

機関番号：82612

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390409

研究課題名（和文） 軟骨発生におけるノンコーディングRNAの機能解析

研究課題名（英文） Non-coding RNAs regulating cartilage development

研究代表者

浅原 弘嗣 (ASAHARA HIROSHI)

独立行政法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・部長

研究者番号：70294460

研究成果の概要（和文）：我々は、miRNA-140(miR-140)が軟骨特異的に発現することを見出した。さらに、miR-140 ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスを作成し、miR-140 が関節炎の抑制に重要であることを示した。また、miR-140 が MMPs や Adamts-5 の発現を抑制することを見出した。これらの成果は、miRNA をターゲットとした新しい関節炎治療の可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：We examined the expression pattern of miRNAs in chondrogenesis and found that miR-140 is specifically expressed in cartilage. Loss and gain of function experiments of miR-140 indicated that miR-140 is critical for both cartilage development and homeostasis, partly via regulating Adamts-5.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野： 整形外科学、分子生物学、リウマチ学、発生生物学、システムバイオロジー

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： 関節病学、軟骨、マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 軟骨細胞分化研究の医学、生物学における重要性

軟骨組織は関節および骨格形成において重要な役割を果たし、関節リウマチ等の関節疾患によるその破壊ははかり知れない苦痛と運動機能に大きな障害を与える。総人口 12,500 万人のうち変形膝関節症の患者数は 1,200 万人で要治療者は 700 万人とされている。現在、関節症の治療で使用されている多くの薬剤の作用点は、痛みや炎症を抑える点にあり、炎症により障害を受けた関節軟骨組織の再生、修復を積極的に促す治療法はなく、新たな薬剤ターゲットの同定が必要とされている。

(2) 本テーマにかかわる申請者のこれまでの研究

申請者は整形外科医、分子生物学者、細胞生物学者として、関節炎の病態における遺伝子発現抑制メカニズムの解明による治療法開発について一貫して研究を続けている。リウマチによる関節破壊の治療において、NF- κ B および AP-1 などの転写因子およびクロマチン因子の重要性を発表した。また、転写因子、転写コファクター軟骨の分化制御をモデルとして、転写コアクティベーター群の組織特異的な制御が軟骨細胞分化に重要であることを示した。また、ホールマウント in situ ハイブリダイゼーション法を用いた網羅的な遺伝子発現解析および機能解析により、骨軟骨発生・分化に関わる新規転写因子グループをシステムティックに同定している。この一連の研究の中で、近年、新たな遺伝子発現制御因子として報告され始めている miRNA についても注目し、ホールマウント in situ ハイブリダイゼーション法を用いた発現解析より組織特異的な miRNA の研究を行っている。

2. 研究の目的

近年、ゲノム遺伝子の転写後発現調節にタンパク質をコードしない RNA(ncRNA) が関与することが新たに示された。特に ncRNA の一種である miRNA は、各種間で非常に高く保存され、標的 mRNA の翻訳阻害もしくは直接分解することで、その標的 mRNA の発現を制御することが明らかになってきており、全遺伝子の約 1/3 が miRNA によって制御されていると推測されることから発生・分化などの生命現象に深く関与することが明らかになってきた。また miRNA は、その発現異常によりガンをはじめとした各種疾患にも関与していることが明らかになりつつあり、核酸医薬のターゲットとしての可能性が高いことから急速にその研究が展開されてきている。しかし、この miRNA の機能や標的遺伝子についてはほとんど明らかになっていない。2007 年になり初めて miRNA-KO マウスの報告があり、

筋特異的に発現するわずか 20 塩基ほどの一種類の miRNA(miR-1) をノックアウトするだけで心臓への異常を引き起こすことが明らかになり、組織特異的 miRNA が、発生・分化に重要な役割があることが示唆された。このことから軟骨特異的に発現する miRNA が存在し、軟骨発生・分化メカニズムに何らかの重要な役割があると考えられる。しかし、骨・軟骨における miRNA についての報告はほとんどないが、機能性 miRNA にするために重要な酵素である Dicer を発生期の四肢特異的にノックアウトしたマウスでは、四肢がかなり短小になることや、miR-140 が軟骨に発現し、HDAC4 を標的としているといった報告があるだけである。以上のことから、組織特異的に発現する miRNA や関節疾患に特異的な miRNA を同定し、その発現制御機構や機能を明らかにすることは、今までの軟骨再生・発生研究や変形性関節症、関節リウマチなど関節疾患研究の為の新たな知見を創出する可能性があると考えた。

本研究で明らかにするべき目標：軟骨特異的発現を示す miRNA の機能を以下により明らかにする。

- (1) miR-140 遺伝子改変マウスの解析による軟骨発生・分化に及ぼす影響
- (2) miRNA の変形性関節症や関節リウマチなどの関節疾患における関与
- (3) 軟骨特異的 miRNA における標的遺伝子の同定
- (4) 軟骨特異的 miRNA の SOX9 による転写抑制メカニズム
- (5) 未分化間葉系細胞における miRNA の軟骨分化に及ぼす影響

3. 研究の方法

(1) SOX9 による直接的な miR-140 の転写制御機構解明

我々は、Sox9 の KO マウスにおいて miR-140 の発現が消失するという結果を得たことより以下について検討することで SOX9 による miR-140 の転写制御機構を明らかにする。

① ルシフェラーゼレポーターベクターを用いた miR-140 のプロモーター解析

miR-140 の軟骨組織特異的な遺伝子発現に必須の DNA エlement を決定する。特に、予測されている SOX9 の結合配列の前後での変異、および結合配列での変異を挿入し、SOX9 の過剰発現のレポーターへの影響を検討する。

② クロマチン免疫沈降法およびゲルシフトアッセイによる解析

予測される SOX9 結合部位に対する PCR プライマー作成、マウスから採取した初代培養の軟骨細胞を固定し、SOX9 に対する抗体 (Chemicon) を使ったクロマチン免疫沈降を行い、Sox9 が miR-140 のプロモーターに直接結合するかどうかを解析する。さらに、マ

ウス肋軟骨、および関節軟骨から採取した初代培養の軟骨細胞から核蛋白質を抽出し、予測される miR-140 の SOX9 結合配列によるオリゴ DNA プローブとのゲルシフトアッセイによって、特異的なバンドがみられるか検討する。さらにバンドが検出された場合は、SOX9 であるかどうかを SOX9 に対する抗体を使ったスーパーシフトアッセイによって検討する。

(2) 間葉系幹細胞の軟骨細胞分化における miRNA の役割

現在までに、前駆軟骨細胞株である ATDC を使った研究結果において、インスリンによる分化誘導により pri-miR-140 の発現が増加していくことを RT-PCR により確認している。ヒト骨髄由来間葉系幹細胞やマウス未分化間葉系幹細胞 10T1/2 などへの miRNA の過剰発現（合成 miR-140 やレンチウイルスによる発現）あるいは、阻害（修飾アンチセンスオリゴ：LNA など）による軟骨分化へ及ぼす影響を検討する。

miRNA の阻害効率が悪い場合は、KO マウスより骨髄由来の間葉系幹細胞を単離し、in vitro での解析に用いる。また、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞は遺伝子を導入しにくいことが知られており、軟骨分化における miR140 の役割を詳細にするために、肥大軟骨・石灰化までの内軟骨骨化を再現できるマウス ATDC5 細胞株を用いた実験も並行して行う。

(3) 関節疾患病態モデルを用いた in vivo、in vitro における発現および機能解析

我々は、培養関節軟骨細胞で発現している miR-140 が、IL-1 β 、TNF α 刺激によりその発現を減少すること、また軟骨基質分解酵素などを標的にしている可能性を示すデータを得たことにより in vivo における関節疾患病態と miRNA の関与を以下のように解析する。

① 膝蓋靭帯、前十字靭帯、内外側々副靭帯を切離し、膝不安定性による変形性関節症モデルマウスの作製を行い、関節軟骨組織における miR-140 の発現を組織切片 in situ ハイブリダイゼーションにより調べる。

② miR-140 により軟骨保護作用を検討するため、KO、Tg マウスについても変形性膝関節症モデルマウスを作製、術後 2、4 週でサフラニン O 染色等の軟骨基質染色や II 型コラーゲン等の免疫染色を行い、変形性関節症における軟骨破壊を評価する。また Mankin scale を用い軟骨障害性をスコア化し評価する。また、ヒト変形性関節症患者由来の軟骨組織や細胞を用いての病理学的解析や miR-140 過剰発現により MMPs やアグリカナゼの発現抑制効果など、軟骨基質維持することでアナボリックに作用し、変形性関節症の進行を抑制できるのかどうかを検討する。

(4) 膝蓋靭帯、前十字靭帯、内外側々副靭帯を切離し、膝不安定性による変形性関節症モ

デルマウスの作製を行い、関節軟骨組織における miR-140 の発現を組織切片 in situ ハイブリダイゼーションにより調べる。

(5) miR-140 による軟骨保護作用を検討するため、KO、Tg マウスについても変形性膝関節症モデルマウスを作製、術後 2 週、4 週でサフラニン O 染色等の軟骨基質染色や II 型コラーゲン等の免疫染色を行い、変形性関節症における軟骨破壊を評価する。また、Mankin scale を用い軟骨障害性をスコア化し評価する。また、ヒト変形性関節症患者由来の軟骨組織や細胞を用いての病理学的解析や miR-140 過剰発現による MMPs やアグリカナゼの発現抑制効果など、軟骨基質維持することでアナボリックに作用し、変形性関節症の進行を抑制できるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 我々は、miRNA に対するマイクロアレイによって組織特異的に発現する miRNA を絞り込み、従来困難であった miRNA に対するホルマウント in situ ハイブリダイゼーション法を可能にすることで、miR-140 が軟骨特異的に発現することを見出した。本年においては、この発現パターンが転写因子 Sox9 と一致することに注目、Sox9 の下流遺伝子である可能性を検討した。まず、Sox9 が miR-140 の発現に必須であることを、Prx-Cre および Col2-Cre トランスジェニックマウスと Sox9 コンディショナルマウスのかけ合わせによる、軟骨分化前、後それぞれでの Sox9 欠損によって miR-140 が欠失することによって明らかにした。また、Sox9 コンディショナルマウス成体からえた初代軟骨培養細胞にアデノウイルスで Cre を導入したところ、Sox9 の欠失と同時に miR-140 が減少することにより、成体軟骨における miR-140 においても Sox9 が重要であることが明らかとなった。逆に、Sox9 の過剰発現によって miR-140 の産生は促進された。さらに、Sox9 が miR-140 を直接制御することをプロモータアッセイ、ゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降アッセイなどを用いて証明した。

(2) miR-140 ノックアウトマウスを作成し、その膝蓋靭帯、前十字靭帯、内外側々副靭帯を切離し、膝不安定性による変形性関節症モデルマウスの作製を行い、関節軟骨組織を解析したところ、miR-140 ノックアウトマウスでは関節炎の進行がコントロールに比べて、より強いことがわかった。さらに miR-140 により軟骨保護作用を検討するため、ノックアウトマウスに加えて、軟骨組織特異的な miR-140 トランスジェニックマウスについても抗原誘導による関節症モデル実験をおこなったところ、miR-140 ノックアウトマウスでは関節炎がより強く発症するが、miR-140 トランスジェニックマウスでは関節炎が抑

制されていることが明らかとなった。
上記マウスサンプルやヒト変形性関節症患者由来の軟骨細胞を用いての病理学的解析によってmiR-140がMMPsやAdamts-5の発現抑制によって、軟骨基質維持し、変形性関節症の進行を抑制することを見出した。さらに、Adamts-5の3'UTRにmiR-140の認識部位を決定し、miR-140によって直接Adamts-5の発現が抑制されることを示した。これらの成果は、miRNAをターゲットとした新しい関節炎治療の可能性を示唆しており、miR-140を介した分子ネットワークを更に解析することによって、軟骨の再生・維持機構の詳細が明らかになることが期待できる。また、これらのツールを利用して、内軟骨性骨化におけるmiR-140の役割についても、解析が進んでいる。

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7件)

- ① Miyaki S, Sato T, Inoue A, Otsuki S, Ito Y, Yokoyama S, Kato Y, Takemoto F, Nakasa T, Yamashita S, Takada S, Lotz MK, Ueno-Kudo H, Asahara H. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev.* 2010; 24(11): 1173-1185. (査読有)
- ② Kato Y, Miyaki S, Yokoyama S, Omori S, Inoue A, Horiuchi M, Asahara H. Real-time functional imaging for monitoring miR-133 during myogenic differentiation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41(11): 2225-2231. (査読有)
- ③ Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, Grogan SP, Higashiyama R, Inoue A, Kato Y, Sato T, Lotz MK, Asahara H. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates IL-1 responses. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(9): 2723-2730. (査読有)
- ④ Yamashita S, Andoh M, Ueno-Kudoh H, Sato T, Miyaki S, Asahara H. Sox9 directly promotes Bapx1 gene expression to repress Runx2 in chondrocytes. *Exp Cell Res.* 2009; 315(13): 2231-2240. (査読有)
- ⑤ Furumatsu T, Ozaki T, Asahara H. Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41(5): 489-497. (査読有)
- ⑥ Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, Asahara H. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(5): 1284-1292. (査読有)
- ⑦ Yokoyama S, Hashimoto M, Ahimizu H, Ueno-Kudoh H, Uchibe K, Kimura I, Asahara H. Dynamic gene expression of Lin-28 during embryonic development in mouse and chicken. *Gene Expr Patterns.* 2008; 8(3): 155-160. (査読有)

[学会発表] (計18件)

- ① Asahara H. Transcription and RNA network regulating locomotive system development and homeostasis. Gordon Conferences -Cartilage Biology & Pathology-. 2011年3月7日. Ventura Beach Marriott (米国).
- ② 浅原弘嗣. システムアプローチによる運動器発生メカニズムと疾患の解明. 科学研究費補助金 基盤研究S「内軟骨性骨形成過程における転写制御ネットワークシステムの統合的理解」公開シンポジウム. 2011年1月21日. 千里阪急ホテル (大阪府).
- ③ 浅原弘嗣. システムアプローチによる運動器の発生と疾患の解明. 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会. 2010年12月7日. 神戸ポートアイランド (兵庫県).
- ④ 浅原弘嗣. システム研究による運動器の発生メカニズムの解明と医療への応用. 第51回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2010年9月5日. 秋葉原コンベンションホール (東京都).
- ⑤ 浅原弘嗣. システムアプローチによる運動器の発生と疾患の解析. 第19回硬組織再生生物学会学術大会. 2010年9月4日. 就実大学E館 (教育実践センター) (岡山県).
- ⑥ 浅原弘嗣. システムアプローチによる運動器疾患の解明. 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会 (日本プロテオーム学会2010年会) 第6回日本臨床プロテオーム研究会. 2010年7月27日. 東京ベイホテル東急 (千葉県).
- ⑦ Asahara H. A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58. 2nd Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology. 2010年5月27日. Institut Pasteur (フランス).
- ⑧ 浅原弘嗣. システムアプローチによる

- 運動器発生メカニズムの解明. 第 23 回日本軟骨代謝学会. 2010 年 4 月 3 日. 鹿児島県医師会館 (鹿児島県).
- ⑨ 浅原弘嗣. システムアプローチによる運動器の分化制御機構の解明. 第 3 回日本再生医療学会総会. 2010 年 3 月 19 日. 広島国際会議場 (広島県).
- ⑩ Asahara H. Systems approach reveals transcriptional network regulated by RP58. International Joint Symposium on "Cell Fate Regulation Research: Stem cells and organogenesis". 2009 年 11 月 26 日. 熊本大学発生医学研究所 (熊本県).
- ⑪ 浅原弘嗣. miRNA による軟骨代謝制御メカニズム. 第 1 回 Orthopedic Research Club. 2009 年 11 月 1 日. かずさアカデミアパーク (千葉県).
- ⑫ 伊藤義晃, 他. システムアプローチによる筋、軟骨、腱の分化制御機構の解明. 第 82 回日本生化学会大会. 2009 年 10 月 21 日. 神戸国際会議場 (兵庫県).
- ⑬ 浅原弘嗣. 関節リウマチに患者における microRNA. 第 2 回基礎と臨床を結ぶ分子病態研究会. 2009 年 10 月 10 日. 学士会館 (東京都).
- ⑭ Yokoyama S, et al. A systems approach reveals myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58. 第 7 回幹細胞シンポジウム. 2009 年 5 月 15 日. 泉ガーデンギャラリー (東京都).
- ⑮ 佐藤天平, 他. 骨・軟骨発生における microRNA-140 の機能解析. 第 22 回日本軟骨代謝学. 2009 年 3 月 6 日. 名古屋国際会議場 (愛知県).
- ⑯ Asahara H, et al. Systems approach reveals myogenesis molecular network anchored by transcription repressor. Keystone Symposia (Epigenetics, Development and Human Disease (A1)). 2009 年 1 月 6 日. Breckenridge, CO (米国).
- ⑰ Miyaki S, et al. Expression of miR-140 in human articular cartilage and during chondrogenesis. The 72nd annual meeting of the American College of Rheumatology and the 43rd annual meeting of the Association of Rheumatology Health Professionals. 2008 年 10 月 24-29 日. San Francisco, CA (米国).
- ⑱ Asahara H. Systems approach reveals transcription network regulated by Sox9. 2nd International SOX Meeting. 2008 年 9 月 18 日. 兵庫県立淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅原 弘嗣 (ASAHARA HIROSHI)
独立行政法人国立成育医療研究センター・
システム発生・再生医学研究部・部長
研究者番号: 70294460

(2) 研究分担者

味八木 茂 (MIYAKI SHIGERU)
独立行政法人国立成育医療研究センター・
システム発生・再生医学研究部・研究員
研究者番号: 10392490

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

工藤(上野) 寛枝 (KUDO-UENO HIROE)
独立行政法人国立成育医療研究センター・
システム発生・再生医学研究部・共同研究員
研究者番号: 20425713

佐藤 天平 (SATO TEMPEI)
独立行政法人国立成育医療研究センター・
システム発生・再生医学研究部・共同研究員
研究者番号: 00571944