

**Lamin A とその変異体 progerin の発現が
骨芽細胞分化に及ぼす影響**

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

築根 直哉

(指導：佐藤 秀一 教授，高橋 富久 教授)

目 次

概 要	1
第 1 章	3
緒 言	
材料および方法	
結 果	
考 察	
図および表	
第 2 章	15
緒 言	
材料および方法	
結 果	
考 察	
図および表	
結 論	30
謝 辞	31
参考文献	32

本学位論文は下記の 2 編の原著論文を総括したものである。

- (1) Tsukune N, Naito M, Kubota T, Ozawa Y, Nagao M, Ohashi A, Sato S, Takahashi T (2017) Lamin A overexpression promotes osteoblast differentiation and calcification in the MC3T3-E1 preosteoblastic cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 488, 664-670
- (2) Tsukune N, Naito M, Ohashi A, Ninomiya T, Sato S, Takahashi T (2018) Forced expression of mouse progerin attenuates the osteoblasts differentiation interrupting β -catenin signal pathway in vitro. *Cell Tissue Res*.
<https://doi.org/10.1007/s00441-018-2930-y>

概 要

核ラミナは、内核膜の下面を覆うタンパク性の薄膜で、その構成タンパクには lamin A, lamin B, lamin C の 3 つのタイプが知られている。このうちヒト lamin A と lamin C は、ともにヒト染色体 1q21 に存在する 12 個のエクソンから成る LMNA 遺伝子の産物である。Lamin A と lamin C (lamin A/C) は LMNA 遺伝子からの alternative splicing によって転写されるため、N 末端側の 566 個のアミノ酸は共通であるが、lamin A は 664 個のアミノ酸から、lamin C は 572 個のアミノ酸からつくられる。Lamin A/C は、他の核内因子と相互作用し、核の構造を維持する他に、遺伝子の複製と発現、細胞分化の決定に関して重要な役割をしている。一方、lamin A の点突然変異体の 1 つである progerin は、遺伝性早老症の Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) の原因タンパクとして知られている。HGPS 患者の特徴として、骨形成の異常による骨格系の成長障害に加えて、骨組織における骨芽細胞と骨細胞の減少があげられる。しかし、lamin A/C が骨芽細胞分化に及ぼす影響、さらに progerin の発現に起因する骨芽細胞分化の抑制メカニズムについては不明な点が多い。本研究は、lamin A と progerin を前骨芽細胞様株化細胞 MC3T3-E1 に過剰発現させることで、lamin A と progerin が MC3T3-E1 の骨芽細胞分化にどのような影響を与えるかを検討した。

第 1 章では、MC3T3-E1 の成熟骨芽細胞への分化過程における lamin A/C の発現パターンの解析および lamin A を過剰発現させたときの影響について検討を行った。分化培地に 20 ng/ml のリコンビナント bone morphogenetic protein (BMP)-2 を添加し、MC3T3-E1 を 7, 14, 21 日間培養した後、lamin A/C の発現について real time PCR と Western blotting によって調べた。その結果、石灰化が誘導された培養 21 日目に lamin A/C の顕著な発現増加が認められた。また、estrogen 受容体アンタゴニストの fulvestrant を添加することで、BMP-2 存在下で促進した lamin A/C の発現と骨芽細胞分化の抑制が示された。次に lamin A cDNA を組込んだ発現ベクターを MC3T3-E1 に遺伝子導入し、lamin A が過剰発現する lamin A 導入細胞を樹立した。分化培地に BMP-2 を添加して 21 日間培養した結果、骨タンパクの alkaline phosphatase (ALP), type I collagen (Col1), bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OC), dentine matrix protein 1 (DMP 1) および骨芽細胞分化関連転写因子 Fra-1 の発現が増加し、基質の石灰化が確認された。BMP-2 存在下、lamin A 導入細胞に fulvestrant を添加して培養した結果、BSP, OC, DMP1, Fra-1 の遺伝子発現と石灰化レベルが減少した。しかし、これらの遺伝子発現と石灰化のレベルは、BMP-2 存在下に fulvestrant を添加した対照群 (ベクターのみ導入) よりも高かった。つまり、lamin A の過剰発現は、fulvestrant によって阻害された MC3T3-E1 の成熟骨芽細胞への分化を完全ではないが回復させた。

第2章では、マウス lamin A の C 末端側 50 アミノ酸を欠如した progerin をコードする lamin A dC50 cDNA を MC3T3-E1 に導入し、導入細胞における骨芽細胞分化について検討した。分化培地で lamin A dC50 導入細胞を 7, 14, 21 日間培養した結果、ベクターのみを導入した対照群と比較して ALP, Col1, BSP, DMP1 と骨芽細胞分化関連転写因子 Runx2 の遺伝子発現が有意に減少した。OC と骨芽細胞分化関連転写因子 osterix (Osx) の遺伝子発現は変化しなかった。一方、分化培地に BMP-2 を添加して lamin A dC50 導入細胞を培養したところ、Runx2 と Osx の発現減少と基質の石灰化の抑制が示された。また、MC3T3-E1 への lamin A dC50 の導入は、 β -catenin の核内移行と細胞内における active β -catenin とリン酸化 GSK-3 β の発現レベルを減少させることも判明した。

以上の結果から、lamin A は MC3T3-E1 の骨芽細胞分化と石灰化を促進するために重要な役割をもつことが明らかになった。また、progerin は active β -catenin の発現と GSK-3 β のリン酸化を抑制し、骨芽細胞の初期分化と最終分化を負に制御していることが示唆された。

第 1 章

Lamin A の発現は前骨芽細胞様株化細胞 MC3T3-E1 の 骨芽細胞分化と石灰化を促進する

緒 言

骨芽細胞分化は、細胞内で機能する様々な転写因子やシグナル伝達分子の相互作用によって調節されている。このうち骨芽細胞分化関連転写因子の Runx2 は、間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させるための最初の effector として機能する。すなわち、間葉系幹細胞は、Runx2 を発現すると骨芽細胞前駆細胞へと表現形質が変化し、その後、前骨芽細胞、骨芽細胞、さらに成熟骨芽細胞へと分化が進む[1,2]。初期の骨芽細胞分化において、前骨芽細胞は弱いながらも骨タンパクの type I collagen (Col1) および alkaline phosphatase (ALP) を発現する[3,4]。分化した成熟骨芽細胞は、Col1 と ALP の他に、骨タンパクの bone sialoprotein (BSP) と osteocalcin (OC) を強く発現し、石灰化に必要な細胞外基質を産生する[5]。その後、成熟骨芽細胞の多くはアポトーシスを起こして消失するが、一部は骨基質の中に取り込まれ骨細胞に分化する。骨細胞は、骨タンパクの dentine matrix protein 1 (DMP1) を強く発現することが知られている[6,7]。これらの骨タンパクは、Runx2 や osterix (Osx) などの分化関連転写因子とともに、骨芽細胞の分化段階に応じて発現し、基質の石灰化をコントロールしている[7-9]。

骨芽細胞分化は異なる環境下で働く多くの外的因子によって調節されている。たとえば女性ホルモンの estrogen は骨形成と骨吸収の両方を調節しながら、生理的な骨量維持のために機能している。一方、estrogen 受容体アンタゴニストの 1 つである fulvestrant は、前骨芽細胞の骨芽細胞への分化と石灰化を阻害する[10,11]。骨芽細胞特異的に estrogen 受容体 α の発現を欠失させた遺伝子欠損マウスの実験から、estrogen シグナルが前骨芽細胞から成熟骨芽細胞への分化と骨形成を直接制御していると考えられている。しかし、fulvestrant が骨芽細胞の分化を抑制するメカニズムは十分には解明されていない[12,13]。

核ラミナは、内核膜の下面を覆うタンパク性の薄膜で、核の形態構築と染色体構造の制御、および遺伝子の転写調節に関与している[14]。核ラミナを構成する分子のうち、分子量の異なる 2 種類の variant である lamin A と lamin C は、同じ 12 個のエクソンをもつ LMNA 遺伝子から alternative splicing で産生される。しかし、ごく稀に LMNA 遺伝子の exon11 にある 1,824 番目の cytosine に点突然変異が起き、thymine に置換 (C_{1,824} → T) されると、その lamin A の点突然変異体は核膜に蓄積し、早老症を特徴とする遺伝性疾患の Hutchinson-Gilford

progeria syndrome (HGPS) が発症する。HGPS 患者の特徴として低身長や骨粗鬆症などの骨格系関連の諸症状がみられることから、lamin A は骨代謝に重要な役割を持つと考えられている[15]。実際に LMNA 遺伝子欠損マウスは、野生型マウスと比較して骨髄内の脂肪蓄積量が増加し、反対に骨量の減少が認められている[16]。また、間葉系幹細胞を用いた研究から、lamin A/C の発現抑制が骨芽細胞分化を阻害することも明らかにされている[17,18]。これらの結果は、lamin A/C が骨芽細胞分化または骨形成過程において重要な役割を果たすことを示唆している。しかし、骨芽細胞分化過程における lamin A の役割は充分には解明されていない。前骨芽細胞様株化細胞 MC3T3-E1 は、適切な培養条件下では石灰化誘導能をもった成熟骨芽細胞へ分化する[19]。そこで、本章の実験では MC3T3-E1 を使用して、前骨芽細胞から成熟骨芽細胞への分化過程における lamin A の役割について遺伝子の強制発現系を用いて検討した。

材料および方法

1. 免疫組織学的検討

パラフィン包埋後の 8 週齢 C57BL/6J マウス長管骨の組織切片スライド (S054WO, Abnova) と下顎骨の組織切片スライド (S060WO, Abnova) を使用した。切片は 200 倍に希釈した polyclonal rabbit anti-lamin A/C antibody (Santa Cruz Biotechnology) と 4°C, 16 時間反応させ、Ca²⁺ と Mg²⁺ を含まない PBS (-) で洗浄した後に、200 倍に希釈した horse radish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Zymed) と室温で 2 時間反応させた。PBS (-) で洗浄後、0.3 µg/µl の 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) で処理することによって抗体結合部の発色を行い、観察した。核染色は Mayer のヘマトキシリンで行った。

2. 細胞培養

マウス前骨芽細胞様株化細胞 MC3T3-E1 (RIKEN Cell Bank, RCB1126) は、10% FBS (GIBCO) を含む α -minimum essential medium (和光純薬) を用い、37°C, 5% CO₂ 環境下で培養した。骨芽細胞分化を誘導するため、コンフルエントに達した MC3T3-E1 を 50 mM β -glycerophosphate, 50 µg/ml アスコルビン酸および 10⁻⁸ M dexamethasone を含んだ分化培地を用いて[20]、リコンビナント bone morphogenetic protein-2 (BMP-2, PeproTech) の添加あるいは非添加の条件で、21 日間培養した。更に estrogen 受容体の下流シグナル伝達を阻害するため、10 µM fulvestrant (Sigma-Aldrich) を添加して 21 日間培養した。

3. 組織化学的検討

MC3T3-E1 を 24 ウェルプレートに播種し、分化培地を用いて BMP-2 の添加

あるいは非添加の条件で、7、14、21日間培養を行った。ALP染色は、細胞を4%パラホルムアルデヒドで10分間固定、洗浄後、基質としてNBT/BCIP溶液(pH 9.5, Roche Diagnostics GmbH)を加え、室温で20分間反応をさせた。一方、石灰化基質の有無を確認するため、細胞をメタノールで10分間固定し、洗浄後、1.0% alizarin red S (Sigma-Aldrich) で30分間染色した。さらに染色した各ウェルに5%ギ酸を加え alizarin red 色素を溶出させ、波長415 nmで吸光度を測定した[21]。

4. Lamin A cDNA のトランスフェクション

マウス lamin A cDNA の coding region は、5'-TCT AGA ACC ATG GAG ACC CCG TC-3' と 5'-GCG GCC GCT TAC ATG ATG CTG CAG-3' をプライマーとした reverse transcription PCR (RT-PCR) によって作成した。発現ベクターは pPyCAG-EGFP-IP (熊本大学発生医学研究所 丹羽仁史博士から供与) を使用した。まずこのベクターの EGFP 配列を切り出し、作成した lamin A cDNA を挿入した。対照としては EGFP 配列を除いただけのベクターを使用した。続いて Lipofectamine LTX と plus reagent (Thermo Fisher Scientific) を用い、発現ベクター 1 µg を製品指示書に従って MC3T3-E1 に導入した。その後、1 µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich) を用いた薬剤選択を行ない、lamin A の安定過剰発現細胞株を樹立した。

5. Western blotting

タンパク量として 20 µg の細胞抽出液を SDS-PAGE 用のゲルで分画し、polyvinylidene difluoride 膜に転写した。10% スキムミルクでブロッキングを行った後、転写膜を 500 倍に希釈した polyclonal rabbit anti-lamin A/C antibody (Santa Cruz Biotechnology) と 4°C、16 時間反応させた。0.1% Tween-20 を含んだ PBS (-) で洗浄した後、転写膜を 500 倍に希釈した HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody と室温で 2 時間反応させた。転写膜の化学発光は、ECL Prime ウェスタンブロッティング検出試薬 (Amersham-Pharmacia Biotech) を使用した。内部対照の actin を検出するため、goat anti-mouse actin antibody (Santa Cruz Biotechnology) および HRP-conjugated donkey anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology) を使用した。

6. Real time PCR

RNA は RNAiso Plus (タカラバイオ) を使用して細胞から抽出した。cDNA は 5 µg の RNA を含んだ 20 µl の反応液に 200 ng のランダムプライマー、10 mM の dNTPs、および 200 U の SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen) を加えて、50°C、50 分間の反応で合成した。合成後、1 µl ずつを各遺伝子のプライマー (表 1) と 20 U の Taq DNA polymerase を含む反応液 19 µl と混合し、Smart

Cycler II (タカラバイオ) を使用して半定量的 PCR (real time PCR) を行った。

7. 統計分析

得られた結果は Student's *t*-test あるいは one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test を用いて評価し, $p < 0.05$ を有意とした。なお, すべての実験で得られた結果は 3 回の平均 \pm SD で示した。

結 果

1. 骨組織における lamin A/C 発現

マウス長管骨における lamin A/C の局在を明らかにするために, 抗 lamin A/C 抗体を用いた免疫染色を行ったところ, 骨梁および皮質骨に存在する骨細胞と骨芽細胞に lamin A/C の発現が観察された (図 1A, B)。また, lamin A/C の発現は歯周組織でも観察された (図 1C, D)。長管骨組織と同様に, lamin A/C の発現は歯槽骨内の骨細胞にも認められたことから (図 1C, D), lamin A/C は軟骨内骨化あるいは膜内骨化で生じたいずれの骨組織においても発現していることが明らかとなった。

骨芽細胞の分化過程における lamin A/C の発現を調べるため, BMP-2 (20 ng/ml) の添加または非添加下の分化培地で, MC3T3-E1 を 21 日間培養した。その結果, 培養 7, 14, 21 日目の BMP-2 添加群では BMP-2 非添加群 (対照群) よりも強い ALP 陽性反応がみられた。また, 対照群では認められなかったが, BMP-2 添加群では培養 21 日目に alizarin red で濃染された石灰化基質が確認された (図 2A)。さらに, real time PCR では, 培養 21 日目に lamin A/C の有意な発現増加が BMP-2 添加群において認められた (図 2A)。一方, BMP-2 (20 ng/ml) 添加あるいは非添加の条件で fulvestrant (10 μ M) の影響を調べた結果, BMP-2 添加によって培養 21 日目に増加する lamin A の発現と石灰化は, fulvestrant の添加で抑制されることが判明した (図 2B)。また, この lamin A に対する影響と同様に, fulvestrant は, BMP-2 添加で培養 21 日目に増加する lamin C の発現も有意に減少させた (図 2C, D)。

2. Lamin A の過剰発現による骨芽細胞の分化と石灰化

骨芽細胞分化における lamin A の役割を探るために, lamin A cDNA を発現ベクターに組み込み, MC3T3-E1 に導入した。対照群にはベクターのみを導入した細胞を使用した。Lamin A 導入細胞は, 対照群と比較して強い lamin A の発現が認められた。この結果は, 導入した lamin A が細胞内でタンパクとして安定に発現していることを明確に示すものであった (図 3A)。次に, 分化培地を用いて, これらの細胞を 0, 5, 10 ng/ml の BMP-2 添加または非添加の条件で 21

日間培養し、ALP 染色と alizarin red 染色を行った。その結果、lamin A 導入細胞では、BMP-2 の添加あるいは非添加に関わらず ALP 陽性反応が対照群の細胞よりも増強した (図 3B)。しかし、BMP-2 非添加の条件下では、lamin A 導入群および対照群のいずれの細胞においても alizarin red 陽性の石灰化基質は認められなかった (図 3B)。一方、lamin A 導入細胞においては、5 ng/ml あるいは 10 ng/ml の BMP-2 添加によって、alizarin red で濃染される石灰化基質が認められた。対照群の細胞では、用いた BMP-2 濃度に関わらず石灰化基質は認められなかったことから (図 3B, C), 過剰発現させた lamin A が BMP-2 に応答して骨芽細胞分化と石灰化を誘導することが示された。さらに、lamin A 導入細胞では、ALP, Col1, BSP, OC, DMP1 および Fra-1 の発現レベルが対照群の細胞よりも増加したことから (図 3D-1), MC3T3-E1 における lamin A の過剰発現は、転写因子 Fra-1 の発現を介して骨タンパクや転写因子の発現を誘導して成熟骨芽細胞への分化を促進すると考えられた。

3. Lamin A によって誘導された骨芽細胞分化における fulvestrant の影響

Fulvestrant は、MC3T3-E1 における骨芽細胞分化と石灰化を阻害し、lamin A/C の発現を抑制した (図 2B)。そこで lamin A 導入細胞における fulvestrant の影響を調べるため、分化培地に 10 ng/ml の BMP-2 を加え、10 μ M の fulvestrant 添加または非添加の条件で 21 日間培養し、MC3T3-E1 の骨芽細胞分化について検討した。その結果、fulvestrant 非添加の条件下では、lamin A 導入細胞の alizarin red による染色強度が増加し、石灰化とともに骨芽細胞分化が促進した (図 4A)。しかし、fulvestrant 添加の条件下では、lamin A 導入細胞における ALP の染色強度は減弱し、石灰化が抑制された (図 4A, B)。さらに、fulvestrant 添加は、lamin A 導入細胞と対照群の細胞のいずれにおいても、BSP, OC, DMP-1 と Fra-1 の発現レベルを fulvestrant 非添加時よりも減少させた (図 4C-F)。Fulvestrant 存在下での lamin A 導入細胞における BSP, OC, DMP1, Fra-1 の発現と石灰化のレベルは、ベクターのみを導入した対照群と比較して高いレベルを示したことから (図 4C-F), fulvestrant 存在下でも骨芽細胞分化を促進するには、lamin A の過剰発現が必要なことが示された。

考 察

核ラミナは線維芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞および破骨細胞などの種々の細胞型それぞれで特異的な発達を示す[22]。サル歯槽骨では、骨芽細胞、骨細胞およびその前駆細胞の核ラミナは、破骨細胞のそれに比して顕著に肥厚している[23]。核ラミナの主成分は、A 型 lamin (lamin A/C) および B 型 lamin (lamin B1 および lamin B2) を含む V 型中間フィラメントタンパクである[14]。このうち

lamin A/C がマウス長管骨と歯槽骨にみられる骨芽細胞と骨細胞に強く発現していたことから (図 1), 本章の実験では前骨芽細胞様株化細胞の MC3T3-E1 を用いて, lamin A の骨芽細胞分化に与える影響について検討した。

ヒト骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化過程において laminA/C の発現が促進することが報告されている[18]。今回, MC3T3-E1 を BMP-2 存在下で培養した結果, 石灰化の促進とともに, lamin A/C の発現レベルの増加も確認された (図 2A)。この結果は, lamin A/C の発現が骨芽細胞分化と関連し, かつ骨芽細胞の機能である骨の石灰化に重要な因子であることを示している。実際, lamin A の過剰発現が BMP-2 に応答して MC3T3-E1 の骨芽細胞分化と石灰化を促進することも, 本章の実験結果は示している (図 3B)。また, lamin A の過剰発現は, 骨タンパクとともに, 骨芽細胞分化関連転写因子 Fra-1 の発現を有意に増加させることも示した (図 3F)。Fra-1 は骨基質形成の活性化因子であり[24], lamin A の過剰発現によって誘導された MC3T3-E1 から成熟骨芽細胞への分化は, Fra-1 の誘導を介して促進した可能性がある。このように lamin A は, 骨芽細胞分化の co-activator として, 骨芽細胞分化の inducer である BMP-2 に応答しながら, 骨形成過程において重要な役割をしていると考えられる。

Lamin A の過剰発現が骨芽細胞分化を促進し, またヒト骨髄由来間葉系幹細胞の脂肪細胞分化を阻害するとの報告があるが[25], lamin A/C の発現減少によって, 間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を抑制するという報告もある[17,18,26]。これらの報告は, lamin A の強い発現が間葉系幹細胞の骨芽細胞への commitment を誘導し, 骨芽細胞前駆細胞から骨芽細胞への分化を促進する可能性を示している。

女性ホルモン estrogen の欠乏は, 閉経後の骨粗鬆症を引き起こす[27]。選択的 estrogen 受容体アンタゴニストとして知られている fulvestrant は, プロテアソームによる estrogen 受容体の分解を促進する。すなわち, fulvestrant は受容体における estrogen の活性阻害に加え, 核内の estrogen 受容体数を減少させることによって, estrogen のシグナル伝達を遮断する[27]。MC3T3-E1 において fulvestrant は石灰化を抑制したが (図 2B, D), fulvestrant が骨芽細胞分化を阻害するメカニズムは不明であったため, 本章の実験では MC3T3-E1 の骨芽細胞分化における fulvestrant の影響についても検討を加えた。BMP-2 非存在下で fulvestrant を添加しても, lamin A/C の発現レベルは fulvestrant 添加群と比較して有意な変化が認められなかった。しかし, BMP-2 存在下での fulvestrant 添加は, fulvestrant 非添加の条件で増加する lamin A/C の発現レベルを顕著に抑制した (図 2B, D)。当初, このような BMP-2 存在下でみられた fulvestrant による抑制効果が, estrogen 受容体を介した estrogen シグナル伝達の阻害によって生じると推測したため, BMP-2 非存在下で estradiol 17 β (E2) を添加し, lamin A/C の発現変化を調べたが, 結果として, 有意な発現増加は認められなかった (未

発表データ)。すなわち, lamin A/C の発現を促進する estrogen シグナルは, BMP-2 非存在下で培養した MC3T3-E1 においては機能しないと考えられた。したがって, estrogen シグナル以外に BMP-2 によって活性化される他のシグナル分子が lamin A/C の発現増強に必要であると推測された。

BMP-2 (10 ng/ml) 存在下において, fulvestrant は対照群の細胞における ALP 染色強度と骨タンパクの発現レベルを低下させた (図 4A-F)。このことは, fulvestrant が BMP-2 によって誘導される MC3T3-E1 の骨芽細胞分化を阻害することを示している。加えて, fulvestrant による骨芽細胞分化と石灰化の抑制は, 転写因子 Fra-1 の発現減少と相関すると考えられるが (図 4C-F), fulvestrant による骨芽細胞の分化抑制メカニズムを十分に解明するにはさらなる研究を要する。一方, BMP-2 と fulvestrant を同時添加によって lamin A 過剰発現細胞で検出される BSP, OC, DMP1 の発現レベルは, 同じく BMP-2 と fulvestrant の同時添加で培養した対照群の細胞での発現レベルよりも有意に高かった (図 4C-F)。lamin A の過剰発現は, fulvestrant によって阻害された MC3T3-E1 の骨芽細胞分化や石灰化レベルを十分に回復するには至らなかった (図 4A)。しかし, lamin A の過剰発現下では, estrogen シグナル機構が抑制されていても, MC3T3-E1 から成熟骨芽細胞への分化や石灰化には促進傾向がみられた。

本章の実験では, lamin A の発現が MC3T3-E1 の骨芽細胞分化と相関し, lamin A 過剰発現が骨タンパクの発現上昇をともなう骨芽細胞分化を促すことを示した。また, estrogen 受容体アンタゴニストの fulvestrant は, MC3T3-E1 の骨芽細胞分化を阻害した。さらに, lamin A の過剰発現は, fulvestrant によって抑制された MC3T3-E1 の骨芽細胞分化および石灰化を部分的に回復させた。すなわち, これらの知見は, lamin A の発現が骨芽細胞機能の維持や成熟骨芽細胞への分化能と密接な関係を示唆している。

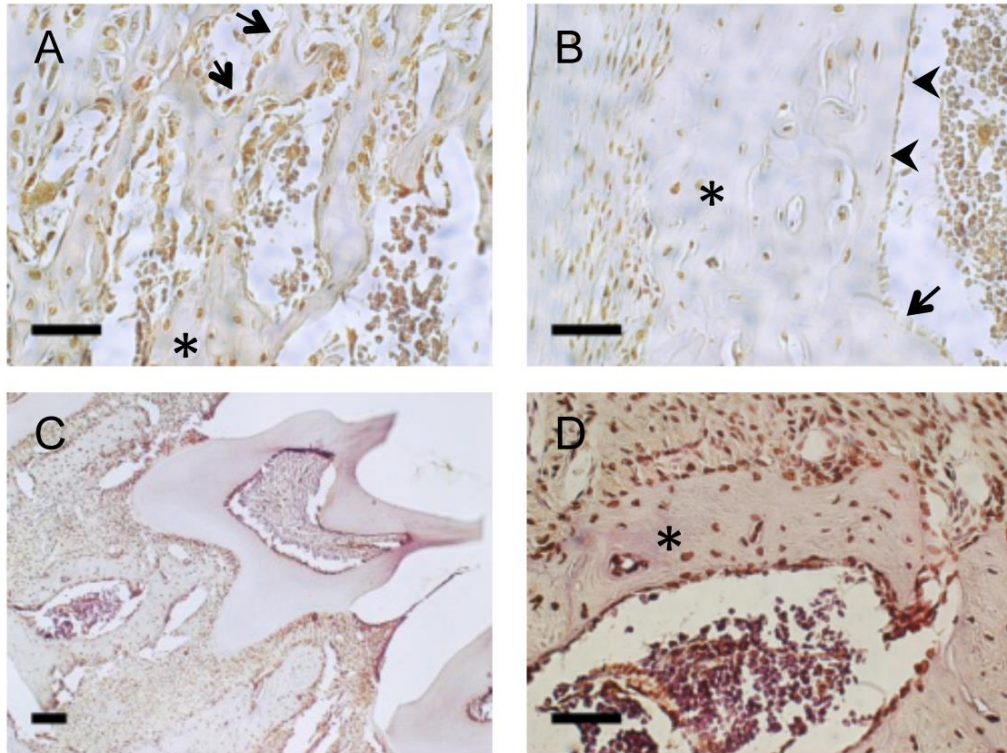


図1 骨芽細胞における lamin A/C の発現

マウスの長管骨 (A, B) および下顎骨 (C, D) 切片の抗 lamin A/C 抗体染色像。A 長管骨 (星印) の骨梁中の骨細胞とその表面の骨芽細胞 (矢印) における lamin A/C の局在を示す (スケールバーは 50 μm)。B 皮質骨 (星印) に存在する骨細胞, 骨髄側の骨芽細胞あるいは骨髄腔面の lining cell (矢頭) における lamin A/C の局在を示す (スケールバーは 50 μm)。C 歯槽骨においても lamin A/C の発現は顕著であった (スケールバーは 100 μm)。D 歯槽骨 (星印) の内部の骨細胞やその表面の骨芽細胞における lamin A/C の局在を示す (スケールバーは 50 μm)。

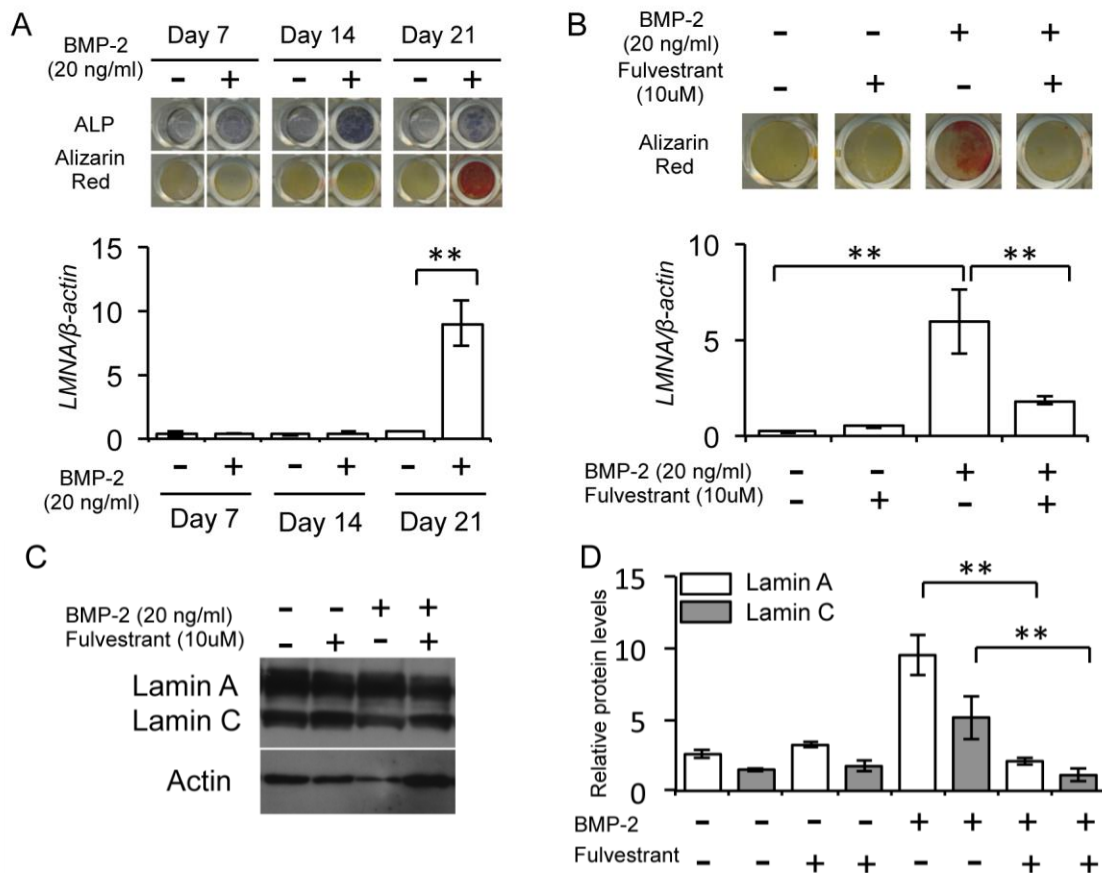


図2 MC3T3-E1 の骨芽細胞分化と lamin A/C の発現

A 分化培地を用いて MC3T3-E1 を BMP-2 (20 ng/ml) 添加 (+) または非添加 (-) で 21 日間培養し, ALP と石灰化を染色によって検出した (上図)。Real time PCR によって, lamin A/C をコードする LMNA 遺伝子と β -actin の発現レベルを調べた。グラフは β -actin の発現レベルで補正された LMNA 遺伝子の相対的な発現量を示す (下図, $**p < 0.01$)。 **B** 分化培地を用いて MC3T3-E1 を BMP-2 (20 ng/ml) と estrogen 受容体アンタゴニストである fulvestrant (10 μ M) の添加 (+) または非添加 (-) の条件で 21 日培養した。細胞は固定後, alizarin red で染色した (上図)。Real time PCR によって LMNA 遺伝子と β -actin の発現レベルを調べた。グラフは, β -actin の発現レベルで補正された相対的な LMNA 遺伝子の発現量を示す (下図, $**p < 0.01$)。 **C** Lamin A, lamin C および actin の発現を Western blotting によって検出した。 **D** Lamin A, lamin C および actin の発現を Western blotting によって検出し, actin の発現レベルで lamin A (白) と lamin C (灰色) の発現レベルをそれぞれ補正し, 相対的な発現量を表すグラフとした ($**p < 0.01$)。

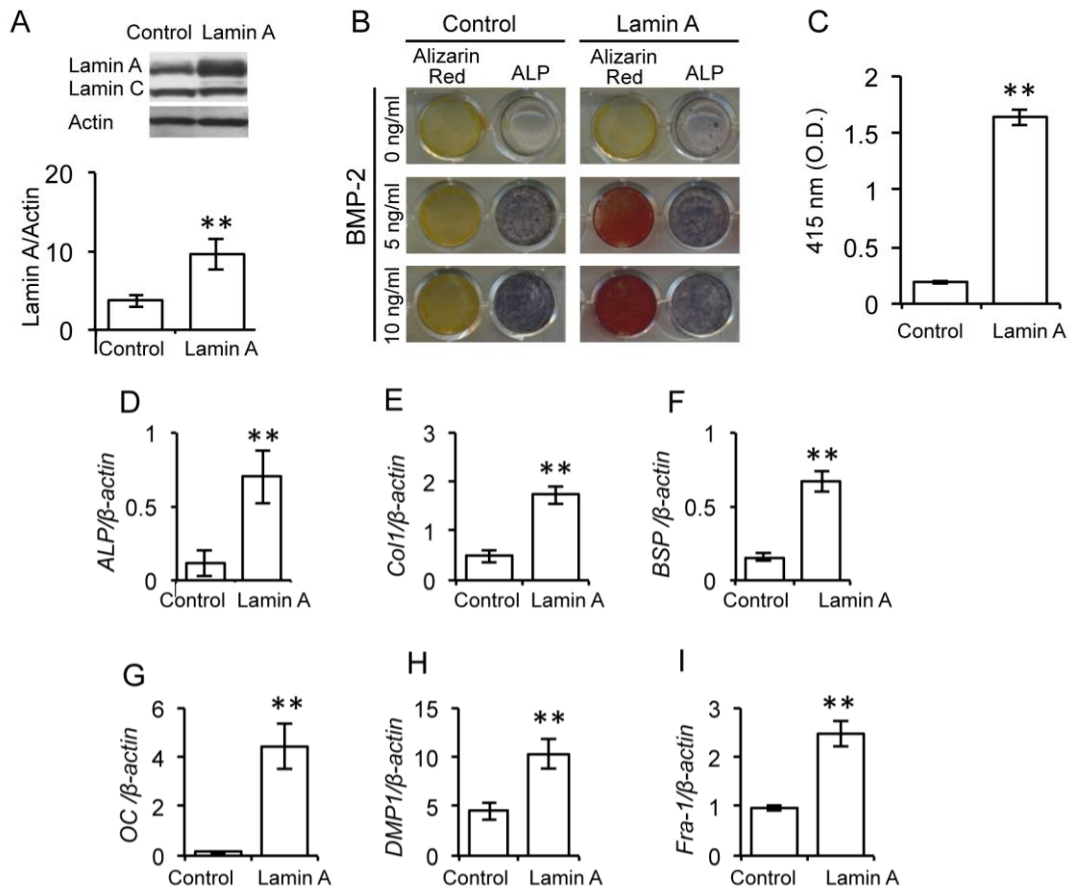


図3 Lamin A の過剰発現が MC3T3-E1 の骨芽細胞分化に及ぼす影響

A lamin A 導入細胞 (Lamin A) とベクター導入細胞 (Control) における lamin A, lamin C, actin の発現。Lamin A と Control で検出された lamin A の発現レベルは、actin の発現レベルで補正して相対的な発現量を表すグラフとした (** $p < 0.01$)。B 分化培地を用いて Lamin A と Control を BMP-2 (0, 5, 10 ng/ml) の存在下で 21 日間培養して ALP 活性と石灰化を染色によって評価した。C Lamin A と Control について、alizarin red で染色後にギ酸によって溶出させた色素を吸光度測定 (O.D. 415) した染色強度 (** $p < 0.01$)。D-K 分化培地を用いて Lamin A と Control を BMP-2 の存在下で 21 日間培養し、ALP (D)、Col1 (E)、BSP (F)、OC (G)、DMP1 (H)、Fra-1 (I) の発現レベルを real time PCR によって測定した。グラフは各発現レベルを β -actin の発現レベルで補正した相対的な発現量。Lamin A で検出された各遺伝子の発現量は Control と比較した (** $p < 0.01$)。

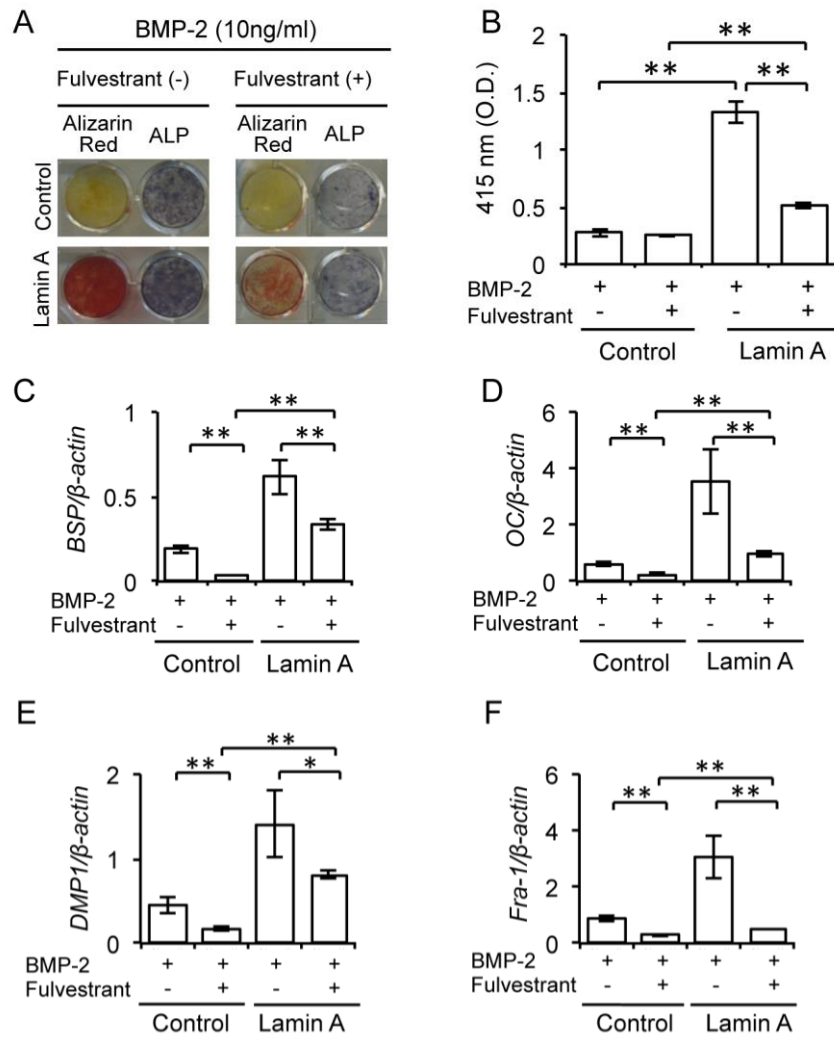


図4 Lamin AによるMC3T3-E1の骨芽細胞分化に及ぼすfulvestrantの影響

A, B 分化培地を用いて lamin A 導入細胞 (Lamin A) とベクター導入細胞 (Control) を BMP-2 (10 ng/ml) と fulvestrant (10 μM) 添加または非添加で 21 日間培養した。**A** ALP 活性と石灰化度を染色によって評価した。**B** 前項 **A** の alizarin red 染色試料から色素を溶出させ、吸光度測定 (O.D. 415) によって求めた染色強度 (** $p < 0.01$)。 **C-F** 分化培地を用いて Lamin A と Control を BMP-2 (10 ng/ml) と fulvestrant (10 μM) 添加または非添加で 21 日間培養した。BSP (C), OC (D), DMP1 (E), Fra-1 (F) の遺伝子発現を real time PCR によって評価した。グラフは、各遺伝子の発現レベルをβ-actin 発現レベルで補正した相対的な発現量 (** $p < 0.01$ および * $p < 0.05$)。

表 1 Real time PCR に使用したプライマーの塩基配列

Gene	Sense Primer (5'→3')	Antisense Primer (5'→3')
Lamin A/C	GTCGATGAAGAGGGAAAGTT	AAAGGATCGTCACCATTCTG
ALP	ATGTCAACCGAAACGCCTCAG	ATGGCGGAGTCGAACATGGCA
Col1	AGGCTGGTGTGATGGGATTC	TTCACCTCTCTCACCAGCAG
BSP	TTTAAGTACCGGCCACGCTA	AACTATCGCCGTCTCCATTT
OC	AGGGAGGAAACAGAACTAAC	TTCACTACCTTATTGCCCTC
DMP1	CAACTGGCTTTTCTGTGGCAA	TGGGTGCGCTGATGTTTGCT
Fra-1	AGGAGTCATACGAGCCCTAG	CTTCGGTTTCTGCACTTAGC
β -actin	ATCTATGAGGGTTACGCGCT	CTGTGGTGGTGAAGCTGTAG

第 2 章

Progerin の発現は前骨芽細胞様株化細胞 MC3T3-E1 における骨芽細胞分化と β -catenin シグナル系を阻害する

緒言

核ラミナは内核膜を裏打ちする薄層であり、その構成タンパクには lamin A, lamin B, lamin C の 3 タイプが知られる[28,29]。これらは様々な核内因子と相互作用し、核の構造を維持する他に、遺伝子の複製や発現、さらに細胞分化の決定に関しても重要な役割を有するとされる[30]。このうちヒト lamin A と lamin C はいずれも、ヒト染色体 1q21 に存在する LMNA 遺伝子からの転写産物である。LMNA 遺伝子は 12 個のエクソンから成り、alternative splicing によって lamin A と lamin C が産生される。その結果、N 末端側の 566 個のアミノ酸は共通であるが、lamin A は 664 個のアミノ酸から、lamin C は 572 個のアミノ酸からなる[31,32]。また、lamin C は LMNA 遺伝子のエクソン 1~10 の直接的な転写産物であるのに対して、lamin A のコード領域はエクソン 1~12 であり、翻訳後修飾によって C 末端側の 18 アミノ酸残基も切断される[33-35]。一方、lamin A の遺伝子変異体は遺伝性早老症の Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) を発症させることが知られている。HGPS は加齢変化の他に重度の骨粗鬆症や骨変形症を伴う疾患として位置づけられている[36]。HGPS の患者では、LMNA 遺伝子のエクソン 11 の 1,824 番目の cytosine に点突然変異が生じ、その結果 cytosine が thymine に置換 ($C_{1,824} \rightarrow T$) されることで異常な splicing が生じ、C 末端側の 50 アミノ酸が欠失した progerin が産生されて核内に蓄積する[33, 36-38]。

マウス LMNA 遺伝子のエクソン 8~11 を欠損させた遺伝子改変マウスでは、ヒト HGPS 患者と同じように骨量の減少をともなう重度の骨粗鬆症と骨変形症が観察されている[39]。また、多量の progerin タンパクを発現させたマウスでは、骨折、骨の低石灰化、そして広範囲な骨組織における骨細胞と骨芽細胞の欠損を伴った重度の骨形態異常が報告されている[40-42]。さらに、siRNA による lamin A/C の発現抑制では、ヒト骨芽細胞と骨髄間葉系細胞における ALP, OC, BSP および Osx の発現レベル低下と石灰化の抑制が生じる[17,18]。しかし、骨芽細胞分化を阻害する progerin の作用メカニズムは解明されていない。

β -catenin シグナルは、間葉系幹細胞や骨芽細胞前駆細胞の骨芽細胞分化にとって重要な役割を持つことが知られている[43-45]。 β -catenin の活性化はそれ自身のリン酸化による。すなわち、非リン酸化 β -catenin (active β -catenin) は、glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) と axin との複合体から分離して核内へ移

行し、標的遺伝子の TCF/LEF motif に結合してその遺伝子発現を誘導する。一方、リン酸化された β -catenin (inactive β -catenin) は、GSK-3 β と axin の複合体に捉えられ、ユビキチン化の後に細胞質内のプロテアソームによって分解される[46]。間葉系幹細胞における lamin A/C の過剰発現は、骨芽細胞分化を強く促進するとともに、 β -catenin の活性化を誘導し、核内での β -catenin と TCF/LEF motif の結合を増強する[25]。一方、lamin A/C 欠損マウスにおいては、 β -catenin の低レベル発現と骨組織中の脂肪細胞増加が認められている[16]。これらの報告は、lamin A が β -catenin のシグナル経路を活性化することで骨芽細胞分化を促進することを示唆している。

本章の実験は、ヒトで生じる progerin に相当する C 末端側 50 アミノ酸を欠損させたマウス progerin をコードする lamin A dC50 cDNA を作成し、前骨芽細胞様株化細胞 MC3T3-E1 へ導入し、この遺伝子導入が骨芽細胞分化に及ぼす影響と β -catenin 及び GSK-3 β の発現の関係について検討した。

材料および方法

1. 細胞培養

MC3T3-E1 の培養は、第 1 章に記載の方法で行った。50 mM β -glycerophosphate, 50 μ g/ml アスコルビン酸および 10^{-8} M dexamethasone を含む培地を分化培地とし、分化培地に BMP-2 を添加したものを石灰化培地とした。コンフルエントに達した MC3T3-E1 を石灰化培地にて 7, 14, 21 日間培養した。

2. マウス lamin A dC50 cDNA の作成

Lamin A dC50 作成のために、約 1.8 kb のマウス lamin A cDNA[47]を鋳型とし、プライマーセット (P1: 5'-GCA TGC TCG CAC TAG CGG GCG TGT-3', P2: 5'-TTA CAT GAT GCT GCA GTT CTG GGA GCT CTG GGC TCC CGC TCC ACC GGC-3') を用いた PCR によって、*SphI* と *NotI* 断端を有する 3'側の短い DNA 断片を増幅した (図 1A)。次に、鋳型 cDNA を *SphI* で消化し、FACE1/Zmpste24 認識部位[33-35]を含む 50 アミノ酸コード領域の 150 bp が欠失した *XbaI-SphI* フラグメントを調製し、これと *SphI-NotI* フラグメント (前述の *SphI* と *NotI* 断端を有する DNA 断片) とを、EGFP 配列を削った発現ベクター-pPyCAG-IP にクローニングした (図 1A)。なお、欠失させた 150 bp がヒト progerin で欠損している 50 アミノ酸に相当することは、得られた lamin A dC50 の塩基配列決定 (single extension service, Sigma-Aldrich) によって確認した (図 1B)。

3. MC3T3-E1 への lamin A dC50 の遺伝子導入

Lamin A dC50 を組込んだ発現ベクターは、第 1 章に記載の方法と同様に

Lipofectamine LTX と plus reagent を用いて MC3T3-E1 へ導入し、陽性クローンを選択した (以下, lamin A dC50 導入細胞)。また, lamin A dC50 と EGFP 配列を持たないベクターを導入した MC3T3-E1 を対照群の細胞とした。

4. RT-PCR と半定量的 RT-PCR

Lamin A dC50 導入細胞と対照群の細胞から全 RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用して抽出し, 第 1 章に記載の方法で cDNA を合成した。

RT-PCR は 1 μ l の cDNA に対して 19 μ l の 2.5 U *Taq* DNA polymerase とプライマーを含む反応液を加えて全量を 20 μ l にした後, 94°C で 15 秒, 64°C で 30 秒のサイクルを 35 サイクル繰返し, 最後に 72°C, 10 分間反応させた。なお, 本章の実験における lamin A および laminA dC50 の検出では, 5'-GCA TGC TCG CAC TAG CGG GCG TGT -3' と 5'-GCG GCC GC T TAC ATG ATG CTG CAG-3' のプライマーセットを用いた。反応後 10 μ l を 2.0% アガロースゲル電気泳動に供し, ethidium bromide 染色を施した。

ALP, Col1, BSP, OC, DMP1, Runx2, Osx, β -actin の発現レベルは, 第 1 章に記載の方法で real-time PCR によって調べた。このために, 第 1 章の表 1 に記載のプライマーに加えて, 骨芽細胞分化関連転写因子 Runx2 については 5'-CAC AAA TCC TCC CCA AGT GG-3' と 5'-GGA GGG CCG TGG GTT CTG AG-3'), Osx については 5'-GGA GGT TTC ACT CCA TTC CA-3' と 5'-TAG AAG GAG CAG GGG ACAGA-3' の各プライマーセットを用いた。

5. Western blotting

Lamin A dC50 導入細胞と対照群の細胞から得たタンパク量 20 μ g の細胞溶解液を用いて, 第 1 章に記載の方法で Western blotting を行った。1 次抗体は polyclonal rabbit anti-lamin A/C antibody (Santa Cruz Biotechnology), anti-mouse GFP antibody (Medical & Biological Laboratories), anti-phospho-GSK-3 β (Ser9) antibody (Cell Signaling Technology), anti- β -catenin antibody (BD PharMingen), anti-active- β -catenin (Upstate Biotechnology) および goat anti-mouse actin antibody (Santa Cruz Biotechnology) を, 2 次抗体は HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) および HRP-conjugated donkey anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology) を使用した。

6. 組織化学的検討

ALP 染色, 石灰化基質の検出, 溶出 alizarin red S 量の測定を第 1 章に記載の方法と同様に行った。

7. レポーターアッセイ

β -catenin の活性測定のために, β -catenin 結合配列である TCF/LEF motif をコ

ードするプラスミド TOP/GFP[26]を lamin A dC50 導入細胞と対照群の細胞に導入した。使用した TOP/GFP は、金沢大学がん進展制御研究所 大島正伸博士より供与を受け、導入は第 1 章に記載の方法で行った。薬剤選択には 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Geneticin (Sigma-Aldrich) を使用して陽性クローンを回収した。得られた細胞はさらに分化培地を用いて 21 日間培養し、メタノールで 10 分間固定した。その後、500 倍に希釈した anti-GFP antibody と 4°C で一晩反応させ、洗浄後に Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG antibody と反応させた。GFP の発現を蛍光顕微鏡 (BZ-8100, KEYENCE) で観察した。なお、核染色には 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の DAPI 溶液を使用した。

8. 回復実験

Lamin A dC50 導入細胞と対照群の細胞を、5 μM SB216763 (Sigma-Aldrich) または 5 μM deoxycholic acid (DCA, Sigma-Aldrich) を含む分化培地で 21 日間培養した。RNA の抽出後、ALP と Col1 の発現レベルを検出するために real time PCR を行った。

9. 統計処理

統計学的処理を必要とする実験はすべて 3 回繰返し、得られた結果を平均 \pm SD として表し、Student's *t*-test あるいは one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test を使用して評価した。 $p < 0.05$ あるいは $p < 0.001$ を有意とした。

結 果

1. ヒトおよびマウスの lamin A と lamin A dC50 の C 末端アミノ酸配列の比較

ヒト lamin A は、ヒト染色体 1q21 の LMNA 遺伝子のエクソン 1~12 にコードされる 664 アミノ酸からなる。しかし実際には C 末端部の翻訳後修飾で、SIM と LLGNSSPRTQSPQNC を含む 18 アミノ酸が lamin A 前駆体から切断されて成熟 lamin A となる (図 1B)。ヒト lamin A では、エクソン 11 に存在する 1,824 番目の cytosine の thymine への点突然変異 (C_{1,824} \rightarrow T) が起きると、18 残基の切断が起きず、その代わりに C 末端側 SPQNC の近位に位置する 607~656 番目に存在する 50 アミノ酸の異常切断が生じる (図 1B)。一方、マウス lamin A も LMNA 遺伝子のエクソン 1 から 12 によってコードされているが、ヒトよりもアミノ酸が 1 つ多く、665 アミノ酸から構成されている[48]。図 1B に示すように本章の実験では、この C 末端側のアミノ酸配列をアライメントして、ヒト lamin A dC50 の欠損部位に相当するマウス lamin A の 608 から 657 番目の 50 アミノ酸が欠失するように lamin A dC50 cDNA を作成した。その後、発現ベクタ

一の pPyCAG-IP に組み込み、MC3T3-E1 に導入した。その結果、RT-PCR では、マウス lamin A と lamin A dC50 の増幅産物はそれぞれ 706 bp と 556 bp として確認できた (図 2A)。抗 lamin A/C 抗体を利用した Western blotting では lamin C (65 kDa) のやや上方に lamin A dC50 のタンパク発現が認められた (図 2B)。対照群では lamin A dC50 の遺伝子及びタンパク発現は検出できなかった (図 2A, B)。

2. MC3T3-E1 の初期骨芽細胞分化における lamin A dC50 の影響

Lamin A dC50 導入細胞と対照群の細胞をそれぞれ分化培地で培養し、骨芽細胞への分化能について検討した。その結果、7, 14, 21 日間の培養で、どちらの細胞群にも弱い ALP 活性は検出されたが、明らかな石灰化は確認できなかった (図 3A, B)。一方、対照群の細胞では骨タンパクの ALP, Col1, BSP, OC, DMP1 と骨芽細胞分化関連転写因子の Runx2, Osx の発現が確認された (図 3C-I)。しかし、lamin A dC50 導入細胞では、対照群の細胞と比較して ALP, Col1, BSP, DMP1, Runx2 の発現レベルが有意に減少していた。なお、OC と Osx の発現レベルに有意な変化は認められなかった。

3. MC3T3-E1 の石灰化誘導における lamin A dC50 の影響

Lamin A dC50 導入細胞と対照群の細胞をそれぞれ石灰化培地で培養し、石灰化誘導能、すなわち骨芽細胞の最終分化に与える lamin A dC50 の影響について検討した。7, 14, 21 日間培養した結果、ALP 活性についてはいずれの細胞群にも有意な変化は認められなかった。一方、培養 21 日目の対照群において alizarin red 陽性の石灰化基質を検出したが、lamin A dC50 導入細胞では顕著な石灰化は認めなかった (図 4A, B)。また、lamin A dC50 導入細胞は、対照群と比較して、BSP, OC, DMP1, Runx2, Osx の発現レベル減少が (図 4E-I)、ALP と Col1 は発現レベル増加が認められた (図 4C, D)。

4. MC3T3-E1 の β -catenin シグナルにおける lamin A dC50 の影響

Lamin A dC50 導入細胞と対照群の細胞に TOP/GFP プラスミドを導入後、分化培地を用いて 21 日間培養し、TCF/LEF motif に対する β -catenin の結合活性及び β -catenin と GSK-3 β の発現を検討した。蛍光染色では、対照群の核に強い GFP の発色が認められたが (図 5A, C)、lamin A dC50 導入細胞では GFP の発現は著しく減少していた (図 5B, D)。同様に Western blotting でも、GFP の発現は対照群で強く、lamin A dC50 導入細胞で弱かった (図 6A, B)。すなわち、 β -catenin の TCF/GFP への結合能は対照群で強く、lamin A 導入細胞では弱いことが明らかになった。さらに total β -catenin に対する active β -catenin の発現 (図 6A, C) は、対照群と比較して lamin A dC50 導入細胞で低かった。同様に、対照群と比較して total GSK-3 β に対するリン酸化 GSK-3 β の発現も lamin A dC50 導入細胞において有意に減少していた (図 6A, D)。

5. Lamin A dC50 を発現した MC3T3-E1 の β -catenin シグナルに与える SB216763 と DCA の影響

前項の結果から, lamin A dC50 による MC3T3-E1 の分化抑制は, active β -catenin とリン酸化 GSK-3 β の発現減少に関係していると考えられた。そこで SB216763 と DCA を使用した回復実験を行った。SB216763 は GSK-3 β の阻害剤として β -catenin の発現を増加させ[49], DCA はヒト大腸癌細胞の β -catenin activator として知られる[50]。Lamin A dC50 導入細胞と対照群の細胞とを SB216763 添加, DCA 添加, あるいはこれら非添加の分化培地で21日間培養し, ALP と Col1 の遺伝子発現を比較した。その結果, DCA 添加で培養した lamin A dC50 導入細胞では, DCA 非添加の lamin A dC50 導入細胞よりも強い Col1 および ALP の発現を認めた (図 7)。さらに, SB216763 を添加した lamin A dC50 導入細胞では, 非添加の lamin A dC50 導入細胞よりも ALP 遺伝子発現が増加し, lamin A dC50 非導入の MC3T3-E1 での ALP 発現レベルにまで回復した (図 7)。

考 察

本章の実験によって, マウス progerin (lamin A dC50) は, 初期の骨芽細胞分化と成熟骨芽細胞への最終分化を抑制することが明らかになった。しかし, 今回作成したマウス lamin A dC50 がマウス HGPS の病因となる本来の progerin と同一配列であるかは不明である。なぜならば, 今回作成したマウス lamin A dC50 は, ヒト lamin A dC50 に一致する 50 アミノ酸 (図 1B) を実験的に欠損させたもので, C 末端側に生じると考えられる SIM の切断については考慮されていない。しかし, ヒトとマウスの lamin A dC50 の C 末端側のアミノ酸配列の保存は良好であり (図 1B), その相同性の高さから, 本章の実験で過剰発現させたマウス lamin A dC50 は, 本来のマウス progerin にかなり近い特性があると期待される。Lamin A dC50 は骨タンパクの OC, BSP と転写因子の Runx2, Osx の発現を抑制した (図 3E, H および図 4E, F, H, I)。これは, ヒト lamin A/C の shRNA を使用した抑制実験の結果ともほぼ一致する[17,18]。このようなことから, 本章の実験で作製した lamin A dC50 の遺伝子導入細胞を用いたアッセイは, ヒトあるいはマウスにおける細胞レベルでの HGPS の病態を評価するために有効な方法だと考えられた。

骨芽細胞分化は間葉系幹細胞の骨芽細胞系への commitment から始まる。骨芽細胞へ commit された細胞は Col1 と ALP の発現が促進し, 骨芽細胞への初期分化が誘導される。続いて, 様々な分化誘導因子の働きで OC, BSP, Runx2, さらに Osx が発現し, 成熟骨芽細胞への分化が促進されて基質の石灰化が誘導される[2]。その後, 成熟骨芽細胞の一部はアポトーシスによって消滅するか,

あるいは骨基質内に取り込まれて DMP1 を強く発現する骨細胞となる[6,7]。MC3T3-E1 は ALP 活性を示すほかに Col1, Runx2 の発現が認められる[51,52]。そして低レベルではあるが、成熟骨芽細胞のマーカーの BSP, OC, Osx, DMP1 の発現も検出されている[52,53]。ところが、今回、分化培地で 21 日間培養したにも関わらず、lamin A dC50 導入細胞では石灰化を誘導できなかったことから(図 3A, B), lamin A dC50 導入細胞はこの培養条件では、最終分化をする以前の前骨芽細胞の表現形質を維持していると考えられた。さらに、ALP, Col1, BSP, DMP1, Runx2 の発現レベルは、lamin A dC50 導入細胞で有意に減少したことから、lamin A dC50 は MC3T3-E1 の初期分化をも抑制すると考えられた。しかし、OC と Osx の発現レベルが lamin A dC50 導入細胞と非導入細胞とで差異がみられなかったことを説明できるデータは現在のところない。

一方、石灰化培地で 21 日間培養した lamin A dC50 導入細胞においては、基質の石灰化や BSP, OC, DMP1, Runx2, Osx の発現レベルが、対照群の細胞よりも有意に減少した (図 4A, B, E-I)。Lamin A/C siRNA を導入した間葉系幹細胞と骨芽細胞においても本章の結果と同様に、Runx2 の DNA 結合能の減少と OC, BSP, Osx の発現低下が報告されている[17,18]。さらに、lamin A/C 欠損マウスも、長管骨における OC 遺伝子の発現レベルの減少と頭蓋と体肢の骨量の低下が報告されている[39-42]。これらのことから、lamin A dC50 は MC3T3-E1 の最終分化を阻害することで骨タンパクの発現と石灰化を抑制していると考えられた。

BMP-2 活性は、Smad や mitogen-activated protein kinase などの BMP-2 シグナル分子の活性化と関係している。そうした分子はまた Runx2 や Osx の発現とともに BMP-2 を介した骨芽細胞分化においても重要な役割をしている[54]。したがって、lamin A dC50 の過剰発現は MC3T3-E1 における BMP-2 シグナルを阻害し、BSP, OC, DMP1, Runx2, Osx などの骨タンパクの発現を抑制しながら、成熟骨芽細胞への分化を負に制御していると考えられる。しかし、石灰化培地で培養した lamin A dC50 導入細胞においては、検出された ALP と Col1 の発現レベルが増加していることから (図 4C, D), lamin A dC50 が BMP-2 シグナル以外の別のシグナル経路を活性化している可能性がある。

本章の結果から MC3T3-E1 における lamin A dC50 と β -catenin の相互作用についても明らかになった。すなわち、TOP/GFP プラスミドによるレポーターアッセイで、対照群の細胞に強い GFP 発現が認められ、lamin A dC50 導入細胞では GFP 発現レベルが著しく低下することが示された (図 5)。Western blotting でも GFP と active β -catenin の発現量の減少が認められた (図 6)。これらの結果は、lamin A dC50 による骨芽細胞分化の抑制 (図 3C-E, G, H, 図 4A, B, E-I) は active β -catenin の減少と関係していることを示唆している。実際、lamin A/C の発現抑制は、 β -catenin の発現レベルを減少させ、 β -catenin の TCF/LEF motif への結合を阻害することが報告されている[17,18]。本章の実験で得られた結果で興味

深い点は、active β -catenin の発現レベル (図 6A, C) と GSK-3 β のリン酸化レベル (図 6 A, D) が同時に減少したことである。GSK-3 β の脱リン酸化は GSK-3 β と axin の複合体における β -catenin のリン酸化を促進し、さらにそのリン酸化 β -catenin のユビキチン化およびプロテオソームによる分解が生じることが報告されている[46]。したがって、lamin A dC50 の過剰発現による骨芽細胞分化の抑制は、細胞内の β -catenin と GSK-3 β の相互作用に依存すると考えられた。実際、lamin A dC50 導入細胞で低下していた Col1 と ALP の発現レベルは、DCA と SB216763 を用いた回復実験で対照群の細胞レベル近くまで回復した (図 7A, B)。すなわち lamin A dC50 の発現が β -catenin のリン酸化と GSK-3 β の脱リン酸化とを同時に誘導することで、それより下流の β -catenin のシグナル経路を阻害し、MC3T3-E1 の初期骨芽細胞分化を抑制していると考えられた。

本章の実験的検討から MC3T3-E1 におけるマウス lamin A dC50 の強発現は、GSK-3 β の脱リン酸化および β -catenin の不活化を誘導し、骨芽細胞分化を負に制御していることが示された。しかし、lamin A dC50 と β -catenin あるいは GSK-3 β の直接的な相互作用については依然不明であり、今後はさらに、lamin A と β -catenin シグナルの制御分子との相互作用について研究を進める必要がある。

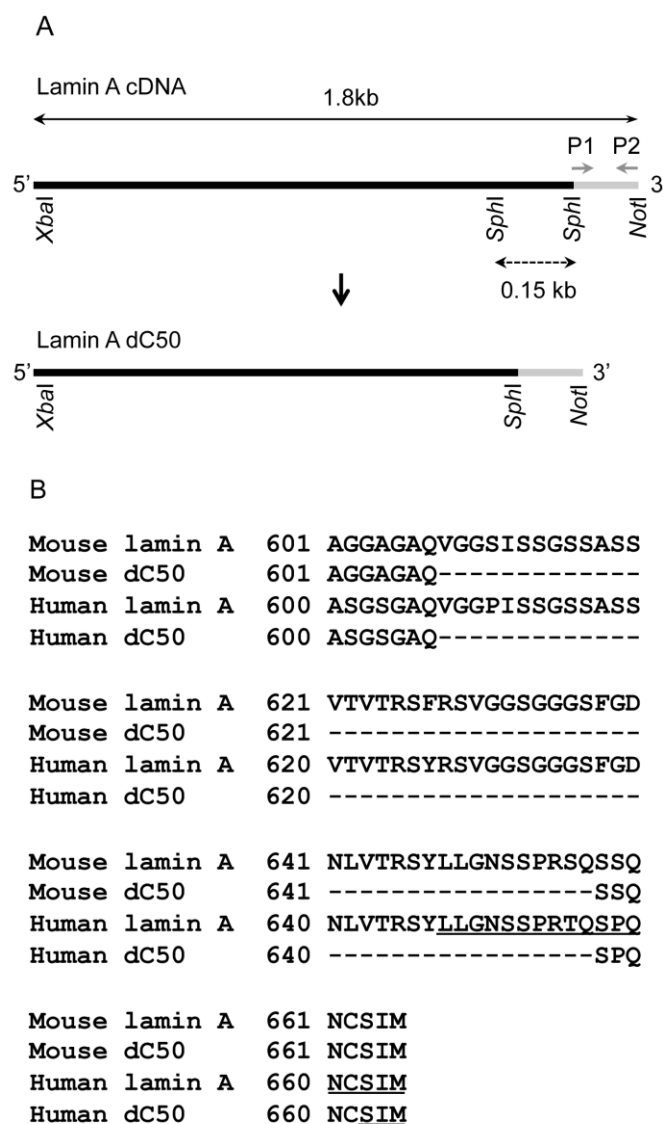


図 1 マウス progerin (lamin A dC50 cDNA) の作成とヒトおよびマウスの lamin A と lamin A dC50 の C 末端アミノ酸配列の比較

A マウス lamin A cDNA と lamin A dC50 の模式図とセンス (P1) およびアンチセンスプライマー (P2) の位置をそれぞれ示す。P1 と P2 は 3'側の短い cDNA 断片 (*SphI-NotI*) を合成するために使用した。そして 3'側の 0.15 kb (*SphI-SphI*) を切断した 5'側の DNA 断片 (*XbaI-SphI*) と連結し、発現ベクター pPyCAG-IP へサブクローニングした。**B** ヒトおよびマウスの lamin A と lamin A dC50 (dC50) の C 末側のアミノ酸配列は、それぞれ良好に保存された構造をとる。ヒト lamin A は、翻訳後修飾によってアンダーラインで示す 18 アミノ酸が欠損している。破線はヒトおよびマウスの dC50 において欠損した 50 アミノ酸を示す。ヒト dC50 は LMNA 遺伝子のエクソン 11 にある 1,824 番目の cytosine が thymine に置換されることで異常な splicing が生じ、結果として 50 アミノ酸が欠損する。マウス dC50 もヒト dC50 と同じ位置のアミノ酸が欠損するように cDNA を作成した。

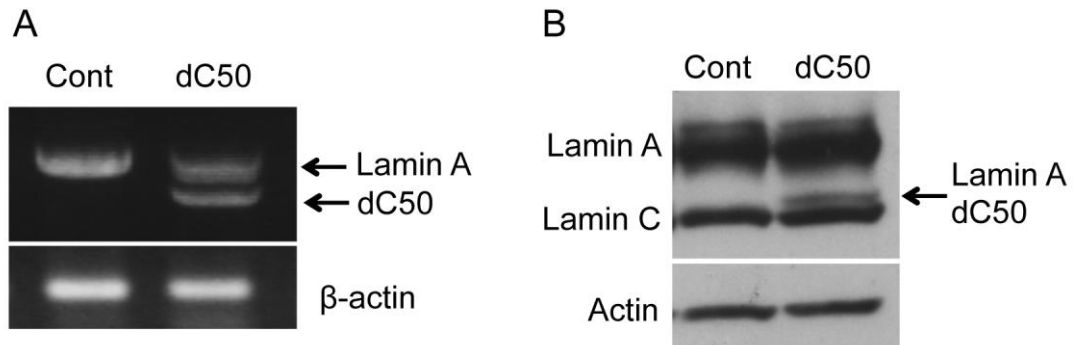


図 2 MC3T3-E1 へ lamin A dC50 の導入

A Lamin A dC50 を導入した MC3T3-E1 (dC50) から RNA を抽出し, lamin A 特異的なプライマーを使用して RT-PCR を行った。上のバンドが本来の lamin A, 下のバンドは lamin A dC50 (dC50) の発現を示す。対照にはベクターのみを導入した細胞 (Cont) を使用した。内部対照として β -actin の発現を示した。**B** lamin A dC50 (dC50) とベクターのみ (Cont) を導入した MC3T3-E1 の細胞溶解液をそれぞれ SDS-PAGE で分画後, polyclonal anti-lamin A/C 抗体を使用して Western blotting を行った。上のバンドは lamin A, 下のバンドは lamin C を示す。そして lamin A dC50 は lamin C のやや上に位置するバンドである。なお, 内部対照 actin を示した。

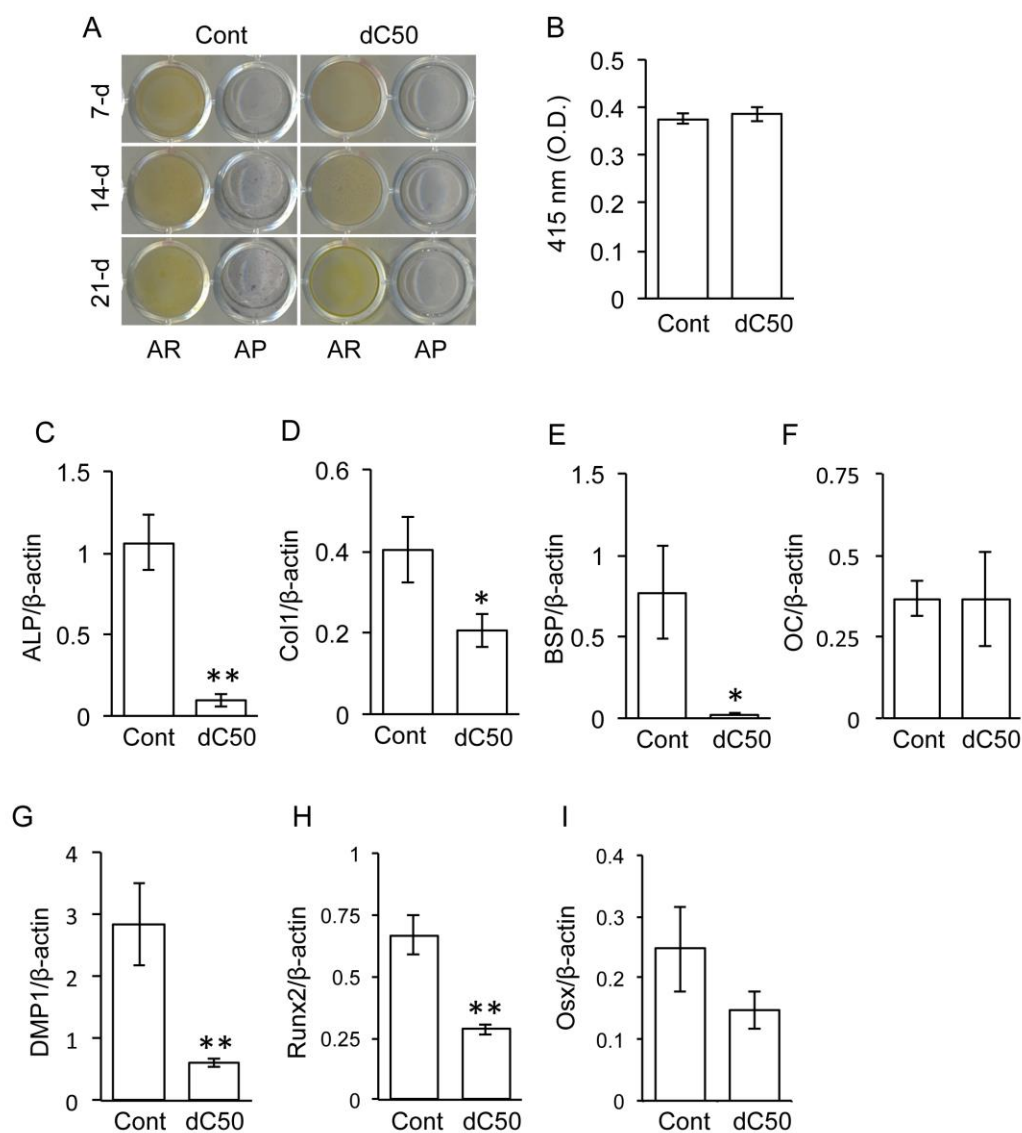


図3 分化培地を用いたときの lamin A dC50 が MC3T3-E1 の骨芽細胞分化に及ぼす影響

A ALP 活性と基質の石灰化に与える影響。Lamin A dC50 導入細胞 (dC50) を分化培地で 7, 14, 21 日間培養し, ALP 染色と alizarin red 染色を行った。対照群としてベクター導入細胞 (Cont) を使用した。**B** Alizarin red の染色強度を測定した。dC50 と Cont の alizarin red 染色後, ギ酸処理によって色素を溶出させ, O.D. 415 の吸光度を測定した。**C~I** dC50 と Cont における骨タンパクと転写因子の発現をそれぞれ比較した。細胞は分化培地で 21 日間培養し, ALP (C), Col1 (D), BSP (E), OC (F), DMP1 (G), Runx2 (H), Osx (I) に特異的なプライマーを使用して real time PCR を行った。それぞれの発現レベルは β -actin の発現レベルで補正し, 相対的な発現量とした。dC50 における骨タンパクと転写因子の発現量は Cont と比較した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)。

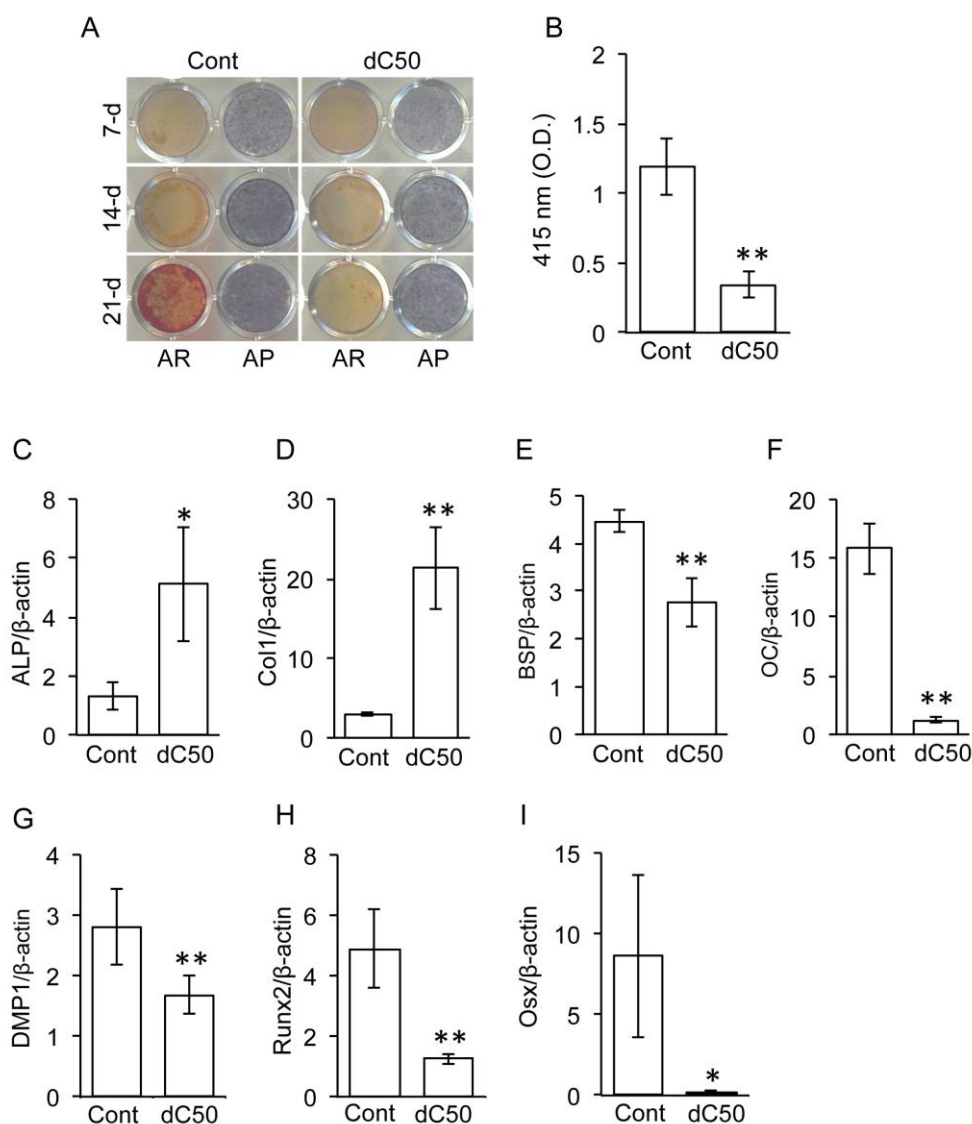


図4 石灰化培地を用いたときの lamin A dC50 が MC3T3-E1 の骨芽細胞分化に与える影響

A ALP 活性と基質の石灰化に与える影響。Lamin A dC50 導入細胞 (dC50) は石灰化培地で 7, 14, 21 日間培養し, ALP 染色と alizarin red 染色を行った。対照群としてベクターのみを導入した細胞 (Cont) を使用した。**B** dC50 と Cont における alizarin red 染色の染色強度を測定した。染色後, ギ酸処理によって色素を溶出させ, O.D. 415 の吸光度を測定した。**C-I** dC50 と Cont における骨タンパクと転写因子の発現を調べた。細胞は石灰化培地で 21 日間培養し, ALP (C), Col1 (D), BSP (E), OC (F), DMP1 (G), Runx2 (H), Osx (I) に特異的なプライマーを使用して real time PCR を行った。それぞれの発現レベルは β -actin の発現レベルで補正し, 相対的な発現量とした。dC50 における骨タンパクと転写因子の発現量は Cont と比較した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)。

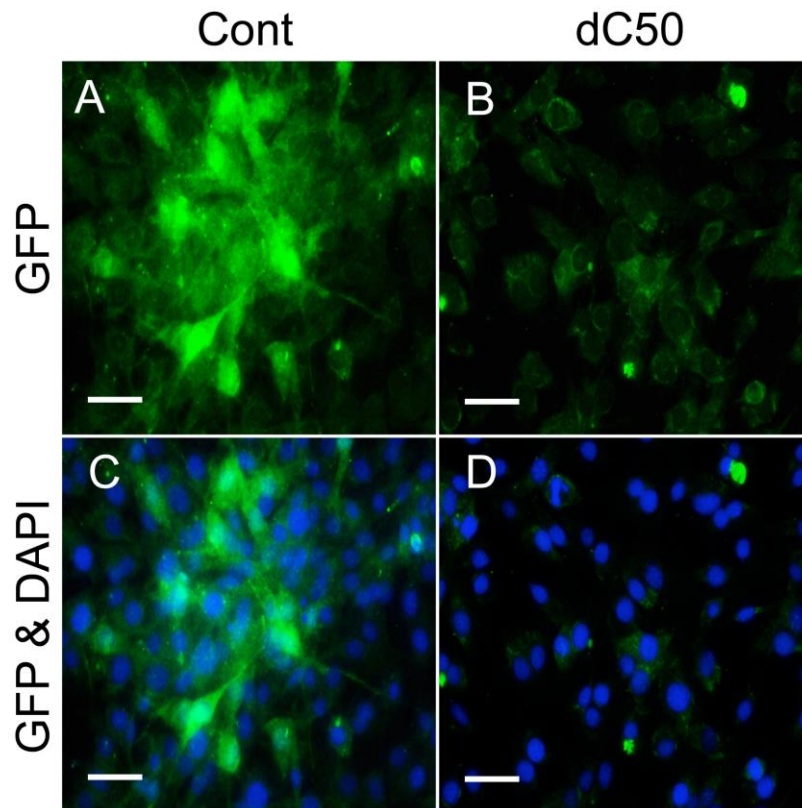


図5 Lamin A dC50 を導入した MC3T3-E1 における β -catenin 活性の検出

A, B ベクターのみを導入した細胞 (Cont) へ TOP/GFP を発現させ、分化培地で 21 日間培養した。**B, D** Lamin A dC50 導入細胞 (dC50) に TOP/GFP を発現させ、分化培地で 21 日間培養した。GFP の発現は TCF/LEF motif に β -catenin が結合することで検出される。核の染色は DAPI 溶液を使用した (スケールバーは 100 μ m)。

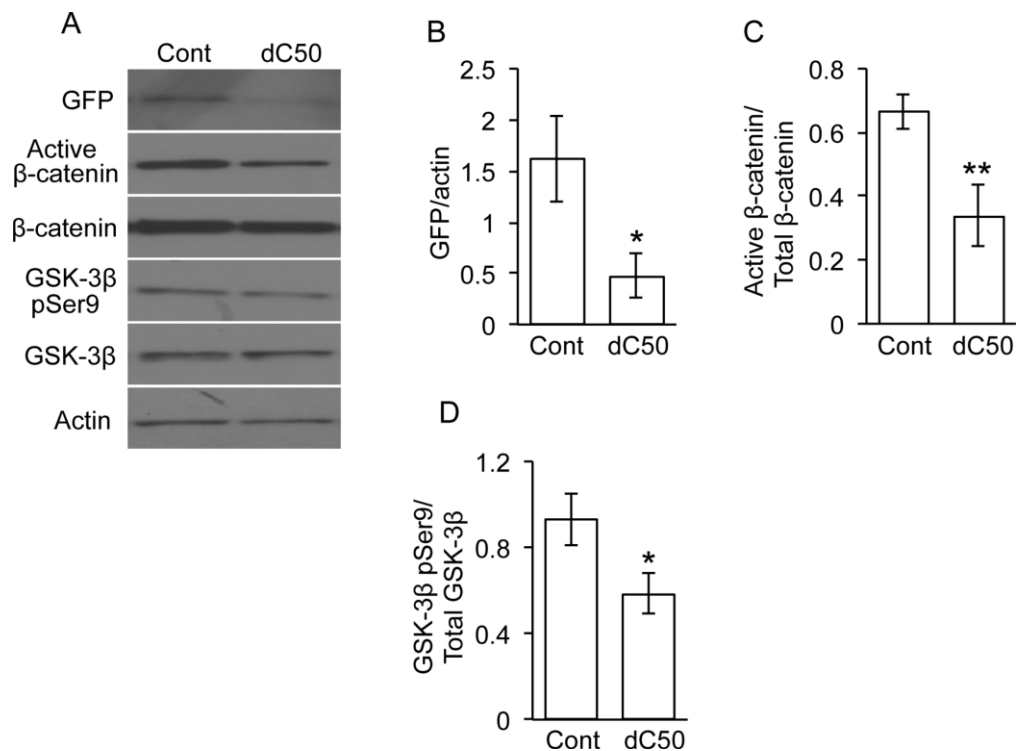


図6 Lamin A dC50 によるβ-catenin と GSK-3βの発現量の変化

Lamin A dC50 導入細胞 (dC50) に TOP/GFP を発現させ、分化培地で 21 日間培養を行った。対照群としてベクター導入細胞 (Cont) に TOP/GFP を発現させ、同じく 21 日間培養を行った。A β-catenin と GSK-3β を Western blotting によって検出した。GFP, total β-catenin (β-catenin), active β-catenin, リン酸化 GSK-3β (GSK-3β pSer9), total GSK-3β (GSK-3β) は、それぞれの特異的な抗体を使用して検出した。内部対照の actin を検出するために抗 actin 抗体も使用した。B-D dC50 および Cont における GFP, active β-catenin, GSK-3β pSer9 の発現レベルを調べた。Western blotting で検出された GFP, active β-catenin と GSK-3β pSer9 の発現レベルは、actin, β-catenin, GSK-3β の発現レベルでそれぞれ補正して相対的な発現量とした。GFP, GSK-3β pSer9 および active β-catenin 発現量は Cont と比較した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$)。

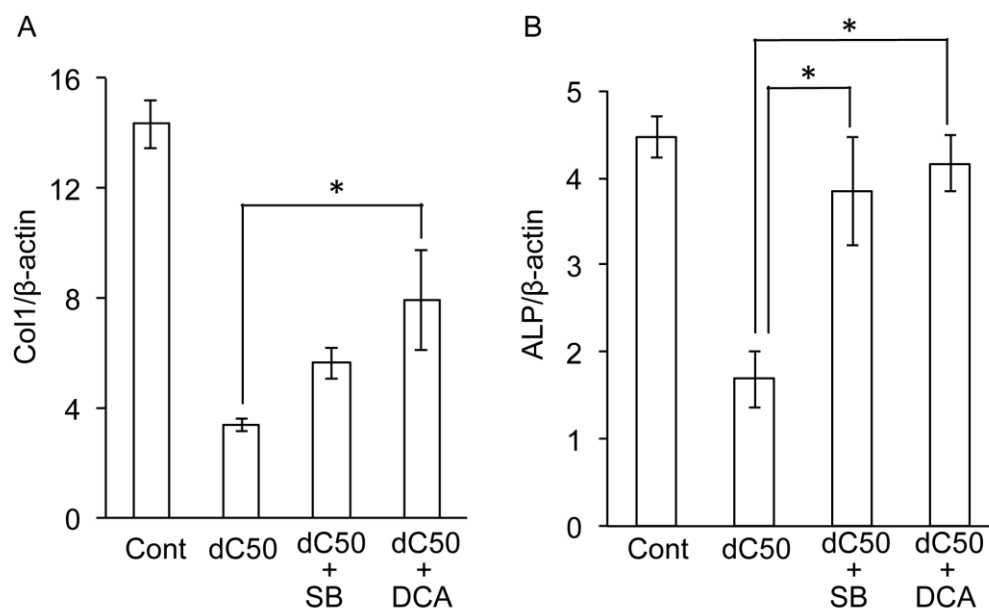


図 7. Lamin A dC50 を導入した MC3T3-E1 の ALP と Col1 の発現に与える SB216763 と DCA の影響

Lamin A dC50 導入細胞 (dC50) に SB216763 (dC50+SB) あるいは DCA (dC50+DCA) を添加し、分化培地で 21 日間培養して Col1 (A) と ALP (B) の発現パターンを real time PCR で調べた。対照群としてベクター導入細胞 (Cont) を使用した。Col1 と ALP のそれぞれの発現レベルは、 β -actin の発現レベルでそれぞれ補正し相対的な発現量とした ($*p < 0.001$)。

結 論

Lamin A と progerin (lamin A dC50) が前骨芽細胞様株化細胞 MC3T3-E1 の骨芽細胞分化に及ぼす影響について調べた結果、以下の結論を得た。

1. BMP-2 誘導性の骨芽細胞分化と石灰化の促進に伴って lamin A/C の発現レベルの増加が認められた。Estrogen 受容体アンタゴニストの fulvestrant はこの BMP-2 誘導性の骨芽細胞分化と石灰化を抑制した。
2. Lamin A の過剰発現は、BMP-2 存在下での ALP, Col1, BSP, OC, DMP1 および Fra-1 の発現レベルを増加させ、骨芽細胞分化を促進し、石灰化を誘導した。しかし、BMP-2 非存在下では骨芽細胞分化と石灰化を誘導することはできなかった。一方、lamin A の過剰発現下では fulvestrant 存在下においても BMP-2 誘導性の骨芽細胞分化と石灰化が認められた。
3. Lamin A dC50 の過剰発現は、BMP-2 非存在下での ALP, Col1, BSP, DMP1 と Runx2 の発現レベルを減少させた。また、BMP-2 存在下で増加した Runx2 と Osx の発現レベルを低下させ、石灰化を阻害した。
4. Lamin A dC50 の過剰発現は、 β -catenin の核内移行を抑制し、active β -catenin とリン酸化 GSK-3 β の発現レベルを低下させた。リン酸化 GSK-3 β 阻害薬 SB216763 と β -catenin 活性化剤 DCA は、lamin A dC50 の過剰発現によって減少した ALP と Col1 の発現レベルを回復させた。

以上のことから、lamin A は MC3T3-E1 の骨芽細胞分化と石灰化を促進するために重要な役割をもつことが明らかになった。また、lamin A dC50 は初期の骨芽細胞分化と成熟骨芽細胞への最終分化を抑制することが示され、このうち初期の骨芽細胞分化では active β -catenin の発現と GSK-3 β のリン酸化レベルの抑制が関係していることが示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導いただいた本学部歯科保存学第 III 講座佐藤秀一教授および解剖学第 I 講座高橋富久教授に深く感謝いたします。また、格別たるご指導、ご鞭撻を頂いた解剖学第 I 講座内藤昌子准教授に心より感謝申し上げます。さらに本研究に対して多大なご協力を頂いた本学部歯科保存学第 III 講座および解剖学第 I 講座の皆様に深く感謝の意を表します。

参考文献

- [1] 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
- [2] Nakashima K, de Crombrughe B (2003) Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet* 19, 458-466
- [3] Huang W, Yang S, Shao J, Li YP (2007) Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci* 12, 3068-3092
- [4] Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Kimura T, Yasui N, Ochi T, Endo N, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T (1999) Maturational disturbance of chondrocytes in *Cbfa1*-deficient mice. *Dev Dyn* 214, 279-290
- [5] Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, Amizuka N, Ito M, Fukuyama R, Miyazaki T, Kitaura H, Nakamura K, Fujita T, Kanatani N, Moriishi T, Yamana K, Liu W, Kawaguchi H, Nakamura K, Komori T (2007) *Runx2* determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Dev Dyn* 236, 1876-1890
- [6] Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, Ooshima T, Sato A, Ijuhin N, Komori T (2001) Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 16, 2017-2026
- [7] Komori T (2010) Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by *RUNX2*. *Cell Tissue Res* 339, 189-195
- [8] Zhang C (2010) Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor *Osx*. *J Orthop Surg Res* 5, e37
- [9] Hartmann C (2009) Transcriptional networks controlling skeletal development. *Curr Opin Genet Dev* 19, 437-443
- [10] Park JB (2013) The effects of fulvestrant, an estrogen receptor antagonist, on the proliferation, differentiation and mineralization of osteoprecursor cells. *Mol Med Rep* 7, 555-558
- [11] Kim H, Tabata A, Tomoyasu T, Ueno T, Uchiyama S, Yuasa K, Tsuji A, Nagamune H (2015) Estrogen stimuli promote osteoblastic differentiation via the subtilisin-like proprotein convertase *PACE4* in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner*

- [12] Khalid AB, Krum SA (2016) Estrogen receptors α and β in bone. *Bone* 87, 130-135
- [13] Shang ZZ, Li X, Sun HQ, Xiao GN, Wang CW, Gong Q (2014) Differentially expressed genes and signalling pathways are involved in mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to 17- β estradiol. *Int J Oral Sci* 6, 142-149
- [14] Broers JL, Ramaekers FC, Bonne G, Yaou RB, Hutchison CJ (2006) Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev* 86, 967-1008
- [15] Liu B, Zhou Z (2008) Lamin A/C, laminopathies and premature ageing. *Histol Histopathol* 23, 747-763
- [16] Tong J, Li W, Vidal C, Yeo LS, Fatkin D, Duque G (2011) Lamin A/C deficiency is associated with fat infiltration of muscle and bone. *Mech Ageing Dev* 132, 552-559
- [17] Akter R, Rivas D, Geneau G, Drissi H, Duque G (2009) Effect of lamin A/C knockdown on osteoblast differentiation and function. *J Bone Miner Res* 24, 283-293
- [18] Rauner M, Sipos W, Goettsch C, Wutzl A, Foisner R, Pietschmann P, Hofbauer LC (2009) Inhibition of lamin A/C attenuates osteoblast differentiation and enhances RANKL-dependent osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 24, 78-86
- [19] Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S (1983) In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96, 191-198
- [20] Takayama T, Suzuki N, Ikeda K, Shimada T, Suzuki A, Maeno M, Otsuka K, Ito K (2007) Low-intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic differentiation in ROS 17/2.8 cells. *Life Sci* 80, 965-971
- [21] Miyazaki T, Miyauchi S, Tawada A, Anada T, Matsuzaka S, Suzuki O (2008) Oversulfated chondroitin sulfate-E binds to BMP-4 and enhances osteoblast differentiation. *J Cell Physiol* 217, 769-777
- [22] Cohen AH, Sundeen JR (1976) The nuclear fibrous lamina in human cells: studies on its appearance and distribution. *Anat Rec* 186, 471-476
- [23] Rifkin BR, Heijl L (1979) The nuclear fibrous lamina of alveolar bone cells. *J Periodontal Res.* 14 132-137

- [24] Eferl R, Hoebertz A, Schilling AF, Rath M, Karreth F, Kenner L, Amling M, Wagner EF (2004) The Fos-related antigen Fra-1 is an activator of bone matrix formation. *EMBO J* 23, 2789-2799
- [25] Bermeo S, Vidal C, Zhou H, Duque G (2015) Lamin A/C acts as an essential factor in mesenchymal stem cell differentiation through the regulation of the dynamics of the Wnt/ β -catenin pathway. *J Cell Biochem* 116, 2344-2353
- [26] Naito M, Omoteyama K, Mikami Y, Takagi M, Takahashi T (2012) Suppression of lamin A/C by short hairpin RNAs promotes adipocyte lineage commitment in mesenchymal progenitor cell line, ROB-C26. *Histochem Cell Biol* 137, 235-247
- [27] Ciruelos E, Pascual T, Arroyo Vozmediano ML, Blanco M, Manso L, Parrilla L, Munoz C, Vega E, Calderon MJ, Sancho B, Cortes-Funes H (2014) The therapeutic role of fulvestrant in the management of patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Breast* 23, 201-208
- [28] Lin F, Worman HJ (1995) Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics* 27, 230-236
- [29] Biamonti G, Giacca M, Perini G, Contreas G, Zentilin L, Weighardt F, Guerra M, Della Valle G, Saccone S, Riva S (1992) The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol* 12, 3499-3506
- [30] Stuurman N, Heins S, Aebi U (1998) Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol* 122, 42-66
- [31] Fisher DZ, Chaudhary N, Blobel G (1986) cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 6450-6454
- [32] McKeon FD, Kirschner MW, Caput D (1986) Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 319, 463-468
- [33] Corrigan DP, Kuszczak D, Rusinol AE, Thewke DP, Hrycyna CA, Michaelis S, Sinensky MS (2005) Prelamin A endoproteolytic processing *in vitro* by recombinant Zmpste24. *Biochem J* 387, 129-138
- [34] Mattout A, Dechat T, Adam SA, Goldman RD, Gruenbaum Y (2006) Nuclear lamins, diseases and aging. *Curr Opin Cell Biol* 18, 335-341
- [35] Navarro CL, Cadiñanos J, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Courrier S, Boccaccio I, Boyer A, Kleijer WJ, Wagner A, Giuliano F, Beemer FA, Freije JM,

- Cau P, Hennekam RC, López-Otín C, Badens C, Lévy N (2005) Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of lamin A precursors. *Hum Mol Genet* 14, 1503-1513
- [36] Hennekam RCM (2006) Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet Part A* 140A, 2603-2624
- [37] Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS (2003) Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293-298
- [38] Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R, Collins FS (2004) Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 8963-8968
- [39] Li W, Yeo LS, Vidal C, McCorquodale T, Herrmann M, Fatkin D, Duque G (2011) Decreased bone formation and osteopenia in lamin A/C-deficient mice. *PLoS One* 6, e19313
- [40] Mounkes LC, Kozlov S, Hernandez L, Sullivan T, Stewart CL (2003) A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins. *Nature* 423, 298-301
- [41] Schmidt E, Nilsson O, Koskela A, Tuukkanen J, Ohlsson C, Rozell B, Eriksson M (2012) Expression of the Hutchinson-Gilford progeria mutation during osteoblast development results in loss of osteocytes, irregular mineralization, and poor biomechanical properties. *J Biol Chem* 287, 33512-33522
- [42] Yang SH, Meta M, Qiao X, Frost D, Bauch J, Coffinier C, Majumdar S, Bergo MO, Young SG, Fong LG (2006) A farnesyltransferase inhibitor improves disease phenotypes in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *J Clin Invest* 116, 2115-2121
- [43] Lin L, Qiu Q, Zhou N, Dong W, Shen J, Jiang W, Fang J, Hao J, Hu Z (2016) Dickkopf-1 is involved in BMP9-induced osteoblast differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells. *BMB Rep* 49, 179-184
- [44] Song L, Liu M, Ono N, Bringham FR, Kronenberg HM, Guo J (2012) Loss of wnt/ β -catenin signaling causes cell fate shift of preosteoblasts from osteoblasts to adipocytes. *J Bone Miner Res* 27, 2344-2358
- [45] Sun C, Yuan H, Wang L, Wei X, Williams L, Krebsbach PH, Guan JL, Liu F (2016) FAK promotes osteoblast progenitor cell proliferation and differentiation

- by enhancing Wnt signaling. *J Bone Miner Res* 31, 2227-2238
- [46] Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, Westendorf JJ (2012) Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease, *Gene* 492, 1-18
- [47] Tsukune N, Naito M, Kubota T, Ozawa Y, Nagao M, Ohashi A, Sato S, Takahashi T (2017) Lamin A overexpression promotes osteoblast differentiation and calcification in the MC3T3-E1 preosteoblastic cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 488, 664-670
- [48] Nakajima N, Abe K (1995) Genomic structure of the mouse A-type lamin gene locus encoding somatic and germ cell-specific lamins. *FEBS Lett* 365, 108-114
- [49] Coghlan MP, Culbert AA, Cross DA, Corcoran SL, Yates JW, Pearce NJ, Rausch OL, Murphy GJ, Carter PS, Roxbee Cox L, Mills D, Brown MJ, Haigh D, Ward RW, Smith DG, Murray KJ, Reith AD, Holder JC (2000) Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol* 7, 793-803
- [50] Pai R, Tarnawski AS, Tran T (2004) Deoxycholic acid activates β -catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. *Mol Biol Cell* 15, 2156-2163
- [51] Wang D, Christensen K, Chawla K, Xiao G, Krebsbach PH, Franceschi RT (1999) Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J Bone Miner Res* 14, 893-903
- [52] Jadowiec J, Koch H, Zhang X, Campbell PG, Seyedain M, Sfeir C (2004) Phosphorylation regulates the gene expression and differentiation of NIH3T3, MC3T3-E1, and human mesenchymal stem cells via the integrin/MAPK signaling pathway. *J Biol Chem* 279, 53323-53330
- [53] Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B, George A (2001) Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4516-4521
- [54] Chen G, Deng C, Li YP (2012) TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 8, 272-288