

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11636

研究課題名(和文) Irx3を含む転写調節因子複合体によるPrg4発現調節機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Elucidating the regulatory mechanisms of Prg4 expression by the formation of the transcriptional complex including Irx3 on its promoter

研究代表者

玉村 禎宏 (TAMAMURA, Yoshihiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：70431963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Prg4は関節軟骨表層に発現する分泌因子で、関節の潤滑性の向上や軟骨変性進行の阻止などの役割が報告されているが、その発現調節機構は不明な点が多い。本研究から、転写調節因子Irx3は、TGF- β シグナル伝達因子Smad3や変形性関節症関連因子Nfatc2との複合体形成によりPrg4発現を誘導することが判明した。さらにIrx3は、Prg4発現を上昇させるWnt/ β -cateninシグナルの関連因子であるWnt4やLgr6と相互作用することが判明した。以上の結果より、Irx3はTGF- β およびWntシグナルとの相互作用を介してPrg4発現を誘導し、軟骨変性の進行を阻止する因子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、Irx3の関節軟骨での発現を明らかにし、Prg4発現誘導シグナルであるTGF- β やWntシグナルとの相互作用を介した新たなPrg4発現調節機構を解明したことである。Prg4は軟骨変性疾患の進行を阻止することが報告されており、本研究結果から、Prg4発現を上昇させるIrx3は同疾患の新たな治療標的となりえる可能性が示唆され、本研究は社会的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Prg4 is a secreted factor which is expressed in surface layer of articular cartilage. Although Prg4 has been reported to enhance the joint lubrication and inhibit the progression of cartilage degradation, regulatory mechanisms of its transcription are largely unknown. In this study, we showed that transcription factor Irx3 upregulates Prg4 expression by forming the transcriptional complex with TGF- β -mediated Smad3 and Nfatc2 which is reported to repress osteoarthritis. We also reported the relationship between Irx3 and Wnt/ β -catenin signaling which is a major regulator of Prg4 expression. Irx3 increased not only the expression of Wnt4 and Wnt co-receptor Lgr6 but the transcriptional activity of Wnt signaling. These results indicate that Irx3 upregulates Prg4 expression by the interaction with TGF- β or Wnt/ β -catenin signaling. Thus, Irx3 might be one of the clinical target for the treatment of cartilage degradation.

研究分野：骨軟骨関連細胞の分化調節

キーワード：Irx3 Prg4 TGF- β Wnt 軟骨細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Prg4 は関節軟骨表層に発現する分泌因子で、関節軟骨表面の摩擦を低減し保護する作用をもつタンパク質として注目されてきた。近年、軟骨特異的 Prg4 過剰発現マウスでは、実験的変形性関節症を誘発させてもコントロールマウスと比較して症状の進行が軽減されることから、Prg4 は変形性関節症に対する治療薬となりえることが示唆された。さらに、fate-mapping 解析の結果、Prg4 発現細胞は、関節表層のみならず関節軟骨全層にわたり散見されたことから、Prg4 発現細胞は関節軟骨を構成する軟骨細胞の幹細胞として機能することが示唆された。以上のことから、軟骨疾患治療や未分化細胞による軟骨再生医療に対して Prg4 発現の誘導が有効であると期待されるが、その発現調節機構はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では Prg4 発現調節機構に関して、転写調節因子 Irx3 と他のシグナル伝達経路との関連を中心に組織学的、分子生物学的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

まず生後8週齢マウス大腿骨における Irx3 および Prg4 を免疫染色により検討した。次に、未分化間葉系様細胞株 C3H10T1/2 細胞に対する TGF- β 処理を Prg4 発現調節機構を解析する実験系として用いた。この実験系において、レトロウイルスを用いた Irx3、変形性関節症関連因子 Nfatc2、TGF- β シグナル伝達因子 Smad3 の過剰発現を行った後、real-time PCR による Prg4 発現解析によりこれらの因子の Prg4 発現調節における役割を検討した。さらに、これらの因子の複合体形成を免疫沈降法により検討した。また、これまでに Prg4 発現を誘導することが報告されている Wnt/ β -catenin(Wnt/bcat)シグナルに着目し、Irx3 により誘導される Wnt シグナル関連因子を real-time PCR により調べた。さらに、ウサギ初代軟骨細胞や軟骨細胞株 N1511 細胞において、Irx3 過剰発現や Wnt シグナル共受容体 Lgr6 に対する siRNA 発現による Wnt/bcat シグナル活性の変化を TOPFlash を用いたレポーターアッセイにより調べた。

4. 研究成果

(1) 免疫染色の結果、Prg4 および Irx3 発現は生後8週齢マウス大腿骨関節軟骨表層に認められた(図1)。

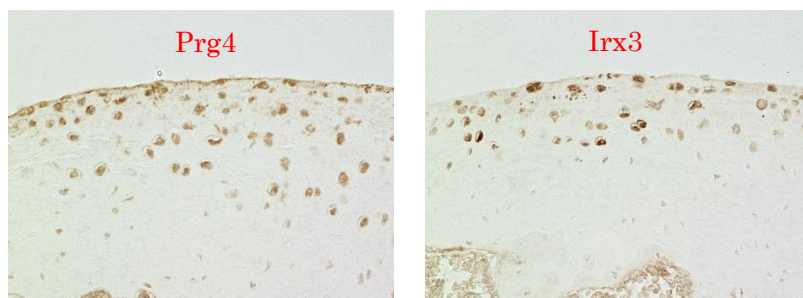


図1 Prg4 および Irx3 の関節軟骨における発現

(2) C3H10T1/2 細胞に Irx3, Nfatc2, および Wnt/bcat シグナルを活性化させる安定型 β -catenin(Δ bcat)を過剰発現させると、Nfatc2 と Δ bcat はコントロール(GFP)と比較して Prg4 発現を上昇させたが、Irx3 単独では上昇させなかった(図2A)。同細胞に TGF β 処理と共に Irx3, Irx3 と Nfatc2 を過剰発現させると TGF β による Prg4 発現誘導が相乗的に上昇した(図2B)。また、TGF β シグナル伝達因子のうち Smad3 は Prg4 発現を上昇させたが、Smad2 は上昇させなかった(図2C)。

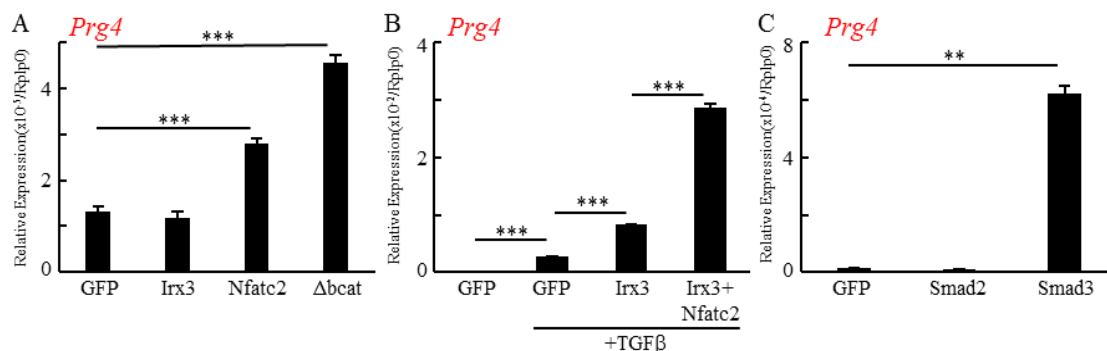


図2 Irx3, Nfatc2, Smad2 および Smad3 過剰発現による Prg4 発現の変化

(3) C3H10T1/2 細胞において、TGF β 処理と共に Irx3, Nfatc2 および Smad3 の機能阻害を行うと、いずれの処理においても TGF β による Prg4 発現誘導が抑制された(図3)

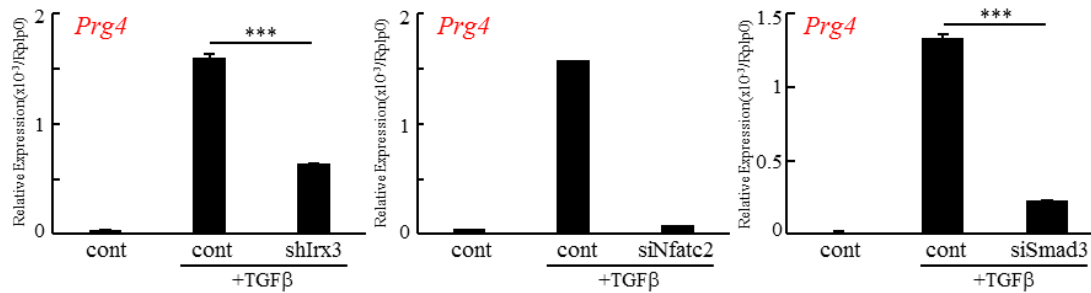


図3 Irx3, Nfatc2 および Smad3 機能阻害による Prg4 発現の変化

(4) 次に Irx3, Nfatc2 および Smad3 の相互作用について調べた。すなわち、C3H10T1/2 細胞に Irx3-V5, HA-Nfatc2 および Flag-Smad3 を発現させ、タグ抗体に対する免疫沈降実験を行ったところ、それぞれの分子間における複合体形成が観察された (図 4)。

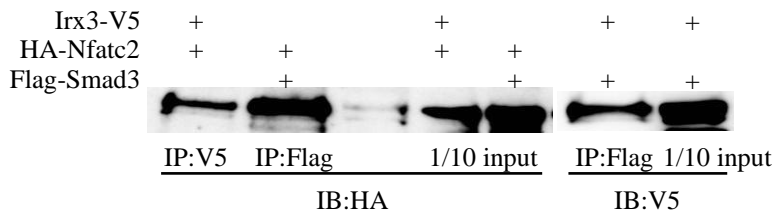
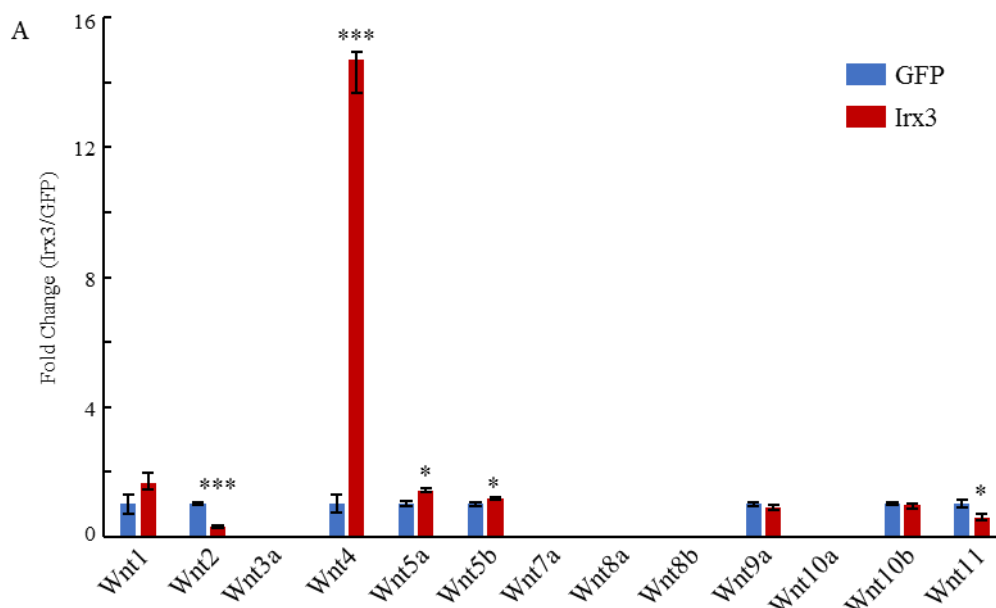


図4 Irx3, Nfatc2 および Smad3 の複合体形成

これらの結果から、TGFβシグナルは Smad3 を介して Prg4 を発現調節し、Irx3 は Nfatc2 や Smad3 と複合体を形成することによって、Prg4 発現を上昇させることが示された。

(5) Wnt/bcat シグナルは Prg4 誘導因子として過去に報告されており、また我々のデータからも Prg4 発現を上昇させることが示された (図 2A)。そこで Wnt/bcat シグナルと Irx3 の関係について調べた。同シグナルのリガンドである Wnt ファミリー遺伝子の発現について検索したところ、Irx3 は Wnt4, 5a, 5b 発現を亢進し、Wnt2, 11 発現を抑制したが、特に Wnt4 に対する発現上昇作用が顕著であった (図 5A)。また、同シグナルの共受容体 Lgr ファミリー遺伝子の発現を調べたところ、Irx3 は Lgr4, 5 発現を抑制し、Lgr6 発現を亢進させた (図 5B)。次に同シグナルレポーター遺伝子 TOPFlash を用いて、Irx3 の Wnt/bcat シグナル活性に対する作用を検討した。Irx3 は、ウサギ初代軟骨細胞において TOPFlash 活性を顕著に増大させ、この活性上昇は Wnt/bcat シグナル阻害因子 DNLEF との共発現により抑制された (図 5C)。また、軟骨細胞株 N1511 細胞において、安定型β-catenin による TOPFlash 活性上昇は、dominant-negative 型 Irx3 (DNIrx3) の共発現により有意に抑制された。さらに、TGFβによる Prg4 発現上昇は、siLgr6 処理により抑制された (図 5D)。



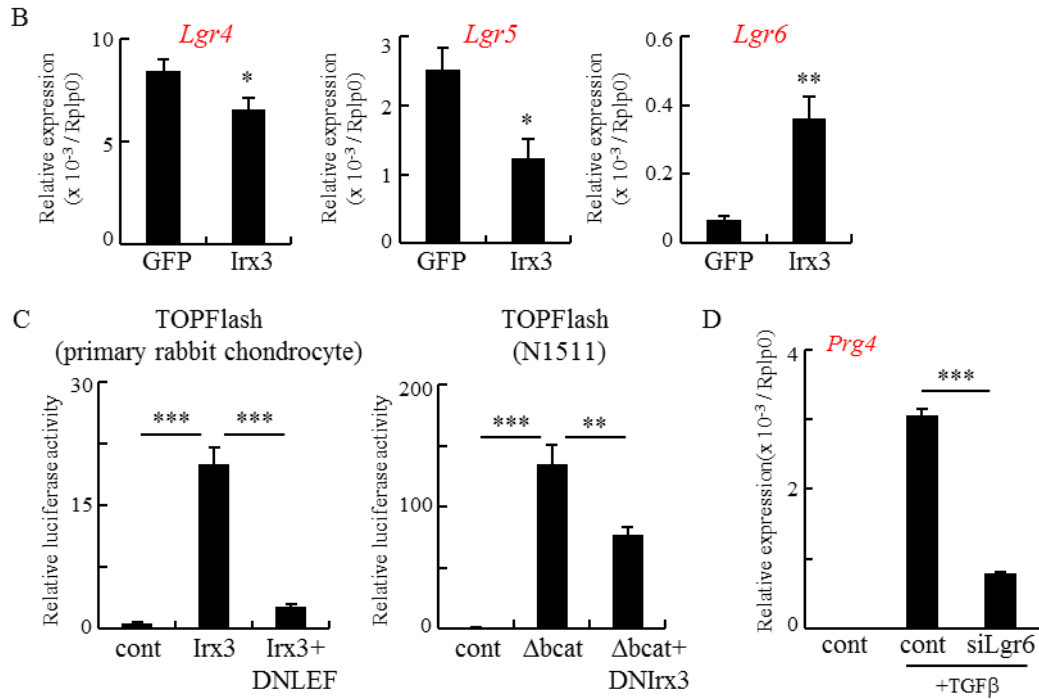


図5 Irx3 と Wnt/ β -catenin シグナルの関係

(6) 最後に生後8週齢マウス大腿骨における Irx3 および Lgr6 発現を連続切片において調べた。両遺伝子発現はかなり類似しており、肥大軟骨層 (矢印) および関節軟骨表層 (矢頭) に認められた(図6)。

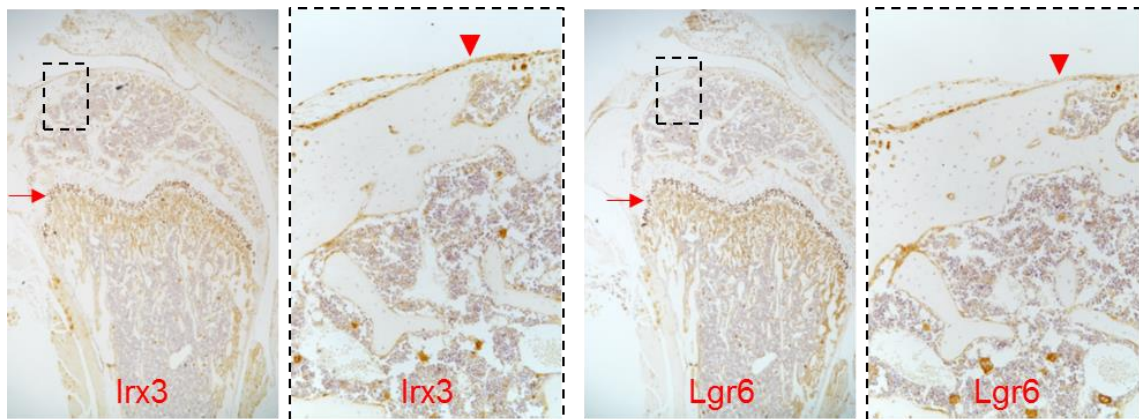


図6 8週齢マウス大腿骨における Irx3 および Lgr6 の発現

Wnt4 は関節軟骨に発現し、Wnt/ β -catenin シグナルを作動させ、関節軟骨形成に関係することが報告されている。この知見と(5)および(6)の研究結果を合わせると、Irx3 は Wnt4 や Lgr6 発現誘導によって Wnt/ β -catenin シグナルを活性化させることにより Prg4 発現を亢進させることが示唆された。

以上の結果から、関節軟骨に発現する Irx3 は TGF β や Wnt/ β -catenin シグナルとの相互作用により Prg4 発現を誘導することが判明し、関節軟骨変性疾患の進行を防ぐ治療標的となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamashita A, Tamamura Y, Morioka M, Karagiannis P, Shima N, Tsumaki N	4. 巻 38
2. 論文標題 Considerations in hiPSC-derived cartilage for articular cartilage repair.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflamm Regen.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-018-0075-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamamura Y, Katsube K, Mera H, Itokazu M, and Wakitani S	4. 巻 232
2. 論文標題 Irx3 and Bmp2 regulate mouse mesenchymal cell chondrogenic differentiation in both a Sox9-dependent and -independent manner	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 3317-3336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.25776.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihiro Tamamura, Kei Sakamoto, Ken-Ichi Katsube, Akira Yamaguchi	4. 巻 518
2. 論文標題 Notch Signaling Is Involved in Fgf23 Upregulation in Osteocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 233-238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.08.038.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木戸玲子、玉村禎宏、下北英輔、鶴尾吉宏
2. 発表標題 水浸ストレス負荷ラットにおける臍島内微小循環系による血糖調節機序に関する免疫組織学的解析：交感神経系の役割について
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神原俊一郎、目良恒、井石智也、玉村禎宏、脇谷滋之、吉矢晋一
2. 発表標題 関節軟骨におけるMultilineage-differentiating stress enduring cells (Muse細胞) の局在についての検討
3. 学会等名 第30回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	脇谷 滋之 (WAKITANI Sigeyuki) (70243243)	武庫川女子大学・健康スポーツ科学部・教授 (34517)	