

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15539

研究課題名(和文)軟骨細胞の脱分化を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism underlying chondrocyte dedifferentiation

研究代表者

篠村 多摩之(Shinomura, Tamayuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：70206118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨の基礎研究および臨床研究の場に於いて、軟骨細胞の脱分化を抑制することは非常に重要な課題である。そこで本研究では、軟骨細胞の形質を安定に保持しているラットの軟骨肉種細胞を用いて、この脱分化過程に関する分子レベルでの解析を進めた。結果的に脱分化の分子機構は依然として不明な状況にあるが、少なくとも特定のレトロウイルスベクターを用いることで、脱分化を特異的にかつ高率に誘導できることが明らかになった。従って、今後はレトロウイルスの挿入位置を確定することで、脱分化の分子機構について有用な情報が得られるものと確信している。

研究成果の概要(英文)：For both basic research and clinical applications, it is very important to prevent dedifferentiation of chondrocytes. Therefore, in this study I have performed a comprehensive analysis of the molecular mechanisms that control the dedifferentiation of chondrocytes using Swarm rat chondrosarcoma chondrocytes. Although the mechanisms are still unclear, I have established a new experimental system to specifically and efficiently induce the chondrocyte dedifferentiation by a retrovirus vector. So, by determining the retrovirus insertion sites, we will be able to elucidate the molecular mechanism of the dedifferentiation.

研究分野：生化学

キーワード：軟骨細胞 脱分化

1. 研究開始当初の背景

軟骨組織は再生能力あるいは修復能力の極めて乏しい組織である。従って、例えば関節表面が損傷を受けると、硝子軟骨は再生されることなく容易に変形性関節症などの関節疾患へと移行していくことが多い。そこで、軟骨組織の修復・再生を目的として、正常軟骨細胞あるいは間葉系幹細胞を用いた様々な治療法の開発が進められている。しかし、軟骨細胞を組織から取り出して増やそうとすると、容易に線維芽細胞様の細胞に変化してしまう。この変化は、「軟骨細胞の脱分化」として以前から良く知られているが、それをコントロールすることは依然として困難な状況にある。

一方、軟骨肉腫として単離された Swarm rat chondrosarcoma (RCS) 由来の細胞は、軟骨細胞としての性質を安定に保持しつつ増殖し、正常軟骨細胞とは逆に脱分化させることが非常に難しい。ところが偶然の発見ではあるが、型コラーゲン遺伝子の第7イントロン内に我々が見出した新たなエンハンサー配列 (E2) (引用文献1) を用いて、軟骨細胞で特異的に働く強力な発現ベクター (図1) を構築し、それを RCS 細胞導入したところ、低頻度ではあるが線維芽細胞様の細胞から成るコロニーの出現を認めた。予備実験から、この現象は発現させた cDNA の種類には依存せず、主にエンハンサーの強さに依存していることが解ってきた。従って、RCS 細胞の脱分化は、ベクター DNA が挿入された染色体の近傍に位置する何らかの遺伝子が、上述のエンハンサー配列によって活性化されたことによって引き起こされた可能性が高いと考えられる。そこで、このベクター DNA 近傍に存在する遺伝子を明らかにすることができれば、脱分化のメカニズムを解明するための糸口が見いだせる可能性が高い。RCS細胞も正常軟骨細胞も共に軟骨細胞であり、従ってその分化形質の維持および脱

分化の制御機構は、共通する点が多いものと考えられる。言い換えれば、RCS細胞の脱分化過程が分子レベルで明らかになれば、正常軟骨細胞に於ける脱分化のメカニズムも自ずと明らかにすることができると考えられる。

2. 研究の目的

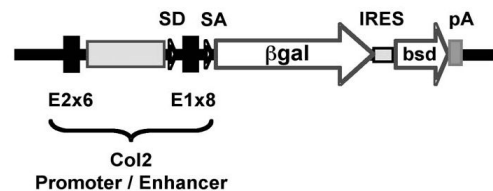
軟骨細胞は、一旦組織から取り出すと容易に線維芽細胞へと形質が変化してしまう。また移植した関節軟骨細胞は硝子軟骨の性質を失いやすく、組織は線維化していくことが多い。こうした細胞の変化を抑制することは、軟骨の基礎研究および臨床研究の場に於いて非常に重要な課題である。そこで本研究では、RCS 細胞を用いて、その脱分化を誘導する遺伝子(群)を同定し、その上で正常軟骨細胞の脱分化に関わる分子機構を明らかにし、その上で軟骨細胞が分化形質を維持するために必要な、遺伝子発現のネットワークを明らかにしていくことを主目的として研究を進める。

3. 研究の方法

(1) 脱分化の誘導

図1に示したプラスミドベクター、pC2Exp-βgalを RCS 細胞に遺伝子導入し、続いてβ

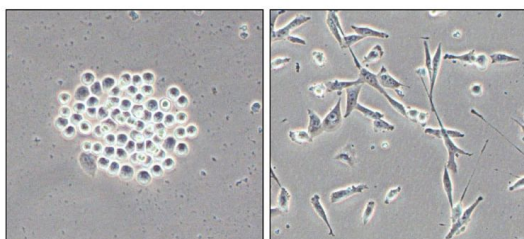
図1. pC2Exp-βgal



E2x6, six tandem copies of enhancer E2;
E1x8, eight tandem copies of enhancer E1; **SD**, splice donor; **SA**, splice acceptor;
βgal, β-galactosidase; **IRES**, internal ribosome entry sites; **Bsd**, blasticidin-S-deaminase;
pA, polyadenylation signal

ラストサイジンによる薬剤選択を行ってベクター DNAが取り込まれた細胞のみを生き残らせてコロニーを形成させた。その後、線維芽細胞様の細胞からなるコロニーを単離し、脱分化した細胞として増やした。尚、元々の RCS 細胞は丸い形態であり、細胞形態の違いは図 2 に示したように一目瞭然である。

図 2 遺伝子導入によって形成されるコロニー



元々の RCS 細胞

脱分化細胞

(2) ベクター DNA の挿入位置の解析

脱分化した各コロニー由来の細胞からゲノム DNA を単離し、Genome Walker 法あるいは Inverse PCR 法により、プラスミドベクターの挿入位置を明らかにした。まず Genome Walker 法については、単離したゲノム DNA を制限酵素 (Eco RV, Msc I, Ssp I, Stu I) で切断し、次にアダプター配列を付けて鑄型 DNA とした。続いてプラスミドベクター、pC2Exp-βgal に特異的なプライマーとアダプター配列に対応するプライマーを用いて PCR 反応を行い、増幅してきた DNA を精製してその塩基配列を決定した。一方 Inverse PCR 法については、単離したゲノム DNA を制限酵素 (Rsa I) で切った後、セルフライゲーションを行って環状の鑄型 DNA を作成した。次に、プラスミドベクター、pC2Exp-βgal に特異的な 2 種類のプライマーを用いて PCR 反応を行い、増幅してきた DNA を精製してその塩基配列を決定した。

PCR 産物のシーケンス解析により明らかになった塩基配列は、GeneBank の DNA データベースと照合して、ゲノム DNA のどこに由来するのかを特定し、プラスミドベクターの挿入位置を確定した。さらに挿入部位

の周辺に存在する遺伝子については、挿入位置の上流および下流のそれぞれ 50 kb の範囲に存在する遺伝子を、データベースから抽出してリストを作成した。

(3) 脱分化を誘導する候補遺伝子と、その脱分化誘導能の確認

ベクター DNA が挿入された近傍に存在する遺伝子について、まず元々の RCS 細胞に於ける発現の有無を RT-PCR で解析した。そして発現が見られなかった遺伝子についてのみ、cDNA を作成して Trap-In システム (引用文献 2) を用いて RCS 細胞で強制発現させ、脱分化が誘導されるかどうか調べた。

4. 研究成果

プラスミドベクターの遺伝子導入によって形成された多数のコロニーから、脱分化した細胞のみからなるコロニーを計 10 クローン単離し、解析をスタートさせた。まず Genome Walk 法および Inverse PCR 法を用いて、プラスミド DNA の挿入部位を解析し、最終的に 3 クローンについてはベクター DNA の挿入位置が確定でき、4 クローンについては得られた塩基配列がゲノム DNA の繰り返し配列であったため、挿入位置の正確な確定には至らなかった。また残りの 3 クローンについては、解析に必要な制限酵素の適切なものが見つからず、結果は得られていない。尚、結果の得られなかった 3 クローンの内、1 クローンについてのみ次世代シーケンサーによる解析を試みたが、結果は予想に反して曖昧で、ベクター DNA の挿入位置は結局確定できなかった。

挿入位置が確定できた 3 クローンについては、解析の結果ベクター DNA の挿入部位に内在性の遺伝子は一切存在していないことが分かった。従って、プラスミド DNA が挿入されたことによって起こる遺伝子の破壊が、脱分化の原因とは考え難いことが解った。そこで次に DNA の挿入に伴う周辺遺伝子の活

性化の可能性について検討するため、プラスミド DNA の挿入部位近傍 (約 100 kb) に存在する遺伝子をデータベースから抽出した。結果は以下の表 1 の通りであった。

(表 1) 挿入部位近傍に存在する遺伝子

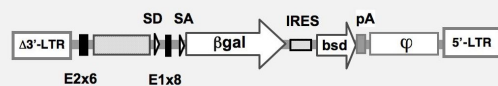
クローン	染色体番号	遺伝子名	Accession No.	遺伝子産物
1	5	Cnbd1	XM_017593701	cyclic nucleotide binding domain containing 1
		Predicted		Cnbd1-like
		Cngb3	NM_001271238	cyclic nucleotide gated channel beta 3
2	7	Pim3	NM_022602	proto-oncogene, serine/threonine kinase
		Predicted		predicted noncoding RNA
		Ttll8	XR_001839000	tubulin tyrosine ligase like 8
3	13	Tpr	NM_001107185	nuclear basket protein
		Predicted	BC003331	
		Pdc	NM_012872	phosducin
		Prg 4	NM_001105962	lubricin

表 1 に記載の 10 種類の遺伝子について、RCS 細胞での発現を RT-PCR で調べ、更に強制発現を試みたが、いずれの遺伝子も RCS 細胞の脱分化とは関連が認められなかった。

ところで、プラスミド DNA を細胞に導入して安定発現細胞株を樹立する場合、一般に DNA は染色体の複数箇所に同時に挿入される場合が多いとの報告がある。このことが正しいとすると、上述した解析において、プラスミド DNA の挿入部位が全て確定できていなかった可能性が高くなる。そこで、こうした不確定な要素を排除する為に、当初の計画を一部変更して、プラスミドベクターに代わりレトロウイルスベクターを用いて脱分化が誘導できるかどうか調べた。まずプラスミドベクター、pC2Exp-bgal に様々な修飾を加え、以下の図 3 に示すような幾つかレトロウイルスベクターを構築して RCS 細胞に感染させた。

図3 レトロウイルスベクター

(1) rvC2Exp-bgal



(2) rvFRTGFPygsd



その結果、rvFRTGFPygsd と名付けたウイルスベクターを用いた場合、非常に高率に RCS 細胞の脱分化を誘導できることが分かった。

そこで現在、このウイルスによる脱分化の分子機構について解析を進めている。そしてこうした解析を通して、軟骨細胞の脱分化を抑制するための有用な情報が得られるものと確信している。

<引用文献>

Shinomura, T. et al. *J. Biochem.* 152 565-575 (2012)

Shinomura, T. et al. *J. Biol. Chem.* 283 33658-33664 (2008)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Tani, H., Sato, Y., Ueda, M., Miyazaki, Y., Suginami, K., Horie, A., Konishi, I., and Shinomura, T., Role of versican in the pathogenesis of peritoneal endometriosis, *J Clin Endocrinol Metab.*, 査読有, Vol.101, 2016, pp.4349-4356

Ito, K., and Shinomura, T., Development and application of a new Silent reporter system to quantitate the activity of enhancer elements in the type II Collagen Gene, *Gene*, 査読有, Vol.585, 2016, pp.13-21

[学会発表](計 4 件)

篠村多摩之, Col2a1 and Acan gene expression regulated by different growth factors are mediated via different enhancer elements, *Gordon research conference on Cartilage Biology & Paththology*, 2017 年 4 月 5 日, Renaissance Tuscany Il Ciocco Lucca (Italy)

ニャン ジャン, 篠村多摩之, II 型コラーゲンとアグリカンの遺伝子発現は異

なった制御下にある、日本軟骨代謝学会、
2017年3月3日、京都市勧業館みやこめ
っせ（京都府・京都市）

ニャン ジャン、篠村多摩之、Histone
modifications regulate the
cartilage-specific gene expression of
type II collagen and aggrecan in
chondrocyte、口腔病学会、2016年11
月26日、東京医科歯科大学（東京都・
文京区）

伊藤 和生、篠村多摩之、II型コラーゲ
ンの大量合成に必要なエンハンサーの
解析、日本軟骨代謝学会、2016年2月
19日、広島大学広仁会館（広島県・広島
市）

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠村 多摩之（SHINOMURA, Tamayuki）
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・准教授
研究者番号：70206118