

## 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25年 5月21日現在

機関番号：15401  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22592067  
 研究課題名（和文） 転写因子 Dec2 と Sox ファミリー蛋白の相互作用による軟骨分化制御機構  
 研究課題名（英文） Involvement of Dec2 in regulation of chondrogenic differentiation via interaction with Sox proteins  
 研究代表者  
 藤本 勝巳 (FUJIMOTO KATSUMI)  
 広島大学・医歯薬保健学研究院・助教  
 研究者番号：40294566

研究成果の概要（和文）：間葉系幹細胞(MSC)の軟骨分化における Dec2 の役割について解析した。軟骨分化誘導した MSC 細胞では、Dec2 の過剰発現によりプロテオグリカンや軟骨分化マーカー遺伝子の発現が低下したことから、Dec2 は軟骨細胞分化に対し抑制的に働いていると考えられた。また、Dec2 は高密度のペレット培養系において軟骨細胞の増殖を抑制した。Dec2 は細胞周期関連遺伝子であるサイクリン D、p21、p16 の発現を介して細胞増殖を制御していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：I studied about the role of Dec2 in regulating chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs). Overexpression of Dec2 decreased the expressions of proteoglycan and chondrocyte-related marker genes in chondrogenic-induced MSCs, suggesting that Dec2 negatively regulates chondrogenic differentiation. Dec2 also suppressed proliferation of MSCs in high-density pellet culture by regulating the expression of cell cycle-related genes such as cyclin D, p21 and p16.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：口腔生化学

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の骨格形成は、未分化間葉系細胞の凝集に始まり、軟骨細胞への分化、増殖、肥大化を経て骨組織へと置換される（内軟骨性骨化）。内軟骨性骨化のそれぞれの分化過程は、様々な転写因子のネットワークによって厳密に制御されている。

特に、Sox9 は未分化間葉系細胞の凝集お

よびその後の軟骨細胞の分化過程に必須の因子であることが知られている。Sox9 遺伝子を欠失したマウスでは内軟骨性骨化が阻害され、軟骨が形成されない。また、Sox5、Sox6 は Sox9 により誘導され、これら3つの Sox 蛋白は軟骨特異的遺伝子であるII型コラーゲンの転写を誘導し、軟骨分化を促進させるが、肥大軟骨細胞への分化過程

ではむしろ抑制的に作用する。Sox ファミリーメンバーは共通構造である HMG box を介して特定の DNA 配列に結合し、転写を調節している。

一方、申請者は軟骨分化に関わる新たな候補因子として bHLH 型転写因子 Dec2 をクローニングした。Dec2 は多くの組織分化の制御に関わっており、例えば、他の転写因子との相互作用を介して、筋肉分化や脂肪細胞分化を負に制御する。また、Dec2 の近縁タンパクである Dec1 は軟骨分化の促進因子であることが知られている。しかし、Dec2 の軟骨分化における役割は不明である。

## 2. 研究の目的

軟骨組織は、組織修復能力に乏しく、一旦損傷を受けると自然再生は困難である。そこで、幹細胞を用いた再生医療による新しい治療法が注目されている。幹細胞を効率的に軟骨細胞に分化させ、移植可能な状態に誘導するためには、未分化状態の維持・増殖および細胞の分化方向を制御する分子機構の解明が重要な課題となる。

細胞分化・発生の過程は転写因子をはじめ多くの因子により調節されていることから、Sox 蛋白を中心とした分子ネットワークの全貌を明らかにすることが、軟骨分化の制御機構を解明する上で重要であると考えられる。本研究により Sox と Dec の関係が解明されることで、Sox 蛋白を介する新しい転写調節のネットワークの存在が示され、また、Dec2 の軟骨分化における役割が明らかになると期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 軟骨分化過程における Dec2 発現パターンの解析

軟骨誘導培地を用いたペレット培養により骨髄由来間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化誘導し、各分化段階の細胞から mRNA を回収した。Dec2 および軟骨分化マーカーの mRNA 量をリアルタイム RT-PCR により定量した。

### (2) 軟骨細胞分化に対する Dec2 過剰発現の影響

Dec2 アデノウイルスベクターを用いて間葉系幹細胞に Dec2 を過剰発現させた後、軟骨細胞に分化誘導した。対照として、LacZ アデノウイルス感染細胞と無感染処置(Mock)細胞を使用した。これら 3 群において、プロテオグリカン、DNA、軟骨マーカー遺伝子、細胞周期関連遺伝子の発現レベルを比較した。

### (3) ルシフェラーゼアッセイ

Sox9 および II 型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性測定系を構築した。両遺伝子上流領域をそれぞれルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に挿入したレポータープラスミドを複製し、軟骨細胞株 ATDC5 細胞に導入した。同時に Dec1, Dec2, Sox6 および Sox9 を強制発現させ、レポーター活性に対する影響を調べた。

## 4. 研究成果

(1) 軟骨分化過程における DEC2 の発現パターンを解析した。DEC2 mRNA は誘導 7 日目から 14 日まで増加し、その後、減少した。一方、軟骨分化マーカーであるアグリカンは 7 日目から、Type II コラーゲンとアルカリンホスファターゼは 14 日目から、Type X コラーゲンは 21 日目に mRNA の発現の上昇が確認された。

(2) 組換えアデノウイルスによる Dec2 強制発現系を用いて、軟骨分化に対する Dec2 過剰発現の影響について解析した。

軟骨分化誘導 14 日、21 日、28 日目の軟骨細胞凝集塊を比較したところ、Mock 群、コントロールのアデノ-LacZ 感染群と比べ、アデノ-Dec2 感染群では細胞凝集塊の小さくなっていった。次に、軟骨分化誘導 21 日目のグリコサミノグリカン (GAG) 量を測定した結果、1 細胞凝集塊当たりの GAG 量はアデノ-Dec2 感染群で Mock および Ad-LacZ 感染群と比較して有意に減少しており、DNA 量当たりの GAG 量 (GAG/DNA 比) についても、アデノ-Dec2 感染群では他の 2 群と比較して、有意に低下していた。

トルイジンブルーによる組織染色を行った。Mock、アデノ-Dec2、アデノ-LacZ 感染群のいずれにおいても分化誘導 14 日目から 28 日までに、プロテオグリカンの染色レベルが経日的に増加した。しかしアデノ-Dec2 感染群では、分化誘導開始 21 日目、28 日目において、他群に比べて染色された領域が減少した。一方、細胞密度は分化誘導 14 日目までは 3 群間に大きな差は認められなかったが、分化誘導 21 日目、28 日目には細胞外基質の蓄積のため Mock およびアデノ-LacZ 感染群で減少し、成熟軟骨細胞の特徴である細胞周囲の lacuna (陰窩) も観察された。しかし、アデノ-Dec2 感染群では分化誘導 21 日目、28 日目でも細胞密度が高く、lacuna を有する細胞数も他の 2 群と比較して減少していた。

さらに、軟骨分化誘導 28 日目の軟骨細胞凝集塊における mRNA の発現レベルを解析したところ、軟骨分化マーカーであるアグリカン

と Type X コラーゲンの mRNA の発現がアデノ-Dec2 感染群で有意に低下していた。また、軟骨分化の初期には、アデノ-Dec2 感染群において FGF18 の発現が著しく低下していた。

(3) 次に、ルシフェラーゼアッセイを行い、II型コラーゲンおよびSox9遺伝子プロモーター活性に対するDec1, Dec2, Sox6, Sox9の影響について解析した。その結果、Sox9はII型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性を促進したが、Sox6, Dec1, Dec2はII型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性に影響しなかった。また、Sox9, Dec2はSox9遺伝子プロモーター活性を抑制したが、Dec1は影響しなかった。さらに、Sox9遺伝子の5'上流領域を解析したところ、多数のSox応答配列が見つかった。これらの実験結果から、Dec2はSox9の発現を抑制することで軟骨分化に対して抑制的に働いていると考えられる。

(4) 軟骨分化過程での細胞増殖に対するDec2の影響について解析した。アデノ-Dec2感染群では軟骨細胞凝集塊あたりのDNA量が減少した。また、Dec2過剰発現により、細胞周期関連遺伝子であるサイクリン D1 が減少し、一方、p21 と p16 の発現が増加したことから、Dec2 はこれらの遺伝子発現を変化させることで、軟骨細胞凝集塊の細胞増殖を抑制していると考えられる。

#### 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 15 件)

- 1) The BHLH transcription factor DEC1 plays an important role in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. Wu, Y., Sato, F., Yamada, T., Bhawal, U.K., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Seino, H., Morohashi, S., Hakamada, K., Abiko, Y., Kato, Y., Kijima, H. *Int. J. Oncol.*, in press. 査読有り DOI: 10.3892/ijo.2012.1559
- 2) Identification of a new clock-related element EL-box involved in circadian regulation by BMAL1/CLOCK and HES1. Ueshima, T., Kawamoto, T., Honda, K.K., Noshiro, M., Fujimoto, K., Nakao, S., Ichinose, N., Hashimoto, S., Gotoh, O., Kato, Y. *Gene*, 510(2), 118-125, 2012. 査読有り DOI: 10.1016/j.gene.2012.08.022
- 3) The basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 inhibits TGF- $\beta$ -induced tumor progression in human pancreatic cancer BxPC-3 cells. Sato, F., Kawamura, H., Wu, Y., Sato, H., Jin, D., Bhawal, U.K., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Seino, H., Morohashi, S., Kato, Y., Kijima, H. *Int. J. Mol. Med.*, 30(3), 495-501, 2012. 査読有り DOI: 10.3892/ijmm.2012.1037
- 4) IL-1 $\beta$ -mediated up-regulation of DEC1 in human gingiva cells via the Akt pathway. Bhawal, U.K., Ito, Y., Tanimoto, K., Sato, F., Fujimoto, K., Kawamoto, T., Sasahira, T., Hamada, N., Kuniyasu, H., Arakawa, H., Kato, Y., Abiko, Y. *J. Cell. Biochem.*, 113(10), 3246-3253, 2012. 査読有り DOI: 10.1002/jcb.24205
- 5) BHLH transcription factor DEC2 regulates pro-apoptotic factor Bim in human oral cancer HSC-3 cells. Wu, Y., Sato, F., Bhawal, U.K., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Seino, H., Morohashi, S., Kato, Y., Kijima, H. *Biomed. Res.*, 33(2), 75-82, 2012. 査読有り DOI: 10.2220/biomedres.33.75
- 6) Smad3 and Snail show circadian expression in human gingival fibroblasts, human mesenchymal stem cell, and in mouse liver. Sato, F., Fujimoto, K., Sato, H., Jin, D., Bhawal, U.K., Wu, Y., Noshiro, M., Kawamoto, T., Seino, H., Morohashi, S., Kato, Y., Kijima, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 419(2), 441-446, 2012. 査読有り DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.076
- 7) Regulation of basic helix-loop-helix transcription factors Dec1 and Dec2 by ROR $\alpha$  and their roles in adipogenesis. Ozaki, N., Noshiro, M., Kawamoto, T., Nakashima, A., Honda, K., Fukuzaki-Dohi, U., Honma, S., Fujimoto, K., Tanimoto, K., Tanne, K., Kato, Y. *Genes cells*, 17(2), 109-121, 2012. 査読有り DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01574.x

- 8) Time-dependent interaction between differentiated embryo chondrocyte-2 and CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  underlies the circadian expression of CYP2D6 in serum-shocked HepG2 cells. Matsunaga, N., Inoue, M., Kusunose, N., Kakimoto, K., Hamamura, K., Hanada, Y., Toi, A., Yoshiyama, Y., Sato, F., Fujimoto, K., Koyanagi, S., Ohdo, S. *Mol. Pharmacol.*, 81(5), 739-747, 2012. 査読有り  
DOI:10.1124/mol.111.076406
- 9) 循環器疾患における時計遺伝子DEC1の意義：加藤幸夫、中島歩、河本健、藤本勝巳、能城光秀：Heart View, 16(8), 103-107, 2012. 査読無し
- 10) 無血清で増幅した間葉系幹細胞と歯髄細胞：加藤幸夫、藤井紗貴子、五藤紀子、北山和子、金輪真佐美、河本健、藤本勝巳、邵金昌、桂由紀、藩海鷗、長谷川森一、辻紘一郎 広島歯科医学雑誌 39巻, 1-8, 2012. 査読無し
- 11) Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 negatively regulates cyclin D1. Bhawal, U.K., Sato, F., Arakawa, Y., Fujimoto, K., Kawamoto, T., Tanimoto, K., Ito, Y., Sasahira, T., Sakurai, T., Kobayashi, M., Kashima, I., Kijima, H., Kuniyasu, H., Abiko, Y., Kato, Y., Sato, S. *J. Pathol.*, 224(3), 420-429, 2011. 査読有り DOI: 10.1002/path.2878
- 12) Basic helix-loop-helix transcription factors DEC1 and DEC2 regulate the paclitaxel-induced apoptotic pathway of MCF-7 human breast cancer cells. Wu, Y., Sato, F., Bhawal, U.K., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Morohashi, S., Kato, Y., Kijima, H. *Int. J. Mol. Med.*, 27(4), 491-495, 2011. 査読有り DOI: 10.3892/ijmm.2011.617
- 13) Anti-apoptotic effect of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 in human breast cancer cells. Liu, Y., Sato, F., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Morohashi, S., Akasaka, H., Kondo, J., Wu, Y., Noshiro, M., Kato, Y., Kijima, H. *Genes Cells*, 15(4), 315-325, 2010. 査読有り doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01381.x
- 14) Interleukin-4 up-regulates histamine H1 receptors by activation of H1 receptor gene transcription. Horio, S., Fujimoto, K., Mizuguchi, H., Fukui, H. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 381(4), 305-313, 2010. 査読有り doi: 10.1007/s00210-010-0491-z.
- 15) Roles of DEC1 and DEC2 in the core loop of the circadian clock, and clock outputs to metabolism. : Kato Y, Noshiro M, Fujimoto K., Kawamoto T.: Hirosaki Med. J. 61(Suppl.), S34-S42, 2010. 査読無し
- [学会発表] (計 14 件)
- 1) Enhanced Proliferation of Stem Cells from Deciduous Teeth in Serum-free Media: STK1/STK2, Noriko Goto, Katsumi Fujimoto, Shin-ichi Hasegawa, Kazuko Kitayama, Veronica Sainik Ronald, Katsuyuki Kozai, Yukio Kato. 8th Biennial Conference PDAA (Pediatric Dentistry Association of Asia), 24-26 May, 2012, Bali Indonesia
- 2) 概日リズムを制御する新規時計エレメント EL-box の同定, 河本健、能城光秀、藤本勝巳、加藤幸夫, 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 平成 24 年 9 月 14-16 日, 郡山市
- 3) Identification of marker genes expressed in human dental pulp cells, Fujii S., Fujimoto K., Srivatanakul P., Nishimura F., Kato Y., 3<sup>rd</sup> Asian Cellular Therapy Organization meeting, 14-17 November, 2012, Chiang Mai Thailand
- 4) ヒト乳歯歯髄細胞における転写因子 MSX1 の標的遺伝子の網羅的解析, 五藤紀子、藤本勝巳、藤井紗貴子、香西克之、加藤幸夫, 第 85 回日本生化学会大会, 平成 24 年 12 月 14-16 日, 福岡市
- 5) Transcription factors regulating differentiation of MSC, Kawamoto T., Kubo H., Iwata Y., Fujimoto K., Noshiro M., Kato Y., 3<sup>rd</sup> International Workshop on BioDental Education & Research Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, 2011 年 1 月 28~30 日, 広島市

- 6) Expression profiles of nuclear receptors and their functions in rat growth plate Chondrocytes, Ozaki N., Noshiro M., Honda K., Hayashibara K., Kawamoto T., Fujimoto K., Tanne K., Kato Y., 3<sup>rd</sup> International Workshop on BioDental Education & Research Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, 2011年1月28~30日, 広島市
- 7) Effect of conditioned medium derived from mouse ameloblast lineage cells on differentiation of human dental pulp cells, Fujii S., Fujimoto K., Nishimura F., Kato Y., 3<sup>rd</sup> International Workshop on BioDental Education & Research Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, 2011年1月28~30日, 広島市
- 8) 細胞表面抗原を指標とした口腔内からの骨前駆細胞の分取, 鎌田浩一、藤本勝巳、西村正宏、末廣史雄、貞森紳丞、赤川安正、加藤幸夫, 第52回日本生化学会中国・四国支部例会, 2011年5月13~14日, 広島市
- 9) 間葉系幹細胞の軟骨分化におけるDEC2の役割, 笹本智子、藤本勝巳、金輪真佐美、河本健、能城光秀、道田将彦、尾崎徳継、丹根一夫、加藤幸夫, 第52回日本生化学会中国・四国支部例会, 2011年5月13~14日, 広島市
- 10) 間葉系幹細胞の増殖・分化ならびにインテグリン発現に対する転写因子GATA6の作用, 道田将彦、河本健、能城光秀、藤本勝巳、金輪真佐美、尾崎徳継、笹本智子、丹根一夫、加藤幸夫, 第52回日本生化学会中国・四国支部例会, 2011年5月13~14日, 広島市
- 11) 核内受容体 ROR $\alpha$  による時計遺伝子 DEC1, DEC2 の発現調節と脂肪分化, 尾崎徳継、能城光秀、河本健、福崎麗、藤本勝巳、丹根一夫、加藤幸夫, 第52回日本生化学会中国・四国支部例会, 2011年5月13~14日, 広島市
- 12) 無血清培地 STK2 によるヒト歯髄細胞の増殖および石灰化能への影響, 藤井紗貴子、藤本勝巳、西村英紀、加藤幸夫, 第50回広島県歯科医学会第95回広島大学歯学会, 2011年11月13日, 広島市

- 13) 核内受容体 (ROR $\alpha$ ) による時計遺伝子 (*Dec1*, *Dec2*) の制御, 尾崎徳継、能城光秀、河本健、藤本勝巳、丹根一夫、加藤幸夫, 第51回日本生化学会中国・四国支部例会, 平成22年5月14-15日, 山口市
- 14) 口腔組織からの骨前駆細胞の分取: 細胞表面抗原による解析, 鎌田浩一、藤本勝巳、西村正宏、貞森紳丞、赤川安正、加藤幸夫, 第51回日本生化学会中国・四国支部例会, 平成22年5月14-15日, 山口市

[産業財産権]  
○出願状況 (計1件)

名称: 脂質代謝関連疾患の検査方法、ならびに脂質代謝関連疾患の予防および/または治療剤の評価方法  
発明者: 加藤幸夫、河本健、藤本勝巳、能城光秀  
権利者: 広島大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-22172 号  
出願年月日: 2011年2月3日  
国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
藤本 勝巳 (FUJIMOTO KATSUMI)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号: 40294566

- (2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

- (3) 連携研究者  
( )

研究者番号: