

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11015

研究課題名(和文) 骨・軟骨に発現するコラーゲン分子群の骨格形成作用機序の解明と組織再生への応用

研究課題名(英文) Studies on the transcriptional regulation and function of fibrillar collagen genes in osteoblasts and chondrocytes

研究代表者

松尾 哲孝 (Matsuo, Noritaka)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：10284788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：線維性コラーゲン遺伝子の骨芽細胞および軟骨細胞における転写調節機構について解析した。軟骨細胞において、XXVII型のプロモーターには、XI型と同様にGC配列が存在した。Sp1のXI型プロモーター活性増強は確認できたが、XXVII型では、その効果は、はっきりしなかった。骨芽細胞において、V型のプロモーターにGC配列が存在し、Sp7によるプロモーター活性の増強を確認したが、XXIV型にはGC配列は存在せず、同様の作用機序は認められなかった。組織特異的発現調節機構については、XI型プロモーター上流およびXXVII型イントロンにある軟骨特異的エンハンサー領域を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外マトリックス分子は、骨・軟骨組織に機械的強度や柔軟性を与えているだけでなく、細胞との相互作用により直接シグナルを伝達し、細胞分化・機能維持を制御している。本研究は、線維性コラーゲン分子の組織特異的発現が厳密に制御されていることに着目して、骨・軟骨細胞における転写調節機構の解析を行った。これらの分子を解析することにより、細胞分化・骨格形成の分子メカニズムが解明されるだけでなく、骨・軟骨形成異常や変形性関節症などの診断・治療法に新しい知見を与え、再生医療分野にも大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated that the transcriptional regulation and function of mouse fibrillar collagen genes in osteoblasts and chondrocytes. In chondrocytes, we previously reported that the proximal promoter of the mouse type XI gene was GC rich sequence, and overexpression of Sp1 increased the proximal promoter activity. In this study, we found that type XXVII gene was also GC rich sequence, however, the proximal promoter activity was not clearly increased by overexpression of Sp1. In osteoblasts, type V collagen genes were also GC rich sequences, however, type XXIV collagen gene was not in the proximal promoter. Furthermore, we confirmed the presence of the chondrocyte-specific enhancer regions of type XI and XXVII genes in chondrocytes.

研究分野：生化学 分子生物学

キーワード：コラーゲン 骨 軟骨 転写

1. 研究開始当初の背景

コラーゲン分子は、生体内タンパク質の約3割を占めており、生体内で幅広く分布している。そして、発生過程において組織形成に関与すると共に、再生過程においても機能発現や維持に重要な役割を果たしている。特に、線維性コラーゲン分子は骨格形成の主役であり、骨・軟骨・皮膚などの幅広い組織で発現している。その中で、骨組織ではI, V, XXIV型コラーゲン分子が、軟骨組織ではII, XI, XXVII型コラーゲン分子が共存しコラーゲン分子会合体を形成する。

未分化間葉系幹細胞は、組織特異的なシグナル情報を受けた後、骨芽細胞・軟骨細胞・線維芽細胞などに分化し、目的の組織や器官を形成する。この細胞の分化過程において、組織特異的な細胞外マトリックス分子が発現し、これらの分子が「細胞の足場」として機能するだけでなく、「細胞分化の道しるべ」として、細胞にシグナルを伝達し、細胞の運命決定を積極的に導いていることが明らかになりつつある。

我々は、この細胞外マトリックス分子の発現調節機構が細胞分化過程に積極的に関与していることに着目し、コラーゲン線維の直径を調節しているV/XI型コラーゲン分子と、量的には非常に少ないが、骨・軟骨特異的に発現するXXIV/XXVII型コラーゲン分子の発現調節機構の解析に着目した。そして、軟骨にしか発現していないと考えられてきたXI型コラーゲン分子が非軟骨組織にも発現しており、組織特異的な選択的スプライシングにより制御されていることを見出した。その発現調節機構を解析したところ、転写因子NF- κ Bが関与しており、転写を正に制御していることを明らかにした。NF- κ Bは、V型コラーゲン遺伝子発現も制御していることが示され、異なるコラーゲン遺伝子に共通の発現調節機構が存在することを証明した。一方、組織特異的な発現パターンを検討した結果、V型コラーゲン分子が、骨形成部位に発現しており、V型コラーゲン分子のN末端ドメインに骨芽細胞特異的な結合領域が存在する事を見出した。

2. 研究の目的

本研究は、線維性コラーゲン分子群の骨格形成に関与する役割について検討した。骨・軟骨組織に焦点を絞り、マウスV/XXIV型コラーゲン遺伝子の骨特異的な転写調節機構およびXI/XXVII型コラーゲン遺伝子の軟骨特異的な転写調節機構を明らかにし、骨・軟骨分化調節機構を解明する目的で、それぞれの遺伝子の基本プロモーター領域および組織特異的なシスエレメント領域の解析を行い、関与する因子の同定と作用機序の解明を試みた。

3. 研究の方法

線維性コラーゲン遺伝子の骨(V/XXIV型)・軟骨(XI/XXVII型)特異的な発現調節機構を検討するために、転写開始点を含む様々な長さの異なるルシフェラーゼコンストラクトを作製し、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、またはエレクトロポレーション法を用いて骨芽細胞・軟骨細胞に導入後、ルシフェラーゼ活性を測定した。次に、活性を示した領域に変異もしくは欠損を加えたルシフェラーゼコンストラクトを作製し、活性に不可欠なプロモーター配列の同定を行った。更に、組織特異的なシスエレメント領域を明らかにするために、ゲノムライブラリーを作製し、網羅的にエンハンサー活性を検討した。

4 . 研究成果

(1) XI/XXVII 型コラーゲン遺伝子

XXVII 型コラーゲンは、量的には少ないが軟骨に限局している線維性コラーゲン分子である。この遺伝子の転写産物を解析したところ、選択的スプライシング産物が存在した。組織分布を調べたところ、1つの転写産物は軟骨に、もう一つの転写産物は非軟骨組織に発現していた。そこで本研究では、軟骨に発現している転写産物に着目し、様々な長さの異なるルシフェラーゼコンストラクトを作製し、軟骨細胞におけるプロモーター活性を検討したところ、転写開始点の上流-325bp までに基本プロモーター活性が認められた。この領域について、更に短い断片のルシフェラーゼコンストラクトを作製して検討した結果、-81bp から上流部分にプロモーター活性の存在が確認できた。更に、活性領域および転写因子結合領域を同定するために、変異もしくは欠損領域を含んだ複数のコンストラクトを作製して検討したが、明確な活性部位は決定できなかった。XXVII 型と同じように軟骨に発現している XI 型コラーゲン遺伝子のプロモーター領域には GC リッチな配列が存在し、転写因子 Sp1 が転写活性を正に制御することを見出しているため、同様な作用があるかどうかを検討した。基本プロモーター構造を比較してみると、XXVII 型にも GC リッチな配列が存在することが認められたので、この配列に変異もしくは欠損を加えたコンストラクトを作製し活性を検討したが、顕著な変化は認められなかった。更に、Sp1 発現ベクターを用いて強制発現実験を行ったが、明らかな制御機構は確認できなかった。

(2) V/XXIV 型コラーゲン遺伝子

XXIV 型コラーゲン遺伝子は、系統樹解析によると遺伝子構造的に XXVII 型遺伝子と同系統であり、量的には少ないが骨に限局している線維性コラーゲン分子である。これまでに XXIV 型の転写産物を解析したところ、XXVII 型と同様に 2 つの転写産物が見つかった。組織分布については、既知の転写産物が骨組織に発現していたが、新しく見つかった転写産物については、発現部位は今のところ分かっていない。そのプロモーター構造から XXVII 型とは少し異なり、選択的プロモーターにより制御されていると考えている。一方、V 型コラーゲン遺伝子は、系統樹解析によると遺伝子構造的に XI 型と同系統であるので、基本プロモーター構造を比較したところ、V 型コラーゲンにも GC リッチな領域が認められた。Sp1 の活性に及ぼす影響を調べたところ、V 型コラーゲンの転写活性も正に制御しており、骨分化に密接に関連している Sp7 は、更に強い活性を示すことを確認した。そこで、XXIV 型の基本プロモーター構造について比較検討したが、V/XI/XXVII 型とは異なり GC リッチな領域は存在せず、同様な制御機構は認められなかった。

(3) 組織特異的発現調節機構

骨・軟骨特異的シスエレメント領域を明らかにするために、作製したゲノムライブラリー断片を用いて骨芽細胞・軟骨細胞におけるルシフェラーゼ活性を測定した。骨芽細胞においては、V 型および XXIV 型について検討したが、骨特異的シスエレメント領域を見つけることは出来なかった。一方、軟骨細胞においては、XI 型コラーゲンのプロモーター上流および XXVII 型コラーゲンのイントロン内にエンハンサー活性領域の存在が示唆された。そこで、活性部位を同定するために、様々な長さ、変異および欠損を加えたルシフェラーゼコンストラクトを作製し、エンハンサー活性を検討したところ、XI 型・XXVII 型共に軟骨エンハンサー活性部位を数十 bp まで絞り込むことが出来た。現在、候補となる調節因子を見いだしており、それぞれの因子の作用機序について検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yano Hiroyuki, Hamanaka Ryoji, Zhang Juan Juan, Yano Mami, Hida Mariko, Matsuo Noritaka, Yoshioka Hidekatsu	4. 巻 60
2. 論文標題 MicroRNA-26 regulates the expression of CTGF after exposure to ionizing radiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radiation and Environmental Biophysics	6. 最初と最後の頁 411 ~ 419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00411-021-00915-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 矢野博之、濱中良志、樋田真理子、松尾哲孝、吉岡秀克	4. 巻 52
2. 論文標題 放射線誘発線維症における非コードRNAの関与	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 512-514
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhang JJ, Yano H, Sasaki T, Matsuo N, Yoshioka H	4. 巻 59
2. 論文標題 The pro- α 1(V) collagen gene (Col5a1) is coordinately regulated by mir-29b with core promoter in cultured cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Connect. Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 263-273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/03008207.2017.1370465	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uehara E, Hokazono H, Sasaki T, Yoshioka H, Matsuo N	4. 巻 81
2. 論文標題 Effects of GABA on the expression of type I collagen gene in normal human dermal fibroblasts	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem	6. 最初と最後の頁 376-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2016.1238296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uehara E, Hokazono H, Hida M, Sasaki T, Yoshioka H, Matsuo N	4. 巻 81
2. 論文標題 GABA promotes elastin synthesis and elastin fiber formation in normal human dermal fibroblasts (HDFs).	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem	6. 最初と最後の頁 1198-1205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 矢野真美、矢野博之、濱中良志、樋田真理子、松尾哲孝、吉岡秀克
2. 発表標題 放射線によるI型コラーゲン発現調節における長鎖非コード (lnc) RNAの機能解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢野博之、濱中良志、矢野真美、松尾哲孝、吉岡秀克
2. 発表標題 骨芽細胞分化における長鎖非コード (lnc) RNAの機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢野博之、濱中良志、矢野真美、樋田真理子、松尾哲孝、吉岡秀克
2. 発表標題 放射線によるI型コラーゲン発現増加における lncRNA-Xの役割
3. 学会等名 第53回日本結合組織学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋田真理子、矢野博之、松尾哲孝
2. 発表標題 XXVII型コラーゲン 1鎖遺伝子の軟骨特異的転写調節機構の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野博之、濱中良志、矢野真美、松尾哲孝、吉岡秀克
2. 発表標題 骨芽細胞分化における長鎖非コード (lnc) RNAの発現
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野博之、濱中良志、松尾哲孝、吉岡秀克
2. 発表標題 長鎖非コードRNAの放射線誘発線維症における機能解析
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋田真理子、矢野博之、佐々木隆子、吉岡秀克、松尾哲孝
2. 発表標題 XXVII型コラーゲン 1鎖遺伝子の転写調節機構の解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野博之、濱中良志、松尾哲孝、甲斐浩一、吉岡秀克
2. 発表標題 骨芽細胞における長鎖非コード (lnc) RNAの発現
3. 学会等名 第 4 2 回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋田真理子、佐藤はるな、佐々木隆子、吉岡秀克、松尾哲孝
2. 発表標題 XXVII型コラーゲン 1鎖遺伝子(Col27a1)の転写調節機構の解析
3. 学会等名 日本生化学会、九州支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Juan Juan Zhang, Hiroyuki Yano, Takako Sasaki, Noritaka Matsuo, Hidekatsu Yoshioka
2. 発表標題 The pro- $\alpha 1(V)$ collagen gene (Col5a1) is coordinately regulated by mir-29b with core promoter in cultured cells
3. 学会等名 第49回 日本結合組織学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐々木 隆子 (Sasaki Takako) (30133193)	大分大学・医学部・客員研究員 (17501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	矢野 博之 (Yano Hiroyuki)		
研究協力者	樋田 真理子 (Hida Mariko)		
研究協力者	吉岡 秀克 (Yoshioka Hidekatsu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関