

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18791480
 研究課題名（和文）
 Col プロモーター解析を通じた軟骨肥大分子の分子メカニズムに関する研究
 研究課題名（英文） Mechanism for hypertrophic differentiation of chondrocytes in the human type X collagen gene promoter.
 研究代表者
 西條 英人（SAIJYO HIDETO）
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号 80372390

研究成果の概要：

肥大軟骨のマーカー遺伝子であるヒト Col プロモーターをクローニングし、その断片を組み込んだルシフェラーゼ・レポーターコンストラクトの作成を行い、このレポーター遺伝子を用いて基本転写活性の評価を行った。レポーターアッセイの宿主細胞はマウステラトカルシノーマ由来未分化間葉系細胞株 ATDC5 を使い、エフェクターは軟骨・骨芽分化の master regulator である転写因子 Runx2 を利用した。その結果、Runx2 はヒト Col プロモーターの転写活性を著しく増強することを確認した。さらに活性を維持するための最小単位までの絞り込みを行ったところ、転写開始点の-89bp から-60bp が Runx2 の Core responsive element であることを同定した。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 1,500,000 | 0 | 1,500,000 |
| 2007年度 | 1,000,000 | 0 | 1,000,000 |
| 2008年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 300,000 | 3,800,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：Col プロモーター、Runx2

1. 研究開始当初の背景

肥大軟骨細胞は生理的条件でも病的条件においても骨誘導の中心的役割を担っており、そのため軟骨の肥大化のメカニズムを知ることは骨再生あるいは軟骨再生医療の観点からも、非常に重要であると考えられる。すなわち肥大化を促進させることにより骨誘導を促し、骨欠損部の補填など骨再生医療に新たな展開をもたらすと考えられる。また、肥大化を抑制することにより軟骨変性を防止し、変形性関節症に対する軟骨再生医療につながる可能性が見えてくる。

肥大軟骨のマーカー遺伝子としては、型コラーゲン（Col ）がよく知られており、Col の発現とそれに影響を及ぼす分子を調べることで、肥大軟骨分化の分子メカニズムを解明することができると思われる。本研究は肥大軟骨細胞の最も信頼できるマーカーである Col にターゲットを絞った新たな研究となる。Col プロモーターに関する研究はこれまでも散見されるが、その転写因子と response element の解析に踏み込んだものは少なく、正確な response element の同定と転写因子の確定には至っていない。

2. 研究の目的

ヒト Col 遺伝子のプロモーター領域をクローニングして発現調節の解析を行い、さらにこれに関わる上流シグナルを解明することにより軟骨肥大分化のスイッチングについての情報を得ることを目標とした。肥大軟骨のマーカ遺伝子 Col のプロモーター解析を行うことで、肥大分化制御の分子メカニズムの解明に大きく貢献することが予想される。これにより、骨欠損部の補填などの骨再生医療への貢献が期待される。肥大分化はまた、変形性関節症など病的な状態においても重要な役割を担っており、そのメカニズムを知ることにより、有効な治療法の糸口が見出される可能性がある。

3. 研究の方法

1) 肥大分化を安定して再現する *in vitro* での実験系を開発。

軟骨細胞肥大化のメカニズムを知るために、まず肥大分化を安定して再現する *in vitro* 実験系を開発を行った。細胞はマウステラトカルシノーマ由来の未分化間葉系細胞株である ATDC5 を用い、平面培養及びアルジネートビーズ中で三次元培養を検討した結果、インシュリンで培養すると平面培養でも3週間後に ColX mRNA を発現したことから、肥大分化を安定して再現することができた。

2) ヒト Col プロモーター領域をクローニングし基本転写活性を評価。

プロモーターの配列は、基本的にヒトゲノム DNA を PCR で増幅するか、ヒトの塩基配列情報をもとに合成オリゴ DNA を作成して再現した。プロモーター断片としては、種間で比較的保存された転写開始点より上流 4.5kb の配列をクローニングした。

3) このプロモーターの deletion & mutation construct を作成して、転写因子が直接結合するシスエレメントを同定。その際、既知の肥大分化制御シグナルである Runx2 と PTHrP を共導入してその影響を解析。

プロモーターの deletion construct を種間で保存された領域を考慮して数種類作成して、転写制御に関する response element や silence element の同定を行った。

4) シスエレメントに結合する蛋白を同定・解析。

同定したシスエレメント配列を4コピー直列につなげた合成プロモーターにプラスチジン耐性遺伝子を組み合わせたプラスミドを作成し、ATDC5 に導入して安定誘導発現細胞株を樹立した。

4. 研究成果

肥大軟骨のマーカ遺伝子であるヒト Col プロモーターをクローニングし、その断片を組み込んだルシフェラーゼ・レポーターコンストラクトの作成を行い、このレポーター遺伝子を用いて基本転写活性の評価を行った。このプロモーターの deletion construct を種間で保存された領域を考慮して数種類作成して、転写制御に関する response element や silence element の同定を行った。レポーターアッセイの宿主細胞はマウステラトカルシノーマ由来未分化間葉系細胞株 ATDC5 を用い、エフェクターは軟骨・骨芽分化の master regulator である転写因子 Runx2 を利用した。その結果、Runx2 はヒト Col プロモーターの転写活性を著しく増強することを確認した。さらに活性を維持するための最小単位までの絞り込みを行ったところ、転写開始点の-89bp から-60bp が Runx2 の Core responsive element (TGAGGG) であることを同定した。Runx2 の Core responsive element への変異体やその配列をタンデムにつないだ construct を作成し、高い転写活性を示すことを再確認した。さらに EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) や Chromatin immunoprecipitation (ChIP) アッセイでは *In vivo* & *In vitro* の両方で、Runx2 の ColX プロモーターへの特異的な結合を示すことができた。

さらに、同定した Core responsive element を含む転写制御部位を4コピー直列につなげた合成プロモーターにプラスチジン耐性遺伝子を組み合わせたプラスミドを作成し、ATDC5 に導入して安定誘導発現細胞株を樹立した。今後はこの細胞株を用いて、ColX プロモーターを制御するそのほかの転写因子を同定する予定である。

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 6件)

1. Saijo H., Chung U.I., Igawa K., Mori Y., Chikazu D., Iino M., and Takato T. Clinical application of artificial bone in the maxillofacial region. *J Artif Organs*. vol.11 p171-176 (2008) (査読有)
2. Saijo H., Chikazu D., Mori Y., Hikiji H., Yonehara Y., and Takato T. Metastasis of prostate cancer to the

mandibular condyle. Asian J Oral Maxillofac Surg. Vol. 20 p86 -88(2008) (査読有)

3. Chikazu D., Mori Y., Saijo H., Hasegawa Y., Fujihara H., Suenaga H., Ko EC., Yonehara Y., Takato T.: Intraoral reconstruction of the soft palate following tumor resection using a mucoperiosteal flap supplied by the greater palatine vessels. Asian J Oral Maxillofac Surg Vol.19:p203 -206(2008) (査読有)
4. Chikazu D., Tomizuka K., Ogasawara T., Saijo H., Koizumi T., Mori Y., Yonehara Y., Susami T. and Takato T.: Cyclooxygenase-2 activity is essential for the osseointegration of dental implants. Int. J. Oral Maxillofac Surg. Vol.36: p 441 -446, (2007). (査読有)
5. 西條英人, 森良之, 近津大地, 藤原久子, 米原啓之, 高戸毅: 骨髄移植後に口腔粘膜にみられた移植後リンパ球増殖症の1例. 日本口腔外科学会雑誌 Vol.53(1): p 13 -17, (2007) (査読有)
6. Mori Y., Eguchi T., Mastuzaki M., Ogihara Y., Susami T., Chikazu D., Saijyo H., Yonehara Y., Takato T.: A 2-stage procedure combining maxillary advancement by distraction technique with mandibular setback surgery in patients with cleft lip and palate. Int J Oral Maxillofac Surg. Vol.35:p594 -597 (2006) (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

1. 西條英人: シンポジウム3 顎骨再建 - 形態から機能まで - 『人工骨やリコンストラクションプレートを用いた再建』 第53回日本口腔外科学会総会(S-3-3) 徳島 2008年10月21日
2. Saijo H., Tei Y., Mori Y., Suenaga H., Chikazu D., Yonehara Y. and Takato T.: Application of Custom-made Artificial Bones in the Maxillofacial Region. AAOMS 89th Annual Meeting, Scientific Sessions & Exhibition In conjunction with the JSOMS and KAOMS; October 8 -13, 2007.

3. 西條英人: カスタムメイド人工骨の設計法. 第24回三次元臓器造形研究会, 2007年7月28日, 東京.
4. 西條英人, 鄭雄一, 森良之, 末永英之, 菅野勇樹, 近津大地, 米原啓之, 高戸毅: 顎顔面領域におけるカスタムメイド人工骨の応用. 第52回日本口腔外科学会総会, 2007年9月29-30日, 名古屋.
5. 西條英人: 三次元CT画像を用いた粘膜骨膜弁法による口蓋形成術後の骨形成状態の評価. 第49回日本形成外科学会総会・学術集会, 2006年4月12-14日, 岡山
6. Saijyo H., Chung UI., Mori Y., Suenaga H., Chikazu D., Yonehara Y., and Takato T.: Application of custom-made artificial bones in the maxillofacial region. 7th Asian Congress of Oral maxillofacial Surgery, November 8, 2006
7. 森良之, 西條英人, 須佐美隆史, 近津大地, 松崎雅子, 荻原祐二, 大久保和美, 末永英之, 中島慶治, 米原啓之, 高戸毅: 下顎枝矢状分割術後の早期プレート抜去症例に関する検討. 第16回日本顎変形症学会, 6月21-22日, 幕張, 2006.

〔図書〕(計3件)

1. 西條英人, 高戸毅: 組織欠損に対する新たなアプローチ. 医学のあゆみ Vol. 226 No.9 救急医療における再生医療 (医歯薬出版株式会社) p800 -808, 2008
2. 西條英人, 高戸毅: 口腔癌と口内炎の鑑別ポイント. 『口腔ケアの基礎知識』 永末書店, p341 -343, 2008
3. 西條英人, 高戸毅: 臨床と研究 第84巻(7) 『口腔内悪性腫瘍』 (大道学館出版部), p70 -75, 2007.

〔産業財産権〕
出願状況（計 0件）
ありません

取得状況（計 0件）
ありません

〔その他〕

ホームページ：
<http://plaza.umin.ac.jp/%7Eoralsurg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西條 英人 (SAIJYO HIDETO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80372390

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし