

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792121

研究課題名（和文）軟骨細胞分化を制御する Sox9 転写ネットワークの解明

研究課題名（英文）Role of Sox9 transcriptional network during chondrocyte differentiation

研究代表者

波多 賢二（HATA KENJI）

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：80444496

研究成果の概要（和文）：

軟骨細胞分化に必須の転写因子 Sox9 は、様々な転写共役因子と転写複合体を構築することにより軟骨細胞分化を誘導する。本研究では軟骨細胞分化過程における Sox9 転写ネットワーク因子の同定とその機能的役割の解明を行った結果、転写因子 Arid5b はヒストン脱メチル化酵素 Phf2 と結合し、Phf2 を *Col2a1* 遺伝子プロモーター上に誘導することにより H3K9Me2 の脱メチル化を促進することが明らかとなった。本研究により Sox9 と Arid5b の協調作用によるエピジェネティックな軟骨細胞分化調節機構が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Sox9 is a transcription factor critical for endochondral ossification; however, proof of its epigenetic regulation remains elusive. Here, we identified Arid5b (AT-rich interactive domain 5b) as a novel transcriptional co-regulator for Sox9. Arid5b physically interacted with Sox9 and cooperatively promoted chondrogenesis through direct binding to the *Col2a1* gene promoter. *Arid5b*^{-/-} mice showed growth retardation with delayed chondrogenesis. The methylation level of H3K9 in chondrogenic marker gene promoters was markedly increased in *Arid5b*^{-/-} chondrocytes. In conclusion, our findings establish a novel epigenomic mechanism of skeletal development, where Arid5b promotes chondrogenesis by facilitating a relationship between Sox9 and Phf2-mediated histone demethylation of chondrogenic gene promoters.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：口腔生化学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：軟骨細胞、Sox9、転写因子

1. 研究開始当初の背景

ヒトの骨格は膜性骨化ならびに内軟骨性骨形成と呼ばれる二つの様式により形成される。内軟骨性骨形成は、軟骨細胞が形成した軟骨原器を鋳型として骨に置換される骨化形式で、椎骨や肋骨、四肢の長管骨など多くの骨格の

形成を制御する。これまでの研究から未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化には Sox ファミリーに属する転写因子 Sex determining region Y-type high mobility group box protein 9 (Sox9) が必須的役割を担うことが明らかにされている。ヒトにおける SOX9 遺伝

子の変異は大腿骨の弯曲など骨格形成異常を呈する Campomelic Dysplasia の原因となっている。これらの知見は、内軟骨性骨形成において Sox9 が必須であることを示す。したがって、軟骨の発生や恒常性維持機構の解明には、Sox9 の転写活性調節メカニズムや標的遺伝子の解明、すなわち Sox9 転写ネットワークの機能的役割を理解することが重要となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、軟骨細胞の分化および成熟過程において Sox9 が構築する転写ネットワークを様々なアプローチを用いて多角的に検討し、その役割を解明することである。

3. 研究の方法

新規の軟骨細胞分化誘導因子の同定を行うために、異なる軟骨細胞分化能を有する線維芽細胞様細胞株 C3H10T1/2 細胞と NIH3T3 細胞に着目した。超高速シークエンサー Solexa を用いて NIH3T3 細胞および C3H10T1/2 細胞の遺伝子発現プロファイリングを行った。生後 0 日齢マウス肋軟骨より初代培養軟骨細胞を採取し、アデノウィルスシステムにより Arid5b を過剰発現させ軟骨細胞分化に及ぼす影響を検討した。軟骨細胞分化は Col2a1 およびアグリカン遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により測定した。Arid5b 遺伝子欠損マウスは Whitson 博士より供与を受け、ISH 法による組織学的検討、さらには生後 0 日齢マウス肋軟骨より初代培養軟骨細胞を回収し生化学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 新規軟骨細胞分化誘導因子の候補遺伝子 Arid5b の同定

超高速シークエンサー Solexa を用いて NIH3T3 細胞および C3H10T1/2 細胞の遺伝子発現プロファイリングを行った結果、C3H10T1/2 に高発現する転写因子として、Arid5b (AT rich interactive domain 5B), ELK1 (member of ETS oncogene family) を同定した。興味深いことに Arid5b 遺伝子欠損マウスは骨格形成異常を示すことが報告されている。以上の結果より、本研究においては新規軟骨細胞分化誘導因子の候補遺伝子として転写因子 Arid5b に焦点を絞ることにした。

(2) 軟骨組織における Arid5b の発現

軟骨細胞分化における Arid5b の役割を明らかにするために、まず軟骨組織における Arid5b の発現を検討した。胎生 15.5 日齢マウスの各組織における Arid5b の発現をリアルタイム PCR 法により検討したところ、初代培養軟骨細胞に高い発現を認めた。また、胎生 12.5 日齢マウスを用いて Whole Mount In

Situ Hybridization を行った結果、Arid5b は Col2a1, Sox9 と同じく胎生期マウス肢芽の軟骨組織に強く発現していることが明らかとなった。

(3) 軟骨細胞分化における Arid5b の機能的役割

Sox9 結合領域を有するレポーターコンストラクト (x4CPE-Luc) を用いて、Sox9 の転写活性に対する Arid5b の効果を検討した。その結果、大変興味深いことに NIH3T3 細胞および C3H10T1/2 細胞において、Arid5b は Sox9 の転写活性を顕著に促進することが明らかとなった。さらに、C3H10T1/2 細胞において観察された Sox9 依存性の Col2a1 遺伝子および Aggrecan 遺伝子の発現増加は、Arid5b を同時に過剰発現することにより顕著に増強された。さらに His タグ Sox9 を用いたプルダウンアッセイを行った結果、Arid5b は C 末端領域を介して Sox9 と物理的に結合することが明らかとなった以上の結果より、Arid5b は Sox9 の転写活性を促進する転写共役因子として、軟骨細胞分化を促進していることが明らかとなった。

(4) Arid5b 遺伝子欠損マウスの解析

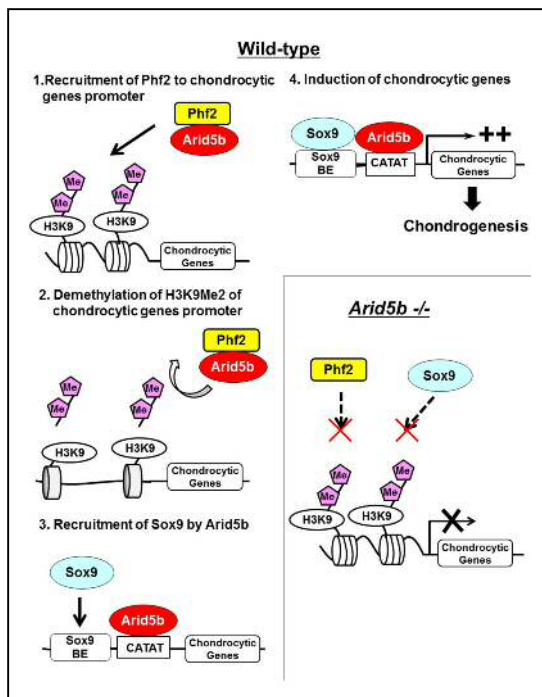
内軟骨性骨化における Arid5b の重要性をさらに明らかにするために、Arid5b 遺伝子欠損マウス (以下 Arid5b(-/-)マウス) の解析を行った。生後 3 週齢の Arid5b(-/-)マウスは、野生型に比較して低身長を示しているのみならず、脛骨の長さが著明に減少していた。

Arid5b(-/-)マウスにおける骨格形成異常の発症メカニズムを明らかにするために、四肢の発生時期における骨格形成、すなわち胎生期における内軟骨性骨化の検討を行った。その結果、胎生 14.5 日齢の Arid5b(-/-)マウスにおいて脛骨の長さの減少および Col2a1 陽性軟骨細胞領域の短縮が認められた。さらには、野生型マウスで検出された Col10 陽性の肥大化軟骨細胞が Arid5b(-/-)マウスにおいて検出されなかったことから、Arid5b(-/-)マウスは内軟骨性骨化の進展に異常を呈していることが明らかとなった。

そこで次に、Arid5b(-/-)マウスにおける内軟骨性骨形成の異常の原因について検討を行った。胎生 14.5 日齢の野生型マウスおよび Arid5b(-/-)マウスより脛骨を採取し、軟骨細胞分化マーカー遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により検討したところ、Arid5b(-/-)マウスの脛骨では野生型に比較して Col2a1 およびアグリカン遺伝子の発現量が有意に減少していることが明らかとなった。また、KO マウスにおける軟骨細胞分化マーカーの発現低下は、Arid5b の過剰発現により回復した。

(5) Arid5bによる軟骨細胞分化遺伝子のエピジェネティック制御

近年, Arid5b がヒストン脱メチル化酵素 Phf2 とコンプレックスを形成し, 標的遺伝子のプロモーター領域の H3K9 ヒストン脱メチル化を介して, エピジェネティックに遺伝子発現を制御していることが報告された。この報告は, 軟骨細胞分化においても Arid5b と Phf2 の複合体が遺伝子発現の調節に関与する可能性を示唆する。そこで, 最後に Arid5b による軟骨細胞分化のエピジェネティックな制御機構について検討した。その結果, Arid5b の過剰発現は Col2a1 遺伝子プロモーター領域の H3K9me2 の脱メチル化を促進することが明らかとなった。さらに, Arid5b(-/-)マウスでは Col2a1 遺伝子プロモーターおよび Aggrecan 遺伝子プロモーターにおける H3K9me2 のメチル化が亢進していることが明らかとなった。重要なことに, Arid5b(-/-)マウス由来の初代培養軟骨細胞では, Col2a1 遺伝子プロモーター領域へのヒストン脱メチル化酵素 Phf2 のリクルートが阻害されていることが明らかとなった。(図参照)



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 6 件)

1: Makino Y, Takahashi Y, Tanabe R, Tamamura Y, Watanabe T, Haraikawa M, Hamagaki M, Hata K, Kanno J, Yoneda T, Saga

Y, Goseki-Sone M, Kaneko K, Yamaguchi A, Iimura T. Spatiotemporal disorder in the axial skeleton development of the Mesp2-null mouse: a model of spondylocostal dysostosis and spondylothoracic dysostosis. Bone. 2013 Mar;53(1):248-58. 査読有り

2: Hisada K, Hata K, Ichida F, Matsubara T, Orimo H, Nakano T, Yatani H, Nishimura R, Yoneda T. Retinoic acid regulates commitment of undifferentiated mesenchymal stem cells into osteoblasts and adipocytes. J Bone Miner Metab. 2013 Jan;31(1):53-63. 査読有り

3: Nishimura R, Wakabayashi M, Hata K, Matsubara T, Honma S, Wakisaka S, Kiyonari H, Shioi G, Yamaguchi A, Tsumaki N, Akiyama H, Yoneda T. Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. J Biol Chem. 2012 Sep 28;287(40):33179-90. 査読有り

4: Nishimura R, Hata K, Ono K, Amano K, Takigawa Y, Wakabayashi M, Takashima R, Yoneda T. Regulation of endochondral ossification by transcription factors. Front Biosci. 2012 Jun 1;17:2657-66. 査読有り

5: Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Wakabayashi M, Yoneda T. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. J Biochem. 2012 Mar;151(3):247-54. 査読有り

6: Amano K, Hata K, Muramatsu S, Wakabayashi M, Takigawa Y, Ono K, Nakanishi M, Takashima R, Kogo M, Matsuda A, Nishimura R, Yoneda T. Arid5a cooperates with Sox9 to stimulate chondrocyte-specific transcription. Mol Biol Cell. 2011 Apr 15;22(8):1300-11. 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

1. The transcription factor FoxC1 regulates chondrogenesis together with Gli2 through

induction of PTHrP

Yoshida M, Hata K, Takashima R, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R and Yoneda T 第35回国骨代謝学会 ミネアポリス 2012年10月12～15日

2. 転写因子Arid5bはSox9標的遺伝子プロモーター領域のヒストン脱メチル化を促進し軟骨細胞分化を制御する

波多賢二、高島利加子、前田芳信、西村理行、米田俊之 第54回歯科基礎医学会、福島 2012年9月25～27日

3. Forkhead box transcription factor FoxC1 controls endochondral bone formation through directly regulating PTHrP

expression Yoshida M, Hata K, Takashima R, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R and Yoneda T オーストラリア-ニュージーランド骨代謝学会 2012年9月2～5日

4. 転写因子FoxC1はPTHrPの発現誘導を介して内軟骨性骨形成を制御する

吉田倫子、波多賢二、高島利加子、井関祥子、山本照子、西村理行、米田俊之 第30回日本骨代謝学会 東京 2012年7月19～21日

5. The transcription factor Arid5b is a novel partner of Sox9 in endochondral bone formation R Takashima, K Hata, K Ono, M Wakabayashi, K Amano, M Nakanishi, Y Maeda, R Whitson, R Nishimura, T Yoneda 第34回米国骨代謝学会 2011年9月16～20日 サンディエゴ

6. The transcription factor Arid5b is a novel partner of Sox9 in endochondral bone formation R Takashima, K Hata, K Ono, M Wakabayashi, K Amano, M Nakanishi, Y Maeda, R Whitson, R Nishimura, T Yoneda the ANZBMS 21st Annual Scientific Meeting 2011年9月4～6日 ゴールドコースト

7. Transcriptional regulation of endochondral ossification Kenji Hata 国際シンポジウム (招待講演) 2011年7月19～21日 第29回日本骨代謝学会、大阪

8. 軟骨細胞分化のエピジェネティック調節 波多賢二、高島利加子、西村理行、米田俊之 2011年7月19～21日 第29回日本骨代謝学会、大阪 招待講演

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波多賢二 (HATA KENJI)
大阪大学・歯学研究科・准教授
研究者番号：80444496

研究者番号：

(3) 連携研究者

西村理行 (NISHIMURA RIKO)
大阪大学・歯学研究科・教授
研究者番号：60294112