

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462805

研究課題名(和文) 転写調節因子 *Irx3* の初期軟骨細胞分化および軟骨形成過程における役割について研究課題名(英文) Role of *Irx3* in chondrogenic differentiation and chondrocyte maturation of mouse mesenchymal cells

研究代表者

玉村 禎宏 (Tamamura, Yoshihiro)

武庫川女子大学・健康・スポーツ科学部・博士研究員

研究者番号：70431963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨分化マスター遺伝子 *Sox9* の機能非依存性に軟骨細胞分化を調節する因子として *Irx3* を同定した。*Irx3* は、前肥大および肥大軟骨細胞に強く発現し、*Bmp* シグナル存在下で初期軟骨細胞分化を促進し、*Sox9* の機能非依存性に *epiphycan* および *lumican* 発現を上昇させた。また、*Irx3* は、*Wnt* シグナルの共役受容体 *Lgr6* とそのリガンド *R-spondin1* を介した同シグナル伝達の活性化により、軟骨細胞の成熟を促進することが判明した。本研究は、*Irx3* の軟骨細胞分化における機能を初めて明らかにし、また *Sox9* の機能を介さない新たな軟骨分化調節機構の存在を示唆するユニークな研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：*Sox9* is known to be a master regulator of cartilage development. In this study, we attempted to identify genes involved in *Sox9*-independent regulatory mechanisms of chondrocyte differentiation and focused on *Irx3*. *Irx3* expression gradually increased with chondrocyte terminal differentiation and promoted the chondrogenic differentiation of mesenchymal cells upon *Bmp2* treatment. *Irx3* partially rescued impaired chondrogenesis via upregulating the expression of *epiphycan* and *lumican* by activating the p38 MAPK pathway under reduced *Sox9* expression. Moreover, *Irx3* stimulates chondrocyte maturation by *Wnt* signaling. This function of *Irx3* might be resulted in part from activation of *Wnt* signaling augmented by *R-spondin1-Lgr6* interaction. These results indicate that *Irx3* represents a novel regulatory factor of chondrocyte differentiation and regulates chondrogenesis independent of the transcriptional machinery associated with *Sox9*-mediated regulation.

研究分野：分子生物学

キーワード：*Irx3* 軟骨細胞 *Wnt*シグナル p38シグナル

1. 研究開始当初の背景

Sox9 は、遺伝子改変マウス解析の結果から、軟骨発生および生後の軟骨機能維持に必須の遺伝子であることが証明されている。しかし、軟骨疾患や幹細胞を用いた軟骨再生医療に対して、Sox9 発現誘導のみで十分であるか不明な点が多く、Sox9 非依存性の軟骨分化調節機構の解明の必要性も考えられる。

2. 研究の目的

本研究では Sox9 非依存性に軟骨分化を調節する因子を探索する実験系のマイクロアレイ解析の結果から、転写調節因子 Irx3 に着目し、その初期軟骨細胞分化および後期軟骨細胞成熟過程における役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

まずマウス軟骨発生における Irx3 発現を免疫染色により調べた。次に、マウス肢芽細胞、未分化線維芽細胞様細胞株 C3H10T1/2 細胞において、Irx3 のレトロウイルスを用いた過剰発現もしくは shRNA を用いた機能阻害実験を行った後、細胞染色や遺伝子解析により Irx3 の初期軟骨細胞分化における役割を解明した。また、ウサギ初代軟骨細胞に Irx3 を過剰発現した後、同様の実験を行い、Irx3 の後期軟骨細胞成熟過程における役割を検討した。さらに shSox9 を発現にさせた C3H10T1/2 細胞に Irx3 を共発現させ、Sox9 機能阻害による軟骨細胞分化阻害をレスキューできるかどうか調べ、その際の Irx3 により誘発されるシグナル伝達機構を調べた。

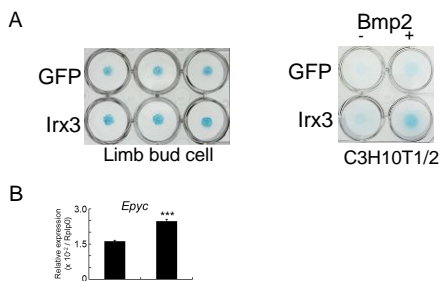
4. 研究成果

(1) 免疫染色の結果、Irx3 はマウス E13.5 軟骨原基の中心部から発現を開始し、その後は前肥大層および肥大層に発現が強くみられた(図 1)。



図1 マウス軟骨原基における Irx3 の発現

(2) Irx3 を過剰発現させたマウス肢芽細胞および C3H10T1/2 細胞ではコントロールと比較して alcian blue 染色が亢進していた(図 2 A)。さらに real-time PCR の結果、Irx3 により、マウス肢芽細胞では Epiphycan(Epyc)発現、C3H10T1/2 細胞では Bmp2 の存在下で II 型 collagen(Col2a1)および Aggrecan 発現が上昇した(図 2 B)。



B(つづき)

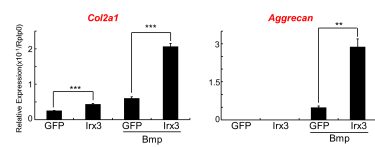


図2 Irx3 の初期軟骨分化に対する作用

(3) 次に Irx3 発現阻害による C3H10T1/2 細胞での遺伝子発現変化について調べたところ、Col2a1 および Aggrecan 発現に変化はみられなかったが、Epiphycan および Lumican 発現が低下した(図 3)。

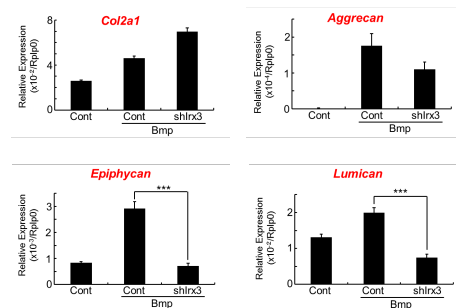


図3 Irx3 発現ノックダウンの軟骨細胞分化に対する影響

以上の結果から Irx3 は Bmp2 存在下で未分化間葉系細胞の軟骨細胞分化を促進し、特に Epiphycan および Lumican 発現調節に重要な役割を持つことが判明した。

(4) さらに Irx3 が Sox9 機能低下による軟骨分化阻害をレスキューできるか調べたところ、shSox9 発現による alcian blue 染色の低下が Irx3 の共発現によりやや回復された(図 4 A)。この際の遺伝子発現を調べた所、shSox9 発現による Col2a1 および Aggrecan 発現の低下は Irx3 共発現により回復されなかったが、Epiphycan および Lumican 発現低下は完全に回復された(図 4 B)。

以上の結果から Irx3 は Sox9 非依存性に軟骨細胞分化を調節することが示唆された。

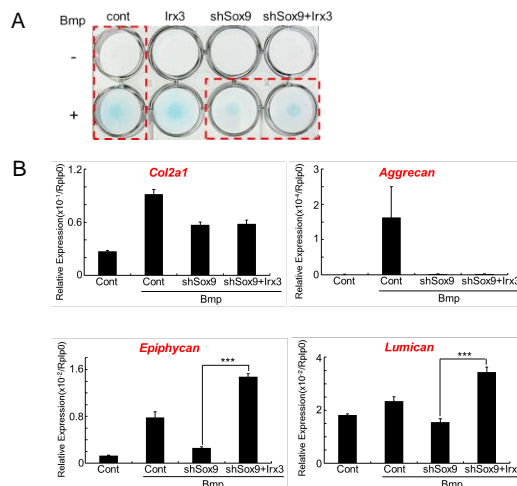


図4 Sox9 発現ノックダウン細胞における Irx3 による軟骨細胞分化レスキュー実験

(5) 次に *Irx3* の *Sox9* 非依存性の軟骨細胞分化調節機構について検討した。*Irx3* 発現細胞では p38 のリン酸化が亢進し、*Bmp2* 存在下ではさらに増強された(図 5 A)。また p38 伝達経路阻害剤 SB202190 処理により *Irx3* による *Epiphycan* および *Lumican* のレスキュー作用が完全に阻害された(図 5 B)。さらに恒常的に p38 シグナル伝達を活性化する *Mkk6* 変異体を発現させると *shSox9* 発現による *Epiphycan* および *Lumican* 発現低下が *Irx3* 共発現の作用と同様に回復された(図 5 C)。以上の結果から、*Irx3* は p38 シグナル伝達経路を介して、*Sox9* の作用非依存性に *Epiphycan* および *Lumican* 発現を調節することが示された。

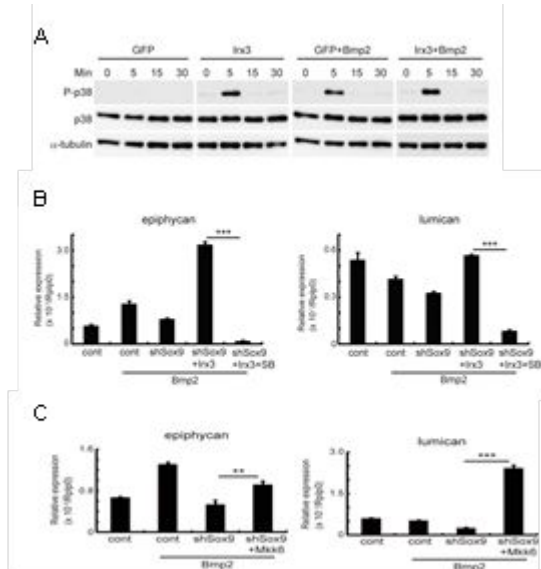


図 5 *Irx3* と p38 経路の関係およびそれらの *Sox9* 非依存性軟骨分化との関係

(6) さらにレトロウイルスを用いてウサギ初代軟骨細胞に *Irx3* を過剰発現させ、alcian blue 染色および real-time PCR による遺伝子解析により軟骨細胞成熟過程における *Irx3* の役割を調べた。*Irx3* 発現細胞では alcian blue 染色が低下し(図 6 A)、*Col2a1* および *Aggrecan*(*Acan*)遺伝子発現が低下したが、軟骨最終分化マーカーである *Mmp13* 発現は上昇した(図 6 B)。

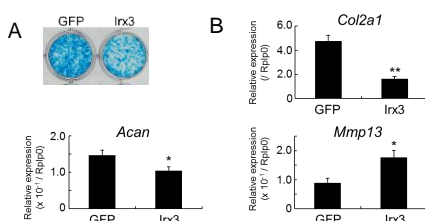


図 6 *Irx3* の軟骨細胞成熟に対する作用

(7) この *Irx3* の軟骨細胞成熟に対する作用は過去の Wnt シグナルの作用と類似していたため、*Irx3* と TOPFlash の関係について調べた。Wnt シグナルレポーター遺伝子 TOPFlash と *Irx3* を C3H10T1/2 細胞に transfection し luciferase assay を行った結果、*Irx3* は TOPFlash 活性を濃度依存性に

上昇させた(図 7 A)。さらに *Irx3* の作用を抑制する DN*Irx3*、Wnt シグナルを活性化する *Nbcac*、同シグナル抑制変異体 LEFEn を用いて luciferase assay を行った結果、*Irx3* と Wnt シグナルの相互作用が証明された(図 7 B)

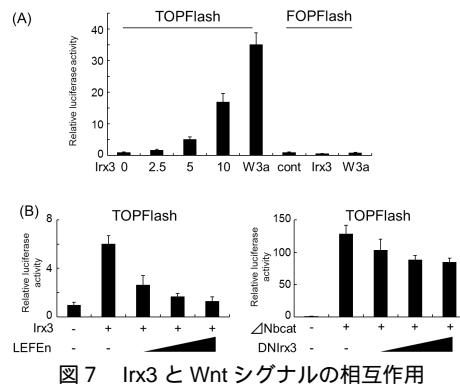


図 7 *Irx3* と Wnt シグナルの相互作用

(8) さらに軟骨細胞分化における *Irx3* と Wnt シグナルの相互作用を調べた所、*Irx3* による軟骨分化抑制作用は LEFEn により阻害され、Wnt シグナル活性化による軟骨分化抑制作用は DN*Irx3* によって抑制された(図 8 A)。また、*Col2a1* および *Acan* 遺伝子発現調節においても同様の所見が得られた(図 8 B)

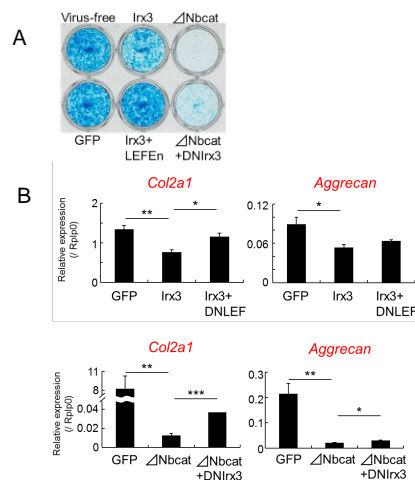


図 8 *Irx3* と Wnt シグナルの相互作用による軟骨細胞分化調節

(9) 最後に *Irx3* と Wnt シグナルの相互作用による軟骨細胞分化調節機構について検討した。*Irx3* は Wnt シグナル共役受容体 *Lgr6* とそのリガンド R-spondin1(*Rspo1*)発現を上昇させることが判明した(図 9 A)。さらに si*Lgr6* 処理した C3H10T1/2 細胞では、*Irx3* による TOPFlash 活性上昇が有意に抑制された(図 9 B)。また、*Irx3* と *Lgr6* は、胎生期および生後において類似した発現パターンを示すことが判明した(図 9 C)。以上の結果から *Irx3* は Wnt シグナルとの相互作用を介して軟骨細胞の成熟を促進することが判明した。また、この相互作用の一部は R-spondin1/*Lgr6* を介するシグナルにより伝達されることが示唆された。

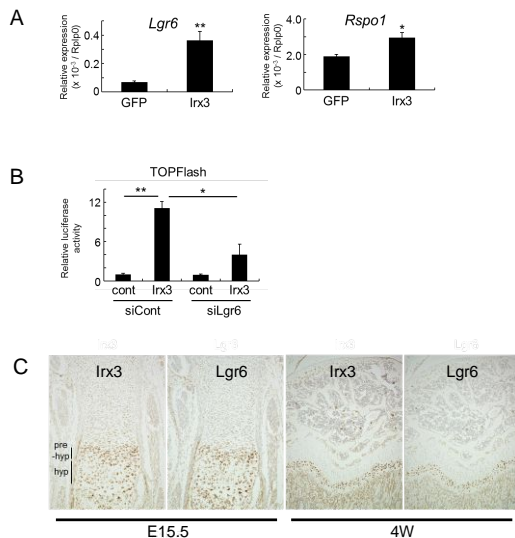


図9 Irx3とLgr6を介するWntシグナル伝達機構

## 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3件)

Tamamura Y, Mera H, Wakitani S (他2名) Irx3 and Bmp2 regulate mouse mesenchymal cell chondrogenic differentiation in both a Sox9-dependent and -independent manner. *J. Cell Physiol.* (2017) Jan. 6, 査読あり, DOI: 10.1002/jcp.25776

Itokazu M., Wakitani S., Mera H., Tamamura Y (他3名) Transplantation of scaffold-free cartilage-like cell-sheets made from human bone marrow mesenchymal stem cells for cartilage repair: a preclinical study. *Cartilage* (2016) 1-12, 査読あり, DOI: 10.1177/1947603515627342

Mera H., Tamamura Y., Wakitani S. (他2名) The population of human bone marrow mesenchymal stem cells supplemented with basic fibroblast growth factor for chondrogenic differentiation. *Osteoarthritis Cartilage* (2015) 23, A382, 査読あり, DOI: 10.1016/j.joca.2015.02.706

[学会発表](計3件)

玉村禎宏、目良恒、糸数万紀、脇谷滋之  
転写調節因子Irx3はWntシグナルにより軟骨細胞分化を調節し、そのシグナル伝達の一部は膜タンパク質Lgr6を介する

第29回日本軟骨代謝学会、平成28年2月19-20日、応仁会館(広島県広島市)

玉村禎宏、目良恒、糸数万紀、脇谷滋之  
軟骨発生および軟骨細胞分化における転写調節因子Irx3の役割

第57回歯科基礎医学会学術大会、平成27年9月11-13日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

玉村禎宏、目良恒、糸数万紀、脇谷滋之  
転写調節因子Irx3の初期軟骨細胞分化における役割について

第28回日本軟骨代謝学会、平成27年3月6-7日、東京医科歯科大学(東京都文京区)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

玉村 禎宏 (TAMAMURA Yoshihiro)  
武庫川女子大学・健康スポーツ科学部・博士研究員

研究者番号: 70431963

### (2)連携研究者

脇谷 滋之 (WAKITANI Shigeyuki)  
武庫川女子大学・健康スポーツ科学部・教授

研究者番号: 70243243

目良 恒 (MERA Hisashi)

新潟大学地域医療教育センター魚沼基幹病院・講師

研究者番号: 70650381