

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20420

研究課題名(和文) 軟骨形成を制御する新規転写因子の細胞内伝達機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel transcription factors controlling cartilage formation

研究代表者

高畑 佳史 (Yoshifumi, Takahata)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：60635845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：未分化間葉系幹細胞から各種骨格系細胞への分化は全く異なるファミリーに属する転写因子によって支配されている。軟骨細胞分化のマスター制御因子としてSox9転写因子が必須であるが、このSox9を制御する上流の転写因子は未だ不明である。本研究ではゲノム編集技術を応用したenChIP法を利用して、Sox9遺伝子を制御する上流の転写因子(Inducer of transcription factor Sox9: Itfs)を新たに同定した。さらに、その転写因子の細胞内シグナル伝達機構の詳細を解析したところ、骨形成因子BMP2によるシグナルによりItfsタンパク質が安定化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Transcription factors belonging to completely different families are responsible for cell differentiation from undifferentiated mesenchymal stem cells to various skeletal cells. Transcription factor Sox9 is essential as a master regulator of chondrocyte differentiation, however the upstream transcription factors regulating this Sox9 are still unknown. In this study, a novel upstream transcription factor (Inducer of transcription factor Sox 9: Itfs) is identified that controls the Sox9 gene using the enChIP method applying genomic editing technology. Further analysis of the intracellular signaling of the transcription factor revealed that the Itfs protein is stabilized by the treatment of BMP2.

研究分野：生化学

キーワード：転写因子 軟骨細胞 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

生体を構築するまでの発生、成長段階、および生命活動において遭遇する損傷や病態による組織欠損の修復には、体性幹細胞が重要な役割を果たしている。その一つに生体骨髄中には造血幹細胞以外に、間葉系細胞へ分化することができる間葉系幹細胞の存在が確認されている。間葉系幹細胞は、自己複製能と骨、軟骨、脂肪、骨格筋、腱、靭帯などの間葉系組織への多分可能を有する体性幹細胞である。骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋芽細胞は共通の未分化間葉系細胞から分化するが、この分化過程のメカニズムを遺伝子レベルで明らかにしたのは筋芽細胞が始まりだった。始めに Basic helix-loop-helix (bHLH) 型の転写因子 MyoD が発見され筋管までの分化を支配することが示された。そして脂肪細胞への分化を支配する転写因子として核内受容体の一つ peroxisome proliferator-activated receptor2 (PPAR2) が同定された。またショウジョウバエの体節形成遺伝子の一つ runt にホモロジーを持つ runt-related transcription factor2 (Runx2) が骨芽細胞の分化を支配する遺伝子の一つとして登場し、さらに軟骨細胞への分化に転写因子 Sox9 が必須であることが示された。このように、未分化間葉系細胞から各種骨格系形成細胞への分化は全く異なるファミリーに属する転写因子によって支配され、各細胞特異的遺伝子の発現を調節すると考えられる。これらの転写因子の発現やその転写活性を制御するものとして、骨形成因子 BMP や FGF、Wnt シグナルなど様々な因子やその調節機構の分子機構の解明が近年めざましく進展を遂げている。

一方で、軟骨組織の多くは、骨格形成において胎生期に存在し、軟骨基質の石灰化に続いて骨組織に置換されることで、体幹形成を決定し、筋肉とともに運動器の中核としての役割を果たしている。多分可能を持つ未分化間葉系細胞は、間葉系組織の中で軟骨原器が形成され、軟骨細胞が増殖するとともに肥大化を伴った分化過程が正常に進行することで、成長板を形成し骨格の長軸方向への伸長を促進する。間葉系細胞から軟骨細胞への分化様式は、転写因子 Sox9 がマスター制御因子として機能するが、骨格の伸張は細胞内の情報伝達機構や他の転写因子などによる調節を介して緻密に制御される。なかでも転写因子 Sox9 の発現を直接制御する転写因子は未だ同定されておらず、それらを理解することは軟骨細胞の分化・機能の制御機構解明にとどまらず、それらに重点的に作用する薬剤

の開発が軟骨成長障害に有効である可能性が見込まれる。

2. 研究の目的

近年再生医療をターゲットとした幹細胞研究は iPS 細胞、ES 細胞を中心に白熱しているが、間葉系幹細胞は奇形腫を形成する iPS 細胞と違って腫瘍性が見られないという観点からも有用な細胞である。しかし幹細胞から軟骨分化の研究を進めるにあたり問題として、均一な細胞の迅速な供給、および軟骨形成のみへの選択的な分化誘導、の2点を克服しないといけない。これらの点をクリアした安全性の高い細胞を提供するためには、細胞内伝達機構の解明が再生医療の実用化に向けた、重要な課題となる。

研究代表者はこれまでの研究で間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞に BMP2 を処置すると、刺激後 6 時間後に Sox9 mRNA の発現が最も上昇することを明らかにした。このように、Sox9 の発現誘導は転写レベルで速やかに行われるため、Sox9 の上流を制御する転写因子の同定を困難にしている大きな要因として、従来の Microarray 解析等では発現誘導に関わる遺伝子を捉えることができなかった。そこで、Sox9 のプロモーター上のエピゲノム解析が有効ではないかと考え Cas9 ゲノム編集技術の応用テクニックである enChIP 法 (Fujita et al *Sci Rep.* 2013) に着目した。enChIP 法は生理的な条件下でクロマチン構造を保持したまま、特定のゲノム領域に結合したタンパク質を同定することのできる非常に強力で画期的な方法である。本研究計画では、enChIP 法を駆使して Sox9 の上流を支配する転写因子の探索と同定を行い、さらに同定した転写因子の Sox9 誘導メカニズムを細胞内伝達機構の観点から分子メカニズムを詳細に解明する。

3. 研究の方法

(1) enChIP 法の条件の最適化

C3H10T1/2 細胞に dCas9 と gRNA の発現ベクターを導入し、その後 BMP2 を刺激しクロマチンを回収する。ターゲットにする gRNA の領域の条件設定のため、プロモーター領域 1kb の範囲内に 3 種類ほど gRNA を設計し、BMP2 刺激により最も反応性の高い領域を選定する。次にコントロールである BMP2 無刺激群および BMP2 刺激群から得たクロマチン・タンパク質複合体を SDS-PAGE によって分離し、ゲルに対して銀染色を行う。標的領域に結合したタンパク質の中から BMP2 によって特異的に増加した部分を切り出し、プロテオーム

解析を行うことで候補となるタンパク質のスクリーニングを行う。

(2) Sox9 遺伝子の発現制御に特異的な転写因子の同定

上記(1)の実験により得られたスクリーニングの結果から、候補となる複数の転写因子の発現ベクターを作成する。作製した発現ベクターを C3H10T1/2 細胞に遺伝子導入を行い、Sox9 遺伝子の発現を誘導するか否かを RT-qPCR 法により検討し、転写因子を同定する。

(3) Sox9 の上流を制御する転写因子の機能解析

enChIP 法で同定された転写因子群を C3H10T1/2 細胞において、ShRNA によりノックダウンを行い、Sox9 の発現に対する効果を RT-qPCR 法にて解析し、軟骨分化に対する役割を検討する。さらに同定された転写因子群を Cas9 を用いたゲノム編集法にてノックアウトし、Sox9 の発現が低下するか否か、軟骨分化能に対する影響について検討する。さらに、Sox9 の発現調節に関わる新規転写因子の作用メカニズムを解明するために、ルシフェラーゼレポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降、DNA プルダウンアッセイ法にて明らかにする。

4. 研究成果

(1) enChIP 法の条件の最適化

設計した3種類のいずれの gRNA 配列も BMP2 刺激により発現の増強が確認できたバンドが銀染色により確認できた。引き続いてゲル切り出しを行った後、MS 解析によりゲル内に含まれるタンパク質の探索を行い、複数の転写因子が候補として得られた。これらの候補遺伝子を Inducer of transcription factor Sox9 (以下 ITFS と呼ぶ)として同定し、これらの Sox9 誘導性に関連して引き続き解析を行った。

(2) Sox9 遺伝子の発現制御に特異的な転写因子の同定

ITFS 関連タンパク質の発現ベクターをそれぞれ作成し、PMXs レトロウイルスベクターに組換えを行った。C3H10T1/2 細胞にレトロウイルスを用いてこれら ITFS タンパク質を過剰発現させ、Sox9 転写産物を RT-qPCR 法にて定量した結果、ITFS1 と ITFS2 遺伝子が Sox9 誘導能を持つことが明らかとなった。

(3) Sox9 の上流を制御する転写因子の機能

解析

Sox9 発現誘導能を持つ ITFS1 および ITFS2 が Sox9 プロモーター状に結合するかどうかの確認を行うため、3xFlag-ITFS1 および 3xFlag-ITFS2 をレトロウイルスを用いて C3H10T1/2 細胞に発現させ、クロマチン免疫沈降法を行った。その結果、Sox9 の転写開始点上流 1000bp に結合することを明らかにした。

ITFS1, ITFS2 の ShRNA ベクターを作成し、C3H10T1/2 細胞でそれぞれの遺伝子ノックダウンを行い Sox9 の発現量を測定した。その結果、ITFS1 および ITFS2 のノックダウンの効果は両者ともに Sox9 の mRNA とタンパク質の発現量を減少させることが明らかとなった。

BMP2 による Sox9 の発現誘導効果と ITFS9 遺伝子との関係性について解析した。BMP2 を C3H10T1/2 細胞に処置することで、ITFS1 の mRNA 発現量に変化は見られなかったが、ITFS1 タンパク質発現量が増加していた。このタンパク質発現量の増加についてのメカニズムは現在解析を進めている最中である。

ITFS1 と ITFS2 の生体における機能的役割を解明するために、Cas9 ゲノム編集法を用いた遺伝子欠損(KO)マウスを作成した。前核期受精卵に Cas9, ssODN, gRNA をそれぞれ混合した溶液をエレクトロポレーションにて導入し、翌日2細胞期になった胚を選別し、偽妊娠マウスに移植を行った。産仔のジェノタイピングを行い、複数のラインの KO マウスを得ることができた。現在はコロニーの安定化と維持を行い、今後 KO マウスの骨表現型を解析していく予定である。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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

高畑 佳史 (TAKAHATA, Yoshifumi)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：60635845