage proteoglycans. Semin Cell Dev Biol 12:69-78

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell 89:755–764

Lee SH, Rho J, Jeong D, Sul JY, Kim T, Kim N, Kang JS, Miyamoto T, Suda T, Lee SK, Pignolo RJ, Koczon-Jaremko B, Lorenzo J, Choi Y (2006) v-ATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. Nat Med 12:1403–1409

Lefebvre V, Li P, de Crombrugghe B (1998) A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. EMBO J 17:5718-33

Liao X, Sharma N, Kapadia F, Zhou G, Lu Y, Hong H, Paruchuri K, Mahabeleshwar GH, Dalmas E, Venteclef N, Flask CA, Kim J, Doreian BW, Lu KQ, Kaestner KH, Hamik A, Clément K, Jain MK (2011) Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. J Clin Invest 121(7):2736-49

McHugh KP, Hodivala-Dilke K, Zheng MH, Namba N, Lam J, Novack D, Feng X, Ross FP, Hynes RO, Teitelbaum SL (2000) Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteo-clasts. J Clin Invest 105:433–440

MichikamiI,FukushiT,TanakaM,EgusaH,MaedaY,Ooshima T, Wakisaka S, Abe M (2012) Kruppel-like factor 4 regulates membranous and endochondral ossification. Exp Cell Res 318:311–325

Miyamoto T, Arai F, Ohneda O, Takagi K, Anderson DM, Suda T (2000) An adherent condition is required for formation of multinuclear osteoclasts in the presence of macrophage colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. Blood 96:4335–4343

Mochizuki A, Takami M, Miyamoto Y, Nakamaki T, Tomoyasu S, Kadono Y, Tanaka S, Inoue T, Kamijo R (2012) Cell adhesion signaling regulates RANK expression in osteoclast precursors. PLoS One 7:e48795

Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knäuper V, Atkinson S, Gavrilovic J (1999) Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. APMIS 107:38-44

Nakamura I, Tanaka H, Rodan GA, Duong LT (1998) Echistatin inhibits the migration of murine prefusion osteoclasts and the formation of multinucleated osteoclast-like cells. Endocrinology 139: 5182–5193

Nakamura I, Pilkington MF, Lakkakorpi PT, Lipfert L, Sims SM, Dixon SJ, Rodan GA, Duong LT (1999) Role of alpha(v)beta(3) integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. J Cell Sci 112:3985–3993

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrugghe B (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell 108:17–29

Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, Takayanagi H (2011) Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. Nat Med 17:1473–1480

Qin C, Baba O, Butler WT (2004) Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med 15:126–136

Rhee DK, Marcelino J, Al-Mayouf S, Schelling DK, Bartels CF, Cui Y, Laxer R, Goldbach-Mansky R, Warman M.L (2005) Consequences of disease-causing mutations on lubricin protein synthesis, secretion, and post-translational processing. The Journal of biological chemistry 280:31325-31332

Rowland BD, Bernards R, Peeper DS (2005) The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. Nat Cell Biol :1074-82

Samee N, Geoffroy V, Marty C, Schiltz C, Vieux-Rochas M, Levi G, Vernejoul MC de (2008) Dlx5, a positive regulator of osteoblastogenesis, is essential for osteoblast-osteoclast coupling. Am J Pathol 173:773–780

Schulz RM, Bader A. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. Eur Biophys J.36 :539-68

Segre JA, Bauer C, Fuchs E (1999) Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. Nat Genet 22:356–360

Shields JM, Christy RJ, Yang VW (1996) Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. J Biol Chem 271: 20009–20017

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted

protein involved in the regulation of bone density. Cell 89:309–319

Sofat N, Robertson SD, Hermansson M, Jones J, Mitchell P, Wait R (2012) Tenascin-C fragments are endogenous inducers of cartilage matrix degradation. Rheumatol Int 32:2809-17

Song C, Zhu S, Wu C, Kang J (2013) Histone deacetylase (HDAC) 10 suppresses cervical cancer metastasis through inhibition of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 expression. J Biol Chem 288:28021-33

Ton-That H, Kaestner KH, Shields JM, Mahatanankoon CS, Yang VW (1997) Expression of the gut-enriched Kruppel-like factor gene during development and intestinal tumorigenesis. FEBS Lett 419: 239–243

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM (2006) RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol Med 12:17–25

Wang M, Shen J, Jin H, Im HJ, Sandy J, Chen D (2011) Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis. Ann N Y Acad Sci 1240:61-9

Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F (2014) The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. Matrix Biol. 39:25-32

Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y, Suda T (2005) DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. J Exp Med 202:345–351

Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, Suda T, Matsuo K (2006) Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. Cell Metab 4:111–121

Zhang W, Geiman DE, Shields JM, Dang DT, Mahatan CS, Kaestner KH, Biggs JR, Kraft AS, Yang VW (2000) The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. J Biol Chem 275:18391-8

図表

Table1：in situ hybridization に使用した cRNA プローブ

cRNA プローブ	GenBank accession No; nucleotide
Integrin-binding sialoprotein (*Ibsp*)	NM_008318; nt.401-1064
Fibronectin 1 (*Fn1*)	NM_010233; nt.60-850
Tenascin-C (*TnC*)	NM_011607; nt.956-1516
Secreted phosphoprotein 1 (*Spp-1*)	NM_009263; nt.436-455

Table2：リアルタイム PCR に使用したプライマー

hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*)	5`-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3` 5`-AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA-3`
Klf4	5`-GCGGGAAGGGAGAAGACACT-3` 5`-GGTCGTTGAACTCCTCGGGTCT-3`
Secreted phosphoprotein 1 (*Spp-1*)	5`-AAAGTGAAGGAAAGCGACGA-3` 5`-GTTCCTTCTGCACCTGCTTC-3`
Vitronectin (*VN*)	5`-ATCCTCTGATGGAGCCAGAGAAC-3` 5`-TGTGGTTCCTAGCCCACTCTCC-3`
Tenascin-C (*TnC*)	5`-AAAACAAGAGGAGCATCCCTGTC-3` 5`-AGGAGGTCTCTGGTCTCCTCAGA-3`
Fibronectin 1 (*Fn1*)	5`-GGTGACTCCTGGGAGAAGTTTGT-3` 5`-GGTCAGGCCTTTGATGGTATAGG-3`

Integrin-binding sialoprotein (*Ibsp*)	5`-AAAGTGAAGGAAAGCGACGA-3` 5`-GTTCCTTCTGCACCTGCTTC-3`
Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (*RANKL*)	5`-CTATGATGGAAGGCTCATGGTTG-3` 5`-ACTTGGGATTTTGATGCTGGTTT-3`
Osteoprotegerin (*OPG*)	5`-GTCCAGATGGGTTCTTCTCAGGT-3` 5`-CTTGTGAGCTGTGTCTCCGTTTT-3`
II 型コラーゲン α1 鎖 (*Col2a1*)	5`-GAAGGTGGAAAGCAAGGTGA-3` 5`-CATCAGTACCAGGAGTGCCA-3`
IX 型コラーゲン α1 鎖 (*Col9a1*)	5`-TGCCAATTCCATTTCTAATGGTG-3` 5`-CATTTATCTTCACGCCAACTTGC-3`
XI 型コラーゲン α1 鎖 (*Col11a1*)	5`-GAGTAGACGGCAGGGATTCTGAT-3` 5`-GTAAACCATCAGCCCCTGGTAAG-3`
アグリカン (*Acan*)	5`-GGAATCCCTCGATGCTTCG-3` 5`-ACTGCAGCGATGACCCTC-3`
デコリン (*Decorin*)	5`-CTGATCTGGGTTTGGACAAGTG-3` 5`-CATTCTCATGGACACGAAGTTCC-3`
バイグリカン (*Biglycan*)	5`-AGGTCACAATCAGATTCGGATGA-3` 5`-GGCAACCACTGCCTCTACTTCTT-3`
フィブロモジュリン (*Fibromodelin*)	5`-AGAAGATCCCTCCTGTCAACACC-3` 5`-GATCCCACCTAACTCTGCCTGTT-3`
ルミカン (*Lumican*)	5`-CCACGCTCCTCAGCTCTTGTAT-3` 5`-TAGCTGTGGGGGCAGTTACATT-3`
プロテオグリカン 4 (*Prg4*)	5`-TGGAGTGCTGTCCTGATTTCAAGAG-3` 5`-GGTATTGGGTGAGCGTTTGGTA-3`

Mmp2	5`-GGAGATCTGCAAACAGGACATTG-3` 5`-CTCCAGAACTTGTCTCCTGCAAA-3`
Mmp3	5`-ACCTAGAAGGAGGCAGCAGAGAA-3` 5`-GGTACTGAAGCCACCAACATCAG-3`
Mmp8	5`-TTACAGGGAACCCAGCACCTATT-3` 5`-TGCAGGTCATAGCCACTTAGAGC-3`
Mmp9	5`-GGCTTCCCTCTGAATAAAGAGGA-5` 5`-CTGCCGGACTCAAAGACTCTGTA-3`
Mmp10	5`-TGATGTTGGTGGCTTCAGTACCT-3` 5`-GGTGCAAGTGTCCATTTCTCATC-3`
Mmp11	5`-CATGTCCCCTTTCTACACCTTCC-3` 5`-TACCCAGTACTGAGCACCTTGGA-3`
Mmp12	5`-AGTGCCCGATGTACAGCATCTTA-3` 5`-GTTTCTGCCTCATCAAAATGTGC-3`
Mmp13	5`-GCTTTTCCTCCTGGACCAAACT-3` 5`-CGCCTGGACCATAAAGAAACTG-3`
Mmp14	5`-AGAGAACTTCGTGTTGCCTGATG-3` 5`-TTCGTCAAACACCCAGTGCTTAT-3`
Mmp16	5`-ATGGAGACAGTTCCCCATTTGAT-3` 5`-TTGTAGGTGGAGGGATCTTGTCA-3`
Mmp17	5`-GGAGTGACATCACACCCTTGAAC-3` 5`-GGTAGTACGGTTGCATGATGGAG-3`
Mmp23	5`-ATGACAGCGAGTACTGGGTCTTG-3` 5`-CCCTCTCTCACCAACCTTGTTTT-3`

Mmp27	5`-GGGTCATCAGGGGATATTCTGTC-3` 5`-CTTGGGTGATATTTTTCGCCTTC-3`
Mmp28	5`-GGCATTCCTGGAGAAGTATGGAT-3` 5`-GGCATTCCTGGAGAAGTATGGAT-3`
Adamts1	5`-GGTTCCACATGCAAGAAGATGTC-3` 5`-GGCCTACCATAAGAACCTGGATG-3`
Adamts2	5`-AATACAGGAACGAGGACGAGAGG-3` 5`-TTTGAGTACAAGGCTCCCATTCA-3`
Adamts4	5`-GCTAGGAGCTGTGCTATTGTGGA-3` 5`-ATAGTCCTTGCCAGGAAAAGTCG-3`
Adamts5	5`-GAGGAACTCCCAGGACAGACCTA-3` 5`-ATTACAATGGCGGTAGGCAAACT-3`
Adamts9	5`-AAGCCGCTAAAGGTATTCTGTGC-3` 5`-GACTCCGTTAAAGACAGCCCAGT-3`
Adamts12	5`-ACAAGAGCTACAGCGGGAGAAGT-3` 5`-TCTGGTGATAAGGACAGCCACAT-3`
Adamts14	5`-CTCCTGAGGACAGGATCTCAACA-3` 5`-AACGCTTTAGGGCTTAGCATCTG-3`
Adamts15	5`-CTGTACAAAGCTGTGGTGCACTG-3` 5`-CTGTGGTTGTAGCCATTGAAAGC-3`
Adamts16	5`-TGTCTGCCTTATTCAAGGATGGA-3` 5`-CCAGTCCAAGTCCTGAGTCTTCA-3`

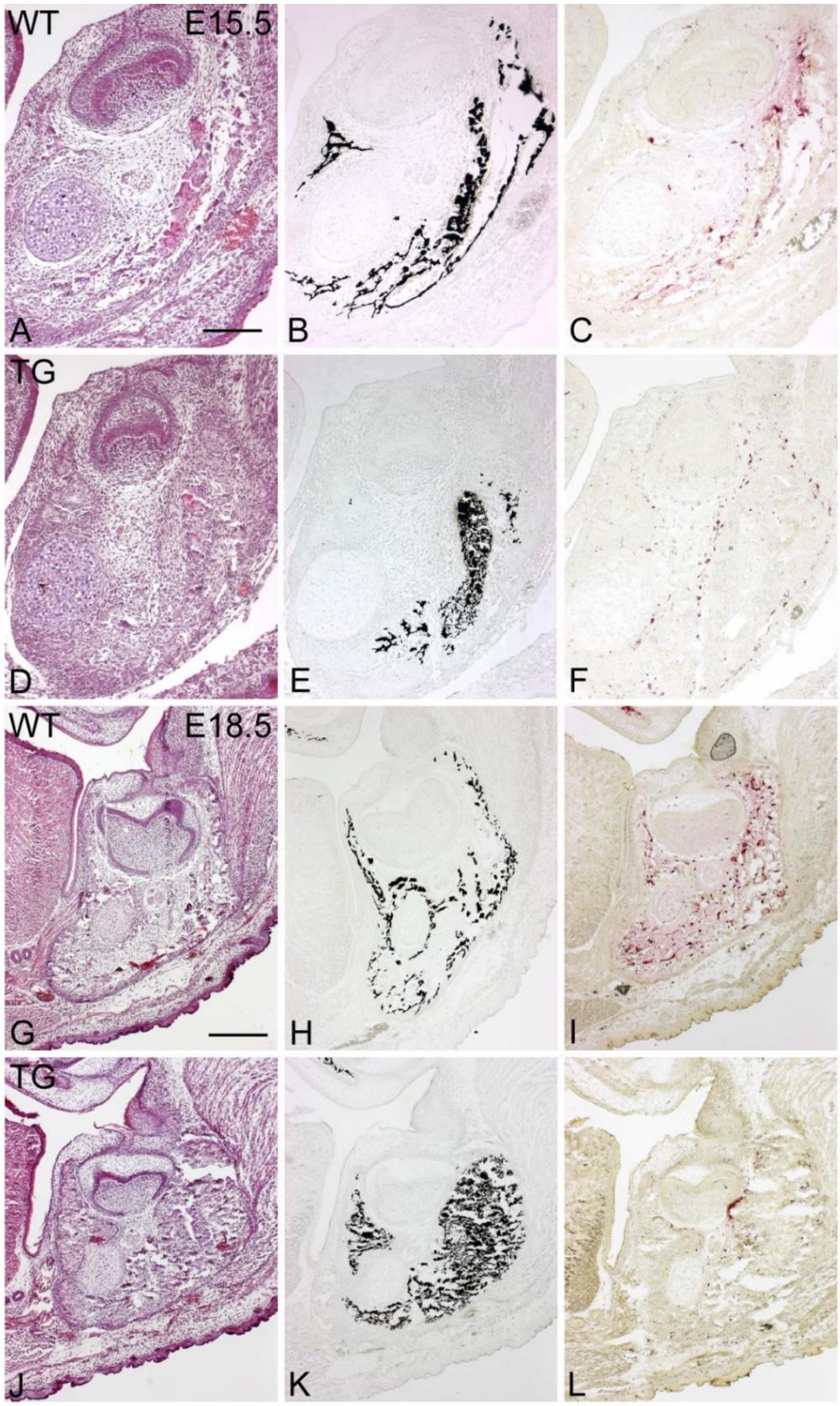


Fig. 1：胎生15.5日齢，胎生18.5日齢 マウス下顎骨部前頭断染色像

野生型マウス（WT：胎生15.5日齢 A-C，胎生18.5日齢 G-I），*Col1a1-Klf4*マウス（TG：胎生15.5日齢 D-F，胎生18.5日齢 J-L）のHE染色像（A，D，G，J)，von Kossa染色像(B，E，H，K)，TRAP染色像(C，F，I，L)．スケールバー ；200μm（A），400μm（G）

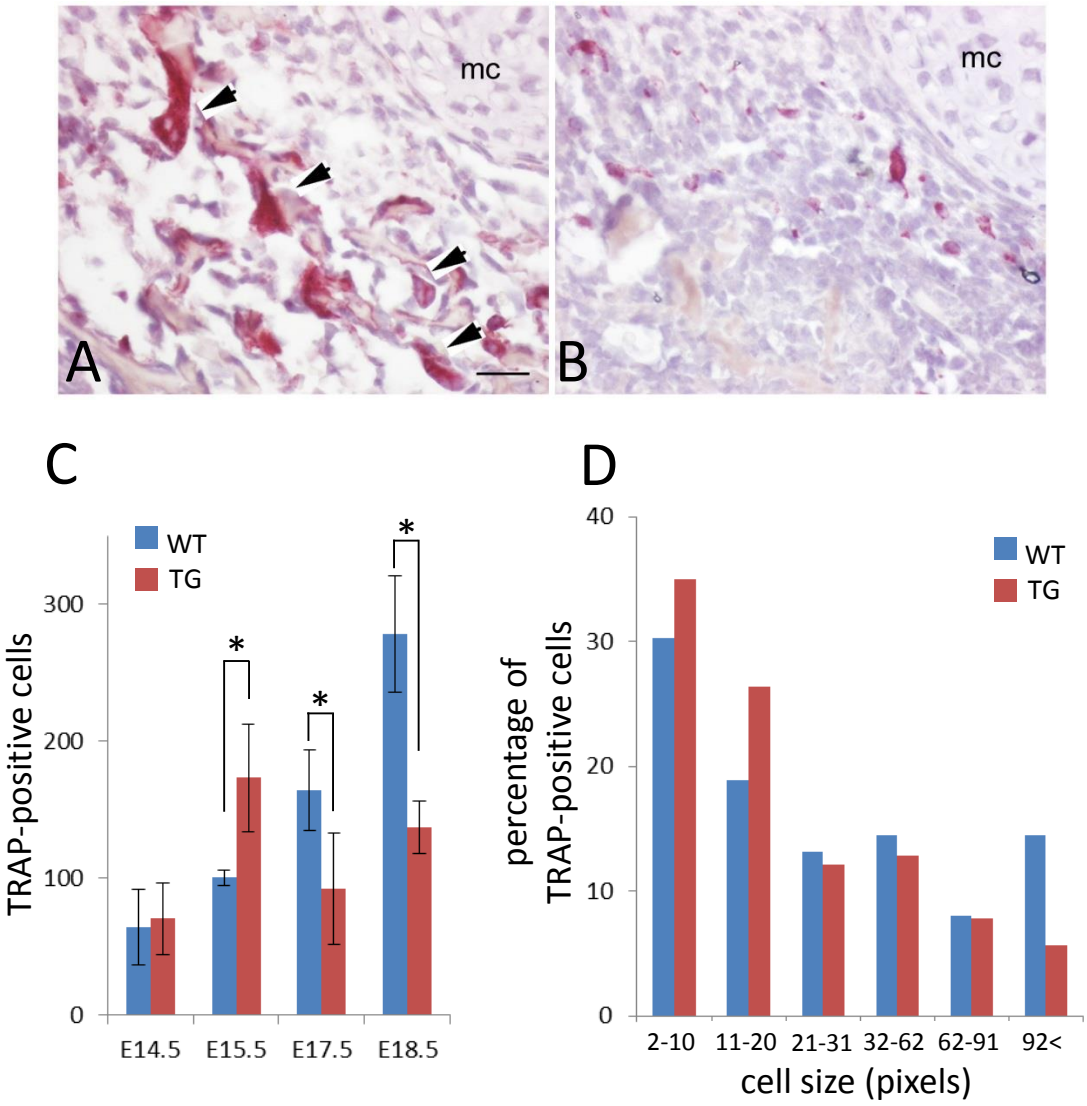


Fig. 2：マウス下顎骨における**TRAP**陽性細胞の数および大きさの定量化

A，B：マウス胎生15.5日齢マウス胎仔前頭断TRAP染色像．メッケル軟骨（mc）付近に野生型マウス（A）では多核TRAP陽性細胞（矢頭）を，*Col1a1-Klf4*マウス（B）では単核TRAP陽性細胞を認める．スケールバー ；50μm　C：胎生14.5日齢-胎生18.5日齢マウス胎仔下顎骨におけるTRAP陽性細胞数．*P< 0.05　D：胎生15.5日齢マウス胎仔下顎骨におけるTRAP陽性細胞の面積分布．WT；野生型マウス TG；*Col1a1-Klf4*マウス

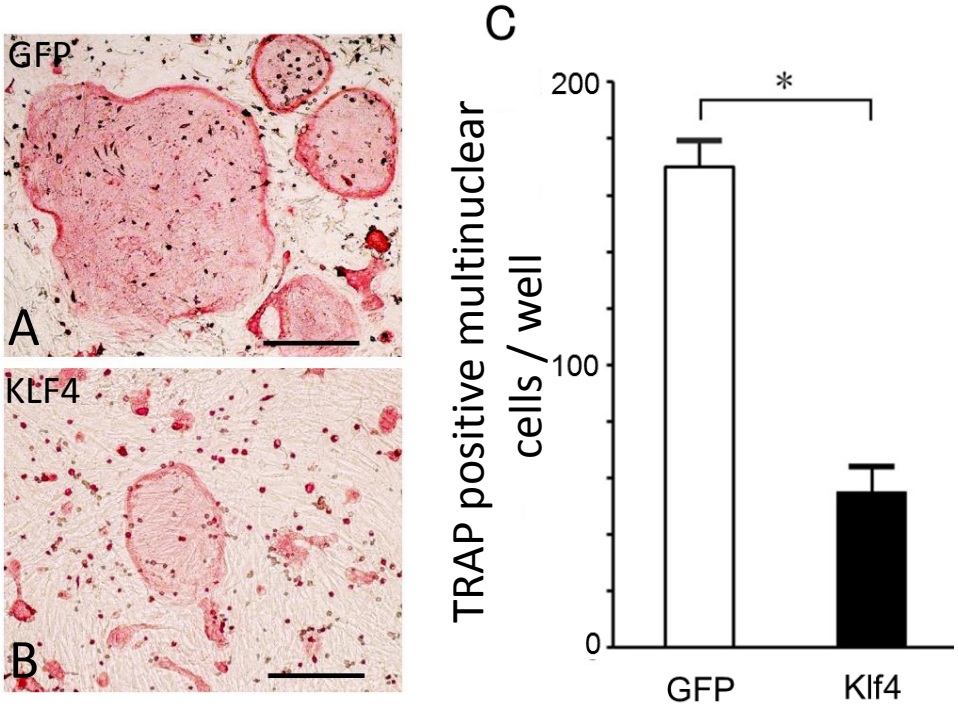


Fig. 3：骨芽細胞－マウス骨髄由来マクロファージ共培養系における**TRAP**陽性細胞数定量化

GFP（A）もしくはKLF4（B）を発現した骨芽細胞と骨髄由来マクロファージを共培養し，培養7日目にTRAP染色を行い， TRAP陽性多核細胞数を計測した（C）．*P< 0.05　スケールバー ；50μm

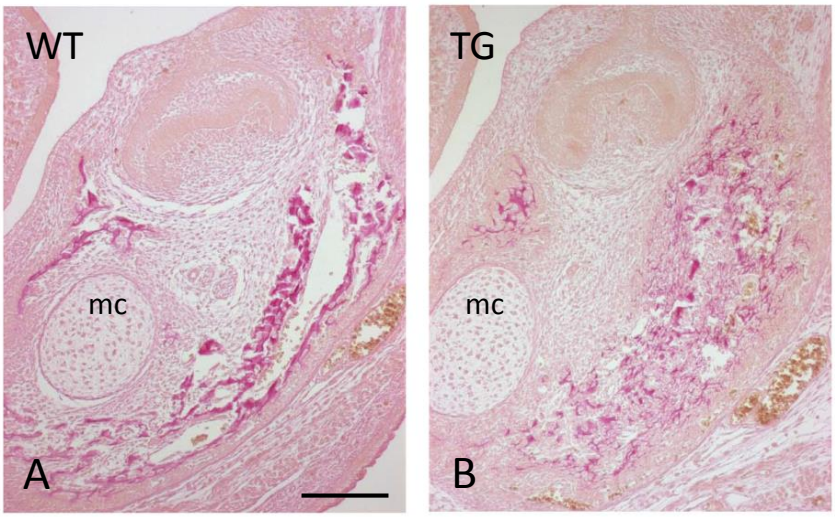


Fig. 4 ：胎生15.5日齢マウス下顎骨部前頭断 **van Gieson**染色像

野生型マウス（WT：A）， *Col1a1-Klf4*マウス（TG：B）ともにvan Gieson陽性領域を認める．mc；メッケル軟骨　スケールバー；200μm

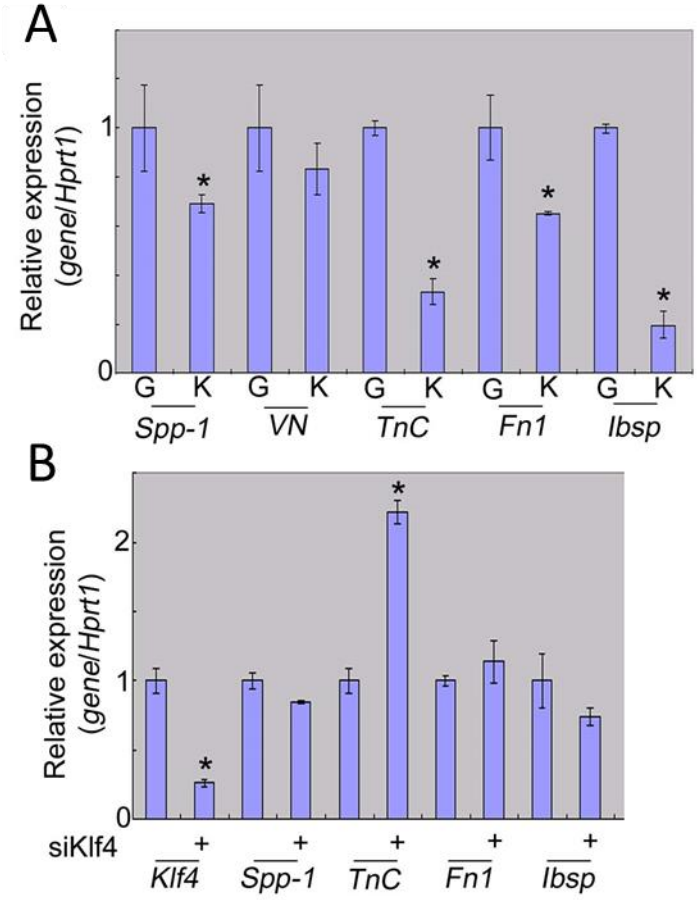


Fig. 5：骨芽細胞におけるKLF4過剰発現時およびノックダウン時のECM発現解析
コンフルエント時のRNAを精製，逆転写を行い，リアルタイムPCRにより骨芽細胞にKLF4を過剰発現させた際のECM（*Spp-1*：*Secreted phosphoprotein 1*，*VN*:：*Vitronectin*，*TnC*:：*Tenascin-C*，*Fn1*：*Fibronectin 1*，*Ibsp*：*Integrin-binding sialoprotein*）発現 （A）ならびにKlf4に対するsiRNA（siKlf4）を導入した際（+：KLF4ノックダウン）の各種ECM発現（B）を測定した．G；GFP K；KLF4
*P< 0.05

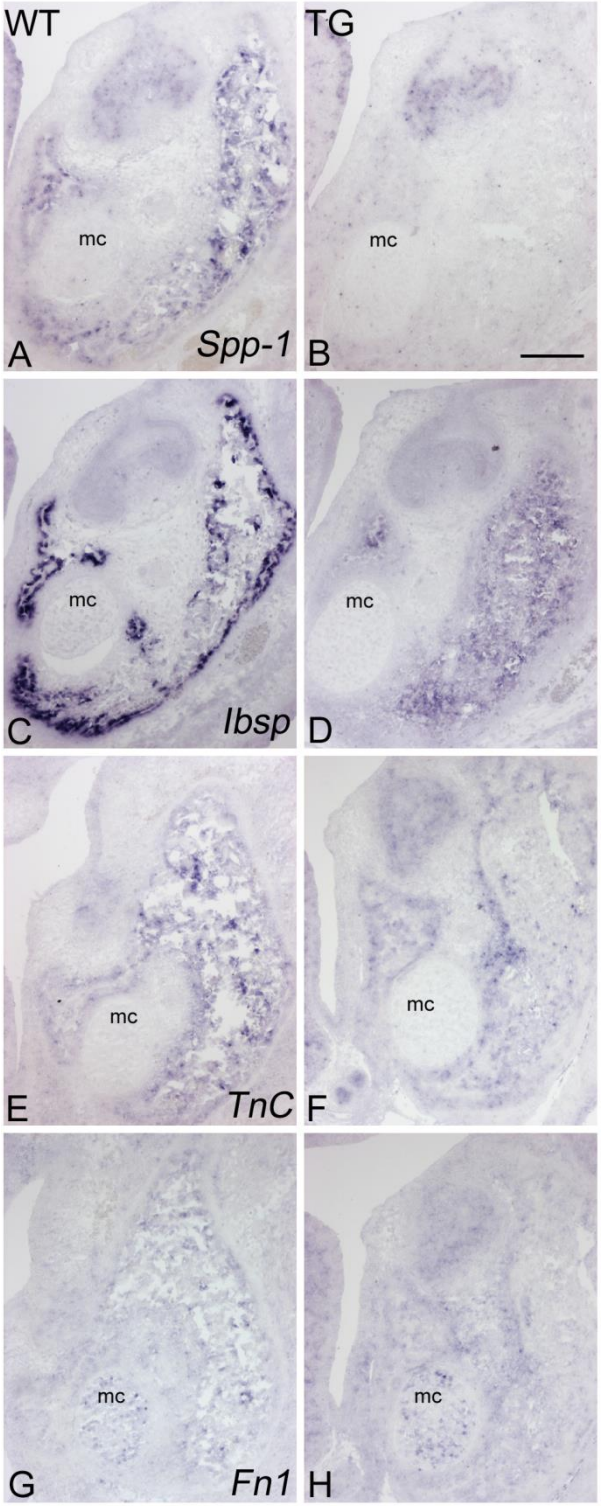


Fig. 6：胎生15.5日齢 マウス下顎骨 における遺伝子発現部位解析

胎生15.5日齢野生型マウス（A，C，E，G），*Col1a1-Klf4*マウス（B，D，F，H）マウス前頭断におけるin situ hybridization像．*Spp-1*（A，B），*Ibsp*（C，D），*TnC*（E，F），*Fn1*（G，H）の遺伝子発現を示す．　mc；メッケル軟骨

スケールバー；200μm

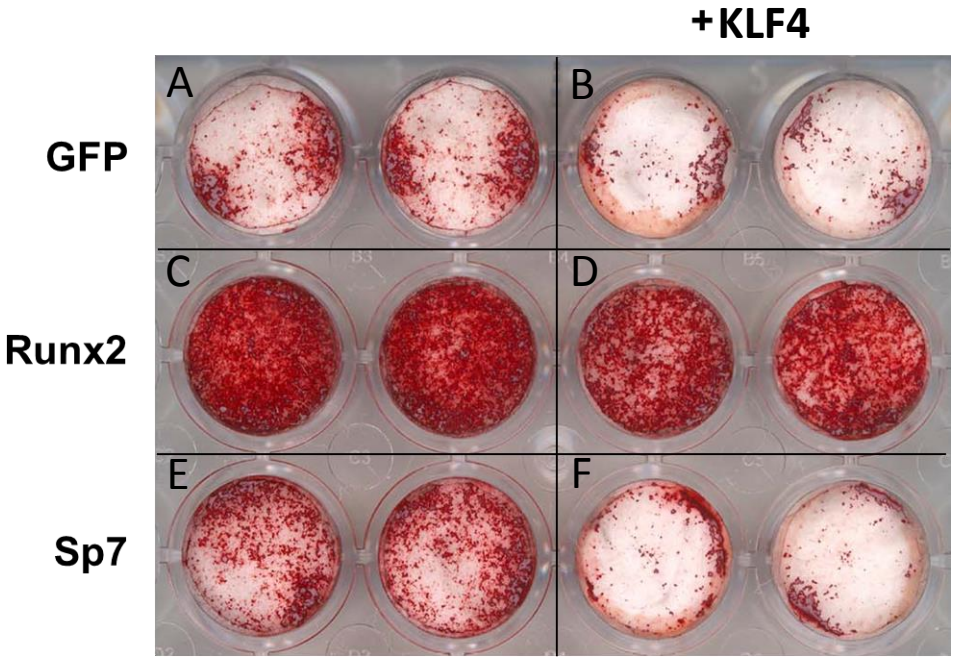


Fig. 7：Runx2，Sp7がKLF4の骨芽細胞分化に対する作用に及ぼす影響

骨芽細胞にKLF4（B），Runx2（C），Sp7（E）をそれぞれ単独発現させ，KLF4とRunx2（D）もしくはKLF4とSp7（F）を共発現させ，骨芽細胞培養8日目にアリザリンレッド染色を行った．コントロール（A）として緑色蛍光タンパク質（GFP）を使用.

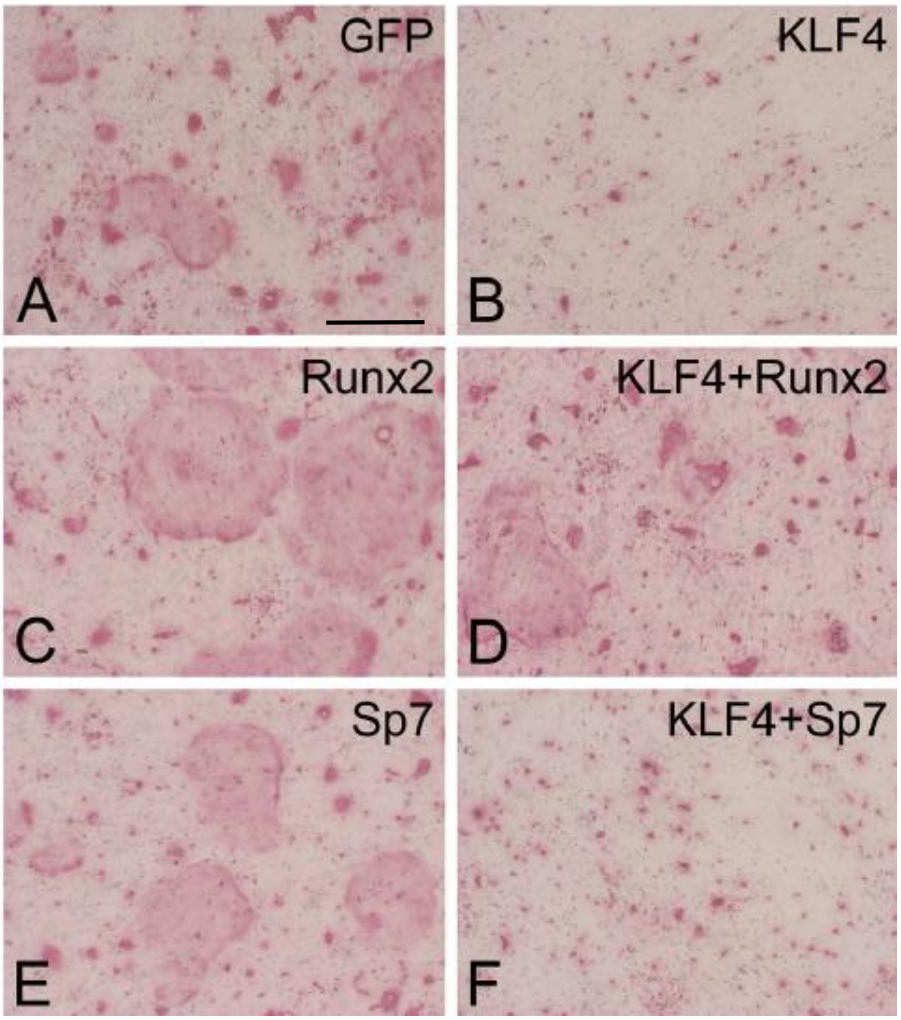
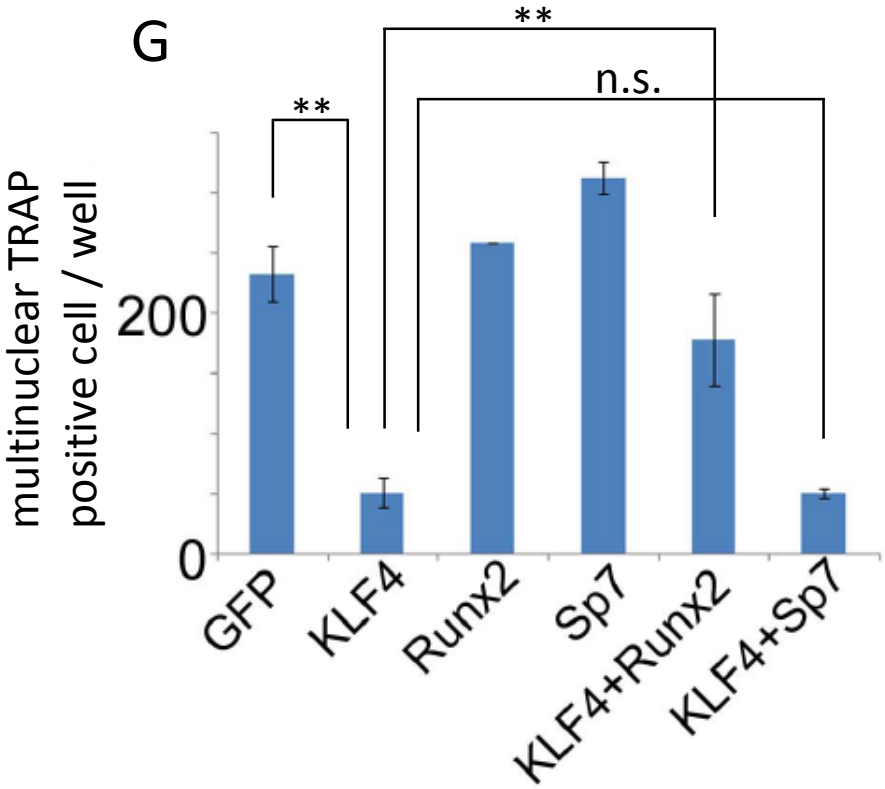


Fig. 8： KLF4による破骨細胞成熟に対する作用にRunx2，Sp7が及ぼす影響
KLF4（B），Runx2（C），Sp7（E）をそれぞれ単独発現，KLF4とRunx2（D）もしくはSp7（F）を共発現させた骨芽細胞をBMMsと共培養させ，培養7日目にTRAP染色像を行った．コントロールとしてGFP（A）を使用．（G；次項）それぞれのTRAP陽性細胞数を計測したもの．統計学的検定の結果は GFP，KLF4，KLF4+Runx2，KLF4+Sp7の間のみを示す．$^{*}P<$ 0.01，n.s.；有意差なし　スケールバー ；50μm


G
**
n.s.
**
multinuclear TRAP
positive cell / well
200
0
GFP
KLF4
Runx2
Sp7
KLF4+Runx2
KLF4+Sp7

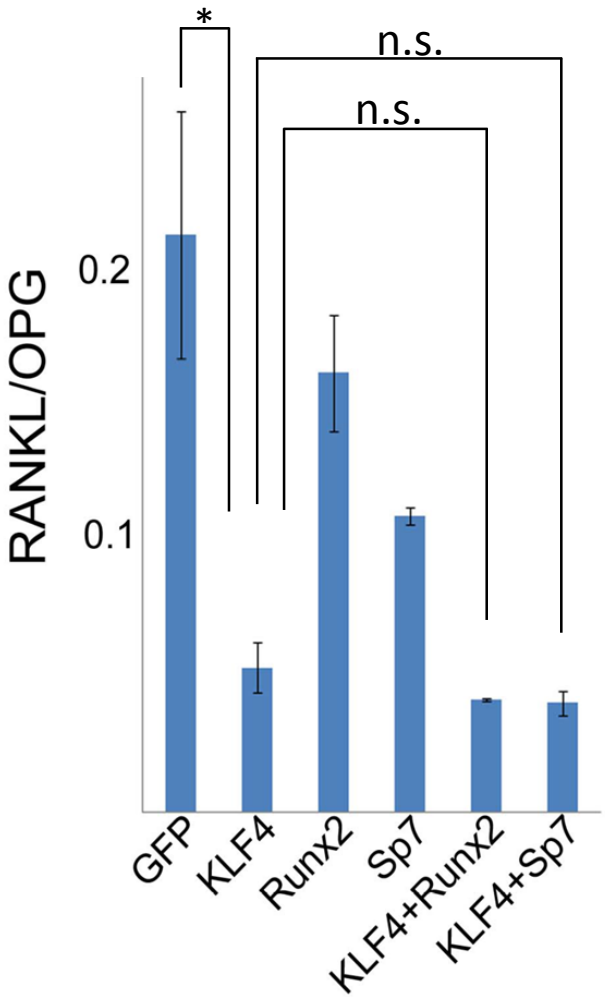


Fig. 9：KLF4によるRANKL/OPG比に対する作用にRunx2，Sp7が及ぼす影響
KLF4，Runx2，Sp7をそれぞれ単独，KLF4とRunx2もしくはSp7を共発現させた骨芽細胞の培養6日目におけるOsteoprotegerin(OPG) 発現量に対するRANKL発現量をリアルタイムPCRにより測定した．統計学的検定の結果は GFP，KLF4，KLF4+Runx2，KLF4+Sp7の間のみを示す．*P< 0.01，n.s.；有意差なし

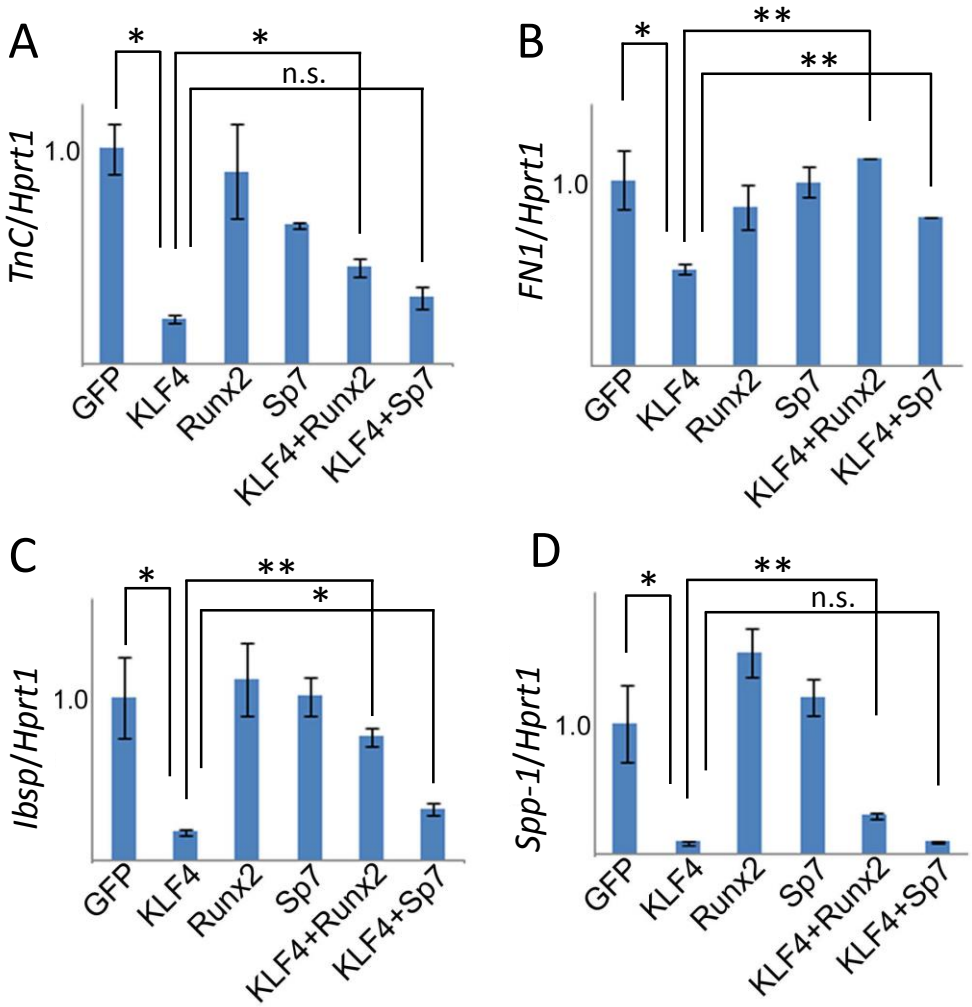


Fig. 10： **KLF4によるECM発現に対する作用にRunx2，Sp7が及ぼす影響**

KLF4，Runx2，Sp7をそれぞれ単独発現，KLF4とRunx2もしくはSp7を共発現させた骨芽細胞コンフルエント6日目における*TnC*（A），*FN1*（B），*Ibsp*（C），*Spp-1*（D）の発現をリアルタイムPCRにより測定した．統計学的検定の結果は GFP，KLF4，KLF4+Runx2，KLF4+Sp7の間のみを示す．*P< 0.05，**P< 0.01， n.s.；有意差なし

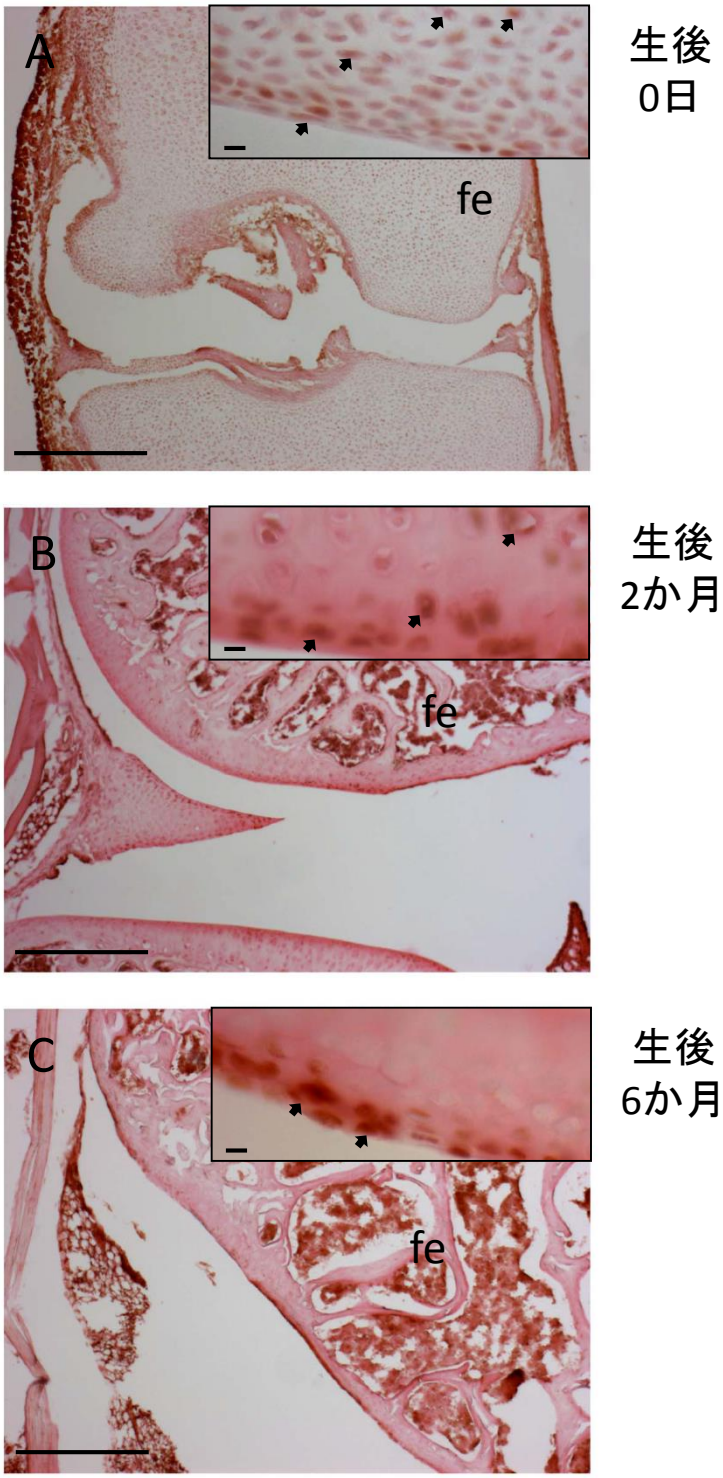


Fig. 11：マウス膝関節における**Klf4**の局在

生後0日（A），生後2か月（B），生後6か月（C）正常マウス膝関節Klf4免疫染色像．拡大像における黒矢印は核に陽性反応を認める軟骨細胞を示す．

fe ；大腿骨　スケールバー ；A-C：500μm，拡大図：10μm

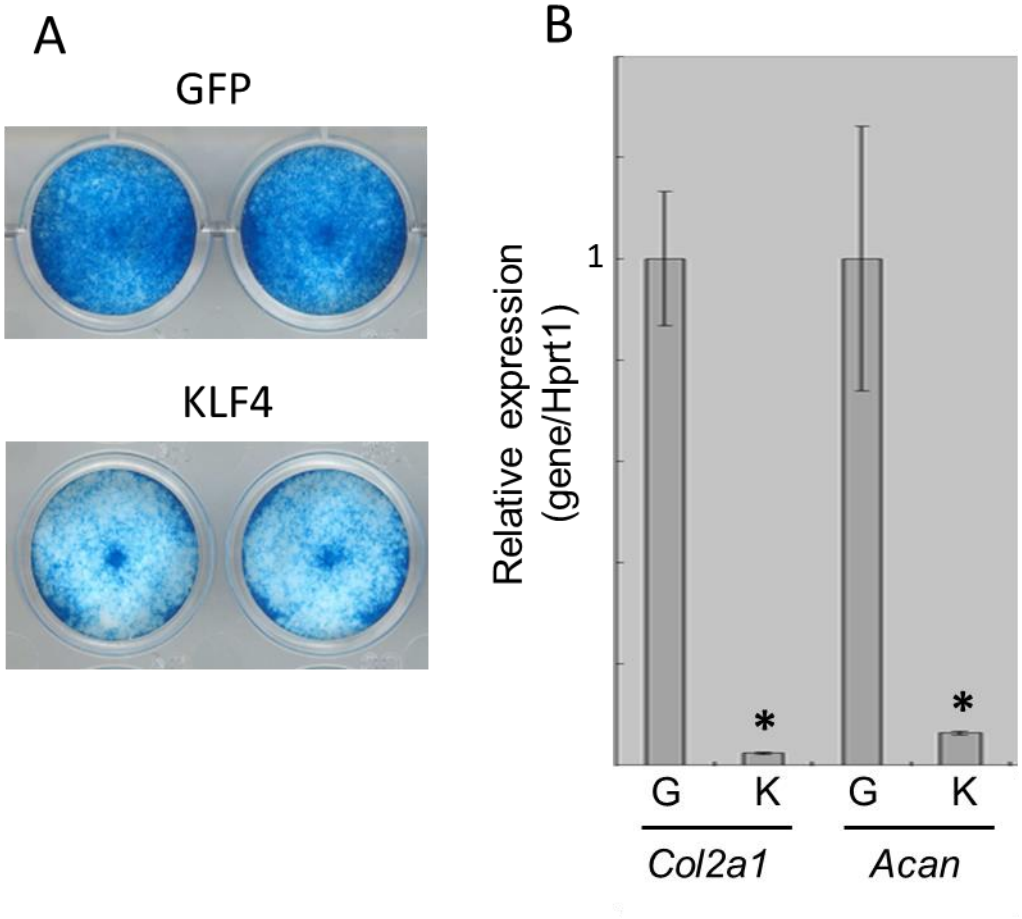
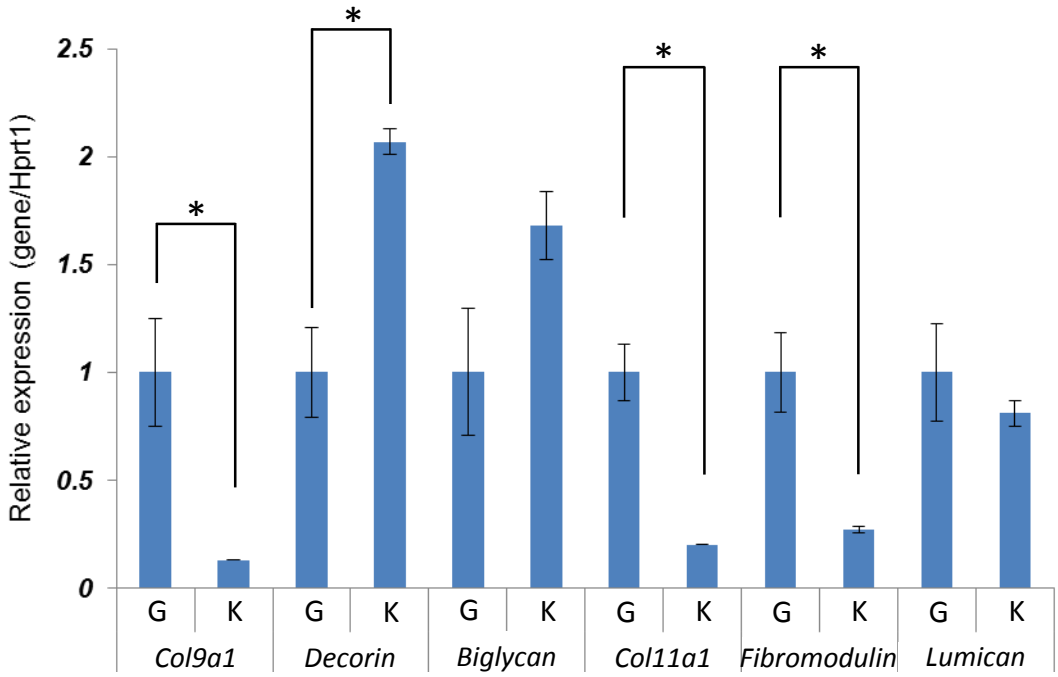


Fig. 12：軟骨細胞においてKLF4がECMに及ぼす影響

GFP，KLF4をそれぞれ発現させた軟骨細胞培養8日目における アルシアンブルー染色像（A）．GFP，KLF4をそれぞれ発現させた軟骨細胞コンフルエント後8日目におけるII型コラーゲン(*Col2a1*），アグリカン（*Acan*）の発現をリアルタイムPCRにより測定した（B）．*P< 0.05　G；GFP　K；KLF4



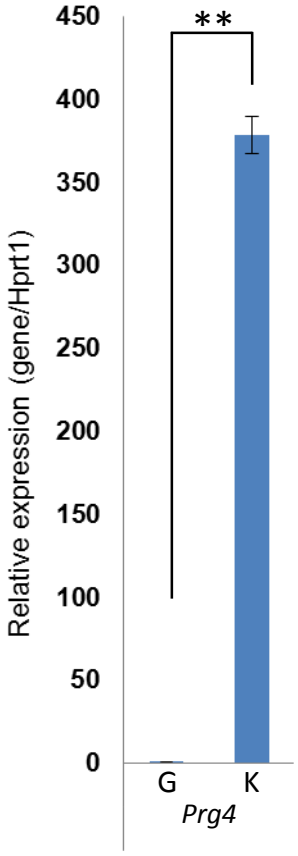


Fig. 13：KLF4を発現させた軟骨細胞におけるECM発現解析

GFP，KLF4をそれぞれ発現させた軟骨細胞コンフルエント後8日目におけるIX型コラーゲン（*Col9a1*），デコリン（*Decorin*），バイクリカン（*Biglycan*），XI型コラーゲン（*Col11a1*），フィブロモジュリン（*Fibromodulin*），ルミカン（*Lumican*），プロテオグリカン4（*Prg4*）の発現をリアルタイムPCRにより測定した． *P< 0.05，**P< 0.01

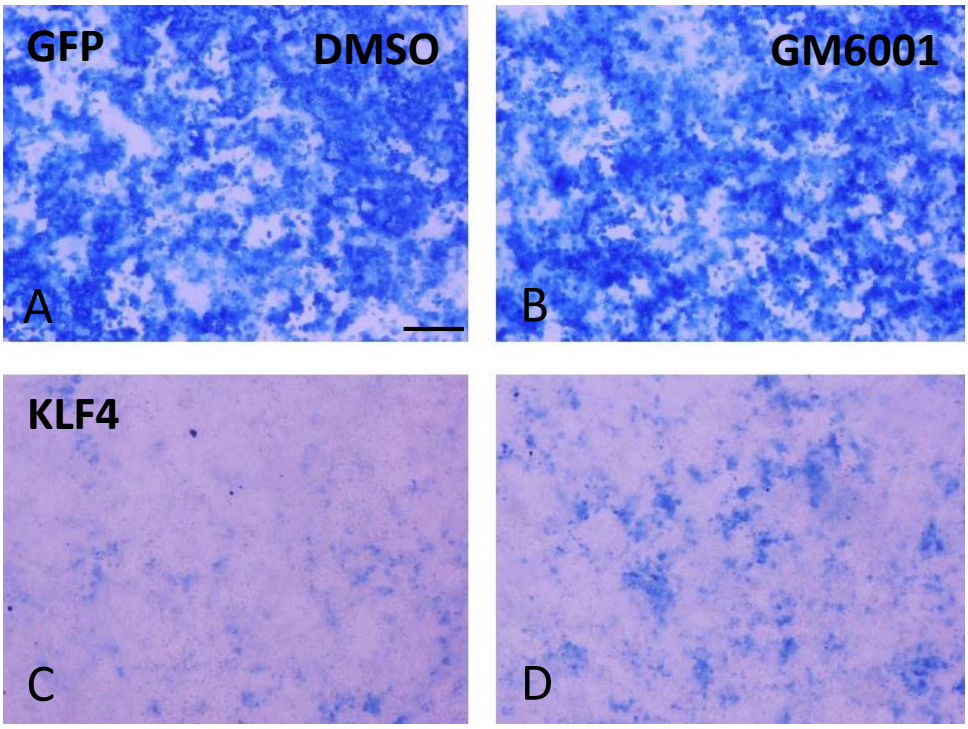


Fig. 14：軟骨細胞におけるKLF4による軟骨基質生成量低下に対するMmp阻害剤の影響

GFP，KLF4をそれぞれ発現させた軟骨細胞にMmp阻害剤であるGM6001を加えたコンフルエント後8日目のアルシアンブルー染色像（B：GFP+GM6001，D：KLF4+GM6001）．コントロールとしてジメチルスルホキシド（DMSO）を加えた（A：GFP+DMSO，C：KLF4+DMSO）．　スケールバー ；50μm

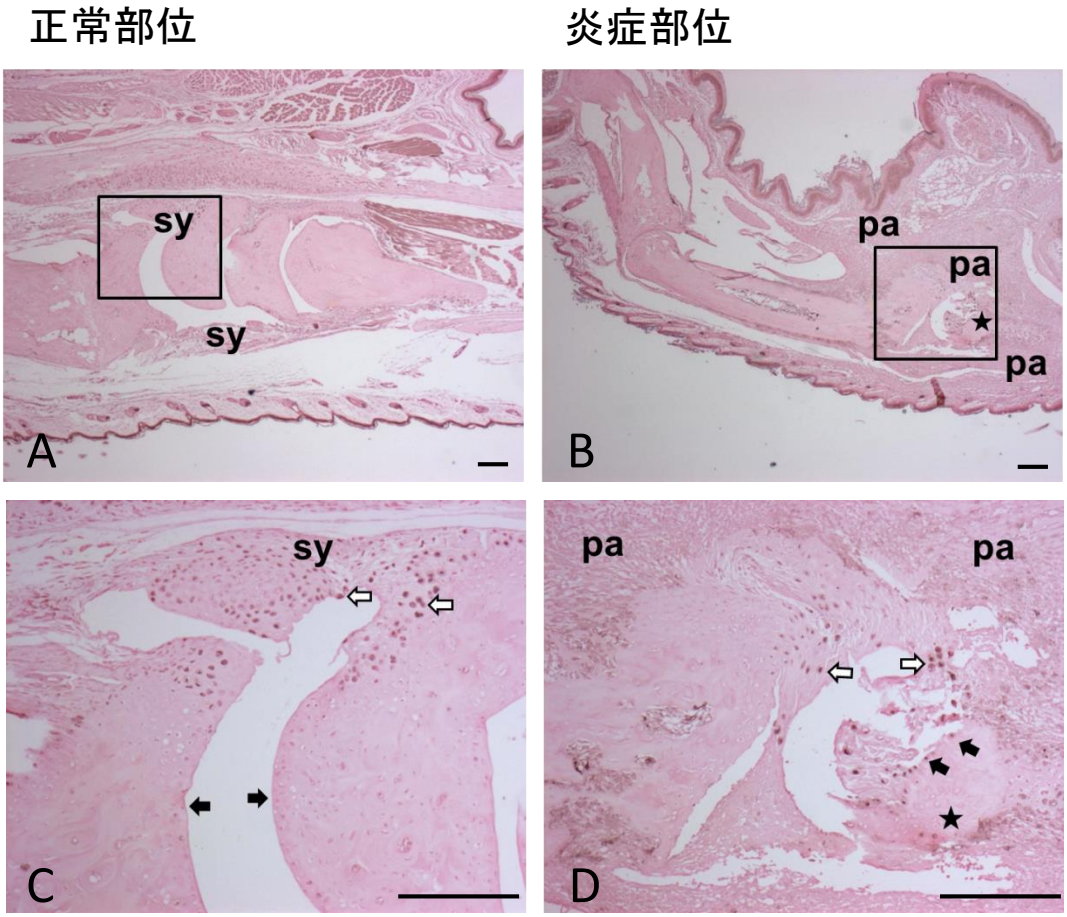


Fig. 15：関節リウマチモデルマウス指関節におけるKlf4の局在

関節リウマチモデルマウスであるD1CCマウスの生後16週指関節Klf4免疫染色像．正常部位（A，C）では滑膜（sy）が，炎症部位（B，D）ではパンヌス（pa）が見られる．正常部位の拡大像（C），炎症部位の拡大像（D）ともに核に陽性反応を認める軟骨細胞（黒矢印）と滑膜細胞（白矢印）が，炎症部位（D）では軟骨破壊部（星印）が見られる． スケールバー；200μm

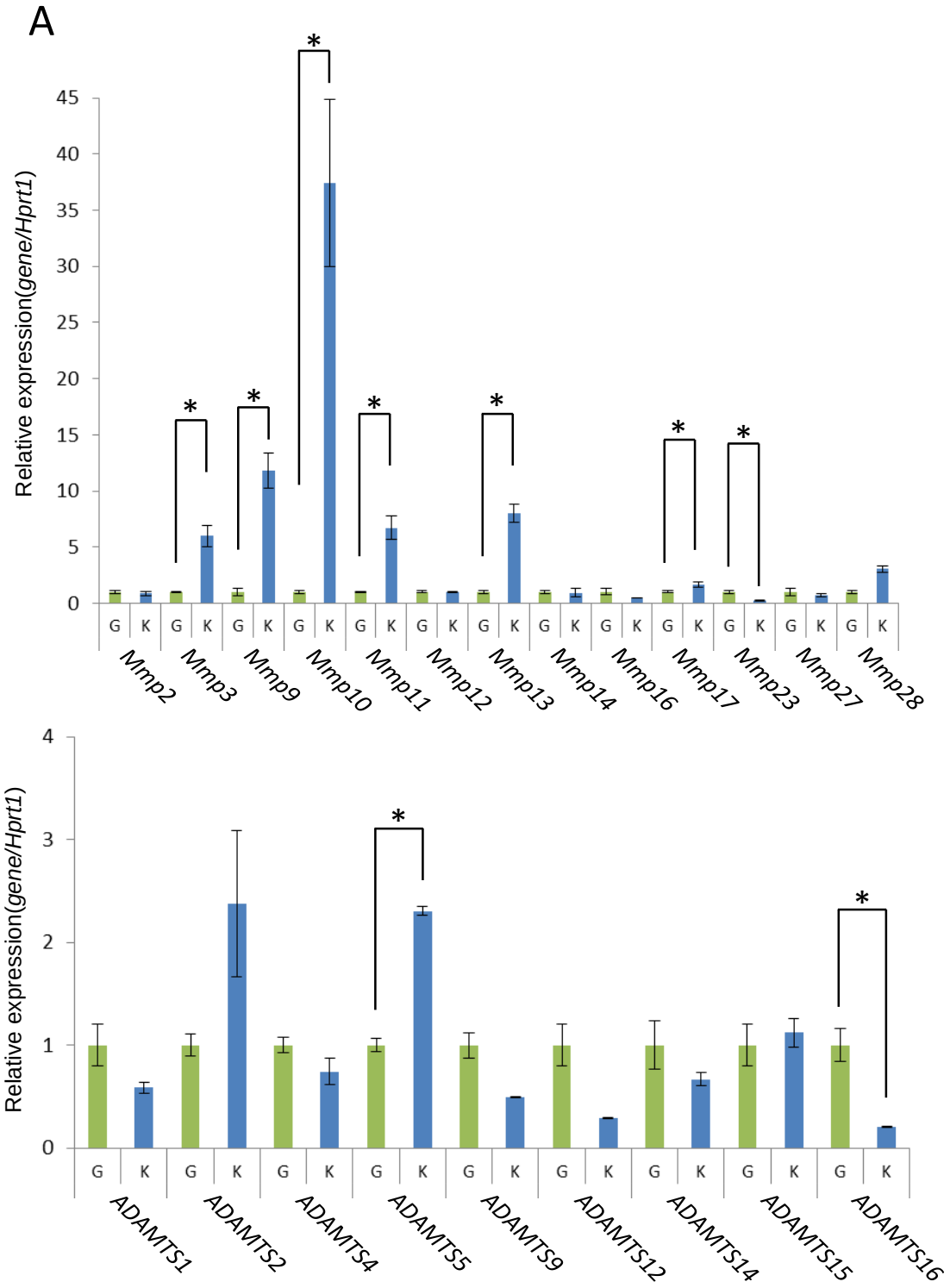
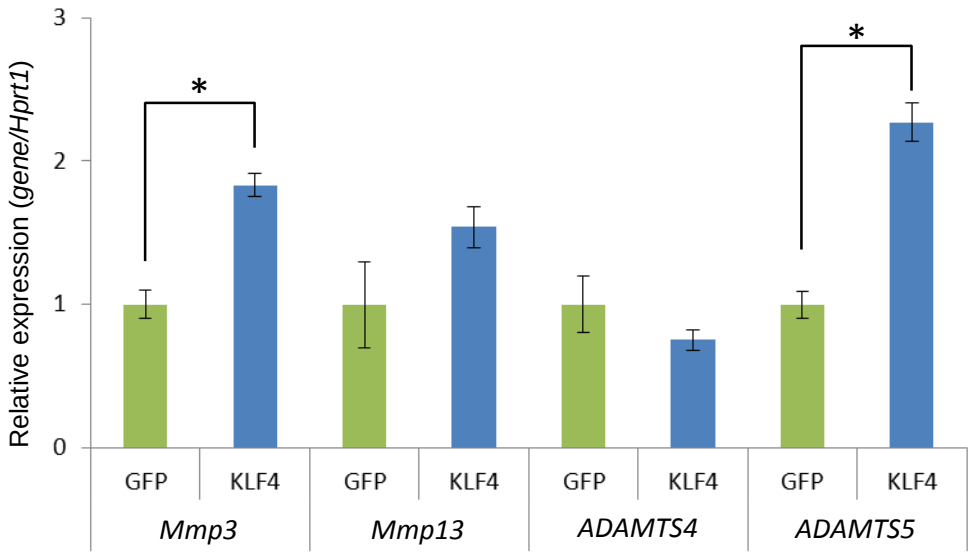


Fig. 16：KLF4を発現させた軟骨細胞におけるプロテアーゼ発現解析

GFP（G），KLF4（K）をそれぞれ発現させた軟骨細胞コンフルエント8日目（A），0日目（B）における各種プロテアーゼの発現をリアルタイムPCRにより測定した．*$P < 0.05$

B


Relative expression (gene/Hprt1)
3
2
1
0
*
*
GFP
KLF4
GFP
KLF4
GFP
KLF4
GFP
KLF4
Mmp3
Mmp13
ADAMTS4
ADAMTS5

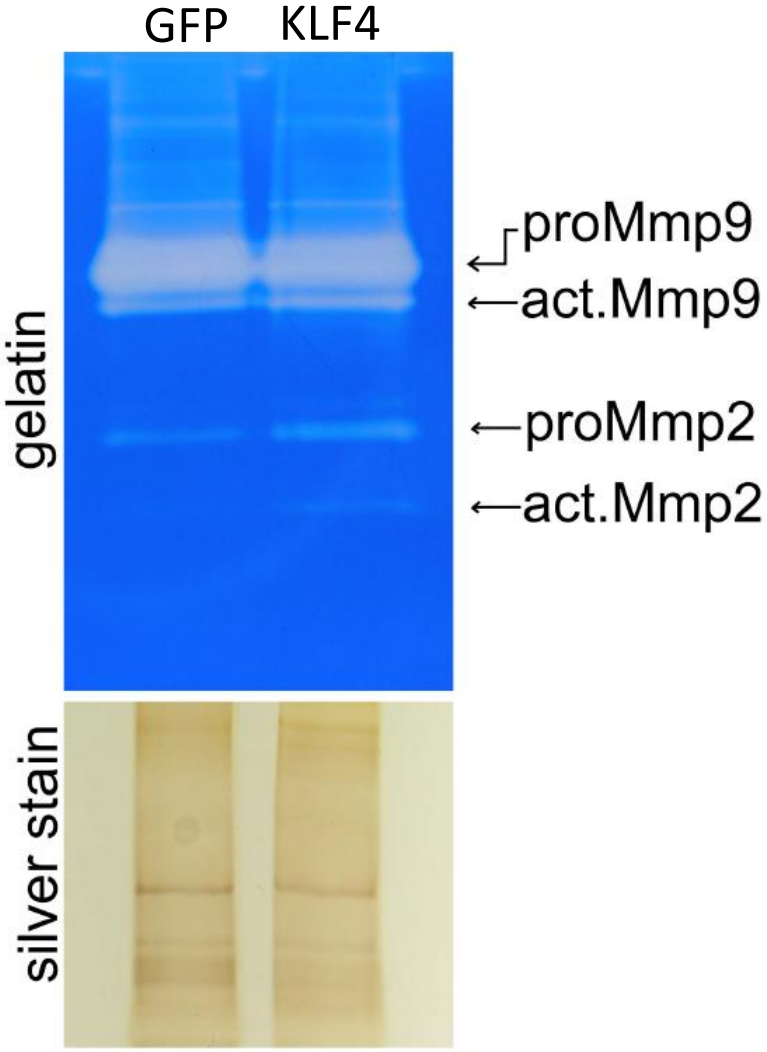


Fig. 17：KLF4を発現させた軟骨細胞におけるMmp2，Mmp9の活性検出
GFP，KLF4をそれぞれ発現させた軟骨細胞培養8日目におけるMmp9、Mmp2の活性をGelatin zymographyにより検出．Mmp9はGFP，KLF4存在下ともに潜在型Mmp9（proMmp9），活性型Mmp9（act.Mmp9）のバンドを認め，Mmp2はGFP存在下では潜在型Mmp2（proMmp2）を，KLF4存在下では潜在型Mmp2（proMmp2），活性型Mmp2（act.Mmp2）のバンドを認める（geltain）．泳動タンパク量比較の為に銀染色を行った（下図）．