

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31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592359

研究課題名（和文） Sox9ユビキチン化酵素発現異常と骨格系発達異常および神経障害との関連

研究課題名（英文） Role of a ubiquitin ligase for Sox9 on endochondral ossification and neurological disorder

研究代表者

服部 高子 (HATTORI TAKAKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00228488

研究成果の概要（和文）：

内軟骨性骨形成過程において Sox9 は間葉系細胞が軟骨細胞へと分化する方向性を決定する転写制御因子として知られており、Sox9 の活性の厳密な調節が正常な骨格形成に必要なと思われる。本課題では、Sox9 の細胞内量を調節する Sox9 特異的ユビキチンリガーゼを同定し、このユビキチンリガーゼによる Sox9 の細胞内量調節が内軟骨性骨形成に及ぼす影響を調べ、ユビキチンリガーゼの異常による Sox9 の分解不全と神経疾患との関わりについて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Sox9 is a master regulatory transcription factor of the SRY gene family regulating chondrogenesis as well as neural development. In this report, we identified a ubiquitin ligase which binds specifically and regulates cellular concentration of Sox9, and examined the role of the ubuquitin ligase on endochondral ossification as well as neurological disorder through controlling cellular concentration of Sox9.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：Sox9, ユビキチン, プロテオミクス解析, 内軟骨性骨形成, 神経疾患

1. 研究開始当初の背景

内軟骨性骨形成における軟骨から骨への移行過程は、長管骨、肋骨、脊椎での骨伸長においてのみ見られるのではなく、骨折時においても治癒過程、骨棘形成過程などでも観察され、高度に複雑な機構で制御されている。軟骨異形成症による低身長、軟

骨再生から骨への速やかな移行による骨折治癒、また、変形性関節症や関節リウマチなど様々な理由で失われた軟骨の再生など、組織再生工学の観点からもその過程の全容解明は切望され続けているが、未だその過程で次々と発現が変遷していく遺伝子の、内軟骨性骨形成における役割も未だ未解明

な部分が多い。

内軟骨性骨形成は、軟骨細胞の観点から見ると、細胞の成長→成熟→肥大化→石灰化→アポトーシスと肥大化軟骨の吸収→骨系細胞の侵入といった連続した現象の流れによって起こる（図1）。これらそれぞれの現象は、さまざまなシグナル伝達によって制御されており、転写制御因子による成長因子、ホルモン、細胞内外基質の発現制御が誘導されている。

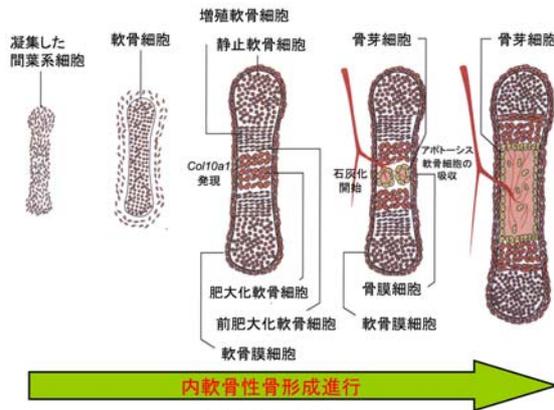


図1 内軟骨性骨形成過程

この軟骨細胞への分化を方向付ける鍵となる転写制御因子が Sox9 であると考えられている。Sox9 は肥大化軟骨組織を含まない軟骨組織で特異的に発現しており、様々な軟骨組織特異的な分化マーカーの発現を促進しているが、骨に置換される直前の肥大化軟骨細胞でその発現は完全に消失する。Sox9 の肢芽におけるコンディショナルノックアウトマウスでは、軟骨が形成されないために完全に手足の無いマウスが形成される（図2）。

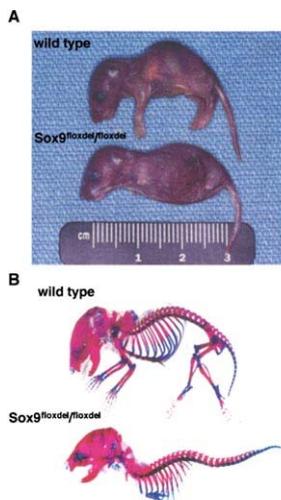


図2 肢芽における Sox9 欠失マウスの表

また、軟骨組織における過剰な Sox9 の発現も軟骨組織の重篤な異形成を誘発する。これらのことから、Sox9 の量的な調節機構は正常な軟骨組織の発生に必須であると思われる。

2. 研究の目的

本申請課題では、まずこのユビキチンリガーゼによる Sox9 の細胞内量調節が内軟骨性骨形成に及ぼす影響を調べ、次にこのユビキチンリガーゼにおける変異が重篤な神経疾患を引き起こしていることが以前より報告されているため、ユビキチンリガーゼの異常による Sox9 の分解不全と神経疾患との関わりについて明らかにすることを最終目的とした。

3. 研究の方法

本研究を行うにあたって、以下の方法を用いた。

- (1) Sox9 に特異的に結合する蛋白を同定するため、軟骨細胞にタグ融合 Sox9 を過剰発現させ、タグ抗体を用いて Sox9-結合蛋白複合体を沈降させた。沈降蛋白をプロテオミクス解析により分析し、1次構造を決定した。
- (2) Sox9 内の結合ドメインを明らかにするため、Sox9 の各ドメインを発現するベクターと結合蛋白を発現するベクターを酵母内に導入し、two-hybrid アッセイを行った。
- (3) それぞれのリコンビナント蛋白を作製し、それらが結合する事、Sox9 が試験管内でユビキチン化される事を確かめた。
- (4) これらの蛋白が細胞内で結合する事を確かめるため、Sox9 と結合蛋白を発現するベクターを COS7 細胞内に導入し、免疫沈降により両蛋白複合体が検出される事を確認した。
- (5) 細胞内で Sox9 と結合蛋白が共局在する事を確かめるため、Cos7 細胞に発現した両蛋白を蛍光免疫染色し、発現部位を確かめた。
- (6) 骨形成における Sox9, 結合蛋白の役割を調べるため、胎生期の長管骨の切片上でそれぞれの抗体を用いて免疫染色を行った。
- (7) Sox9 結合蛋白の軟骨細胞分化に及ぼす影響を調べるために、マウス胎生期肢芽より

軟骨細胞を単離し、結合蛋白を発現するベクターを導入し、Sox9蛋白量を調べると共に、軟骨分化マーカー遺伝子の発現、II型コラーゲンプロモーター活性の変化を調べた。

- (8) Sox9結合蛋白の発現量を減少させるために、マウス胎生期肢芽より単離した軟骨細胞にsiRNAを導入し、Sox9蛋白量を調べると共に、軟骨分化マーカー遺伝子の発現、II型コラーゲンプロモーター活性の変化を調べた。
- (9) Sox9結合タンパク質欠損マウスより調製した神経細胞抽出液を調製し、Sox9タンパク量の変化を確かめた。

4. 研究成果

- (1) Sox9を過剰発現した軟骨細胞抽出液から精製したSox9結合蛋白の解析により、ユビキチンリガーゼが単離された。
- (2) このユビキチンリガーゼとSox9断片を酵母内で共発現する事により、Sox9中のユビキチンリガーゼ結合部位はHMGドメインである事が明らかとなった。
- (3) Sox9はユビキチンリガーゼ、ユビキチン発現ベクターとの共発現で細胞内で効率良くユビキチン化される事、また、それぞれのリコンビナント蛋白によりin vitroでもユビキチン化される事が明らかとなった。
- (4) Sox9発現ベクター、ユビキチンリガーゼ発現ベクター導入による細胞内での異所性発現により両者は核内での部分的な共局在が観察された。
- (5) 骨形成におけるSox9, ユビキチンリガーゼの役割を調べるために、胎生期の長管骨をそれぞれの抗体で免疫染色すると、Sox9は前肥大軟骨層および骨端軟骨辺縁部で強い発現を示すが、ユビキチンリガーゼの発現はそれらの領域で非常に弱く発現している事が明らかとなった。

(6) ユビキチンリガーゼを発現ベクター導入により胎生期肢芽より単離した軟骨細胞に過剰発現させ、Sox9の活性におよぼす影響、細胞内Sox9量の減少、軟骨細胞マーカー遺伝子発現の変化を確認したところ、ユビキチンキナーゼ発現により、細胞内Sox9濃度の低下に伴うII型コラーゲンプロモーター活性の低下、アグリカンmRNAの低下が観察された。

(7) ユビキチンリガーゼをsiRNA導入により軟骨細胞でノックダウンし、Sox9の活性におよぼす影響、細胞内Sox9量の減少、軟骨細胞マーカー遺伝子発現の変化を確認したところ、細胞内Sox9濃度の上昇に伴ったII型コラーゲンプロモーター活性の上昇、アグリカンmRNAの増加が観察された。

(8) ユビキチンリガーゼ欠損マウスより調製した神経細胞抽出液では、Sox9の蓄積のみでなく、Sox8, Sox10も蓄積している事が明らかとなった。

これらの点から本研究では、

- ①Sox9特異的なユビキチンリガーゼを初めて単離し、Sox9の細胞内濃度を調節している機構を明らかにした。
- ②ユビキチンリガーゼがSox9の濃度を調節する事により活性も調節している事が明らかとなった。
- ③これまで胎生期の神経系におけるSox9の発現は知られていたが、生育に伴って消失していく事、またユビキチンリガーゼの欠失によってSox9が蓄積している事が神経疾患の誘発に結びついている可能性を強く示唆した。

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. Surmann-Schmitt, C., Sasaki, T., Hattori, T., Eitzinger, N., Schett, G., von der Mark, K., and Stock, M. The Wnt antagonist Wif-1 interacts with CTGF and inhibits CTGF activity. *J Cell Physiol.*, 査読有、2011, in press.
2. Coustry, Françoise; Oh, Chundo; Hattori, Takako; MAITY, SANKAR; de Crombrughe, Benoit and Yasuda, Hideyo; The dimerization domain of SOX9 is required for transcription activation of a chondrocyte-specific chromatin DNA template. *Nucleic Acids Research*, 査読有、2010 38: 6018-6028.
3. Takako Hattori, Catharina Mueller, Sonja Gebhard, Eva Bauer, Friederike Pausch, Britta Schlund, Michael Boesl, Andreas Hess, Cordula Surmann-Schmitt, Helga von der Mark, Benoit de Crombrughe, Klaus von der Mark. Sox9 is a major negative regulator of cartilage vascularisation, bone marrow formation, and endochondral ossification. *Development*, 査読有、2010, 137, 901-911.
4. Aoyama E, Hattori T, Hoshijima M, Araki D, Nishida T, Kubota S, Takigawa M. N-terminal domains of CCN protein 2/connective tissue growth factor bind to aggrecan. *Biochem J.* 査読有、420(3):413-20. 2009
2. 服部高子、他：結合組織成長因子 CCN2/CTGFは頭部神経堤由来の軟骨細胞分化に必須である、第34回日本分子生物学会年会、2011.12.13-16, パシフィコ横浜、神奈川県
3. Kawata, K., Kubota, S., Hattori, T., et al.: The low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) deficiency in the cartilage tissue leads to skeletal dysmorphisms. 第34回日本分子生物学会年会、2011, 12, 13-16, 横浜
4. Abd El Kader, T., Kubota, S., Nishida, T., Hattori, T., et al.: Characterization of the effect of CCN2 modules independently and in different combinations on chondrocytic cells. A meeting sponsored by the International CCN society, Vancouver, BC, Canada, September 24-27, 2011.
5. Abd El Kdaer, T., Kubota, S., Nishida, T., Hattori, 他: Assessment of combinational effect of independent CCN2 modules on chondrocytic cells. 第84回日本生化学会大会、2011, 9, 21-24, 京都国際会議場、京都 (0, P)
6. Hoshijima, M., Hattori, T., et al.: Roles of the heterotypic CCN2/CTGF-CCN3/NOV and homotypic CCN2-CCN2 interactions in matrix synthesis in chondrocytes. The 33th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, California, September 16-20, 2011.

[学会発表] (計46件)

1. 星島光博、服部高子、他：
CCN2/CTGF-CCN3/NOVおよびCCN2-CCN2のダイマー形成が軟骨細胞の分化機能に及ぼす役割。第25回日本軟骨代謝学会、2012, 3, 9-10, 名古屋

7. Emilio Satoshi Hara, Mitsuaki Ono, Satoshi Kubota, Wataru Sonoyama, Takako Hattori, 他: Harmine, an inducer of CCN2/CTGF, promotes chondrogenesis and suppresses TNF- α -induced inflammatory response, 優秀ポスター、第29回日本骨代謝学会、2011. 7. 28-30、大阪国際会議場, 大阪
8. Tarek Abd El Kdaer, Satoshi Kubota, Takashi Nishida, Takako Hattori, 他: Evaluation of independent and combinational effect of CCN2 modules on chondrocytic cells, 第29回日本骨代謝学会、2011. 7. 28-30、大阪国際会議場, 大阪
9. 星島光博、服部高子、他: CCN2/CTGF のホモダイマー形成、およびCCN3/NOV とのヘテロダイマーの形成が軟骨細胞の基質合成に及ぼす役割、第29回日本骨代謝学会、2011. 7. 28-30、大阪国際会議場, 大阪
10. Shinsuke Itoh, Takako Hattori, et al.. Cartilage-specific overexpression of CCN2/CTGF protects articular cartilage from age-related osteoarthritis-like changes, The 2011 Gordon Conference on Cartilage Biology and Pathology, March 6-11, 2011, Ventura Beach Marriott, Ventura, CA
11. Shinsuke Itoh, Takako Hattori, et al.. Cartilage-specific overexpression of CCN2/CTGF protects articular cartilage from age-related degenerative changes. 連携機能を活用した口腔からQOL向上を目指す研究
「国際シンポジウム」2011. 2. 9-10, ホテルオークラ新潟, 新潟
12. 服部高子、他: CCN2/CTGFはマトリリン-3 と結合して軟骨マトリックス成分のネットワーク形成を促進する、BMB2010 (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. 12. 7-10、神戸ポートアイランド, 神戸
13. Shinsuke Itoh, Takako Hattori, et al.. Cartilage-specific overexpression of ccn2/ctgf protects articular cartilage from age-related osteoarthritis-like changes. The sixth International Workshop on the CCN Family of Genes, 20th-24th October 2010 , Slieve Donard Hotel, Newcastle, Northern Ireland, 2010 ICCNS-SPRINGER Award
14. Takako Hattori, et al. CCN2/CTGF Interacts with Matrilin-3 and Enhances Assembly of a Cartilage Matrix Protein and Filamentous Network. The sixth International Workshop on the CCN Family of Genes, 20th-24th October 2010 , Slieve Donard Hotel, Newcastle, Northern Ireland
15. 内田瑤子、服部高子、他: Exportin-1 によるCCN2/CTGFの核-細胞質間分子輸送とその生理的意義: 第52回歯科基礎医学会総会、2010. 9. 20-22、タワーホール船越、東京
16. 服部高子、他: CCN2/CTGFはマトリリン-3 と結合して軟骨マトリックス成分のネットワーク形成を促進する、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合同学術集

会、2010. 8. 19-20、秋田拠点センター・アルヴェ、秋田

17. 服部高子、他：CCN2/CTGFの核内移行とExportin-1による核-細胞質間分子輸送、第28回日本骨代謝学会、2010. 7. 21-23、京王プラザホテル、東京
18. T. Fujisawa, M. Ueda, M. Ono, T. Hattori, et al. Suppression of BMP-2-induced osteogenic differentiation of hBMSCs by TNF- α . The International Association for Dental Research, July 14-17, 2010, Centre Convencions Internacional Barcelona, Barcelona, Spain,
19. 服部高子、他：Sox9は血管侵入、骨髄形成および内軟骨性骨形成の最終段階を抑制する-*Col10a1*-BACトランスジェニックマウスを用いた解析-、第23回日本軟骨代謝学会、シンポジウム「軟骨分化の分子生物学」2010. 4. 2-3、鹿児島県医師会館、鹿児島
20. Takako Hattori, et al.: Sox9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, 2009 Gordon Conference on Cartilage Biology and Pathology, June 7-12, 2009, Les Diablerets Conference Center, Les Diablerets, Switzerland.

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称1：がんの治療又は予防剤

発明者：滝川正春、服部高子、他

権利者：同上

種類：特許

番号：

出願年月日：2012. 1. 12

国内外の別：国内

名称2：アポトーシス誘導剤と併用されるがんの治療又は予防剤

発明者：滝川正春、服部高子、他

権利者：同上

種類：特許

番号：

出願年月日：2012. 1. 12

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www.dent.okayama-u.ac.jp/seika/index_sc_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 高子 (HATTORI TAKAKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00228488

(2) 研究分担者

滝川 正春 (TAKIGAWA MASAHARU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20112063

久保田 聡 (KUBOTA SATOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90221936

西田 崇 (NISHIDA TAKASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30322233

青山 絵理子 (AOYAMA ERIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10432650

(3) 連携研究者