

令和元年6月6日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11476

研究課題名(和文)軟骨細胞の成長概日リズムとSOX9-ユビキチンリガーゼとの関連

研究課題名(英文) Role of Sox9 and its ubiquitin ligase on the Circadian growth rhythm in chondrocytes

研究代表者

服部 高子(Hattori, Takako)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00228488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、メラトニン受容体MT-1、MT-2が軟骨組織に発現していること、メラトニン添加により軟骨細胞の増殖が促進されること、また、MT-1、MT-2のアンタゴニストの添加によりその効果が消失すること、メラトニンの長期投与により軟骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現が促進される一方で、肥大化のマーカー遺伝子の発現は抑制されること、さらに軟骨細胞がメラトニン合成酵素を発現しており、メラトニン産生は質量分析解析で確かめられたこと、メラトニン合成酵素および受容体遺伝子は概日リズムを持った発現をし、メラトニン投与によってメラトニン合成酵素遺伝子および受容体遺伝子は早い誘導を受けることを明らかにした

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜からの光刺激を受けて松果体より概日リズムを示しながら合成、分泌されるメラトニンが、軟骨細胞自身の概日リズムを持ったメラトニン合成を誘導し、その合成されたメラトニンが軟骨細胞における概日リズムを中枢のリズムと同調させ、軟骨細胞の増殖促進、肥大化抑制、軟骨基質の合成促進を行うことを明らかにした。「寝る子は育つ」とは、夜間にメラトニンが内軟骨性骨形成を促進することを示す最初の報告である。

研究成果の概要(英文)：1. Gene expression of melatonin-synthesizing enzymes and melatonin receptors was detected in mouse primary chondrocytes. 2. Production of melatonin in chondrocytes was confirmed by mass spectrophotometric analysis. 3. Melatonin enhanced chondrocyte growth and increased expression of chondrocyte markers, but inhibited hypertrophy. These effects were abolished by addition of an antagonist. 4. Melatonin rapidly upregulated a melatonin synthesizing enzyme and receptor expression and expression of the clock gene Bmal1, while downregulated Per1. 5. Chronobiological analysis of C3H mouse chondrocytes, which express melatonin, revealed that melatonin induced the cyclic expression of melatonin and modified the cyclic rhythm of Bmal1, Mt1 and Mt2, but not in BALB/c mouse chondrocytes. These results indicate that exogenous and endogenous melatonin works in synergy in chondrocytes to adjust rhythmic expression to the central suprachiasmatic nucleus clock.

研究分野：生化学、分子生物学、軟骨代謝、硬組織発生学、時計生物学

キーワード：メラトニン AANAT 概日リズム 軟骨細胞 メラトニン受容体 BMAL1 PER1

1. 研究開始当初の背景

メラトニン(N-アセチル-5-メトキシトリプタミン)は、トリプトファンから合成され松果体より分泌されるホルモンである。メラトニンは夜間に松果体から持続的に分泌され、一定の生理活性濃度で循環し、概日リズムを形成している。循環液中のメラトニンは、脳を含むほとんどの組織に存在する膜受容体 MT1, MT2 を介して細胞内にシグナルを伝達する。骨端軟骨の生育・代謝にも概日リズムが存在する可能性が考えられ、また概日発現リズムを持つ遺伝子が報告されつつあるが、これらの遺伝子発現のリズムが内軟骨性骨形成に及ぼす役割についての報告は驚くことに皆無であった。一方で、研究代表者等のグループは、低身長の治療法の開発を目的に、軟骨組織に特異的に発現する結合組織成長因子 (CCN2) を軟骨組織で特異的に発現するマウスを作製したところ、このマウスが長管骨の延長によって体が大きくなる事を見出し、さらにその分子機構としてインスリン様増殖因子 IGF の軟骨組織での誘導を介した内軟骨性骨形成の強力な促進作用を *in vivo* で証明した (Nao Tomita, Takako Hattori, et al. PLoS One. 2013;8(3):e59226)。このマウスは老齢時の関節変性も全く示さない事を報告し、CCN2 に関節軟骨の老化防止作用がある事を示した (Itoh S, Hattori T, et al. PLoS ONE 8(8): e71156)。このように、軟骨を介した骨への形成を促進する事は、身長を伸ばすだけでなく、関節軟骨の機能維持にもつながる事が実証された。そこで、メラトニンが軟骨組織の成長を正に制御することが証明出来れば、低身長の治療だけでなく関節軟骨の機能維持にも応用できるのではないかと考えて研究を開始するに至った。

代表者らのグループは、これまで軟骨細胞の分化の方向性を決定付けるマスター分子の活性を調節する機構を明らかにしてきた。1.SOX9 が SUMO 化される事によって軟骨細胞内で安定化する事 (Hattori T, et al. J. Biol. Chem. 281(20), 14417-14428, 2006)、2.その転写活性が Tip60 によって上昇する事 (Hattori T. et al., Nucleic Acids Research, 2008, 36: 3011-3024)、3.軟骨から骨への転換直前に消失してしまうその発現を維持させると、骨への転換が著しく遅延する事 (Hattori T. et al. Development, 2010, 137, 901-911) を報告しているが、4.さらにこの SOX9 が軟骨から骨への転換前にユビキチンリガーゼ E6AP によって急速に分解される事を報告した (Hattori T. et al. J. Biol. Chem. 2013 288: 35138-35148)。この E6AP は概日リズムを持った発現をする事が報告されつつあり (Nucleic Acids Res. 2014 42: 5765-5775) また、CCN2 の発現は SOX9 によって誘導される (服部ら、未発表)。軟骨細胞の概日リズムによる増殖はメラトニン-SOX9-E6AP 機構によって惹起されているのではないかと?

E6AP は、重篤な精神疾患を特徴とする Angelman syndrome(AS)の原因遺伝子として報告されており、AS モデルである E6AP-/-マウスにおいて neuron のみでなく、軟骨組織にも SOX9 の分解遅延による蓄積が観察される (Hattori T. et al. J. Biol. Chem. 2013 288: 35138-35148)。このマウスは出生後、異常な神経伝達に伴う運動能力の変質、および生育の著しい遅延が見られる事から、正常な概日リズムを持った SOX9 の細胞内濃度の調節は、軟骨組織の正常な発生に必須だと考えられた。

2. 研究の目的

そこで、当初、研究期間の3年間で以下の事項について明らかにする事を目的とした。

1. 軟骨細胞のメラトニンへの応答機構。メラトニン応答性の指標としては細胞増殖、軟骨分化マーカー遺伝子の発現の変動からも軟骨の分化の程度が推察できる。さらにはメラトニン受容体である MT-1, MT-2 が軟骨細胞に発現しているか。
2. メラトニンリセプターの軟骨細胞過剰発現でマウスの軟骨の成長促進が見られるか。
3. メラトニン合成系の軟骨細胞における分布。現在、松果体において合成されたメラトニンが体液によって循環すると考えられているが、軟骨組織自身がメラトニンを合成する可能性を調べる。
4. 軟骨分化の方向性を決定する転写調節因子 SOX9 との関連性を調べる。間葉系細胞や線維芽細胞にメラトニンを添加した場合に SOX9 の細胞内濃度の変化が見られるか確かめる。もし変動があるのなら、概日リズム模擬実験系を用いて、SOX9 特異的ユビキチンリガーゼ E6AP や SOX9 特異的 SUMO リガーゼ PIASs の発現の変動に伴って SOX9 の細胞内濃度に変動が見られないか観察する。

3. 研究の方法

出生直後のマウス各組織から total RNA を精製し、MT-1, MT-2, メラトニン合成酵素遺伝子

AANAT の遺伝子発現を調べた。軟骨組織からコラゲナーゼ処理によって単離した初代培養軟骨細胞にメラトニンを添加し、細胞増殖、内軟骨性骨形成に伴う遺伝子発現の変化を調べた。さらに、初代培養細胞から4時間おきにRNAを回収し、メラトニン受容体、合成酵素の遺伝子発現の変化を調べた。MT-1, MT-2, AANAT mRNAの軟骨組織における発現部位は、出生後2日目の長管骨骨端軟骨部分の組織切片を用いた in situ hybridization によって確かめた。

4. 研究成果

1. メラトニン受容体の軟骨組織における発現

メラトニン受容体が軟骨組織において発現していることを確かめるために、BALB/c マウスより軟骨組織を含む各臓器を摘出し、メラトニン受容体遺伝子である Mt1, Mt2 mRNA の発現量を各臓器で比較したところ、軟骨組織において、これまで発現が広く知られている脳組織と比較しても同等か、あるいはそれ以上の発現が観察された。In situ hybridization、および静止—増殖軟骨層領域と、肥大化軟骨細胞層領域とを分取して回収した RNA の解析によって、これらの受容体の発現はより血管新入部位に近接した肥大軟骨細胞層領域で高いことが明らかになった。

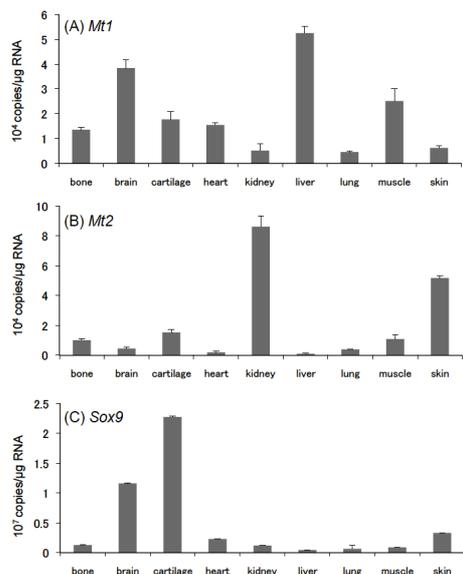


図1 メラトニンリセプターmRNAのBALB/cマウス各臓器における発現

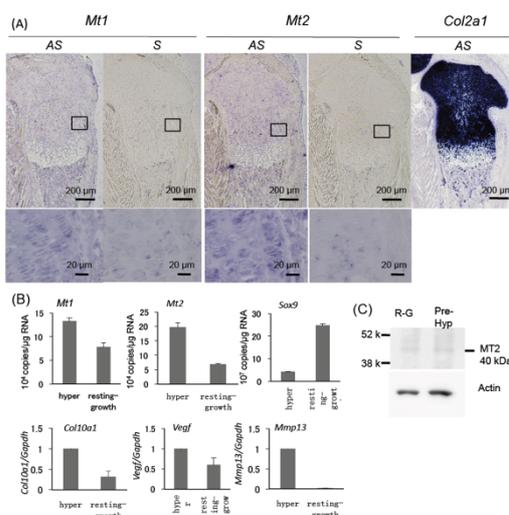


図2 Mt1, Mt2 mRNAの軟骨組織における発現(in situ hybridization)と、mRNAおよびタンパクの肥大軟骨領域における発現量の増大

2. メラトニンの軟骨細胞における作用

メラトニンをBALB/c由来初代培養軟骨細胞に添加すると細胞増殖が促進され、その効果はメラトニンアンタゴニストであるLuzindoleの添加で阻害された。また、遺伝子発現の変化を調べると、軟骨特異的細胞外基質遺伝子の発現が促進され、さらに、軟骨細胞の強力な肥大化抑制因子であるSox9の発現も促進していた一方で、軟骨細胞の肥大化マーカー遺伝子であるCol10a1の発現は抑制されていた。

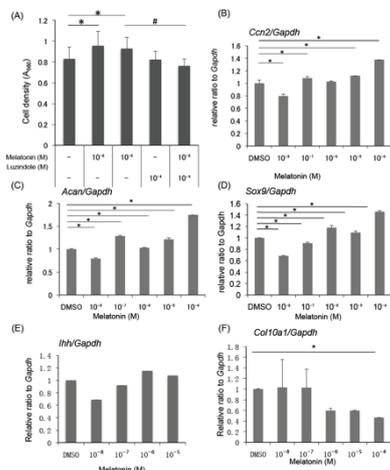


図3 メラトニンの軟骨細胞増殖促進作用とルジンドールによる抑制およびメラトニンの軟骨細胞マーカー遺伝子の発現促進と肥大軟骨細胞マーカー遺伝子の発現抑制

3. 軟骨細胞におけるメラトニン合成酵素の発現とメラトニンの産生

軟骨細胞自身がメラトニン合成能を持つか調べるために、メラトニン合成酵素であるAanat (arylalkylamine N-acetyltransferase) およびHiomt (hydroxyindole O-methyltransferase)

mRNA の発現を BALB/c マウスの各臓器で調べたところ、脳のみでなく、軟骨組織を含む多くの臓器での産生が確認された。しかしながら、BALB/c を含む樹立されたマウス系統の多くが検出可能なレベルのメラトニンを産生していないとの報告があるため、ラット初代培養軟骨細胞の培養上清と細胞溶解液中にメラトニンが存在していることを質量分析器で確かめた。さらに、AANAT の活性は、ニワトリ由来軟骨細胞の細胞溶解液と、AANAT の基質である 5-hydroxytryptamine の異性体として tryptamine を使用した場合の N-acetyltryptamine の生成量で評価した。

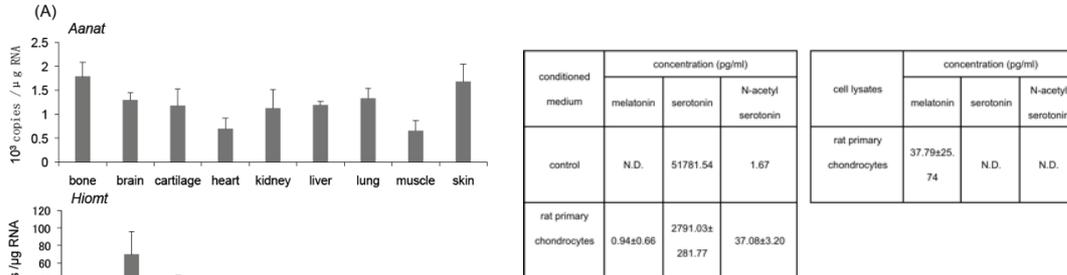


表1 ラット培養軟骨細胞の培養上清と細胞抽出液におけるメラトニンの検出

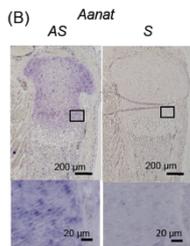


図4 メラトニン合成酵素の BALB/c マウス各臓器における発現

4. メラトニンによる遺伝子発現の継時的変化

BALB/c 由来初代軟骨細胞にメラトニンを作用させて、継時的に遺伝子発現の変化を調べたところ、メラトニン添加後早期に Mt1, Mt2 受容体, aanat mRNA の遺伝子発現上昇が見られ、それに続いて細胞増殖マーカーである Ihh の発現上昇が観察された。さらに概日リズムのマスター遺伝子である Bmal1 の早期誘導が見られた一方、Per1 は抑制された。

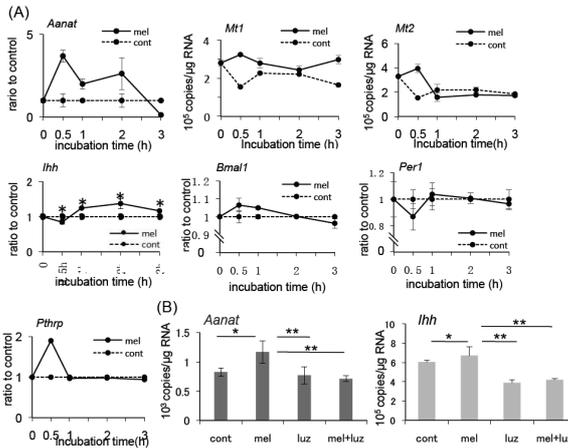


図5 メラトニン作用時の遺伝子発現の継時的変化

5. メラトニンの Bmal1 mRNA のリズム発現に及ぼす影響とメラトニンによるメラトニン合成酵素 AANAT mRNA のリズム発現誘導

メラトニンが概日リズムに影響を及ぼすのか調べるために、4時間おきに RNA を回収し、発現パターンを調べた。BALB/c 由来初代培養軟骨細胞は細胞間のリズムを同調させるために 1% 血清入り培地で 24 時間培養後、50% 血清入り同培地に 2 時間置き、Bmal1 mRNA のリズム性発現が惹起されることを確認した上でメラトニン添加における影響を観察した。メラトニンは Bmal1 mRNA の発現のピークをメラトニン添加後 17 時間後に調整することが明らかになったが、検出可能な内因性メラトニンを産生しないと報告されている BALB/c 由来培養軟骨細胞では、Bmal1 の周期長そのものをメラトニンの添加が変化させなかった。一方で、検出可能なメラトニンを産生していると報告されている C3H マウス由来軟骨細胞では、メラトニンの添加によって周期的な AANAT mRNA 産生が誘導され、Bmal1 mRNA の発現周期も 18 時間から 24 時間へと変

化した。このことは、外因性のメラトニンが軟骨細胞の内因性メラトニンのリズム発現を誘発し、体内のリズムと同調させている可能性を示唆した。

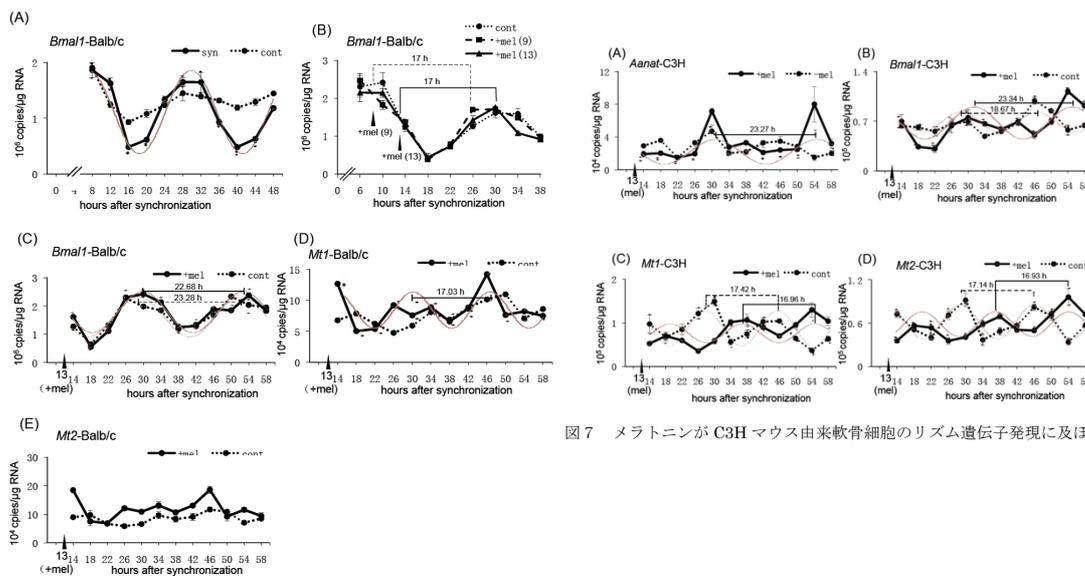


図6 メラトニンがBALB/cマウス由来軟骨細胞のリズム遺伝子発現に及ぼす影響

図7 メラトニンがC3Hマウス由来軟骨細胞のリズム遺伝子発現に及ぼす影響

これらの結果は、メラトニンは軟骨細胞にそのリセプターを介して作用し、軟骨細胞の増殖を促進する一方で肥大化を抑制することを示している。その分子機構としては、血流により軟骨組織に到達したメラトニンが軟骨組織辺縁部に多く存在するレセプターMT1及びMT2を介してAANATを誘導することにより軟骨組織でのメラトニン産生が促進され、そのメラトニンはオートクライン、パラクライン的に軟骨組織に作用することが考えられた。さらにメラトニンは概日リズムを持って軟骨細胞から産生され、軟骨組織のメラトニン産生リズムは、中枢で産生され血流を介して軟骨組織に到達したメラトニンによって同調する可能性が示唆された。

骨格の成長は、間葉系細胞が軟骨細胞への分化、増殖、成熟、肥大化を介して骨に転化する内軟骨性骨形成過程をたどるが、概日リズムによって軟骨組織から分泌されるメラトニンを応用すれば、軟骨の成長を促進し、さらに骨への転化が抑制されるため、低身長の治療に有効な手段となると思われる。さらに、関節軟骨は骨への転化が起こらない永久軟骨組織であるが、加齢に伴う変性で誘発される変形性関節症は、上記の内軟骨性骨形成過程を異所的に伴うことが近年の研究で明らかになっている。メラトニンは軟骨組織の肥大化を抑制することから変形性関節症の進行を止めることができるのではないと思われる。本研究によるメラトニンの軟骨組織での概日リズム形成機構の解明は、低身長治療のみでなく関節機能維持によるアンチエイジング療法の開発につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

- ① Fu S, Kuwahara M, Uchida Y, Koudo S, Hayashi D, Shimomura Y, Takagaki A, Nishida T, Maruyama Y, Ikegame M, Hattori A, Kubota S, Hattori T. : Circadian production of melatonin in cartilage modifies rhythmic gene expression. *J Endocrinol*. 査読有、2019 Mar 1; 241(2), pp161-173.
- ② Hattori T. New function of Tip60 in controlling triacylglycerol synthesis. *Biotarget* 査読有、2018;2:13. Doi: 10.21037/biotarget.2018.08.03.
- ③ Hara E. S., Okada M., Nagaoka N., Hattori T., Kuboki T., Nakano T., Matsumoto T.: Chondrocyte burst promotes space for mineral expansion. *Integrative Biology*, 査読有、2018 10(1): 57-66.
- ④ Hara E. S., Okada M., Nagaoka N., Hattori T., Kuboki T., Nakano T., Matsumoto T.: Bioinspired Mineralization Using Chondrocyte Membrane Nanofragments. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 査読有、2018, 4 (2), pp 617-625.
- ⑤ Uchida Y, Irie K, Fukuhara D, Kataoka K, Hattori T, Ono M, Ekuni D, Kubota S, Morita M. Commensal Microbiota Enhance Both Osteoclast and Osteoblast Activities. *Molecules*. 査読有、2018 Jun 23;23(7).
- ⑥ Kawai M, Liu N., Hattori T., Kataoka Y., Takigawa M., Kubota S., Yamamoto T., Ohura K.: Sorcin Expression in the Epiphyseal Growth Plates of Mice. *Journal of Hard Tissue Biology*, 査読有、2016, 25(1): 57-62.
- ⑦ Murase Y, Hattori T, Aoyama E, Nishida T, Maeda-Uematsu A, Kawaki H, Lyons KM, Sasaki A, Takigawa M, Kubota S. : Role of CCN2 in Amino Acid Metabolism of Chondrocytes. *J. Cell Biochem.*, 査読有、117, 927-937, 2016. doi: 10.1002/jcb.25377

- ⑧ Hara C, Kubota S, Nishida T, Hiasa M, Hattori T, Aoyama E, Moriyama Y, Kamioka H, Takigawa M. Involvement of multiple CCN family members in platelets that support regeneration of joint tissues. *Mod. Rheumatol.*, 査読有, 21, Apr, 1-10, 2016. doi: 10.3109/14397595.

〔学会発表〕(計16件)

- ① 近藤 星、桑原実穂、Shanqi, F., 池田健司、石川崇典、大野充昭、西田崇、久保田聡、服部高子：長鎖(約6kb)ssODNおよびCRISPER/Cas9を用いたヒト科霊長類特異的 lncRNA のマウス受精卵へのエレクトロポレーションによる高効率ノックインの試み。第41回日本分子生物学会年会、2018, 11, 28-30, 横浜。
- ② Shanqi Fu, 桑原実穂, 内田瑤子, 林大智, 下村侑司, 高垣安紗美, 西田崇, 丸山雄介, 池亀美華, 服部淳彦, 服部高子, 久保田聡: Circadian production of melatonin and its receptors in cartilage influences chondrocyte rhythmic gene expression. 第91回日本生化学会大会、2018, 9-24-26, 京都 (0,P) 若手優秀発表賞
- ③ 近藤星、桑原実穂、Fu Shanqi、池田健司、石川崇典、大野充昭、西田崇、久保田聡、服部高子：ヒト科霊長類特異的 lncRNA のエレクトロポレーションによる マウス受精卵への効率的なノックインの試み、ブレインストーミング2018、瀬戸内市、2018, 9, 15 (P)
- ④ 服部高子：低身長治療のみでなく関節機能維持によるアンチエイジング療法の開発を目的とした軟骨組織の概日リズム形成機構の解明、平成29年度基礎医学研究助成渡辺慶子賞研究発表会。2018.6.10 東京、至誠会館。
- ⑤ 服部高子、Shanqi Fu、桑原実穂、内田瑤子、近藤 星、林大智、下村侑司、高垣安紗美、西田崇、丸山雄介、池亀美華、服部淳彦、久保田聡：軟骨組織におけるメラトニン合成とその受容体発現は概日リズムを持ち、軟骨細胞の代謝に影響を及ぼす。2017年度生命科学系学会合同年次大会 第40回日本分子生物学会 第90回日本生化学会大会、2017, 12-6-9, 神戸 (P)
- ⑥ 服部高子、西田崇、久保田聡：軟骨組織におけるメラトニンの作用。第58回歯科基礎医学会学術大会、2016, 8, 24-26, 札幌 (0)

〔図書〕(計5件)

- ① 服部高子：軟骨組織における CCN ファミリー遺伝子群の濃度調節による軟骨成長促進と関節機能維持の試み。平成28年度公益財団法人両備種園記念財団研究助成金報告書, 2018, 18-25.
- ② Hattori T, Itoh S, Takigawa M: Generation and Analysis of Cartilage-Specific CCN2 Overexpression in Transgenic Mice, in *Methods in Molecular Biology: CCN Proteins: Methods and Protocols* (ed. M. Takigawa), 1489, 391-403, 2017.
- ③ Hattori T, Hoshijima M, and Takigawa M: Protein Imaging of CCN2 and CCN3 in Living Cells, in *Methods in Molecular Biology: CCN Proteins: Methods and Protocols* (ed. M. Takigawa), 1489, 211-215, 2017.
- ④ M. Hoshijima, T. Hattori, M. Takigawa: Protocols for Screening for Binding Partners of CCN Proteins: Yeast Two-Hybrid System, in *Methods in Molecular Biology: CCN Proteins: Methods and Protocols* (ed. M. Takigawa), Springer, 1489, 145-154, 2017.
- ⑤ Aoyama E, Hattori T, Kubota S, Takigawa M: Production of Recombinant CCN2 Protein in *Escherichia coli*, in *Methods in Molecular Biology: CCN Proteins: Methods and Protocols* (ed. M. Takigawa), Springer, 1489, 77-84, 2017.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：久保田 聡
ローマ字氏名：Satoshi Kubota
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：教授
研究者番号(8桁)：90221936

研究分担者氏名：西田 崇
ローマ字氏名：Takashi Nishida
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：准教授
研究者番号(8桁)：30322233

研究分担者氏名：高江洲 かずみ(河田かずみ)
ローマ字氏名：Kazumi Takaesu-Kawata
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：助教
研究者番号(8桁)：10457228

研究分担者氏名：池亀 美華
ローマ字氏名：Mika Ikegame
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：准教授
研究者番号(8桁)：70282986