

骨芽細胞における活性型コラーゲンジペプチド (Pro-Hyp) による Foxo1, Foxg1 を介した  
Runx2 発現誘導機構の解明

野村 佳歩

我が国は、超高齢社会に突入しており、特に平均寿命と健康寿命の差が大きいことが問題となっている。平均寿命と健康寿命の差が拡大すれば、高齢者の Quality of life (QOL) の低下や、介護給付費の増大が懸念される。したがって、疾病予防により健康寿命と平均寿命の差の短縮を図ることが急務であると考えられる。健康寿命の終わり、すなわち介護が必要となる原因の約20%が関節疾患や骨折等の骨格系疾患であることが報告されている。そこで、骨格系疾患の予防・改善を行うことで健康寿命の延伸に寄与したいと考えた。

骨格系疾患に対して予防・改善効果を示す Collagen peptide (CP) に着目した。ヒト介入試験において、CP を経口摂取することで骨密度改善や変形性膝関節症患者の症状軽減効果が示されている。しかし、その詳細な分子作用メカニズムは明らかになっていない。本研究では、活性型 CP である Pro-Hyp による骨芽細胞分化誘導作用機構を明らかにすることで CP 分子作用メカニズムの一つを解明することを目的とした。

骨芽細胞分化を制御する転写調節因子として骨形成のマスター遺伝子である Runt-related transcription factor 2 (Runx2) や、Forkhead box o1 (Foxo1) が知られている。Foxo1 は Runx2 と複合体を形成することで Runx2 をオステオカルシンプロモーターから解離し、骨基質タンパク質であるオステオカルシンの転写を抑制することが報告されている。

また、君羅らは、Pro-Hyp が Runx2 の遺伝子発現を誘導し、骨芽細胞分化を促進することを報告している。そして、siRNA を用いて骨芽細胞内の Forkhead box g1 (Foxg1) の発現を抑制すると、Pro-Hyp による Runx2 遺伝子の発現誘導が見られなくなる。さらに、骨芽細胞分化の誘導も見られなくなることから、Pro-Hyp による Runx2 発現誘導に Foxg1 が必須

であることを報告している。そして Fox 転写調節因子は、Fox コアシーケンスである 5'-(A/C)AA(C/T)A-3'の塩基配列を認識し、DNA へ結合することが報告されている。

以上の報告から Pro-Hyp による骨芽細胞分化誘導に Foxo1, Foxg1 および Runx2 が関与すると推測される。これら転写調節因子の複合体の形成は転写制御を行う上で重要であることが分かる。Foxo1 と Runx2 は複合体を形成することが報告されているが、Foxg1 は Runx2 と複合体を形成するかは明らかになっていない。Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1 および Runx2 の複合体形成を制御することで Runx2 発現を誘導していると予想した。また Pro-Hyp は骨芽細胞に取り込まれることが報告されている。しかしその取り込み機構や、細胞内における Pro-Hyp の局在は明らかとなっていない。したがって、第1章では、Pro-Hyp の骨芽細胞内

取り込み機構と Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1 および Runx2 の骨芽細胞内局在に与える影響について検討した。第 2 章では、Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1 および Runx2 タンパク質相互作用に与える影響を明らかにした。最後に、第 3 章では Runx2 P1 プロモーターにおける Pro-Hyp レスponseエレメントの探索を行った。そして Pro-Hyp の添加に依存して Pro-Hyp レスponseエレメントに結合する転写調節因子の同定を行った。

本研究では、骨芽細胞における Pro-Hyp の Runx2 発現誘導の分子作用メカニズムを明らかにした。骨芽細胞において、Pro-Hyp の非存在下では、Runx2 は Runx2 P1 プロモーターに結合し、Runx2 mRNA 発現を抑制する。そして、Foxg1 は細胞質に局在し、Runx2 と Foxo1 は細胞質と核の両方に存在する。骨組織で骨基質が分解され Pro-Hyp が産生されると、ペプチドトランスポーターの Solute Carrier 15a 4 (Slc15a4) を介して、Pro-Hyp は骨芽細胞に取り込まれ Foxo1 と Foxg1 に結合する。Pro-Hyp が結合した Foxo1 は Runx2 P1 プロモーターに結合する Runx2 に結合する。結果、Runx2 の Runx2P1 プロモーターからの解離を引き起こす。また、Pro-Hyp は Foxg1 に結合し Foxg1 と Runx2 の相互作用を解離する。Pro-Hyp は解離した Foxg1 の細胞質から核への移行を誘導する。この Pro-Hyp による Foxg1 の核内移行の誘導は、Pro-Hyp が Foxg1 に結合することにより生じる Foxg1 の立体構造の変化が関与していることが示唆された。そして Foxo1 と Foxg1 が Fox コアシークエンスと Runx2 結合領域を含む Runx2 P1 プロモーターの Pro-Hyp 応答領域に結合することで Runx2 プロモーターを活性化する。以上が本研究で明らかにした Pro-Hyp による Foxg1 および Foxo1 を介した Runx2 mRNA 発現誘導機構である。

本研究では、活性型 CP である Pro-Hyp による骨芽細胞分化誘導の分子作用メカニズムを明らかにした。内因性および外因性 Pro-Hyp は、骨芽細胞分化を誘導するカップリングファクターの一つとして機能しているのではないかと推察された。また、活性型 CP である Hyp-Gly は破骨細胞を抑制することが報告されている。したがって、体内において Pro-Hyp は骨形成を誘導し、Hyp-Gly は骨吸収を誘導することで骨形成と骨吸収のバランスを保っていると予想される。この結果は、活性型 CP は骨代謝において重要な役割を果たしており、骨代謝制御の調節を解明する上で重要な知見となる可能性がある。CP の分子作用メカニズムが明らかになることは CP の普及に繋がり健康寿命の延伸に寄与できると考える。

## **Stimulation of the Runx2 P1 promoter by collagen-derived dipeptide Prolyl-hydroxyproline bound to Foxg1 and Foxo1 in osteoblasts**

Kaho Nomura

Japan has entered a super-aging society, and the large gap between average life expectancy and healthy life expectancy has become a particular problem. If the gap between average life expectancy and healthy life expectancy widens, it raises concern about the quality of life (QOL) of the elderly will decline and the cost of long-term care benefits will increase. Therefore, it is considered urgent to shorten the gap between healthy life expectancy and average life expectancy through disease prevention. It has been reported that skeletal diseases such as joint diseases and fractures account for about 20% of the causes of the end of healthy life expectancy, i.e., the need for nursing care. Therefore, we wanted to contribute to the extension of healthy life expectancy by preventing and improving skeletal diseases.

We focused on Collagen peptide (CP), which has preventive effect and improvement on skeletal diseases. In human intervention studies, oral intake of CP has been shown to improve bone density and reduce symptoms in patients with knee osteoarthritis. However, the detailed molecular mechanism of action has not been clarified. In the present study, we aimed to elucidate the osteoblast differentiation mechanisms by Pro-Hyp, an active CP.

Runx-related transcription factor 2 (Runx2), a master gene for osteogenesis, and Forkhead box o1 (Foxo1) are known to be transcriptional regulators involved in osteoblast differentiation. Foxo1 forms a complex with Runx2 to induce osteoclast differentiation. Foxo1 interact with Runx2 to dissociate Runx2 from the osteocalcin promoter.

Kimira *et al.* reported that Pro-Hyp induces gene expression of Runx2 and promotes osteoblast differentiation. In addition, we have demonstrated for the first time that Forkhead box g1 (Foxg1) plays a vital role in Runx2 mRNA expression by Pro-Hyp. It has also been reported that the Fox transcriptional regulator recognizes the 5'-(A/C)AA(C/T)A-3' base sequence, which is the Fox core sequence, and binds to DNA.

These reports indicate that the formation of complexes of Foxo1, Foxg1 and Runx2 is important for transcriptional regulation. We hypothesized that Pro-Hyp induces Runx2 expression by regulating the interaction of Foxg1, Foxo1 and Runx2.

Therefore, in Chapter 1, we examined the mechanism of Pro-Hyp cellular uptake and the effect of Pro-Hyp on the subcellular localization of Foxg1, Foxo1 and Runx2 in osteoblasts. In Chapter 2, the effects of Pro-Hyp on Foxg1, Foxo1 and Runx2 protein interactions were clarified. Finally, in Chapter 3, we explored the Pro-Hyp response element in the *Runx2* P1 promoter. By identifying the transcriptional regulator that binds to the Pro-Hyp response element in *Runx2* P1 promoter depending

on the addition of Pro-Hyp, we elucidated the molecular mechanism of Runx2 transcriptional activation by Pro-Hyp.

In this study, we elucidated the molecular mechanism of action of Pro-Hyp in inducing Runx2 expression in osteoblasts. In osteoblastic cells, in the absence of collagen-derived dipeptide Pro-Hyp, Runx2 binds to the *Runx2* distal P1 promoter's proximal region, inhibiting Runx2 expression. First, Pro-Hyp is incorporated into osteoblastic cell through Solute carrier family 15 member 4 (Slc15a4). Then, Pro-Hyp binds to Foxo1, leading to their interaction with Runx2, causing Runx2 to dissociate from the *Runx2* promoter and resulting in Runx2-Foxo1 heterodimer localizes in the cytoplasm. Foxo1, which has been localized to the nucleus, binds to the *Runx2* P1 promoter. Next, Pro-Hyp binds to Foxg1, disrupting the interaction between Foxg1 and Runx2. Lastly, the dissociated Foxg1 translocates to the nucleus from the cytoplasm, binding to the *Runx2* P1 promoter and activating it. This is the mechanism of Pro-Hyp-mediated induction of Runx2 mRNA expression via Foxg1 and Foxo1 that we elucidated in this study.

In this study, we clarified the molecular mechanism of action of the active CP, Pro-Hyp, in inducing osteoblast differentiation. It was speculated that endogenous and exogenous Pro-Hyp may function as one of the coupling factors to induce osteoblast differentiation. In addition, Hyp-Gly, an active CP, has been reported to inhibit osteoclasts. Therefore, it is expected that Pro-Hyp induces bone formation and Hyp-Gly induces bone resorption in the body, thereby maintaining the balance between bone formation and resorption. This result suggests that active CP plays an important role in bone metabolism and may provide important insights into the regulation of bone metabolism. The clarification of the molecular mechanism of CP will lead to the widespread use of CP and contribute to the extension of healthy life expectancy.

## 論文審査の結果の要旨

骨組織は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返し、再構築（リモデリング）することでその構造と機能を維持している。骨芽細胞から分泌される type I コラーゲンやオステオカルシンは、骨形成の中心的な役割を果たしている。また、破骨細胞から分泌される酸（H<sup>+</sup>）や matrix metalloproteinase (MMP)、カテプシン K などのプロテアーゼが骨吸収に働く。この骨形成と骨吸収の平衡関係は、骨芽細胞と破骨細胞との間の機能的共役（カップリング）の上に成り立っており、骨吸収を調節する parathyroid hormone (PTH) や、骨形成を調節する insulin-like growth factor I (IGF-I) などのカップリングファクターにより制御されている。この骨吸収と骨形成のバランスが崩れることにより骨量が減少して骨粗鬆症が引き起こされる。コラーゲンペプチドは、ヒト介入試験において経口摂取により骨密度改善や変形性膝関節症患者の症状を軽減する効果が報告されている。また、コラーゲンペプチドである proline-hydroxyproline (Pro-Hyp) が、骨芽細胞分化のマスター遺伝子である Runx2 や Osterix の遺伝子発現を誘導し、骨芽細胞分化の指標である alkaline phosphatase 活性を促進することが報告されている。さらに、破骨細胞が分泌する H<sup>+</sup>やプロテアーゼにより骨基質中のコラーゲンが分解されることにより体内でコラーゲンペプチドが産生されること、コラーゲンの一次構造の中で Pro-Hyp や hydroxyproline-glycine (Hyp-Gly) の配列の多さは顕著であることなどが確認されているが、コラーゲンペプチドの機能と作用機序の詳細については明らかとなっていない。そこで、野村佳歩氏はコラーゲンペプチドである Pro-Hyp がカップリングファクターの 1 つとして骨組織のリモデリングに関与するとの想定のもと、Pro-Hyp による骨芽細胞分化誘導作用機構の解明を目的に詳細な研究計画を立案し実施した。

本論文は、第 1 章 Pro-Hyp の細胞への取り込み機構の解析と Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1, Runx2 の骨芽細胞内局在に与える影響、第 2 章 Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1, Runx2 タンパク質相互作用に与える影響、第 3 章 Pro-Hyp の Foxg1, Foxo1, Runx2 を介した Runx2 P1 プロモーターの転写活性機構の解明で構成されている。以下に第 1 章から第 3 章の概要を示す。

第 1 章では、Pro-Hyp の細胞への取り込み機構の解析と Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1 または Runx2 の骨芽細胞内局在に与える影響について検討した。第 1 節では、FITC で蛍光標識した Pro-Hyp を用い、Pro-Hyp がペプチドトランスポーターである Slc15a4 を介して骨芽細胞に取り込まれ、核内や細胞質に局在することを示した。第 2 節では、骨芽細胞内に取り込まれた Pro-Hyp が、Foxg1, Foxo1 または Runx2 の細胞内局在に及ぼす影響を免疫細胞染色で検討し、Pro-Hyp は Foxg1 の細胞質から核への移行を促進する一方、Runx2 の核から細胞質への移行を促進することを明らかにした。また、Pro-Hyp は Foxo1 の細胞内局在には影響を与えず、Foxo1 は核内と細胞質に分布することを示した。第 3 節で

は、ligand binding assay 法を用いて Pro-Hyp が Foxg1 及び Foxo1 に特異的に結合することを明らかにした。また、protease digestion assay 法を用いて、Pro-Hyp が Foxg1 の C 末端側の立体構造を変化させることで核内移行を惹起することを示唆した。これらのことから、Pro-Hyp は Slc15a4 を介して骨芽細胞に取り込まれ、Foxg1 と結合して核内に移行し、Runx2 を核外へ移行させると結論付けた。

第 2 章では、リコンビナントタンパク質 (GST-Foxo1, GST-Foxg1, GST-Foxg1A-D および GST-Runx2) を用いて Pro-Hyp が Foxg1, Foxo1 あるいは Runx2 タンパク質間の相互作用に与える影響について検討した。GST-pull down assay と immunoprecipitation を用い、第 1 節では、Pro-Hyp が Foxo1 と Runx2 の結合を増強することを確認した。第 2 節では、Foxg1 と Runx2 が相互作用することを初めて見出し、さらに、その Foxg1 と Runx2 の結合を Pro-Hyp が減弱することを示した。第 3 節では、Foxg1 と Runx2 の結合領域について、Foxg1 の DNA 結合ドメインと Runx2 の C 末端領域であることを示した。

第 3 章では、Pro-Hyp の Foxg1, Foxo1 および Runx2 を介した Runx2 プロモーターの転写活性化機構の解析を行なった。第 1 節では、luciferase reporter assay のためのレポータープラスミドの構築過程を示し、そのプラスミドを用いて以下の実験を行った。第 2 節では、Pro-Hyp 応答領域として Runx2 P1 プロモーターの nt -365 から -332 を同定し、この領域に Runx2 結合部位と Fox コア配列が含まれることを確認した。第 3 節では、Pro-Hyp 依存的に Pro-Hyp 応答領域に結合する転写因子を chromatin immunoprecipitation-quantitative polymerase chain reaction (ChIP-qPCR)解析し、Runx2 は Pro-Hyp の非存在下では Runx2 P1 プロモーター内の Pro-Hyp 応答部位に結合するが、Pro-Hyp の存在下ではそこから解離することを示した。一方、Foxg1 と Foxo1 は、Pro-Hyp 非存在下では Runx2 P1 プロモーターに結合しなかったが、Pro-Hyp 存在下では Runx2 P1 プロモーターの Pro-Hyp 応答部位に結合しレポーター応答を活性化することを示した。第 2 章および第 3 章の結果から、Runx2 結合部位を含む Runx2 P1 プロモーター内の Pro-Hyp 応答領域に対して、Pro-Hyp 非存在下では Runx2 のみが結合し、存在下では Runx2 が解離することにより転写抑制を阻害し、Foxg1 と Foxo1 の結合により Runx2 の転写を活性化すると結論付けた。

以上、野村佳歩氏は、本論文において Pro-Hyp の骨芽細胞分化誘導作用発現に至る過程について明らかにした。これは、食品機能学分野のみならず分子生物学分野において学術的に顕著な成果である。また、Pro-Hyp が Foxo1 の転写制御にも関与する可能性を示し、コラーゲンペプチドが骨代謝のみならず、糖代謝、脂質代謝や筋代謝と関連することを示唆した点も特筆に値する。本研究はコラーゲンペプチドの活用によりロコモティブシンドローム、糖尿病や肥満症など広範な疾患の発症予防に寄与し、健康寿命の延伸に貢献する可能性を示唆する成果である。以上のことから、本研究科課程による博士（薬科学）論文に十分値するものと判断した。