

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09592

研究課題名(和文)新規軟骨分化誘導転写因子EMX2を制御する分子間ネットワークの解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular networks that regulate novel chondrogenic transcription factor, EMX2

研究代表者

池田 敏之 (Ikeda, Toshiyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80322759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：EMX2の軟骨分化誘導能を、プロモーター・レポーターアッセイ、リアルタイムRT-PCR、導入細胞のALP/アルシアンブルー染色により確認した。EMX2の軟骨細胞誘導能はSOXトリオと異なり、未分化軟骨細胞株や間葉系幹細胞など軟骨分化能を有する細胞に特異的であった。EMX2にはエクソン2を欠くスプライシングバリエーションが存在し、このバリエーションでは軟骨分化誘導能が弱かった。EMX2の転写制御を活性化する転写因子としてRELAが同定されNF- κ Bシグナルと密接な関連性をもつことが示唆された。EMX2の下流に位置し軟骨分化誘導能を有する分子として複数のTNFスーパーファミリーリガンドを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨分化誘導能を持つ新規転写因子EMX2を新たに同定した。EMX2はSOXトリオと異なり軟骨分化誘導能をもつ細胞種に特異的に作用し、より分化が進行した状態についての研究標的分子として有望である。またEMX2の上流・下流にNF- κ Bシグナルが関与すること、TNFスーパーファミリーリガンドの中に軟骨分化誘導能をもつものが存在することが示唆されたことで、軟骨再生薬開発への糸口が見えてきたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chondrogenesis by introduction of EMX2 was confirmed in several chondrogenic cell lines and human MSC by promoter-reporter assays, real-time RT-PCR analyses, and ALP/alcian blue staining of cultured cells. In contrast to the SOX trio, chondrogenesis derived from EMX2 was specific to chondrogenic cells and it could not induce chondrogenesis in carcinoma cell lines. There was a short variant of EMX2 in which lacked exon 2, and this variant had weaker chondrogenic ability. RELA activated EMX2 promoter, and close relationship between EMX2 and NF- κ B signals was suggested. As chondrogenic factors that were induced by EMX2, several TNF superfamily ligands were identified.

研究分野：軟骨代謝学

キーワード：軟骨分化 SOXトリオ 選択的スプライシング 転写因子 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた現在、Osteoarthritis (OA)や Rheumatoid Arthritis (RA)など、軟骨の変性・破壊を本態とし、加齢とともに発症率の上昇する common disease に対する対策は喫緊の課題である。非免疫性の変性・破壊による OA はもちろんのこと、近年いわゆるバイオ製剤の発達により病態のコントロールがより容易になった RA においても、治療の過程でいったん失われてしまった軟骨の再生能はゼロに等しく、人工関節をはじめとする手術療法にたよるを得ないのが現状である。軟骨再生医療はこれらの疾患の治療における有望なアプローチであるが、現実的には生体内の細胞に直接作用して軟骨再生を促すような真の再生医療は実現しておらず、部分的な欠損に対する軟骨細胞移植、初期変性状態への多血小板血漿の投与、顎関節などの非荷重関節に対する細胞治療など、ごく限定的な疾患に実験的な治療が行われるにとどまっている。このひとつの理由として耐久性と滑動性というきわめて特殊な生体力学的特徴を持ち、型コラーゲンをはじめとする特異的なマトリックス分子からなる軟骨組織の分子レベルでの分化誘導メカニズムについてはきわめて表面的な知見しか得られていないことがあげられる。研究代表者は長らくこの課題に取り組んできたが、本研究ではこの過程であらたに見出した SOX トリオ (SOX5, SOX6, SOX9) の下流の転写因子 EMX2 を標的とし、その分子間ネットワークを明らかにすることで、軟骨分化のメカニズムの詳細な解明と軟骨再生薬開発の足がかりを得ようと試みた。

2. 研究の目的

EMX2 の軟骨分化誘導の検証

EMX2 の相互作用分子の検証

EMX2 の転写制御メカニズムの解明と転写誘導物質のスクリーニング

EMX2 の選択的スプライシング制御機構解明

EMX2 の下流分子の検索と機能解析

を目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

EMX2 と相同遺伝子である EMX1 を RT-PCR クローニングし、強制発現ベクターを作成した。まず軟骨特異的遺伝子である SOX6/COL2A1 のプロモーター・ルシフェラーゼレポータープラスミドと各種細胞株に同時導入し、転写活性化の有無を検討した。ついで各種細胞株に一過性の強制発現系、レトロウィルス発現系、アデノウィルス発現系を用いて EMX1/EMX2 を導入し軟骨分化誘導能を検討した。軟骨分化誘導能はリアルタイム RT-PCR による軟骨特異的遺伝子の mRNA の誘導の有無と培養細胞の ALP 染色・アルシアンブルー染色によって評価した。

EMX2 と軟骨分化誘導能をもつ他の転写因子を SOX6/COL2A1 のプロモーター・ルシフェラーゼレポーターアッセイの系にて同時導入し相乗的に作用するか検討した。また強制発現系の免疫沈降により蛋白間の直接的な結合の有無を評価した。

EMX2 遺伝子は 3 エクソンから形成されるが、転写開始点上流 4 kb から 3'UTR までの配列をいくつかのセットにわけてクローニングし、ルシフェラーゼ・レポーターアッセイにて、ベースの転写活性、軟骨分化にかかわる転写因子とくに SOX9/SOX トリオによる転写活性化の有無について検討した。

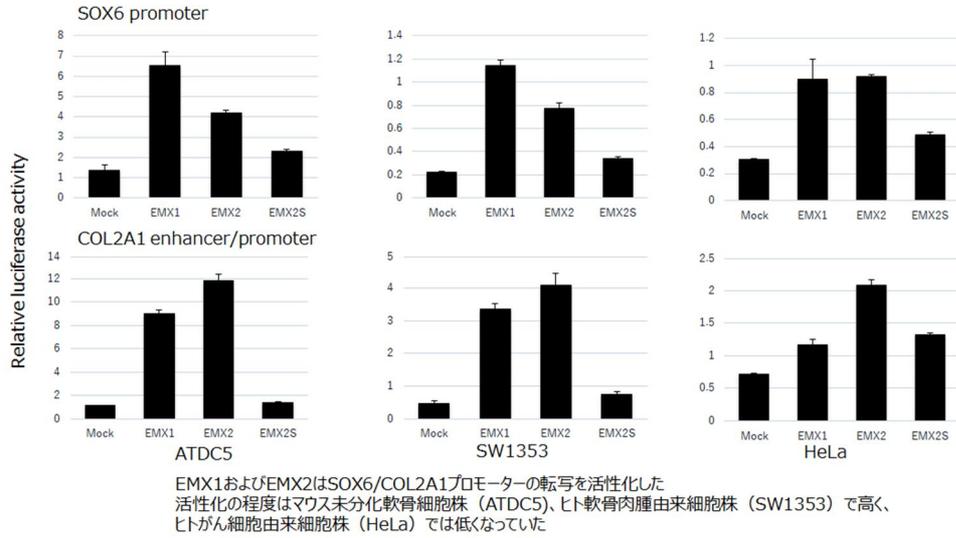
事前の検討により EMX2 の exon 2 は選択的スプライシングによる制御を受けていることがわかった。そこで EMX2 遺伝子全長をクローニング、N 末 Halo-tag をつけた強制発現ベクターを作成した。これと SOX トリオや他の軟骨分化関連の転写因子の強制発現ベクターを同時導入し選択的スプライシングに影響を与えるか検討した。また p63 の選択的スプライシングにかかわる exon 12 と exon 14 の間に EMX2 の exon 2 をはさみこんだ系を作成し、エクソン内に変異をいれてスプライシングパターンに変化がでるか検討した。

方法 で作成した EMX2 導入による軟骨分化誘導の系を用い、EMX2 と関連する可能性の高いシグナルの関連分子について、リアルタイム RT-PCR にて EMX2 による誘導を検証した。とくに TNF スーパーファミリーに着目して解析を行った。また TNF スーパーファミリーの軟骨分化誘導能について検証を行った。

4. 研究成果

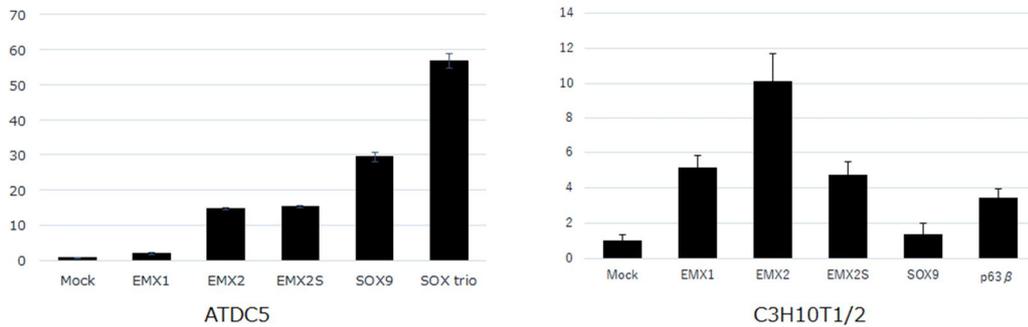
EMX のヒト気管軟骨および精巣組織由来 cDNA を用いた RT-PCR クローニングの結果、EMX2 には exon 2 を欠くショートバリエーション (以下 EMX2S) が存在すること明らかになった。EMX2S は DNA との結合に重要な役割を果たすホメオドメインを欠いており、通常の転写因子としての作用はないことが予測された。ルシフェラーゼ・レポーターアッセイの結果、EMX1, EMX2, EMXS を SOX6 および COL2A1 の転写を活性化したが、この活性化は軟骨系の細胞株でとくに強く認められた (図 1)。また軟骨特異性の高い COL2A1 プロモ

図1



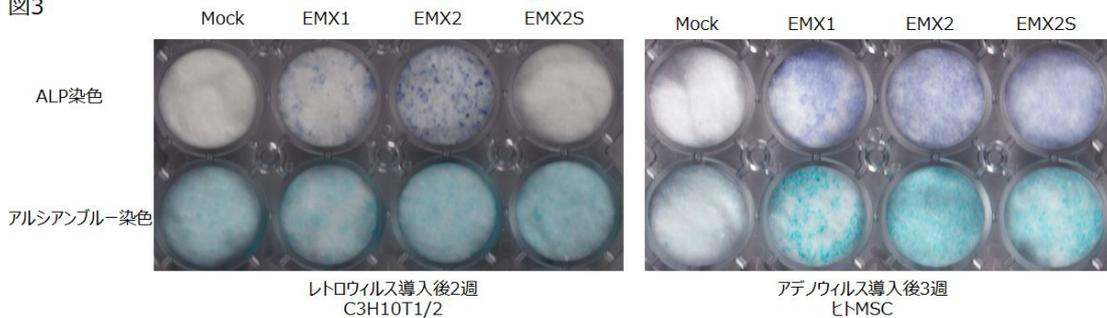
ーターの活性化の程度は EMX2 の方が強かった。未分化軟骨細胞株 ATDC5 や C3H10T1/2 に EMX1/2 を一過性に強制発現したところとくに EMX2 で Col2a1 mRNA を誘導した(図2)。転写活性化能の低い EMX2S にも Col2a1 の誘導能を認めた。また未分化軟骨細胞株

図2 Col2a1 relative mRNA level (トランスフェクション後48時間)



C3H10T1/2 にレトロウイルス発現系で EMX1/EMX2 を安定導入すると Sox6, Col2a1 などの軟骨特異的遺伝子の mRNA の誘導のほか、培養 1~2 週で ALP 染色、アルシアンブルー染色陽性の軟骨基質の産生を認めた(図3a)。ヒト MSC にアデノウイルスを用いて EMX1/EMX2 を導入した系でも同様の結果であった(図3b)。興味深いことに転写因子と

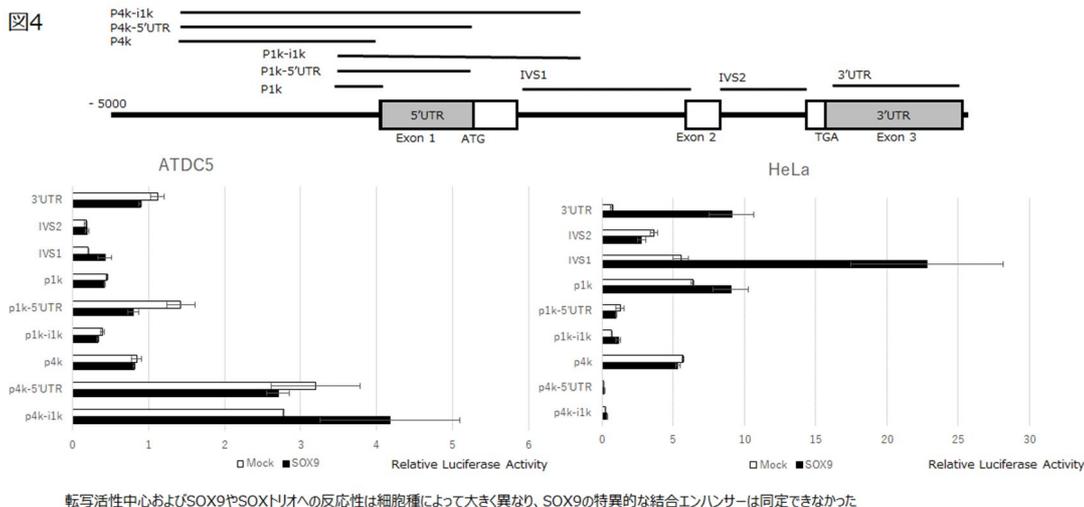
図3



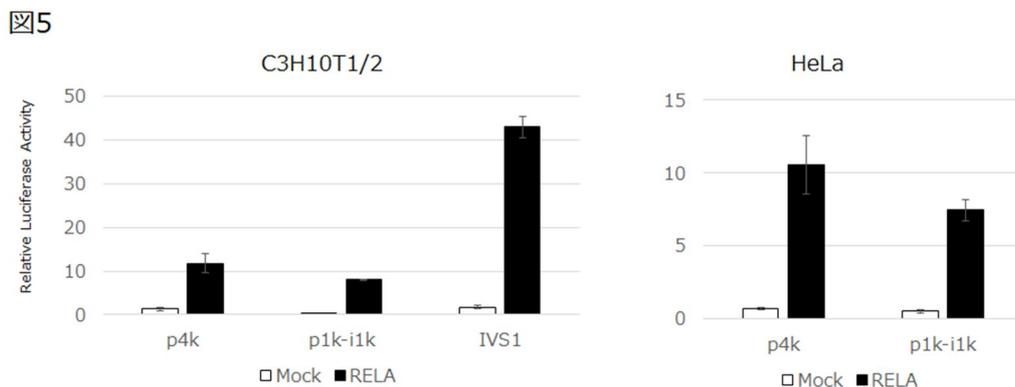
しての活性を欠くはずの EMX2S にも弱いながら軟骨分化誘導能を認め、図2の結果とあわせて、EMX2 は軟骨特異的遺伝子の転写誘導以外のメカニズムでも軟骨分化に寄与していることが示唆された。

SOX9, p63 のほか、複数の軟骨分化にかかわる転写因子と、EMX2 の相互作用を SOX6/COL2A1 のプロモーター・レポーターアッセイにて、検証したが相加的・相乗的に作用する転写因子を見出すことはできなかった。293 細胞をホストセルにし、強制発現系による免疫沈降法で同様のスクリーニングを行ったが、いずれの候補転写因子とも蛋白・蛋白間結合を確認することはできなかった。

EMX2 の転写制御をになう上流分子の検索のため、転写開始点の上流 4 kb からイントロン 1、イントロン 2、3'UTR までをいくつか断片化して組み込んだルシフェラーゼ・レポーターベクターを作成し、ベースの活性と SOX トリオの中心の転写因子 SOX9 への反応性を確認したが、転写活性の強い領域や SOX9 への反応性は細胞種によって大きく異なっており、SOX9 が直接結合し作用する特異的なエンハンサー配列は同定できなかった(図 4)。EMX2 は SOX9、SOX トリオの直接的転写制御を受けているわけではないと推



察される。そこで作成したレポーターベクターのうち転写開始点やイントロン 1 を含む主要なコンストラクトを用いて EMX2 遺伝子に直接結合制御している可能性の高い転写因子のスクリーニングを行った。その結果 RELA が細胞種にかかわらず、EMX2 の転写制御を活性化することが明らかになった(図 5)。現在直接結合するエンハンサー配列の同定を試みている。

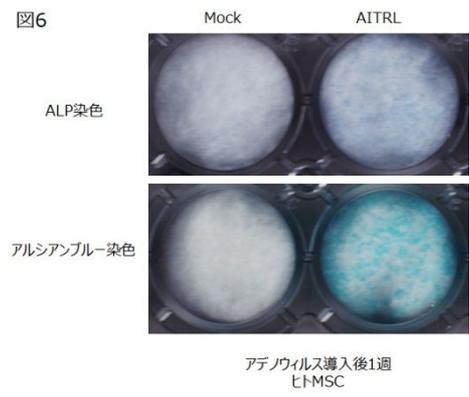


EMX2 の遺伝子全長からなるコンストラクトを軟骨分化関連転写因子と同時導入しスプライシングパターンの変化を観察したが、コンストラクトのみの状況でもショートバリエーションの PCR 産物はわずしか検出されず、導入転写因子によるスプライシングパターンの変化を確認することはできなかった。そこで p63 の選択的スプライシングを利用した系に、EMX2 のエクソン 2 周囲配列を組み込んで、エクソン内の変異や欠失でショートバリエーションへのシフトが起こるかを検討し、ESE (exonic splicing enhancer) の同定を試みたがキー配列や特異的に結合する SRSF (serine arginine rich splicing factor) の同定にはいたらなかった。

結果で NF κ B シグナル伝達系の下流転写因子 RELA と EMX2 の関連が示唆されたため、NF κ B シグナル伝達系の上流に位置するリガンド・レセプターのひとつである TNF スーパーファミリーに着目し、EMX2 により軟骨分化を誘導した MSC 由来の cDNA を用いて検討したところ、複数のレセプター・リガンドで発現誘導が認められた。そこで TNF スーパーファミリーリガンドのレトロウィルス発現系を作成、C3H10T1/2 に安定導入して ALP 染色で軟骨分化誘導能をスクリーニングしたところ、4 種類のリガンドが軟骨分化誘導能を有する可能性があることが判明した。現在アデノウィルス発現系でヒト MSC に遺伝子で導入し、ヒトの軟骨再生医療に応用可能か検討中であるが、うち AITRL (activation-inducible TNF-related ligand) については、導入後 1~2 週間ほどで、アルシアンブル

一・ALP 染色陽性となり、軟骨分化誘導能が
認められた (図 6)。

図6



確

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 0件）

1. 著者名 Tokunaga Kurato, Nakamura Kensuke, Inokuchi Ryota, Hayase Naoki, Terada Rui, Tomioka Yuji, Ikeda Toshiyuki, Kobayashi Etsuko, Okazaki Hitoshi, Sakuma Ichiro, Doi Kent, Morimura Naoto	4. 巻 54
2. 論文標題 Cardiac Variation of Internal Jugular Vein as a Marker of Volume Change in Hemorrhagic Shock	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 717 ~ 722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001548	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 Terada Rui, Ikeda Toshiyuki, Mori Yoshiteru, Yamazaki Sho, Kashiwabara Kosuke, Yamauchi Haruo, Ono Minoru, Yamada Yoshitsugu, Okazaki Hitoshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Comparison of two point of care whole blood coagulation analysis devices and conventional coagulation tests as a predicting tool of perioperative bleeding in adult cardiac surgery - a pilot prospective observational study in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 3525 ~ 3535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/trf.15523	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 Cardigan Rebecca, Ikeda Toshiyuki, Goto Naoko, Okazaki Hitoshi, Dunbar Nancy et al.	4. 巻 117
2. 論文標題 International Forum on Policies and Practice for Transfusion of ABO and RhD Non Identical Platelets: Summary	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vox Sanguinis	6. 最初と最後の頁 136 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vox.13129	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 Ikeda Toshiyuki, Terada Rui, Nagura Yutaka, Okazaki Hitoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 High-dose intravenous iron supplementation after preoperative autologous blood donation is useful to prevent post-donation/preoperative anemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transfusion and Apheresis Science	6. 最初と最後の頁 103348 ~ 103348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.transci.2021.103348	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 池田 敏之	4. 巻 50
2. 論文標題 血液製剤を掘り下げる 6.外科医の立場から	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Technology	6. 最初と最後の頁 142~148
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 -

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 澤田 良子, 中村 潤子, 川端 みちる, 名倉 豊, 池田 敏之, 岡崎 仁
2. 発表標題 HLA抗体特異性同定試験の比較検討
3. 学会等名 第68回 日本輸血・細胞治療学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 會田 砂良, 名倉 豊, 中村 潤子, 川端 みちる, 澤田 良子, 廣瀬 有香, 奥谷 美紅, 山崎 翔, 池田 敏之, 岡崎 仁
2. 発表標題 当院における安全な輸血療法のための医師看護師向け院内教育の取り組み
3. 学会等名 第68回 日本輸血・細胞治療学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 美香, 池田 敏之, 寺田 類, 関口 ひろみ, 岡崎 仁
2. 発表標題 COVID-19感染拡大により影響を受けた自己血輸血利用患者の実態調査
3. 学会等名 第34回 日本自己血輸血・周術期輸血学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 潤子, 池田 敏之, 澤田 良子, 川端 みちる, 名倉 豊, 松橋 美佳, 長山 和弘, 佐藤 雅昭, 中島 淳, 岡崎 仁
2. 発表標題 肺移植症例における抗HLA抗体の解析
3. 学会等名 第67回 日本輸血・細胞治療学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 敏之, 山崎 翔, 寺田 類, 高橋 美香, 小林 佳子, 関口 ひろみ, 岡崎 仁
2. 発表標題 自己血輸血に関連したインシデントレポートの解析
3. 学会等名 第33回 日本自己血輸血・周術期輸血学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 翔, 池田 敏之, 寺田 類, 高橋 美香, 小林 佳子, 関口 ひろみ, 岡崎 仁
2. 発表標題 自動採血装置の保守管理体制構築の取り組み
3. 学会等名 第33回 日本自己血輸血・周術期輸血学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田 敏之, 寺田 類, 名倉 豊, 小林 佳子, 岡崎 仁
2. 発表標題 自己血貯血後の高用量静注用鉄剤投与は貯血後・術前貧血の予防に有効である
3. 学会等名 第35回 日本自己血輸血・周術期輸血学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学医学部附属病院 輸血部
<http://square.umin.ac.jp/traf-ky/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------