

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390415

研究課題名（和文） 治療標的分子探索を目指したNF- κ Bシグナルによる軟骨・骨の包括的制御機構の解明研究課題名（英文） Research of bone and cartilage regulation by NF- κ B signal for innovative targeted therapy.

研究代表者

伊藤 英也（ITO HIDEYA）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30436464

研究成果の概要（和文）：

軟骨のマスター転写因子 SOX9 の上流プロモーター配列の高度保存領域を用いたルシフェラーゼアッセイによって、NF- κ B シグナルの転写因子である RelA が SOX9 のプロモーター活性を極めて強力に活性化することが判明した。RelA と SOX9 はマウス胎児の四肢軟骨組織において共局在していることが免疫組織染色によって明らかとなった。SOX9 プロモーターのデリレーション、ミュートーションを用いた解析により、RelA の応答領域として転写開始点上流-250bp 付近に NF- κ B 結合領域を同定することができた。RelA を強制発現することにより、HeLa 細胞や ATDC5 細胞において軟骨の初期分化は促進された。以上のことから RelA は SOX9 の誘導を介して軟骨の初期分化を促進的に制御することが証明された。

研究成果の概要（英文）：

Among transcription factors whose binding motifs were identified in the highly-conserved regions between human and mouse SOX9 promoters, a nuclear factor kappa B (NF- κ B) member RelA strongly activated the promoter activity. RelA and SOX9 were co-localized in the limb cartilage. Deletion, mutagenesis, and tandem-repeat analyses identified the core region responsive to RelA at the NF- κ B binding motif to be around -250 bp of the human SOX9 promoter, and this was confirmed to show specific binding to RelA. RelA induced the chondrogenic differentiation parameters in HeLa and ATDC5 cells. In conclusion, we have identified RelA as a transcriptional factor for SOX9 induction and chondrogenic differentiation via binding to an NF- κ B binding motif in the SOX9 promoter.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

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

キーワード：骨・軟骨代謝学、NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症など軟骨変性に基づく疾患の分子メカニズムの解明や、新規治療法の解明のためにも、軟骨細胞の分化制御機構の解明は必須であるが、そのマスター転写因子 **SOX9** がどのように誘導されてくるかは詳しくは分かっていなかった。我々は **preliminary** なスクリーニングによって **NF-κB** シグナルが **SOX9** の転写活性を上げることが突き止めた。

2. 研究の目的

SOX9 の転写誘導を中心に **NF-κB** による軟骨分化制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

in vitro では **SOX9** 以外のマーカー遺伝子についても制御の対象であるかを広く吟味した。**in vivo** では **RelA-flox** マウスを用いて解析を行った。

4. 研究成果

軟骨のマスター転写因子 **SOX9** の上流プロモーター配列の高度保存領域を用いたルシフェラーゼアッセイによって、**NF-κB** シグナルの転写因子である **RelA** が **SOX9** のプロモーター活性を極めて強力に活性化することが判明した。**RelA** と **SOX9** はマウス胎児の四肢軟骨組織において共局在していることが免疫組織染色によって明らかとなった。**SOX9** プロモーターのデリーション、ミューテーションを用いた解析により、**RelA** の応答領域として転写開始点上流・**250bp** 付近に **NF-κB** 結合領域を同定することができた。**RelA** を強制発現することにより、**HeLa** 細胞や **ATDC5** 細胞において軟骨の初期分化は促進された。以上のことから **RelA** は **SOX9** の誘導を介して軟骨の初期分化を促進的に制御することが証明された。

SOX9 以外のマーカーについては、2型コラーゲンやアグリカンなどの軟骨基質遺伝子の転写活性を上げることは判明したが、直接の応答領域を同定することはできず、これらの活性化は **SOX9** の誘導を介していると考えた。**Rela-flox** を用いた解析については、軟骨特異的 **Cre** マウスとの交配によってマイルドな成長障害を認め、生体内でもその機能の重要性が示唆された。その作用点などについては現在詳しく解析を行っている。

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 8 件)

1. Lack of a chondroprotective effect of cyclooxygenase 2 inhibition in a surgically induced model of osteoarthritis in mice. Fukai A, et al. *Arthritis Rheum.* 2012 ;64(1):198-203.

(査読有り)

2. C/EBPβ and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2α as the inducer in chondrocytes. Hirata M, et al. *Hum Mol Genet.* 2012 ;21(5):1111-23. (査読有り)
3. Gα(q) signal in osteoblasts is inhibitory to the osteoanabolic action of parathyroid hormone. Ogata N, et al. *J Biol Chem.* 2011;286(15):13733-40. (査読有り)
4. Akt1 in murine chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiologic and pathologic conditions. Fukai A, et al. *Arthritis Rheum.* 2010 ;62(3):826-36. (査読有り)
5. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2α during skeletal growth and osteoarthritis development. Saito T, et al. *Nat Med.* 2010;16(6):678-86. (査読有り)
6. Mechanisms underlying catabolic and anabolic functions of parathyroid hormone on bone by combination of culture systems of mouse cells. Shinoda Y, et al. *J Cell Biochem.* 2010;109(4):755-63. (査読有り)
7. Transcriptional induction of **SOX9** by **NF-κB** family member **RelA** in chondrogenic cells. Ushita M, et al. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009 ;17(8):1065-75. (査読有り)
8. Screening of chondrogenic factors with a real-time fluorescence-monitoring cell line **ATDC5-C2ER**: identification of sorting nexin 19 as a novel factor. Kan A, et al. *Arthritis Rheum.* 2009 ;60(11):3314-23. (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

1. Functional Redundancy of **GSK-3α** and **GSK-3β** to Control Chondrocyte Differentiation through Phosphorylation of **RelA/NF-κB p65** Itoh S, et al. The American Society for Bone and Mineral Research(ASBMR) 2011.9.19 San Diego, USA
2. Functional Redundancy of **GSK-3α** and **GSK-3β** to Control Chondrocyte Differentiation through Phosphorylation of **RelA/NF-κB p65** Itoh S, et al. Osteoarthritis Research Society International(OARSI) 2011.9.16 San

- Diego,USA
3. Transcriptional induction of ADAMTS5 by NF- κ B family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development Kobayashi H, et al. International Osteoporosis Federation / Australian and New Zealand Bone & Mineral Society 2011.9.7 Gold coast(AUS)
 4. Functional Redundancy of GSK-3 α and GSK-3 β to Control Chondrocyte Differentiation through Phosphorylation of RelA/NF- κ B p65 Itoh S, et al. International Osteoporosis Federation / Australian and New Zealand Bone & Mineral Society 2011.9.5 Gold coast(AUS)
 5. HIF2A/NF- κ B signal in chondrocytes controls extensive steps of osteoarthritis development in mice and human. Fukai A, et al. 2010 World Congress on Osteoarthritis 2010. 9. 23 Brussels, Belgium

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 英也 (ITO HIDEYA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30436464

(H22-H23)

池田 敏之 (IKEDA TOSHIYUKI)

東京大学・医学部附属病院・特任教員

研究者番号：80322759

(H22)

(2) 研究分担者

伊藤 英也 (ITO HIDEYA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30436464

(H22→研究代表者)

緒方 直史 (OGATA NAOSHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10361495

筑田 博隆 (CHIKUDA HIROTAKA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30345219

(3) 連携研究者

特になし