

機関番号：17501  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20390402  
 研究課題名（和文）：5型・11型コラーゲン分子の骨・軟骨・筋・歯牙における遺伝子発現及び機能解析  
 研究課題名（英文）：Analysis of type V/XI collagen gene regulation and its function in bone, cartilage, muscle and dentin.  
 研究代表者：  
 吉岡 秀克（YOSHIOKA HIDEKATSU）  
 大分大学・医学部・教授  
 研究者番号：00222430

## 研究成果の概要（和文）：

V/XI型コラーゲンは線維形成に必須である。六つの $\alpha$ 鎖より構成され、時間的、空間的に特異的な発現を示す。本研究では骨芽細胞における $\alpha 1(V)$ 、 $\alpha 3(V)$ 遺伝子、歯牙細胞における $\alpha 2(XI)$ 鎖遺伝子の転写調節について解析し、基本プロモーターの領域を明らかにした。また骨分化誘導因子 Sp7/Osterix の結合部位を $\alpha 1(V)$ 、 $\alpha 3(V)$ 遺伝子プロモーター上において同定した。さらに、創傷治癒モデルにおける、V/XI型コラーゲン $\alpha$ 鎖の経時的な遺伝子発現パターンを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Type V/XI collagen is essential for fibrogenesis. It consists of six  $\alpha$  chains, of which expression are restrictedly regulated temporally and spaciouly. In present project, we clarified the basal promoter region of  $\alpha 1(V)$  and  $\alpha 3(V)$  collagen genes in osteoblastic cells and  $\alpha 2(XI)$  collagen gene in odontoblastic cells. We also identified the binding site of osteoblast differential factor, Sp7/Osterix, in the promoter of  $\alpha 1(V)$  and  $\alpha 3(V)$  collagen genes. Furthermore, we showed the expression pattern of the  $\alpha$  chains using wound healing model.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は種々の刺激の影響を受けて、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋芽細胞、歯芽細胞、線維芽細胞等に分化する。これらの細胞は種々のコラーゲン分子を発現する。骨や皮膚ではI型コラーゲンが、軟骨ではII型コラーゲンが最も多く作り出され

る。これらのメジャーコラーゲン分子がコアになり、その他の量的に少ないマイナーコラーゲン分子と高分子会合体を形成し、“コラーゲン線維”を形成する。私達は現在まで、マイナーコラーゲンである5型・11型（以下、V/XI型）コラーゲン分子について、その一次構造を決定し、その遺伝子発現に関する

研究を行ってきた。このコラーゲン分子は線維形成に必須である (Li Y et al Cell 1995)。V/XI型コラーゲン分子をつくる $\alpha$ 鎖は6鎖存在するが、私達がヒト $\alpha 1(XI)$ 鎖のN末のユニークな構造 (Npp、AD) を示して以来 (JBC,1990)、 $\alpha 1(V)$ 、 $\alpha 3(V)$ 、 $\alpha 2(XI)$ の4鎖がこの構造を持つことが報告された。この構造はコラーゲンのプロトタイプであるI型、II型、III型コラーゲンの $\alpha$ 鎖には見られない構造である。また、 $\alpha 1(XI)$ 鎖のAD (酸性) 領域には、組織特異的な選択的スプライシングが見られる (Matrix Biol 2001)。

これらの遺伝子は細胞による発現の違いが見られる。ノーザンブロット法、RT-PCR法、*in situ* ハイブリダイゼーション法、免疫組織学法等による解析により、骨芽細胞、軟骨細胞、筋芽細胞、歯芽細胞、線維芽細胞現における各遺伝子の発現の違いをしめした。

今まで私たちは、ヒトまたはマウス $\alpha 1(V)$ 、 $\alpha 3(V)$ 、 $\alpha 1(XI)$ 鎖遺伝子の基本プロモーターの解析を行っている。いずれの遺伝子においても、転写開始上流約 200 bp までがコアプロモーター領域であると思われる。いずれの遺伝子においても、共通に CBF/NF-Y 因子が結合し、活性の上昇に関与している。さらに $\alpha 1(V)$ 鎖遺伝子には Sp1 あるいは Sp1 様因子の因子が結合しているが活性に関与しているかは不明である (Matrix Biol 2004)。 $\alpha 3(V)$ 鎖遺伝子には二つの未知のサプレッサー因子が結合している (JBC 2005)。 $\alpha 1(XI)$ 鎖遺伝子にはさらに上流に GATA 様因子及び未知の因子が結合し、活性の上昇に関与している (JBC 1995、JBC 2003)。一方、 $\alpha 2(XI)$ 鎖遺伝子の遺伝子調節機構については他のグループが解析を行っている (Tsumaki N et al JCB 1996)。II型遺伝子( $\alpha 3(XI)$ 鎖はII型の修飾された鎖)の場合と同様に、軟骨細胞の発現には Sox9 重要であることが示された (Bridgewater LC et al JBC 1998)。

## 2. 研究の目的

V/XI型コラーゲン分子を構成する $\alpha$ 鎖遺伝子の骨芽細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞、歯芽細胞等における遺伝子調節機構を *in vitro* 及び *in vivo* の系を用いて解析し、その転写調節の違いを明らかにする。

$\alpha 1(V)$ 、 $\alpha 3(V)$ 、 $\alpha 1(XI)$ の近位プロモーターの解析では CBF/NF-Y が共通に見られたが、この因子はI型の $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖遺伝子にも結合しており、むしろ、非軟骨系の細胞に共通の発現を行なう因子として重要と思われる。さらにプロモーターの上・下流領域を解析し、各遺伝子の細胞特異的な発現調節機構を明

らかにしたい。その中には骨特異的転写因子の Runx2、Sp7/Osterix、或いは軟骨特異的転写因子 Sox9 やそのファミリーの結合部位や、その他の未知の因子の結合部位が明らかにできるだろう。さらに、マウスを使った *in vivo* の系を用いて、生体内での遺伝子発現を時間的 (発生)、空間的 (組織特異的) に詳細に解析することができる。

## 3. 研究の方法

1) 細胞培養: 線維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、歯牙細胞、横紋筋細胞の性質を有する細胞を培養し、各種実験を行った。骨芽細胞の分化実験では $\beta$ -グリセロリン酸を用いて分化を行った。マウス歯牙組織よりの細胞を培養し、テロメラーゼ遺伝子をトランスフェクションし、不死化を行った。

2) 動物: マウスを用いて歯牙組織の採取及び創傷治癒の実験を行った。ウサギ及びラットを用いて抗体作製を行った。

3) RT-PCR、リアルタイムRT-PCR法: 遺伝子発現の定性、及び定量を行うため各々を行った。

4) RACE法: 転写開始点を決定するために行った。得たcDNAはサブクローニングし、塩基配列を決定した。

5) DNAコンストラクト作製: 各遺伝子のプロモーター領域のDNA断片をルシフェラーゼ遺伝子に結合し、ルシフェラーゼアッセイに用いた。特異的な領域のcDNA断片を用い、GST融合タンパクを作製し、抗体作製に用いた。

6) 細胞導入及びルシフェラーゼアッセイ法: 種々のDNAコンストラクトを細胞に導入し、転写活性を測定した。

7) ゲルシフトアッセイ法: 活性部位のDNA結合タンパク質の有無を調べるために行った。また、既知の因子の結合を抗体を用いたスーパーシフトアッセイで行った。

8) CHIPアッセイ法: 既知の因子の細胞内 (*in vivo*) での結合を確かめるために行った。

9) siRNA阻法: 培養細胞に添加し、遺伝子発現の阻止を行った。

10) 抗体作製: GST融合タンパクを用いて、ウサギ或いはラットに免疫した。抗体の力価や特異性はELISA法、ウエスタンブロット法或いは組織染色法で確かめた。

11) 組織観察: 光顕および電顕にて形態を観察した。

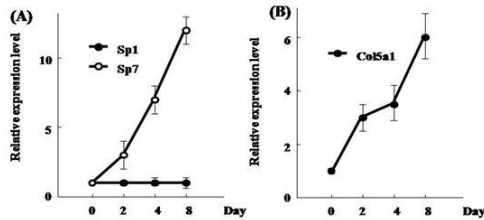
1 2) 免疫組織化学: 通常の光顕レベルでの免疫組織化学および免疫電顕を行った。

1 3) *in situ* ハイブリザイゼーション: RNAを<sup>35</sup>Sでラベルし、リボプローブを作製し、マウス胎児および成体の組織の遺伝子発現を調べた。

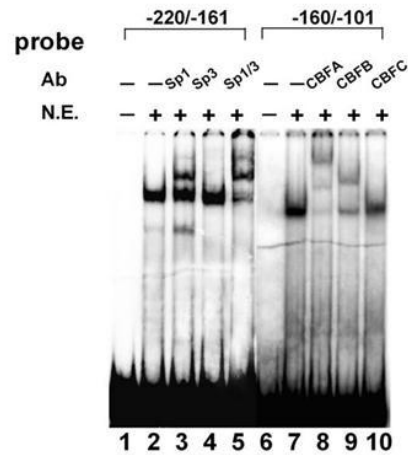
1 4) 創傷治癒実験: マウス背部に直径5 mmの穴を作製し、実験を行った。

#### 4. 研究成果

1) V型コラーゲン $\alpha 1$ (V) 遺伝子の転写調節: 以前、横紋筋肉腫細胞を用いた研究において、この遺伝子の近位プロモーター領域に転写因子CBF/NF-Yが結合することを認めた。本研究において骨芽細胞を用い、骨芽細胞に特異的に発現する転写因子Sp7/Osterixの関与について調べた。その結果、Sp7/OsterixはSp1結合部位に結合し、Sp1よりもV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子の転写活性を増加させた。また、特異的なsiRNAで25%程度抑制することができた。また、前骨芽細胞を骨芽細胞に分化させると成熟するにつれ、Sp7/Osterixの発現が増加し、それに比例し、V型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子の転写活性が増加した(下図)。

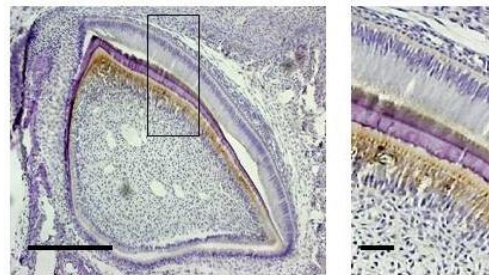


2) V型コラーゲン $\alpha 3$ (V) 遺伝子の転写調節: この遺伝子の骨芽細胞における主要転写開始点は、翻訳開始点上流-102bpであった。ルシフェラーゼアッセイの結果より、基本プロモーター活性は転写開始点上流-337bpまでの領域であった。ゲルシフトアッセイの結果より、基本プロモーター領域内に2箇所の転写因子結合部位が認められた。抗体を用いたスーパーシフトアッセイで各々の領域には関与する結合因子はSp1/3及びCBF/NF-Yであった(下図)。



さらに、Sp1結合部位に同ファミリーメンバーであるSp7/Osterixの関与について調べた。Sp7/Osterixは骨芽細胞に特異的に発現する転写因子である。その結果、Sp7/OsterixはSp1結合部位に結合し、Sp1よりもV型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖遺伝子の転写活性を増加させた。また、V型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖遺伝子の転写はSp7/Osterixに特異的なsiRNAで25%程度抑制することができた。また、前骨芽細胞を骨芽細胞に分化させると成熟するにつれ、Sp7/Osterixの発現が増加し、それに比例して、V型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖遺伝子の転写活性が増加した。

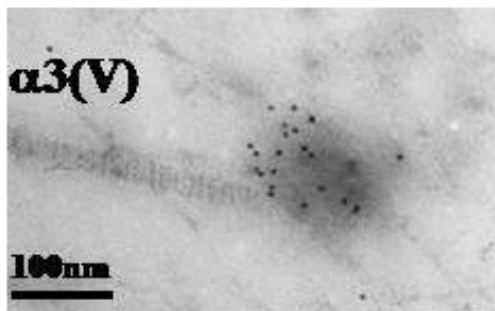
3) XI型コラーゲン $\alpha 2$ (XI) 遺伝子発現及び転写調節: 従来、この遺伝子は軟骨に発現することが知られているが、私たちは歯牙組織で発現していることを見出し(右上図)、歯根部及び歯冠部における転写産物を $\alpha 1$ (XI)鎖、 $\alpha 1$ (V)鎖、 $\alpha 2$ (V)鎖遺伝子と比較するた



めに、リアルタイム RT-PCR法を用いて定量的に比較した。その結果、 $\alpha 2$ (XI)鎖遺伝子の発現量は歯冠部に多く、歯根部に少なく、 $\alpha 1$ (V)鎖、 $\alpha 2$ (V)鎖遺伝子と類似していた。一方、 $\alpha 1$ (XI)鎖遺伝子は歯根部に多く、歯冠部に少なく、両遺伝子の発現が異なることが示された。

また、象牙芽細胞を用いて転写調節機構の解析を行った。転写開始点は翻訳開始点の上流-134bpに認められた。これは軟骨細胞における転写開始点下流-384bpに位置しており、軟骨細胞での転写調節とは異なることが示唆された。ルシフェラーゼアッセイの結果より、基本プロモーター活性は転写開始点上流+133bpまでの領域であった。ゲルシフトアッセイの結果より、基本プロモーター領域内の2つの領域(+191~+270及び+251~+330)に結合する因子の存在が明らかになった。また、第1イントロンには軟骨と異なりエンハンサー活性は認められなかった。

4) 創傷治癒におけるV型コラーゲン $\alpha$ 鎖の発現：マウス背部に全層欠損マウスを作製し、フィブリル型コラーゲンの発現をRT-PCR法で定量した。その結果、I型に比べ、V型 $\alpha$ 1、 $\alpha$ 3鎖の発現量は低く、 $\alpha$ 1鎖がI型同様に持続的な発現が見られるのに対し、 $\alpha$ 3鎖の発現は4~10日にかけて一過性であった。特異抗体を作製し、免疫電顕を行ったところ、 $\alpha$ 1鎖が細いフィブリルに存在しているのに対し、 $\alpha$ 3鎖はコラーゲン線維や細いフィブリルには見られず、不定型な構造の中に存在していた(下図)。また、以前の*in vitro*の研究で示唆したように、 $\alpha$ 3鎖はヘパラン硫酸と一緒に不定型な構造部位に存在していた。



#### 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4件)

1. Hamada Y, Sumiyoshi H, Matsuo N, Wu Y-F, Nakashima M, Yanagisawa S, Yoshioka H: The pro- $\alpha$ 2(XI) collagen gene is expressed in odontoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 392, 166-170, 2010.
2. Wu Y-F, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yoshioka H: The Sp1 and CBF/NF-Y

transcription factors cooperatively regulate the mouse pro- $\alpha$ 3(V) collagen gene (*Col5a3*) in osteoblastic cells. *Acta Medica Okayama* 64, 95-108, 2010a.

3. Wu Y-F, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yoshioka H: Sp7/Osterix up-regulates the mouse pro- $\alpha$ 3(V) collagen gene (*Col5a3*) during the osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 503-508, 2010b.
4. Wu Y-F, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yoshioka H: Sp7/Osterix is involved in the up-regulation of the mouse pro- $\alpha$ 1(V) collagen gene (*Col5a1*) in osteoblastic cells. *Matrix Biol* 29, 701-706, 2010c.

[学会発表] (計15件)

1. 住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克：創傷治癒過程におけるV型コラーゲン $\alpha$ 3鎖の機能：第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会 平成22年12月10日 神戸ポートアイランド国際展示場(神戸)
2. 呉 ユンフェン、松尾哲孝、住吉秀明、吉岡秀克：Sp7/osterixは骨芽細胞においてV型コラーゲン遺伝子を調節する：第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会 平成22年12月8日 神戸ポートアイランド国際展示場(神戸)
3. 松尾哲孝、Wu Yun-Feng、住吉秀明、吉岡秀克：Sp7/Osterixは、骨芽細胞分化過程においてマウスV型コラーゲン $\alpha$ 3鎖遺伝子の発現を増強する：第42回日本結合組織学会学術大会・第57回マトリックス研究会大会 平成22年8月19日 秋田拠点センター・アルヴェ(秋田)
4. 住吉秀明、松尾哲孝、吉岡秀克：創傷治癒過程におけるV型コラーゲン $\alpha$ 3鎖の機能について：第42回日本結合組織学会学術大会・第57回マトリックス研究会大会 平成22年8月19日 秋田拠点センター・アルヴェ(秋田)
5. Yunfeng Wu, Noritaka Matsuo, Hideaki Sumiyoshi, Hidekatsu Yoshioka: Sp7/Osterix transcription factors upregulate the mouse pro- $\alpha$ 3(V) collagen gene (*Col5a3*) in osteoblastic cells.: 第33回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム 平成21年9月10-12日、唐津シーサイドホテル(唐津)
6. 松尾哲孝、Wu Yunfeng、住吉秀明、吉岡秀克：マウスV型コラーゲン $\alpha$ 3鎖遺伝子の転写調節機構の解析：2009年

- 度生物機能研究会 平成21年6月13日 フェニックス・シーガイア・リゾート コテージムヒカ (宮崎)
7. Wu Yunfeng, 松尾哲孝, 住吉秀明, 吉岡秀克: マウスV型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖遺伝子の転写調節機構の解析:平成21年度日本生化学会九州支部例会 平成21年5月16-17日 九州大学病院キャンパス (福岡)
8. Yunfeng Wu, Noritaka Matsuo, Hideaki Sumiyoshi, Hidekatsu Yoshioka: Sp1 and CF/NF-Y transcription factors upregulate the proximal promoter of mouse  $\alpha 3(V)$  collagen gene in osteoblasts. Yokosuka Science Festa (8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 41st Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research, 56th Annual Meeting of the Japanese Matrix Club) June 4-7, 2009 Yokosuka.
9. Hideaki Sumiyoshi, Noritaka Matsuo, Hidekatsu Yoshioka: Study of fibrogenesis using a wound healing model. Yokosuka Science Festa (8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 41st Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research, 56th Annual Meeting of the Japanese Matrix Club) June 4-7, 2009 Yokosuka.
10. Yunfeng Wu, 松尾哲孝, 住吉秀明, 吉岡秀克: The Sp7/osterix transcription factor up-regulate the mouse pro- $\alpha 3(V)$  collagen gene (*Col5a3*) in osteoblastic cells. : 第32回日本分子生物学会 平成20年12月9-12日、パシフィコ横浜 (横浜)
11. 住吉秀明, 松尾哲孝, 吉岡秀克: The study of fibrogenesis using a wound healing model. : 第32回日本分子生物学会 平成20年12月9-12日、パシフィコ横浜 (横浜)
12. 住吉秀明, 松尾哲孝, 吉岡秀克: 創傷治癒におけるコラーゲン産生と癒着との関連: 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会 平成20年12月9-12日、神戸ポートアイランド (神戸)
13. 濱田康英, 住吉秀明, 松尾哲孝, 中嶋桃子, 吉岡秀克: コラーゲン $\alpha 2(XI)$ 鎖は歯牙細胞に発現する: 第32回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム 平成20年9月11-13日、阿蘇リゾートグランヴィリホテル (阿蘇)
14. 住吉秀明, 松尾哲孝, 吉岡秀克: 皮膚創傷治癒過程をモデルとした組織線維化のメカニズムの解析: 第40回日本結合組織学会・第55回マトリックス研究会 平成20年5月29-31日、こまばエミナース (東京)
15. Wu Yunfeng, 松尾哲孝, 住吉秀明, 吉岡秀克: マウスV型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖遺伝子の転写調節機構の解析: 平成20年度日本生化学会九州支部例会 平成20年5月17-18日 九州大学箱崎キャンパス (福岡)
- [図書] (計0件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計0件)
- [その他]
- なし
6. 研究組織
- (1)研究代表者
- 吉岡 秀克 (YOSHIOKA HIDEKATSU )  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号: 00222430
- (2)研究分担者
- 松尾 哲孝 (MATSUO NORITAKA )  
大分大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10284788
- 住吉 秀明 (SUMIYOSHI HIDEAKI )  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号: 60343357
- 浜中 良志 (HAMANAKA RYOJI )  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号: 60274750
- 二宮 善文 (NINOMIYA YOSHIFUMI)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号: 70126241