



Title	骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞分化におけるLeukemia Inhibitory Factor(LIF)の機能解析
Author(s)	松下, 健太
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/54608
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

骨髓ストローマ細胞の骨芽細胞分化における
Leukemia Inhibitory Factor (LIF) の機能解析

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻（歯科保存学教室）

（指導教官：林 美加子教授）

松下 健太

本論文の一部は、第134回日本歯科保存学会(2011年6月, 千葉)、
第137回日本歯科保存学会(2012年11月, 広島)および
International Conference on Progress in Bone and Mineral
Research 2012 (November, Vienna, Austria) において発表した。

緒言

近年、失われた組織や機能の回復を目指した再生医療に関する研究が進められており、歯科における再生医療の重要な幹細胞として未分化間葉系幹細胞がある。この未分化間葉系幹細胞は、骨芽細胞、軟骨芽細胞、線維芽細胞、脂肪細胞、および神経細胞などに分化することができる(1-8)。すなわち、歯科領域において、象牙質歯髄複合体、歯根膜、そして歯槽骨の源となる幹細胞と考えられている(9)。こうした観点から、未分化間葉系幹細胞を含む骨髄ストローマ細胞の分化機構を理解することは再生医療の臨床応用を考えるうえで極めて重要である。

未分化間葉系幹細胞が多く存在する骨組織は生理的環境下で常にリモデリングが行われる(10)。骨のリモデリングは様々なサイトカインやホルモンにより調節されており(11-13)、なかでも Interleukin-6 (IL-6)ファミリーサイトカインは骨芽細胞や破骨細胞の分化を調節するサイトカインとして知られている(13-19)。例えば、マウス頭蓋冠から調整した前骨芽細胞に対し、IL-6、IL-11 および OSM は骨芽細胞への分化を誘導するが、Leukemia Inhibitory Factor (LIF) は骨芽細胞への分化を誘導しないという報告がある(20、21)。LIF には多様な機能があり、なかでもマウス ES 細胞 (Embryonic Stem Cell) を未分化

な状態に維持するのに必要な因子として知られている (22)。LIF は受容体にファミリー共通の gp130 と LIF 特異的受容体の LIFR β を持つ (23)。シグナル伝達の仕組みは以下のとおりである。LIF が受容体に結合し、二量体 (gp130 と LIFR β) を形成すると、受容体の細胞内ドメインに結合している Janus Kinase (JAK) は、自己リン酸化する。リン酸化した JAK は gp130 と LIFR β の細胞内ドメインのチロシン残基をリン酸化する。これらリン酸化されたチロシン残基は Src homology 2 (SH2)ドメインの結合モチーフとなる。ここへ転写因子 Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) が結合し、JAK によりリン酸化を受けて活性化する。活性化した STAT3 は核内に移行し、目的の遺伝子のプロモーター領域に結合する。こうして転写が開始され、目的のタンパクが合成される (24-29)。STAT3 により誘導されるタンパクとして Suppressor of cytokine signaling pathway 3 (SOCS3) がある。SOCS3 は JAK によりリン酸化された gp130 あるいは LIFR β の細胞内ドメインのチロシン残基に結合したり、JAK のキナーゼ領域に結合することにより、下流へのシグナル伝達を阻害する。このように、SOCS3 には JAK-STAT3 シグナル伝達経路を負に制御する働きがある (30-43)。このほかに、SOCS3 は SOCS-box という領域を持つ。これはユビキチン修飾に関与する ElonginB および ElonginC の足場となり、ユビキチン化によるタンパク分解を誘導するという報告がある

(44-49)。

一方、骨芽細胞の分化を制御するシグナルとして IL-6 ファミリーサイトカインのほかにも、Wnt、Bone morphogenetic protein (BMP)、Transforming growth factor- β (TGF- β)、Insulin-like growth factor (IGF)、Fibroblast growth factor (FGF)、Hedgehog (HH)シグナルなどがある (50-56)。なかでも骨芽細胞への分化を誘導する主たるシグナル伝達経路として Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路がある(55-56)。この Wnt/ β -catenin シグナル伝達の仕組みは以下のとおりである。Wnt が受容体に結合していない場合、細胞内にある β -catenin は Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) 含むタンパク複合体によってユビキチン修飾を受け、分解され、核内へ移行できない。しかし、Wnt が受容体に結合すると GSK3 をはじめとする β -catenin 抑制タンパクが受容体へと引きつけられるため、 β -catenin は分解を受けず核内へ移行することができ、転写因子として目的のタンパクの発現を誘導することができる (55-66)。また、Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路と FGF2 シグナルのクロストークが報告されており、他のシグナルと協調しながら骨芽細胞の分化を制御している (67)。

ところで、マウス頭蓋冠由来の前骨芽細胞を用いた実験において、LIF は分化促進や抑制のどちらの効果も示さないという、他の IL-6 ファミリーサイトカインとは異なる挙動を示している (20)。そして、未分化間葉系幹細胞を含む骨

髄ストローマ細胞の骨芽細胞への分化における、LIF の働きについて明らかにした報告は未だない。そこで、骨髄ストローマ細胞から骨芽細胞への分化における LIF の効果およびそのメカニズムを明らかにすることを目的として本研究を遂行した。

材料および方法

1. 骨髄ストローマ細胞の調整

4~6 週齢の C57BL/6J マウス（日本チャールズ・リバー、神奈川）の大腿骨と頸骨から骨髄細胞を採取し、10%胎仔血清（FBS）（Equitech-Bio, Texas, USA）を含む α -MEM 培地（GIBCO, New York, USA）にて 37°C、5%CO₂ 下で培養した。培養 3 日目に、浮遊細胞を PBS にて除去した。計 14 日間培養したのちトリプシン-EDTA（シグマアルドリッチジャパン、東京）にて付着細胞を回収して骨髄ストローマ細胞を得た（図 1）。

2. 骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞への分化誘導

10%FBS 含有 α -MEM に 50 μ g/ml アスコルビン酸と 10 mM β グリセルフォスフェイトおよび 10⁻⁸ M デキサメタゾン（シグマアルドリッチジャパン）を添加して骨芽細胞分化誘導培地を作成した。この培地にて骨髄ストローマ細胞を 3 \times 10⁵ /well、4 \times 10⁵ /well、5 \times 10⁵ /well の細胞数で播種し、50ng/ml LIF 添加群あるいは非添加群で 2~3 週間培養した。

3. Colony-forming units-osteoblast (CFU-O) の計測

骨髓ストローマ細胞を骨芽細胞分化誘導培地中に 50 ng/ml LIF 添加群あるいは非添加群で 3 週間培養した後、10%中性緩衝ホルマリン液で 15 分間固定した。Tris-HCl に Fast red violet LB Salt および Naphthol AS-MX phosphate (シグマアルドリッチジャパン) を溶解させて作製した ALP 染色液を加えて 45 分間放置したのち、蒸留水で 3 回洗浄した。さらに 2.5%硝酸銀水溶液を加えて 30 分間放置し、蒸留水で 3 回洗浄した。こうして、ALP 染色および von Kossa 染色をおこない、赤く染色された ALP 染色と石灰化物を黒く染色する von Kossa 染色が共に認められる Colony-forming units-osteoblast (CFU-O) (図 2) の数を顕微鏡観察下で計測した。

4. 骨芽細胞分化マーカーの定量

骨髓ストローマ細胞を 50 ng/ml LIF 添加骨芽細胞分化誘導培地あるいは非添加培地にて 2 週間培養後、Sepasol-RNA I (Nacalai Tesque, 京都) を用いて mRNA を抽出した。この mRNA を Oligo-dT プライマー (ライフテクノロジーズジャパン, 東京) および逆転写酵素 (TOYOBO, 大阪) を用いて cDNA を合成した。cDNA は、*ALP*、*Coll1a*、*BSP*、*OCN*、*Osx*、*Runx2* に特異的なプライマー (表 1) (ライフテクノロジーズジャパン) および SyberGreen PCR

master mix (Applied Biosystem, California, USA) そして ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem) を用いて (95°C 10 秒 / 60°C 30 秒)×40 サイクルのリアルタイム PCR を行った。これらの遺伝子発現量の定量は内在性コントロールとして用いた L32 遺伝子の発現量との比較により行った。この相対的定量化に必要な計算は、 $\Delta\Delta Ct$ 法により行った。

5. ウェスタンブロッティング

骨髄ストローマ細胞を 50 ng/ml LIF で刺激を行った。その細胞を細胞溶解バッファー[20 mM Tris HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 1% NP40, 500 μ M sodium vanadate, 1 mM dithiothreitol, 5 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride]にて溶解し、30 分間の遠心分離 (14,000rpm, 4°C) 後に、上清を回収し、これをタンパク抽出液とした。タンパク抽出液を 3×Laemmli's sodium dodecyl sulfate (SDS) サンプルバッファーにて希釈し、100°Cで5分間加熱処理した。SDS-PAGEにてサンプルを展開し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。ニトロセルロースメンブレンをブロックエース (雪印, 札幌) にてブロッキングした後、ラビット抗リン酸化 SATA3 抗体 (Cell Signaling, Massachusetts, USA)、ラビット抗 STAT3 抗体 (Cell Signaling)、ラビット抗 SOCS3 抗体 (Cell Signaling)、ラビット抗 β -catenin

抗体 (Cell Signaling) およびラビット抗 β -actin (Cell Signaling) と反応させた。これに西洋わさび過酸化酵素 (HRP) 標識抗ラビット IgG 抗体を反応させ、ECL キット (GE healthcare Japan, 東京) を用いて発光シグナルを増幅した後、X 線フィルム (Kodak, New York, USA) に現像した。

6. SOCS3 ノックダウン骨髄ストローマ細胞の作成

骨髄ストローマ細胞に MOI of 1 で shSOCS3 Lentiviral Transduction Particles (シグマアルドリッチジャパン) を 8 μ g/ml 臭化ヘキサジメトリン (シグマアルドリッチジャパン) とともに 24 時間培養し、shRNA 法にて SOCS3 ノックダウン骨髄ストローマ細胞を作成した。

7. 免疫沈降

骨髄ストローマ細胞を 50 ng/ml LIF で 2 時間刺激した後、細胞を細胞溶解バッファー [20 mM Tris HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 1% NP40, 500 μ M sodium vanadate, 1 mM dithiothreitol, 5 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] にて溶解した後、30 分間の遠心分離 (14,000rpm, 4°C) を行った。こうして得られた上清に Protein A Sepharose (Adar Biotech, Rehovot, Israel) にラビット抗 β -catenin 抗体 (Cell Signaling)

を吸着させた物を加え、4℃で 24 時間振とうした。その後、細胞溶解バッファ
ーで 3 回洗浄し、×3 SDS バッファーに溶解し、SDS-PAGE にて展開し、ラ
ビット抗 SOCS3 抗体 (Cell Signaling) およびラビット抗 β -catenin 抗体 (Cell
Signaling) にてブロットした。

8. 統計処理

統計学的有意差の検定には、Student's-t 検定および ANOVA 検定を用いた。

結果

1. 骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞分化に対する LIF の機能解析

骨芽細胞分化誘導培地で培養したものでは多数の CFU-O を認めた (図 3 A, C)。これに対し、LIF を加えたものでは CFU-O がほとんど認められなかった (図 3B, C)。そして、LIF の効果は 3×10^5 /well, 4×10^5 /well, 5×10^5 /well のいずれの細胞数においても認められた (図 3C)。また、LIF は 0.5 ng/ml、5 ng/ml、50 ng/ml のいずれの濃度でも CFU-O の形成をほぼ完全に抑制し、その効果は濃度依存的であった (図 4)。

2. LIF による骨芽細胞分化マーカー発現量の検証

次に、骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞分化に対する LIF の抑制効果を骨芽細胞分化マーカーである *ALP*、*Col1a*、*BSP*、*OCN*、*Osx*、*Runx2* の発現量について着目し、リアルタイム PCR にて解析した。その結果、LIF はいずれの骨芽細胞分化マーカーの発現量に対しても有意に抑制していた (図 5)。

3. LIF-STAT3 シグナル伝達経路の解析

骨髄ストローマ細胞の LIF 刺激による LIF-STAT3 シグナル伝達経路の活性化について解析を行った。LIF の刺激後、5 分、15 分、30 分後にリン酸化 STAT3 を検出した (図 6)。次に、LIF-STAT3 シグナル伝達経路の活性化により転写される *SOCS3* の発現についてリアルタイム PCR にて解析したところ、骨芽細胞分化誘導培地に LIF 存在下で培養したものは、LIF 非存在下で培養したものと比べて有意に *SOCS3* の発現量が増加していた (図 7)。また、タンパクレベルでの発現量についてウエスタンブロッティング法にて調べたところ、LIF 刺激 2 時間後に、*SOCS3* のタンパクを検出した (図 8)。

4. *SOCS3* ノックダウン骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞分化に対する LIF の機能解析

まず、ウエスタンブロッティング法にて、*SOCS3* タンパクがノックダウンされていることを確認した (図 9A)。この *SOCS3* ノックダウン骨髄ストローマ細胞を LIF 添加骨芽細胞分化誘導培地にて 3 週間培養後、ALP 染色と von Kossa 染色を行った。その結果、LIF 存在下にて培養しても骨芽細胞への分化抑制効果は認められず、骨芽分化誘導培地単独で培養したものと同様に多数の

CFU-O が観察された (図 9B, C)。

5. LIF による骨芽細胞分化における β -catenin への影響および SOCS3 と β -catenin の会合

骨髓ストローマ細胞を 50 ng/ml LIF 添加あるいは非添加骨芽細胞分化誘導培地で 5 日間培養した。これら培養細胞からタンパクを調整し β -catenin の発現を確認したところ、LIF 存在下で培養したものでは、 β -catenin タンパクの発現量減少が認められた (図 10A)。

また、骨髓ストローマ細胞において LIF によって誘導される SOCS3 と β -catenin の会合について免疫沈降法を用いて調べたところ、SOCS3 は β -catenin と会合することが明らかとなった (図 10B)。

考察

これまでにラット頭蓋冠由来の骨芽細胞に対して LIF は骨芽細胞への分化を抑制するという報告があったが(21)、マウス骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞への分化に対しての LIF の働きについての報告は未だない。そこで、本研究では骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞への分化に対する LIF の効果と、そのメカニズムを明らかにすることを研究の目的とした。解析の結果、LIF 非存在下の骨芽細胞分化誘導培地で培養したものでは多数の CFU-O が認められたのに対し、LIF 存在下のものでは CFU-O はほとんど認められなかった。このことから、LIF は骨髄ストローマ細胞の分化を抑制的に制御することが明らかとなった(図 3、4)。また、リアルタイム PCR の解析結果から骨芽細胞分化マーカーである *ALP*、*Col1a*、*BSP*、*OCN*、*Osx*、*Runx2* の発現量が有意に抑制されたことから、遺伝子発現レベルにおいても LIF は骨芽細胞への分化を抑制していることが検証された(図 5)。これらの結果から、LIF は骨芽細胞の分化を抑制することがわかった。

LIF の受容体として gp130 および LIFR β があり、LIF がこれら受容体と結合すると、その下流のシグナル伝達経路である LIF-JAK-STAT3 シグナル伝達経路を活性化することが知られている(24-29)。この LIF による骨芽細胞への分

化抑制は、LIF-JAK-STAT3 シグナル伝達経路が活性化し、これにより誘導されるタンパクが骨芽細胞分化に対し何らかの影響を及ぼしているという仮説を立てた。まず、骨髓ストローマ細胞において、このシグナル伝達経路が LIF により活性化されるか否かについてウエスタンブロッティング法にて調べたところ、LIF の刺激によりリン酸化 STAT3 が認められた (図 6)。これにより、骨髓ストローマ細胞において LIF により、このシグナル伝達経路が活性化することがわかった。次に、この伝達経路によって誘導される SOCS3 タンパクに注目した。このタンパクはリン酸化されたチロシン残基に結合し、JAK によるシグナル伝達分子のリン酸化を抑制することのほかに、ユビキチン化によるタンパク分解にも関与することが知られている (30-43)。この SOCS3 によるユビキチン化は、ユビキチン化する目的のタンパク質に SOCS3 タンパク中の SH-2 ドメイン領域で結合する。そして、SOCS3 中の SOCS-box 領域が ElonginB や ElonginC などのユビキチン修飾に関与するタンパクの足場として機能する結果、効率的に目的タンパクを分解すると考えられている (44-49)。そこで、このユビキチン化によるタンパク分解に重要な働きを持つ SOCS3 に着目し、研究を進めた。まず、LIF により骨髓ストローマ細胞において SOCS3 の mRNA の発現が増加することをリアルタイム PCR で、タンパクの発現が誘導されることをウエスタンブロッティング法にて確認した (図 7、8)。そして、

LIF-STAT3 シグナル伝達経路により発現が誘導される SOCS3 の働きについて検証するために、レンチウイルスを用いた shRNA 法によるノックダウン実験を行った。その結果、SOCS3 を shRNA 法にてノックダウンした場合では、LIF 存在下の骨芽細胞分化誘導培地で培養しても多数の CFU-O が観察された (図 9B、C)。このことから、LIF による骨髓ストローマ細胞の骨芽細胞への分化抑制は LIF-JAK-STAT3 シグナル伝達経路が活性化することにより SOCS3 が誘導され、この SOCS3 が重要な役割を担っていることが示唆された。

次に、骨芽細胞の分化誘導を制御している Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路に着目した (50-51)。 β -catenin は Wnt が受容体に結合していない非活性化状態では、Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) などによるユビキチン化により分解され、核内に移行することができず転写因子として機能することができない。しかし、Wnt が受容体に結合すると GSK3 など β -catenin のユビキチン化に関与する分子は Wnt 受容体に結合するため、 β -catenin はタンパク分解を受けなくなり、核内に移行することができる。こうして β -catenin は転写因子として機能することができ、目的の遺伝子の発現を誘導することができる (50-61)。

そこで、SOCS3 が β -catenin と会合し、ユビキチン化を促進しているという仮説を立て、免疫沈降法にてこの仮説の検証を試みた。その結果、SOCS3 は β -catenin と会合していることが明らかとなった (図 10 B)。また、

LIF-JAK-STAT3 シグナル伝達経路の活性化による β -catenin の発現量の変化をウエスタンブロッティング法にて解析したところ、LIF を加えて培養した骨髓ストローマ細胞では β -catenin の発現量が減少していることがわかった(図 10A)。このことから、LIF-JAK-STAT3 シグナル伝達経路により誘導される SOCS3 は、 β -catenin と会合し (図 10 B)、 β -catenin をユビキチン化し、分解していることが強く示唆された(図 11)。この結果から、LIF は骨髓ストローマ細胞の骨芽細胞への分化を抑制的に制御していることが明らかとなった。

これまで、マウス頭蓋冠由来の前骨芽細胞に対して IL-6 ファミリーサイトカインのうち、LIF のみが骨芽細胞への分化促進効果を示していない報告がある (20) が、本研究の対象としたマウス骨髓ストローマ細胞に対する LIF 以外の IL-6 ファミリーサイトカインの効果の解析は今後の検討課題である。

そして、LIF によって誘導される SOCS3 が β -catenin をユビキチン化していることを確認するために、抗ユビキチン抗体を用いて、 β -catenin タンパクへのユビキチンの結合を解析することが、必要であると考ええる。さらに、SOCS3 をノックダウンした骨髓ストローマ細胞では LIF 刺激によって β -catenin の発現量の減少に変化を及ぼすのかを検討することも必要であると考ええる。

次に、 β -catenin のその他の機能に目を向けると、 β -catenin は Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の転写因子として働くだけではなく、細胞接着に関与する

E-cadherin と細胞骨格タンパクとの結合を介在するアダプタータンパクとして重要な働きがある(68-77)。LIF によって誘導される SOCS3 に β -catenin が分解され、細胞内の β -catenin 量が減少すると細胞接着にも影響を及ぼし、他の細胞との接着をも阻害している可能性がある。この細胞接着の阻害が分化抑制に影響をおよぼす可能性も否定はできない。その例として、Embryonic stem cell (ES 細胞) においては、E-cadherin および β -catenin をノックアウトしたマウス ES 細胞は分化抑制剤を添加しなくても未分化能を維持するという報告がある (78)。このことから、細胞接着が細胞分化にとって重要な因子となることが示されており、骨髄ストローマ細胞の分化においても重要である可能性がある。よって、本研究で明らかとなった LIF による分化抑制は Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の阻害のみならず、細胞接着も阻害し分化を抑制していることも推察される。今後、これを確かめるために、LIF 添加骨芽細胞分化誘導培地で培養した骨髄ストローマ細胞の細胞表面の E-cadherin や細胞膜付近の β -catenin の局在の変化を免疫蛍光染色等により確認することを計画している。

結論

LIF は、骨髄ストローマ細胞において、LIF-STAT3 シグナル伝達経路を活性化させて SOCS3 を誘導し、SOCS3 により Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路を抑制する。その結果、LIF は骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞分化を抑制的に制御していることを明らかにした。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、適切なるご指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座(歯科保存学教室)、林 美加子教授ならびに大阪大学副学長、恵比須 繁之教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、終始変わらぬ御指導を賜りました伊藤 祥作博士に心から感謝いたします。

最後に、本研究に御協力下さいました大阪大学歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文献

1. Owen M, Friedenstein AJ. (1988): Stromal stem cells: Marrow-derived osteogenic precursors. Ciba Found Symp 136: 42-60
2. Owen M. (1988): Marrow stromal stem cells. J Cell Sci Suppl 10: 63-76
3. Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. (1988): Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: Effect of dexamethasone. J Cell Biol 106: 2139-2151
4. Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. (1990): Continuously growing bipotential and monopotential myogenic, adipogenic, and chondrogenic subclones isolated from the multipotential RCJ 3.1 clonal cell line. Dev Biol 142: 313-318
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284: 143-147
6. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. (2001): Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. Stem Cells 19: 180-192

7. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. (2003): Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116: 1827-1835
8. Boeuf S, Richter W. (2010): Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors. *Stem Cell Res Ther* 13: 31-40
9. Ishizaka R, Iohara K, Murakami M, Fukuta O, Nakashima M. (2012): Regeneration of dental pulp following pulpectomy by fractionated stem/progenitor cells from bone marrow and adipose tissue. *Biomaterials* 33: 2109-2118
10. Wagner EF, Karsenty G. (2001): Genetic control of skeletal development. *Curr Opin Genet Dev* 5: 527-532
11. Rodan GA, Martin TJ. (2000): Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289: 1508-1514
12. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. (2003): Osteoclast differentiation and activation . *Nature* 15: 337-342
13. Harada S, Rodan GA. (2003): Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 15: 349-355
14. Sims NA, Walsh NC. (2010): GP130 cytokines and bone remodelling in health and disease. *BMB Rep* 43: 513-523

15. Manolagas S.C. (1995): Role of cytokine in bone resorption. *Bone* 17: 63-67
16. Nishimura R, Moriyama K, Yasukawa K, Mundy G. R, and Yoneda T. (1998): Combination of interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors induces differentiation and activation of JAK-STAT and MAP kinase pathways in MG-63 human osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 13: 777-785
17. Malaval L, Liu F, Vernallis AB, Aubin JE. (2005): gp130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors. *J Cell Physiol* 204: 585-593
18. Udagawa N, Takahashi N, Katagiri T, Tamura T, Wada S, Findlay DM, Martin TJ, Hirota H, Taga T, Kishimoto T, Suda T. (1995): Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med* 182: 1461-1468
19. O'Brien CA, Gubrij I, Lin SC, Saylor RL, Manolagas SC. (1999): STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. *J Biol Chem*

274:19301-1938

20. Itoh S, Udagawa N, Takahashi N, Yoshitake F, Narita H, Ebisu S, Ishihara K.(2006): A critical role for interleukin-6 family-mediated Stat3 activation in osteoblast differentiation and bone formation. *Bone* 39: 505-512
21. Falcon D, Oizumi K, Aubin JE. (2007): Leukemia inhibitory factor influences the Fate choice of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells* 25: 305-312
22. Hilton DJ. (1992): LIF: lots of interesting functions. *Trends Biochem Sci* 17: 72-76
23. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. (1998): Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334: 297-314
24. Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U, Starnes C, Lile J, Scully S, Guo J, Elliott G, McNinch J, Shaklee CL, Freeman D, Manu F, Simonet WS, Boone T, Chang MS. (1999): Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: A cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11458-11463

25. Hirano T, Nakajima K, Hibi M. (1997): Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev* 8: 241-252
26. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. (2003): IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149: 1-38
27. Ishihara K, Hirano T. (2002): Molecular basis of the cell specificity of cytokine action. *Biochim Biophys Acta* 1592: 281-296
28. Hirano T, Ishihara K, Hibi M. (2000): Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 15: 2548-2556
29. Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE Jr, Yancopoulos GD. (1995): Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267: 1349-1353
30. Krebs D, Hilton D. (2001): SOCS Proteins: Negative Regulators of Cytokine Signaling. *Stem Cells* 19: 378-387

31. Tan JC, Rabkin R. (2005): Suppressors of cytokine signaling in health and disease. *Pediatr Nephrol* 20: 567-575
32. Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. (2003): Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol* 4: 1169-1176
33. Croker BA, Kiu H, Nicholson SE. (2008): SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19: 414-422
34. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. (2007): SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7: 454-465
35. Boyle K, Robb L. (2008): The role of SOCS3 in modulating leukaemia inhibitory factor signalling during murine placental development. *J Reprod Immunol* 77: 1-6
36. Larsen L, Röpke C. (2002): Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *APMIS* 110: 833-844
37. Alexander WS, Starr R, Metcalf D, Nicholson SE, Farley A, Elefanty AG, Brysha M, Kile BT, Richardson R, Baca M, Zhang JG, Willson TA, Viney EM, Sprigg NS, Rakar S, Corbin J, Mifsud S, DiRago L, Cary D, Nicola NA, Hilton DJ. (1999): Suppressors of cytokine signaling (SOCS): negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* 66: 588-592

38. Starr R, Hilton DJ. (1998): SOCS: suppressors of cytokine signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 1081-1085
39. Nicholson SE, Hilton DJ. (1998): The SOCS proteins: a new family of negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* 63: 665-668
40. Cooney RN. (2002): Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 17: 83-90
41. Kile BT, Alexander WS. (2001): The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cell Mol Life Sci* 58: 1627-1635
42. Nicola NA, Greenhalgh CJ. (2000): The suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins: important feedback inhibitors of cytokine action. *Exp Hematol* 28: 1105-1112
43. Krebs DL, Hilton DJ. (2000): SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 113: 2813-2819
44. Kohroki J, Nishiyama T, Nakamura T, Masuho Y. (2005): ASB proteins interact with Cullin5 and Rbx2 to form E3 ubiquitin ligase complexes. *FEBS Letters* 579: 6796-6802

45. Piessevaux J, Lavens D, Peelman F, Tavernier J. (2008): The many faces of the SOCS box. *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 371-381
46. Babon1 J, Sabo J, Zhang J, Nicola N, Norton R. (2009): The SOCS box encodes a hierarchy of affinities for Cullin5: implications for ubiquitin ligase formation and cytokine signaling suppression. *J Mol Biol* 20: 162-174
47. Linossi EM, Nicholson SE. (2012): The SOCS box-adapting proteins for ubiquitination and proteasomal degradation. *IUBMB Life* 64: 316-323
48. Pintard L, Willems A, Peter M. (2004): Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J* 21: 1681-1687
49. Kile BT, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ. (2002): The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci* 27: 235-2341
50. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Suda T, Yoshiki S. (1991): Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol.* 113: 681-687

51. Noda M, Camilliere JJ. (1989): In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology*. 124: 2991-2994
52. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. (1989): Insulin-like growth factor (IGF) and bone. *Connect Tissue Res*. 20: 277-282
53. Naski MC, Ornitz DM. (1998): FGF signaling in skeletal development. *Front Biosci*. 3: 781-794
54. Tickle C, Eichele G. (1994): Vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Biol*. 10: 121-152
55. Hoepfner L, Secreto F, Westendorf J. (2009): Wnt Signaling as a Therapeutic Target for Bone Diseases. *Expert Opin Ther Targets* 13: 485-496
56. Kubota T, Michigami T, Ozono K. (2009): Wnt signaling in bone metabolism. *J Bone Miner Metab* 27: 265-271
57. Clevers H, Nusse R. (2012): Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 8: 1192-1205
58. Reya T, Clevers H. (2005): Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 14: 843-850

59. Sethi JK, Vidal-Puig A. (2010): Wnt signalling and the control of cellular metabolism. *Biochem J* 15:1-17
60. Nusse R. (2012): Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: 4-9
61. Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, Westendorf JJ. (2012): Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene* 15: 1-18
62. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. (2011): New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int Rev Cell Mol Biol* 291: 21-71
63. Kikuchi A. (2000): Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 16: 243-248
64. Herr P, Hausmann G, Basler K. (2012): WNT secretion and signalling in human disease. *Trends Mol Med* 18: 483-493.
65. Whyte JL, Smith AA, Helms JA. (2012): Wnt signaling and injury repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: 4-8
66. Niehrs C, Acebron SP. (2012): Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO J* 22: 2705-2713

67. Fei Y, Xiao L, Doetschman T, Coffin DJ, Hurley MM. (2011): Fibroblast growth factor 2 stimulation of osteoblast differentiation and bone formation is mediated by modulation of the Wnt signaling pathway. *J Biol Chem.* 25: 40575-40583
68. Gumbiner BM. (1996): Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 9: 345-357
69. Shapiro L, Weis WI. (2009): Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: 1-22
70. Fu C, Jiang A. (2010): Generation of tolerogenic dendritic cells via the E-cadherin/beta-catenin-signaling pathway. *Immunol Res* 46: 72-78
71. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. (2009): E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28: 151-166
72. Wilusz M, Majka M. (2008): Role of the Wnt/beta-catenin network in regulating hematopoiesis. *Arch Immunol Ther Exp* 56: 257-266
73. Nelson WJ. (2008): Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans* 36: 149-155

74. Daugherty RL, Gottardi CJ. (2007): Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology* 22: 303-309
75. Xu W, Kimelman D. (2007): Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *J Cell Sci* 1: 3337-3344
76. Hartsock A, Nelson WJ. (2007): Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778: 660-669
77. Perez-Moreno M, Fuchs E. (2006): Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell* 11: 601-612
78. Soncin F, Mohamet L, Eckardt D, Ritson S, Eastham AM, Bobola N, Russell A, Davies S, Kemler R, Merry CL, Ward CM. (2009): Abrogation of E-cadherin-mediated cell-cell contact in mouse embryonic stem cells results in reversible LIF-independent self-renewal. *Stem Cells* 27:2069-2080

表1 リアルタイム PCR に使用したプライマー

ALP	forward	5'-CCAACCTCTTTTGTGCCAGAGA-3'
ALP	reverse	5'-GGCTACATTGGTGTGAGCTTTT-3'
Col1a	forward	5'-GCTCCTCTTAGGGGCCACT-3'
Col1a	reverse	5'-CCACGTCTCACCATTGGGG-3'
BSP	forward	5'-CAGGGAGGCAGTGACTCTTC-3'
BSP	reverse	5'-AGTGTGGAAAGTGGCGTT-3'
OCN	forward	5'-CTGACCTCACAGATGCCAAGC-3'
OCN	reverse	5'-TGGTCTGATAGCTCGTCACAAG-3'
Osx	forward	5'-ATGGCGTCCTCTCTGCTTG-3'
Osx	reverse	5'-TGAAAGGTCAGCGTATGGCTT-3'
Runx2	forward	5'-TGTTCTCTGATCGCCTCAGTG-3'
Runx2	reverse	5'-CCTGGGATCTGTAATCTGACTCT-3'

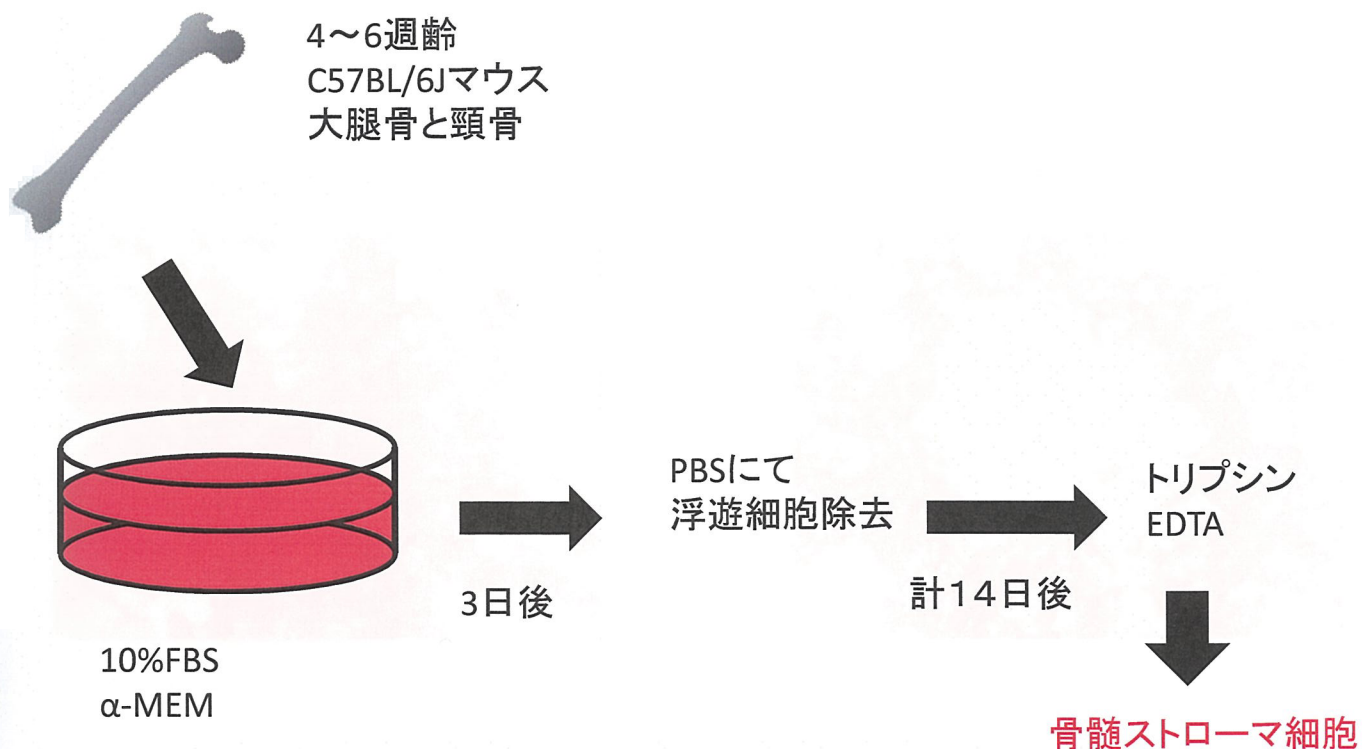
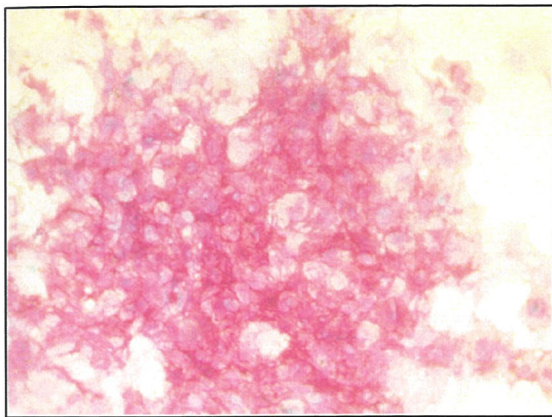


図1 骨髓ストローマ細胞の調整

4～6週齢のC57BL/6Jマウスの大腿骨と頸骨から骨髓細胞を採取し、10%胎仔血清（FBS）を含む α -MEM培地にて37℃、5%CO₂下で培養した。培養3日目に、浮遊細胞をPBSにて除去した。計14日間培養したのちトリプシン-EDTAにて付着細胞を回収して骨髓ストローマ細胞を得た。

CFU-ALP



CFU-O

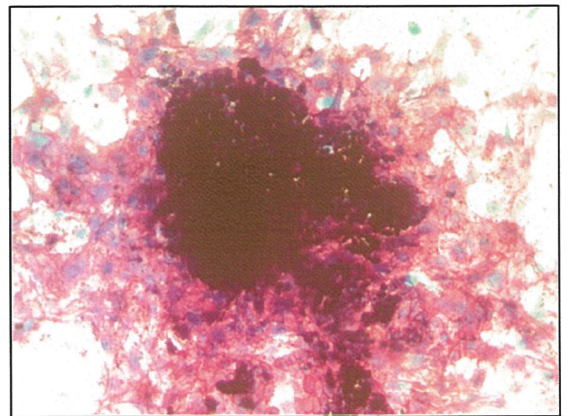


図2 Colony-forming units-osteoblast (CFU-O)

CFU-O は赤く染色された ALP染色と石灰化物を黒く染色するvon Kossa染色が共に認められるもの。

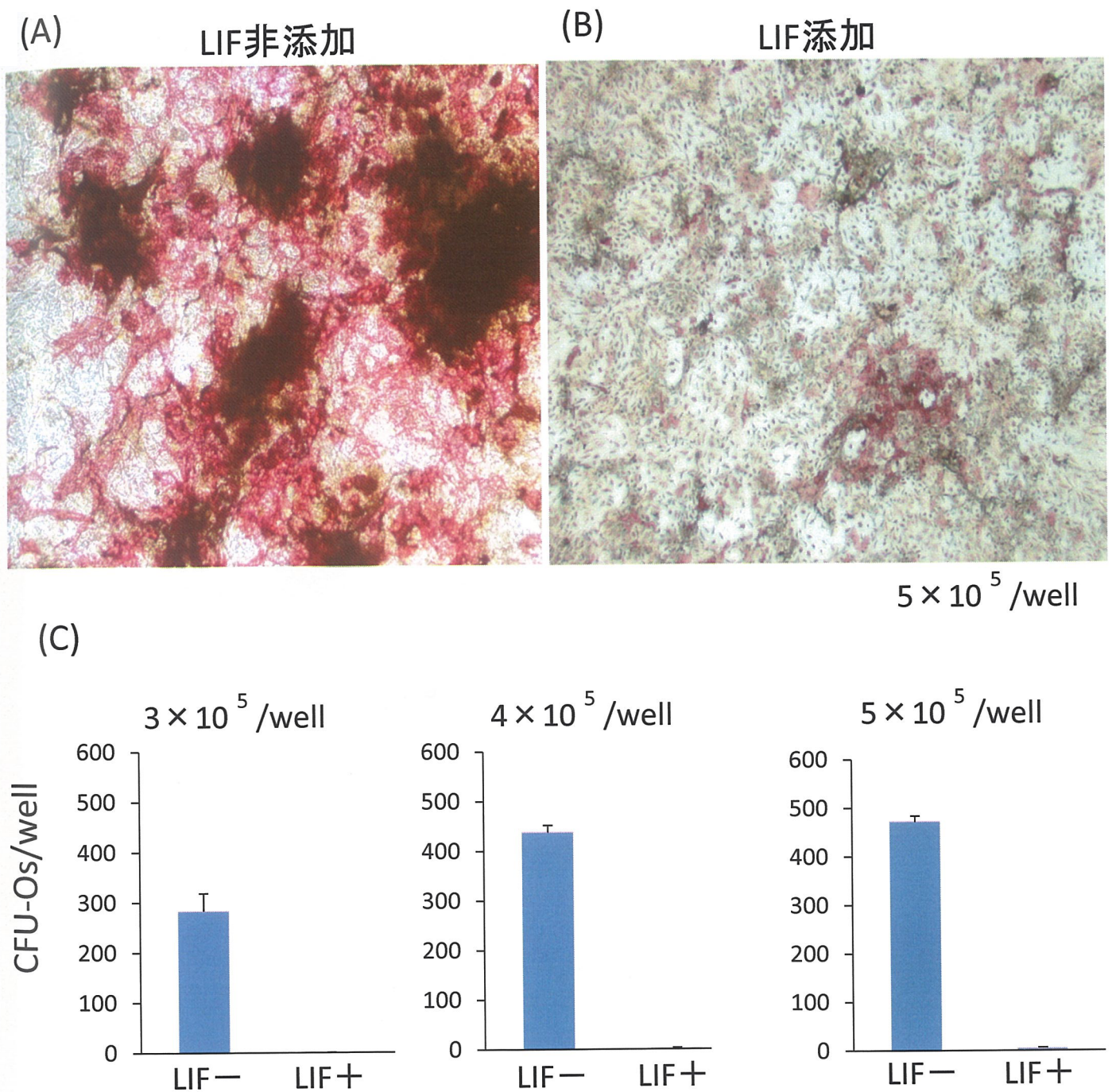


図3 LIFによる石灰化抑制

骨芽細胞分化誘導培地にLIFを含むものと含まないもので3週間培養したのちALP染色とvon Kossa染色を行った(A,B)。そして、CFU-Oを顕微鏡観察下で計測した(C)。結果の各値は、同一条件下で培養した3回の実験の平均値と標準偏差を示す。LIFを添加したものはCFU-Oがほとんど認められなかった。

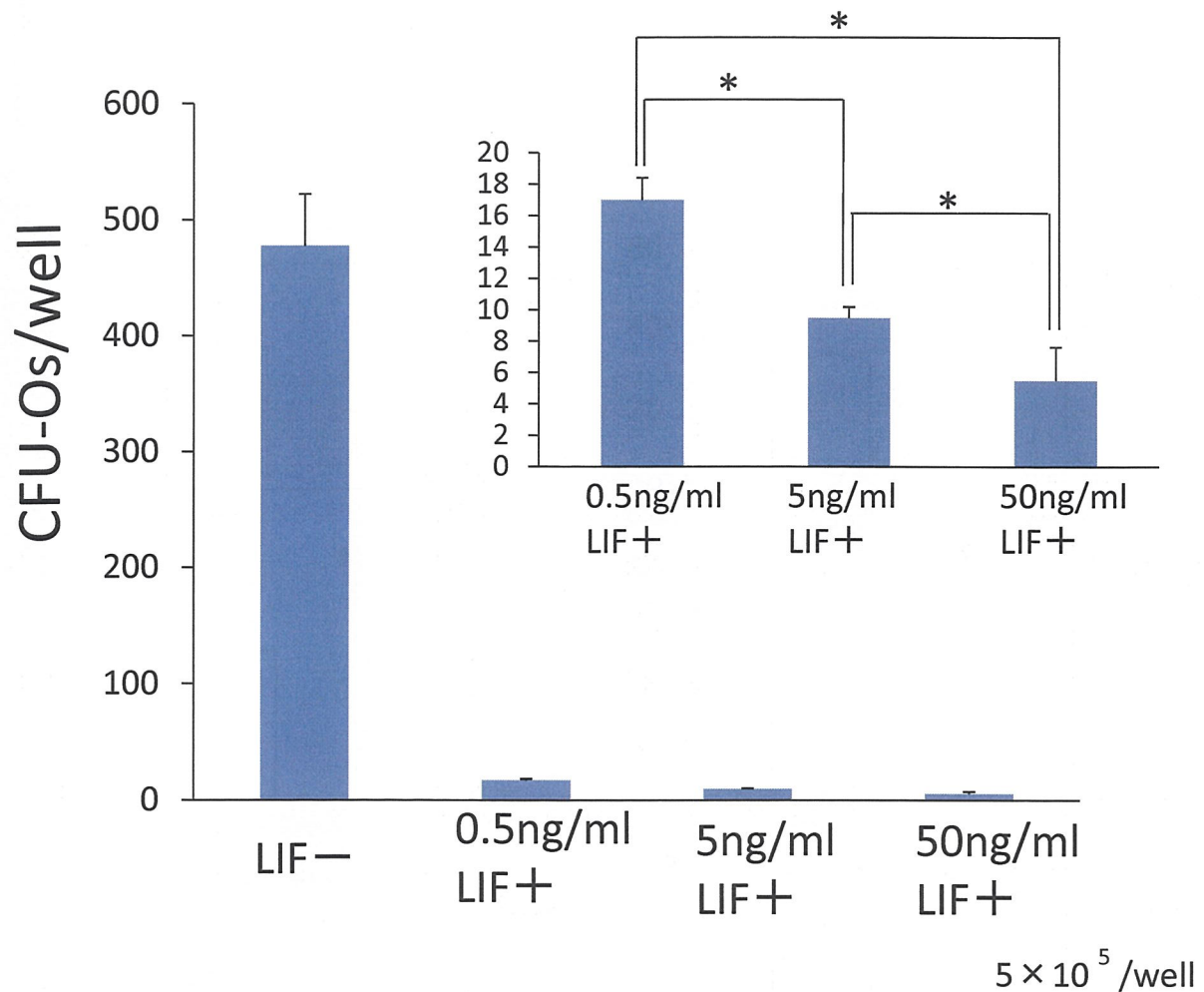


図4 LIFは濃度依存的に石灰化を抑制する

5×10^5 /wellの細胞数で0.5ng/ml, 5ng/ml, 50ng/mlの各濃度のLIF存在下と非存在下の骨芽細胞分化誘導培地にて3週間培養後に、ALP染色とvon Kossa染色を行い顕微鏡下でCFU-Oを計測した。結果の各値は、同一条件下で培養した3回の実験の平均値と標準偏差を示す。*P<0.05
LIFはいずれの濃度でもCFU-Oの形成をほぼ完全に抑制し、その効果は濃度依存的であった。

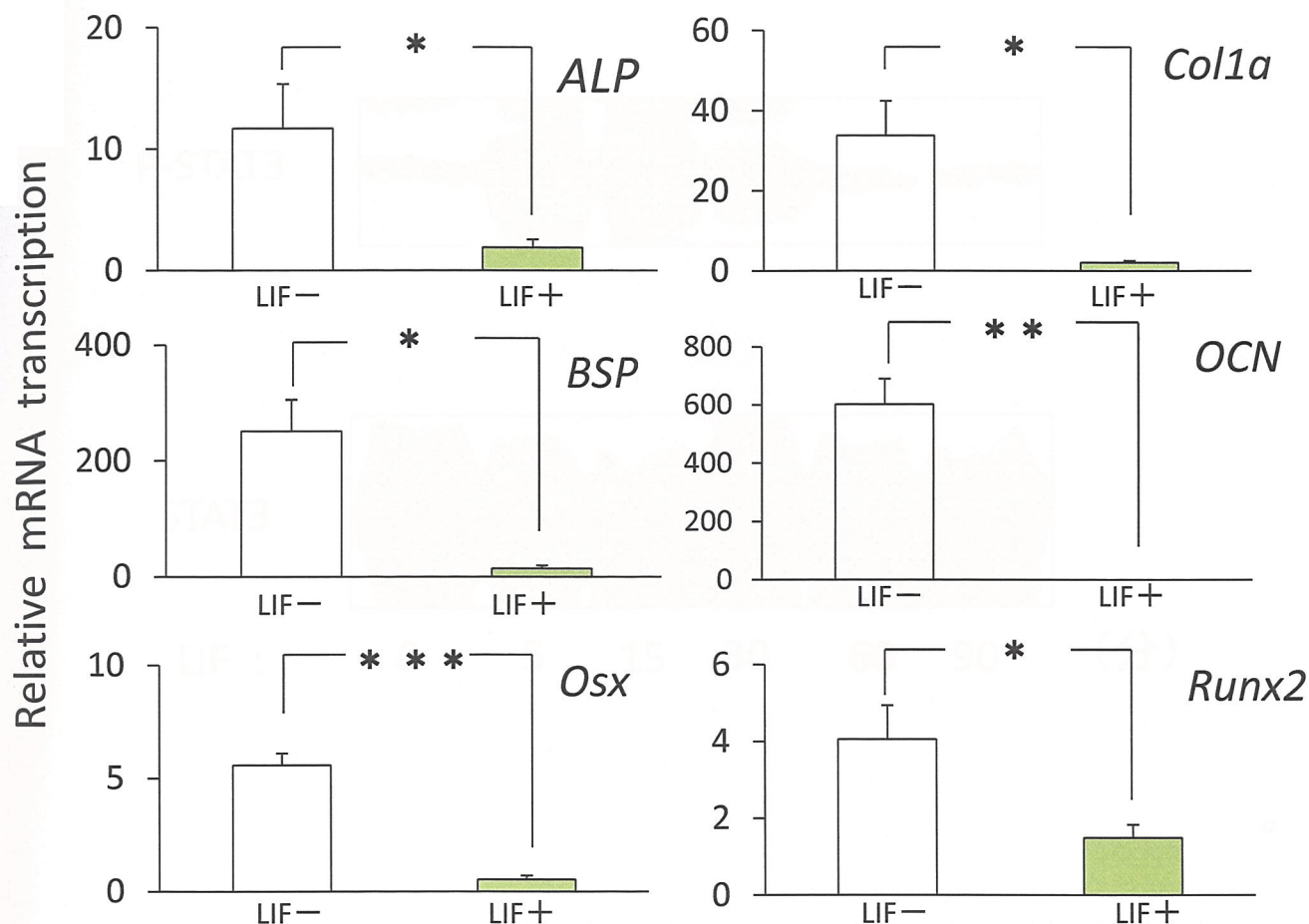


図5 LIFは骨芽細胞分化マーカーの発現を抑制する

50ng/ml LIF添加あるいは非添加の骨芽細胞分化誘導培地で骨髓ストローマ細胞を2週間培養したのちmRNAを回収し、cDNAを合成した。得られたcDNAに対して各プライマーを用いてリアルタイムPCRを行った。mRNAの発現量はL32を用いて補正した。結果の各値は、同一条件下で培養した3回の実験の平均値と標準偏差を示す。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$

LIFはいずれの骨芽細胞分化マーカーの発現量も有意に抑制していた。

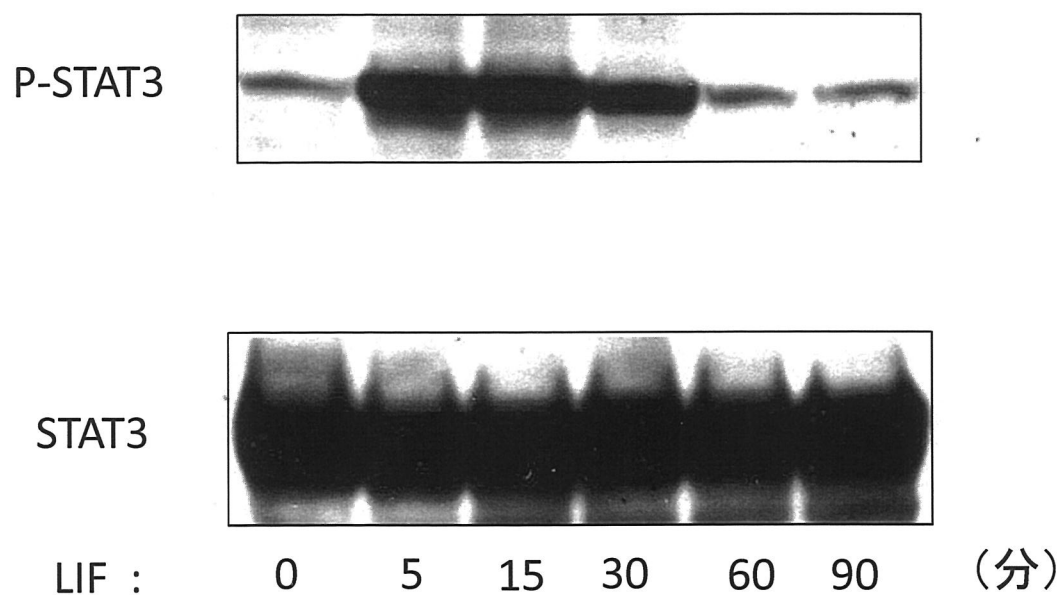


図6 骨髄ストローマ細胞においてLIFはJAK-STAT3シグナル伝達経路を活性化する

50ng/ml LIF刺激後、細胞を溶解しタンパクを回収したのち、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、LIF刺激後、5分、15分、30分後にリン酸化STAT3が発現した。

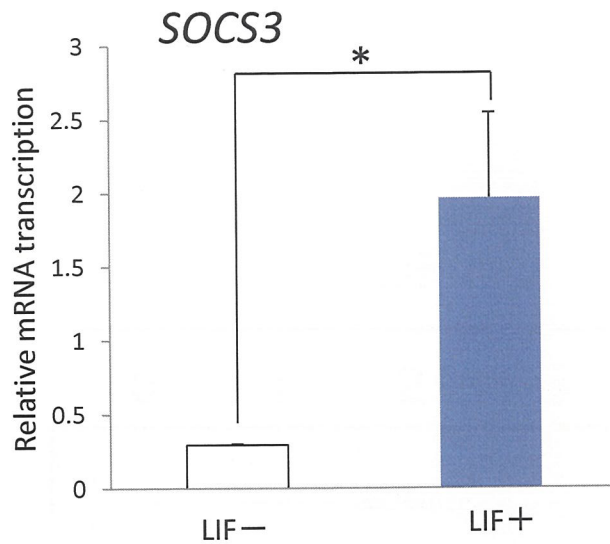


図7 骨髄ストローマ細胞においてLIFはSOCS3の発現を誘導する

LIF存在下あるいは非存在下の骨芽細胞分化誘導培地で2週間培養したのちmRNAを回収し、cDNAを合成した。得られたcDNAに対してSOCS3プライマーを用いてリアルタイムPCRを行った。mRNAの発現量はL32を用いて補正した。結果の各値は、同一条件下で培養した3回の実験の平均値と標準偏差を示す(B)。* $P < 0.05$
この結果から、LIFによりSOCS3の発現が増加することが明らかとなった。

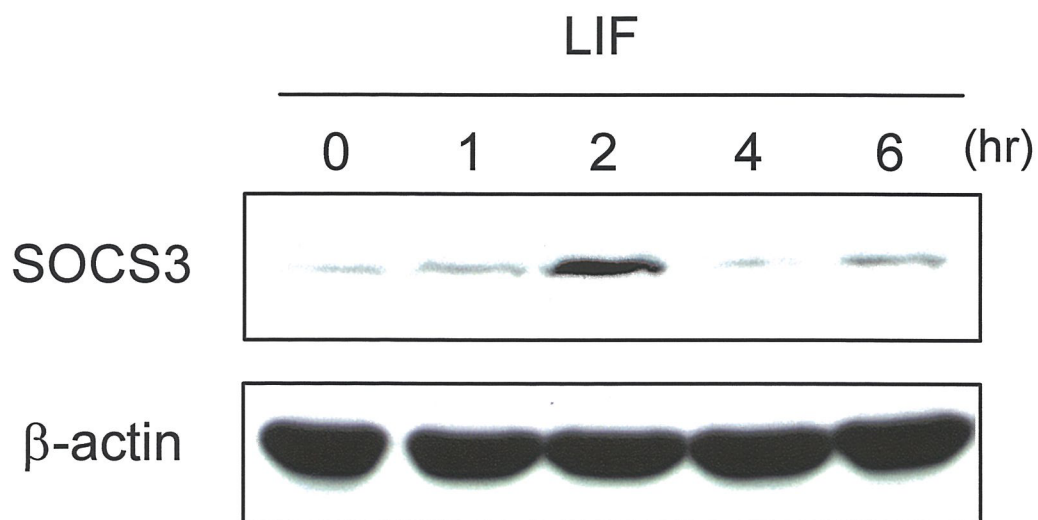


図8 骨髄ストローマ細胞においてLIFはSOCS3の発現を誘導する

50ng/ml LIF刺激後、細胞を溶解しタンパクを回収したのち、ウェスタンブロットティングを行った。その結果、LIFの刺激によりSOCSタンパクが発現することが明らかとなった。

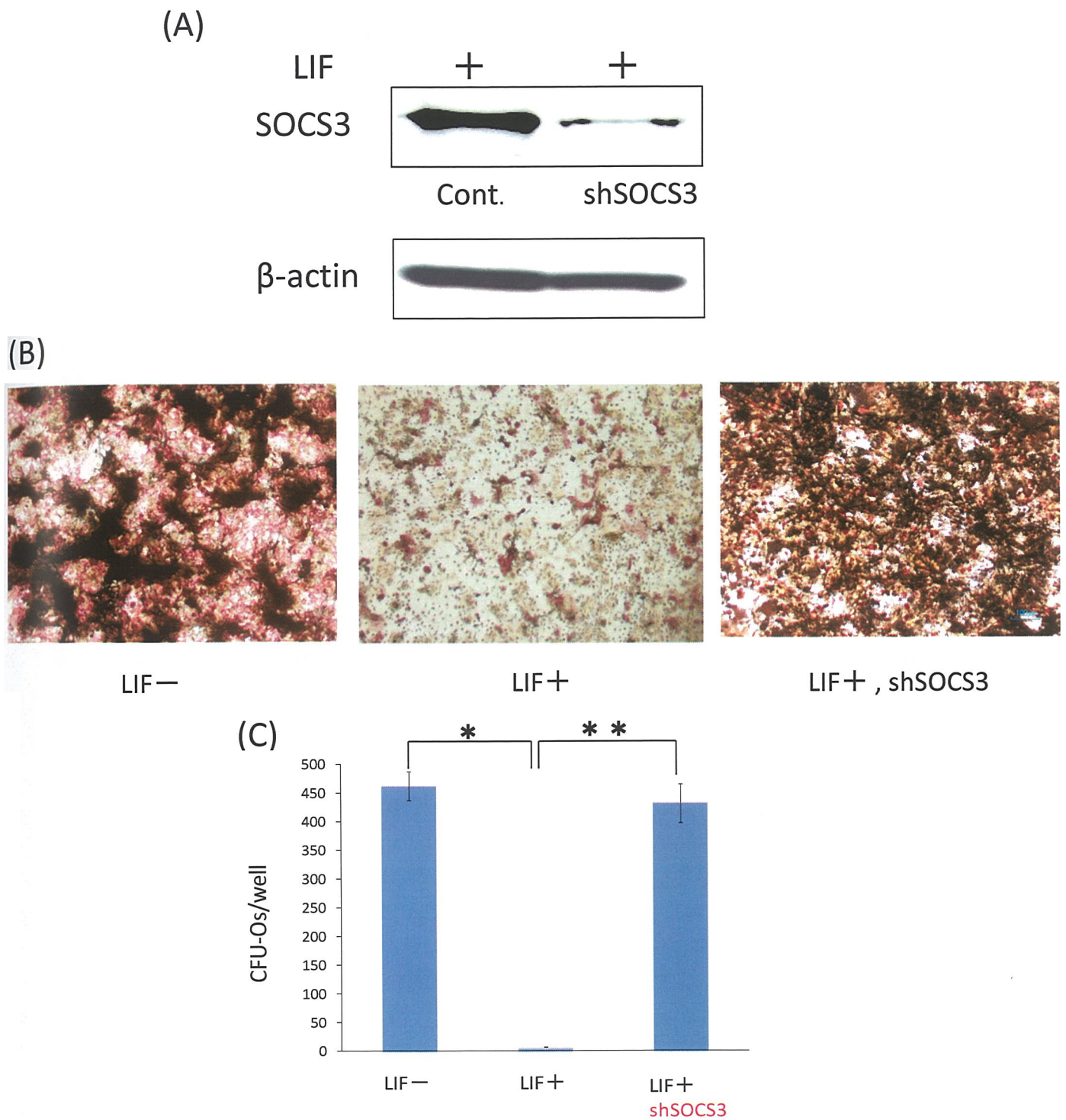


図9 LIFの骨芽細胞への分化を抑制する効果はSOCS3をノックダウンすることにより消失する

レンチウイルスにてshRNAを細胞に導入し、SOCS3タンパクをノックダウンした。ウエスタンブロッティング法にてSOCS3タンパクの発現を確認した(A)。SOCS3ノックダウン骨髓ストローマ細胞を50ng/ml LIF存在下で2週間培養し、ALP染色とvon Kossa染色を行った後(B)、顕微鏡観察下でCFU-Oを計測した。結果の各値は、同一条件下で培養した3wellの平均値と標準偏差を示す。* $P < 0.005$, ** $P < 0.05$ (C) SOCS3をノックダウンするとLIFによる分化抑制効果は認められなかった。

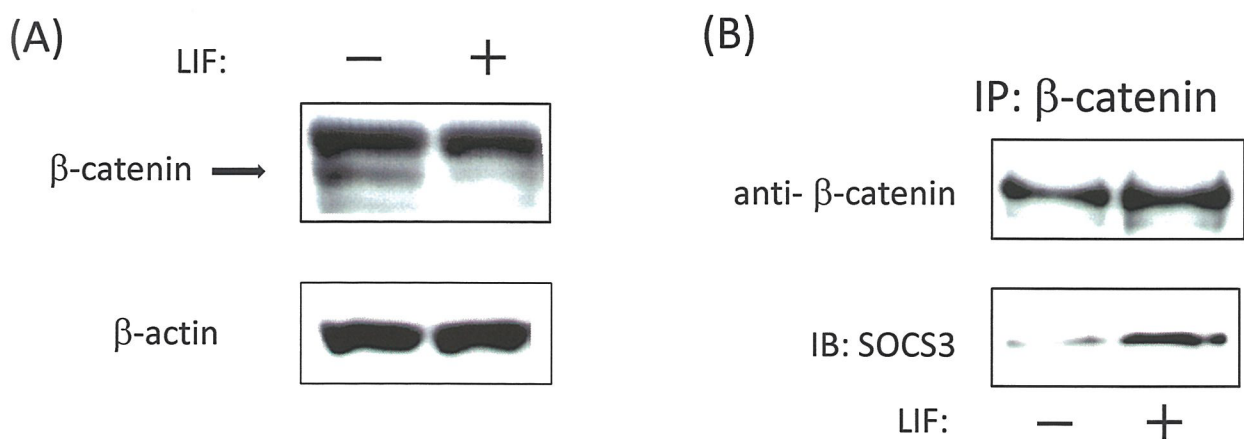


図10 LIFによるβ-cateninの減少およびSOCS3とβ-cateninの会合

50 ng/ml LIF存在下および非存在下の骨芽細胞分化誘導培地にて5日間培養した後、タンパクを回収しウエスタンブローディングを行った(A)。また、50 ng/ml LIFで刺激後2時間後にタンパクを回収したのち抗β-catenin抗体にて免疫沈降し、SDS-PAGEにて展開、転写したのち抗SOCS3抗体にてブロットした(B)。

LIF添加骨芽細胞分化誘導培地で培養すると、β-cateninの発現量は減少していた。また、免疫沈降法によりβ-cateninとSOCS3が会合していることが明らかとなった。

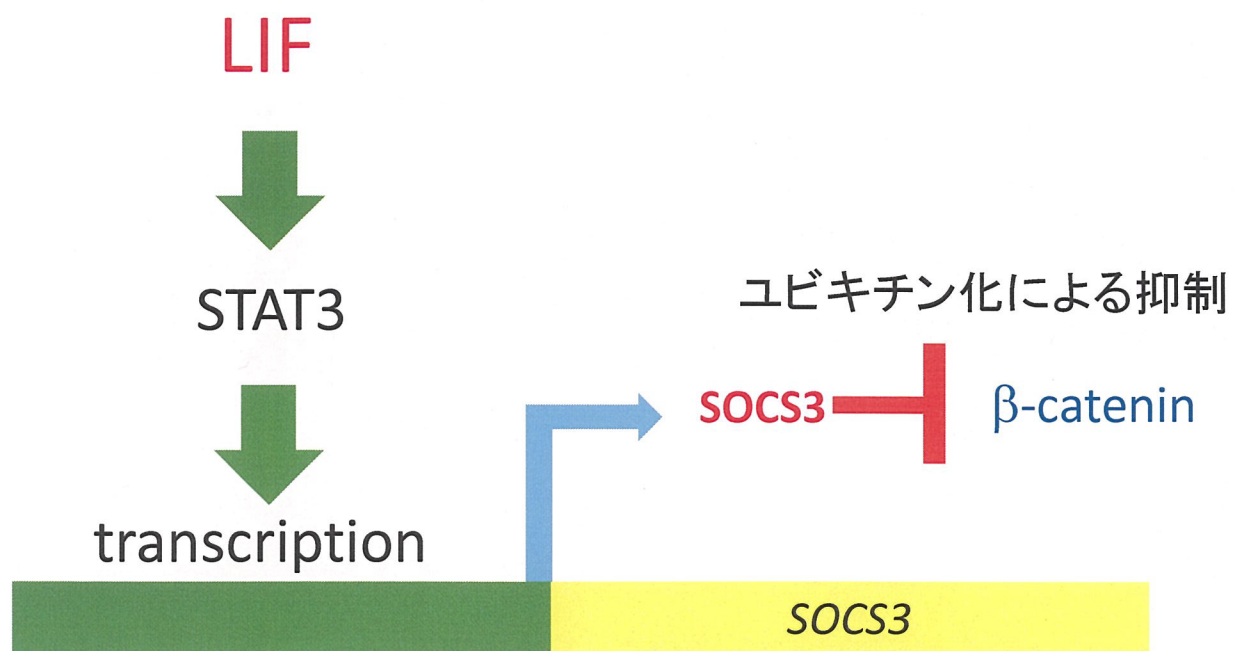


図11 骨芽細胞分化におけるLIFの機能

骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞分化において、LIFはJAK-STAT3シグナル伝達経路を活性化して、SOCS3の発現を誘導し、SOCS3がβ-cateninと会合して、ユビキチン化によりβ-cateninを分解していることが強く示唆された。