

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 7 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440152

研究課題名(和文)軟骨細胞におけるウロテンシンとそのアナログ(URP)の新しい機能の解明

研究課題名(英文)The elucidation of novel function of urotensin II and URP in the chondrocytes

研究代表者

今野 紀文(KONNO, NORIFUMI)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・講師

研究者番号：50507051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、軟骨細胞におけるU₂-UTRの生理機能とその作用機序を明らかにし、さらには指趾の発生や再生、軟骨疾患との関連性を探ることを目標として行った。その結果、軟骨のUTR発現レベルは軟骨形成初期に高く、成熟軟骨では低いことが解った。培養下の軟骨組織へのU₂処理により軟骨基質であるⅡ型コラーゲンとTGF- β 1の遺伝子発現が有意に増加した。肢切断後のスパイク(軟骨組織)形成がUTRアンタゴニストの処理により抑制された。以上の結果から、U₂-UTR系は軟骨組織の形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the relation between U₂-UTR system and chondrogenesis using the cartilage tissues of *Xenopus laevis*, aim to clear the function of U₂-UTR system in the chondrocytes. As the results, we found the levels of UTR mRNA expression in the early process of chondrogenesis is significantly higher than that in the mature cartilage tissue. The treatment of U₂ for the isolated cartilage tissue significantly increased the gene expression of the type2 collagen and TGF- β 1. Furthermore, the treatment of UTR antagonist (urantide) inhibited the formation of the spike cartilage tissue after amputation of the froglet limb. These results suggest that the U₂-UTR system is involved in the early process of the chondrogenesis.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：ウロテンシン URP 軟骨 アフリカツメガエル

1. 研究開始当初の背景

ウロテンシン (U) は、ハゼの尾部下垂体から同定された血管・平滑筋収縮に作用するペプチドホルモンである。1999年に、アミノ酸 11 個からなるヒト U が orphan receptor GPR14 (後に UT 受容体と改名) の内因性リガンドとして発見され、最強の心血管収縮物質であることが示された。最近、U と構造的に類似した U-related peptide (URP) が発見され、現在では U /URP が心血管疾患や慢性腎不全、糖尿病と関連し、循環器学や創薬領域において注目を集めつつある。

最近、両生類での U /URP の機能を探る研究において、UT 受容体が肺を構成する軟骨組織や、胸部軟骨および指関節軟骨に発現していることを新規に見出した。さらに、ラットの肋軟骨や関節軟骨、気管軟骨でも UT 受容体の発現を確認した。これまで、U /URP の作用部位が脊椎動物の軟骨組織に存在するという報告は無く、我々が見出した軟骨細胞での知見は U /URP の新しい機能を示唆する重要な発見となった。

指や膝の関節部分は、2 型コラーゲンやプロテオグリカンといった細胞外基質を主成分とした硝子軟骨で構成されている。硝子軟骨は個体発生期に骨格の鋳型として形成され、生後は成長軟骨として身長を伸ばし、関節軟骨として運動機能を担っている。しかしながら、軟骨は血管や神経が存在しないために修復能に乏しく、加齢による変性や外的損傷によって様々な軟骨疾患 (変形性関節症や軟骨無形成症) の発症につながる事が知られている。また、脊椎動物の指肢の発生や再生においても、軟骨原基が骨の鋳型となり、軟骨細胞の増殖と肥大化・石灰化を経て、骨組織に置換される (軟骨内骨化) など、軟骨機能の調節は骨格形成の根幹をなす重要な機構である。さらに、最近、U は心臓繊維芽細胞でのコラーゲン合成を促進することが軟骨での UT 受容体の発現が報告され、U は細胞外基質の産生に関与していることが示唆されている (Dai et al., 2007, 2011)。このような学術的背景から、“U /URP が軟骨細胞に発現する UT 受容体を介して軟骨細胞の機能 (細胞外基質の産生、成長因子およびサイトカインの産生) の制御に重要な役割を担っている”と考えている。したがって、本申請研究では、軟骨細胞における U /URP の生理機能とその作用機序を明らかにし、さらには指肢の発生や再生、軟骨疾患との関連性を探ることを目標としている。

2. 研究の目的

上述の背景とこれまでの研究成果をもとに、本研究は、U /URP-UT 受容体システムによる軟骨機能の制御に関わる分子機構を明らかにし、それらの知見をもとに脊椎動物の指肢の発生や再生における軟骨形成の仕組みや、軟骨疾患の発症機序といった応用研

究への展開を視野に入れて研究を進める。研究期間内に以下の 2 項目について、分子生理学的アプローチにより研究を進める。

1) 両生類および哺乳類の軟骨細胞における U /URP の機能解析

先行研究において、UT 受容体が軟骨細胞に発現したことから、申請者は U /URP が軟骨細胞の何らかの機能制御に作用していると考えている。そこで、まず両生類あるいはラットの軟骨細胞を単離・培養して、軟骨細胞への U /URP の添加が細胞外基質 (2 型コラーゲン、プロテオグリカン) の遺伝子やタンパク質の発現に及ぼす影響を解析する。また、軟骨細胞自身が産生する成長・増殖因子 (TGF- β 、bFGF、IGF-I) や他の液性因子 (副甲状腺ホルモン関連タンパク質: PTHrP、コンドロモジュリン) の遺伝子発現に U /URP-UT 受容体に関与しているか否かを、UT 受容体のアンタゴニスト (urantide) や siRNA を用いて検証する。さらに、これらの遺伝子の発現制御に関わる細胞内シグナル経路を、各経路を構成する因子の阻害剤を用いて明らかにする。

2) U /URP-UT 受容体システムが両生類指肢の発生・再生における軟骨形成や、軟骨疾患に関連しているか否かの検証

脊椎動物の個体発生において、軟骨の形成は骨格形成の基盤となるイベントである。そこで、U /URP-UT 受容体システムが両生類の指肢の発生や再生における軟骨形成に関与するか否かを、指肢の再生が可能な両生類 (ツメガエル幼生やイモリ) を用いて検証する。まず、指肢の発生・再生過程において、軟骨細胞での UT 受容体の時間・空間的な発現動態を遺伝子およびタンパク質レベルで解析するとともに、UT 受容体のノックダウンによる表現型への影響についても評価する。また、UT 受容体の発現と加齢や軟骨疾患との関連性を探るため、老齢ラット (マウス) や骨疾患モデルにおける U /URP および UT 受容体の発現動態を評価する。以上の研究から、軟骨細胞における U /URP の新たな機能とその作用機序を明らかにし、その成果を哺乳類研究にフィードバックすることで、軟骨形成機構の解明や軟骨疾患研究への基盤を構築する。

3. 研究の方法

1. 両生類および哺乳類の軟骨細胞における U /URP の機能解析

ツメガエルの胸部軟骨およびラットの肋軟骨からコラーゲナーゼ処理によって硝子軟骨細胞を単離し、培養下の軟骨細胞に U /URP を処理することでその直接作用を調べる。申請者は、U /URP が軟骨基質 (2 型コラーゲンやプロテオグリカン) や種々の成長・増殖因子 (TGF- β 、bFGF、IGF-I、PTHrP、コンドロモジュリン) の産生に作用すると考えてい

るため、これらの遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により解析する。

2. U /URP-UT 受容体システムが両生類指肢の発生・再生における軟骨形成や、軟骨疾患に関連しているか否かの検証

指肢の発生・再生研究のモデルであるツメガエルやイモリを用いて、軟骨形成における U /URP-UT 受容体システムの関与について調べる。まず、指肢の発生・再生における軟骨形成を、2 型コラーゲンを指標として組織学的に捉えるとともに、U /URP や UT 受容体の発現有無と局在を分子生物学的、免疫組織化学的に調べる。また、これらの発現がどのような成熟段階の軟骨細胞に見られるかをマーカーとの共局在を調べることで把握する。さらに、個体レベルで UT 受容体の翻訳を阻害する vivo-モルフォリンの投与や、UT 受容体アンタゴニストで処理した際の指肢形成への影響を形態学的、分子生物学的手法により評価する。

4. 研究成果

(a)成長過程の軟骨組織における UTR の発現変化

一般的に、軟骨細胞は増殖しながら周囲に型コラーゲンやアグリカンなどの細胞外基質を産生・分泌して肥大化し、やがて基質産生能が低下した肥大軟骨細胞へと分化する。軟骨組織における U -UTR 系の機能を推定するため、異なる成長段階のアフリカツメガエル(変態直後, 変態4ヶ月後, 成熟個体)の胸骨における UTR 遺伝子の発現変化を解析した。その結果、胸骨における UTR 発現レベルは変態直後の幼若個体で高く、成長に伴って低下した。また、各成長段階の胸骨組織切片において、アルシアンブルー染色と UTR に対する蛍光免疫染色を行ったところ、変態直後の胸骨では軟骨細胞周囲に軟骨基質がほとんど観察されなかったのに対して、変態4ヶ月後と成熟個体の胸骨では細胞周囲に多量の軟骨基質の存在が観察された。したがって、U -UTR 系は軟骨組織の発達過程において何らかの機能に関連している可能性が考えられた。

(b)U -UTR 系が軟骨基質形成に関わる遺伝子発現に及ぼす影響

軟骨細胞における U -UTR 系の機能を探るため、胸骨組織を用いた組織培養によって、U が軟骨基質形成に関わる遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。アフリカツメガエルの幼若個体から単離した胸骨を、12 時間の前培養後に 10^{-8} M U を添加した培養液に浸漬して 24 時間処理した。その後、定量 PCR 法を用いて、Col2a1 遺伝子と同遺伝子の発現を促進させるトランスフォーミング増殖因子(TGF-1)の発現を解析し、対照群と比較した。その結果、U 添加群における両遺伝子の発現は対照群に比べて有意に増加し、その作用は

UTR アンタゴニストである Urantide (UR) の前処理によって減弱した。したがって、軟骨細胞において、U -UTR 系は TGF-1 や軟骨基質を構成する 2 型コラーゲンの発現に関与していることが示唆された。また、U -UTR 系による軟骨機能を解析するためにマウス軟骨培養細胞(ATDC5)を用いて実験を行っていたが、作成した UTR 安定発現細胞株は U による細胞内応答を示さなかったため、ATDC5 には UTR を介したシグナル伝達系が備わっていないか、あるいは細胞の形質変化により消失した可能性が考えられた。そこで平成 27 年度からゲノム編集技術 TALEN により U および UTR 遺伝子に変異を導入したノックアウト個体の作出に取り組んだ。現在、数塩基が欠失したノックアウト個体を得ており、系統化のために交配を繰り返している。

(c)スパイク形成に及ぼす UTR アンタゴニストの影響

変態後のアフリカツメガエルの肢を切断すると、軟骨とそれを覆う皮膚からなる釘状の構造(スパイク)が形成される。そこで、生体内において、軟骨形成に対する U -UTR 系の関与を調べるため、幼若個体の前肢を切断後、切断部付近に UR(100 pmol/g BW)を 1 日 1 回投与し、saline を投与した対照群とのスパイク形成過程を比較した。その結果、UR 投与個体のスパイク形成は対照群に比べて遅延した。また、切断1ヶ月後のスパイク切片における軟骨部位の伸長を比較したところ、UR 投与群の軟骨の伸長は対照群に比べて有意に短かった。したがって、アフリカツメガエルの生体内においても、U -UTR 系は軟骨組織の形成に関与している可能性が示唆された。

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 7 件)

1. Kakumura K., Takabe S., Takagi W., Hasegawa K., Konno N., Bell J., Toop T., Donald J., Kaneko T., Hyodo S. Morphological and molecular investigations of the holocephalan elephant fish nephron: the existence of a countercurrent-like configuration and two separate diluting segments in the distal tubule. Cell and Tissue Research, 362: 677-688. 2015. (査読有) doi: 10.1007/s00441-015-2234-4.

2. Tomiyama S., Nakamachi T., Uchiyama M., Matsuda K., Konno N. Urotensin II upregulates migration and cytokine gene expression in leukocytes of the African clawed frog, Xenopus laevis. General and Comparative Endocrinology,

216: 54-63, 2015. (査読有) doi:
10.1016/j.ygcen.2015.04.009.

3. Uchiyama M., Konno N., Shibuya S.,
Nogami S.
Cloning and expression of the epithelial
sodium channel and its role in
osmoregulation of aquatic and estivating
African lungfish *Protopterus annectens*.
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol,
183: 1-8, 2015. (査読有) doi:
10.1016/j.cbpa.2014.12.028.

4. Shimizu S., Nakamachi T., Konno N.,
Matsuda K.
Orexin A enhances food intake in bullfrog
larvae. *Peptides*, 59: 79-82, 2014. (査
読有)
doi:10.1016/j.peptides.2014.07.013.

5. Nakamachi T., Shibata H., Sakashita A.,
Iinuma N., Wada K., Konno N., Matsuda K.
Orexin A enhances locomotor activity and
induces anxiogenic-like action in the
goldfish, *Carassius auratus*. *Hormones and
Behavior*, 66: 317-323, 2014. (査読有)
doi: 10.1016/j.yhbeh.2014.06.004.

6. Kaiya H., Konno N., Kangawa K., Uchiyama
M., Miyazato M.
Identification, tissue distribution and
functional characterization of the
ghrelin receptor in West African lungfish,
Protopterus annectens. *General and
Comparative Endocrinology*, 209: 106-117,
2014. (査読有) doi:
10.1016/j.ygcen.2014.07.021.

7. Konno N., Fujii Y., Imae H., Kaiya H.,
Mukuda T., Miyazato M., Matsuda K.,
Uchiyama M.
Urotensin II receptor (UTR) exists in
hyaline chondrocytes: a study of
peripheral distribution of UTR in the
African clawed frog, *Xenopus laevis*.
General and Comparative Endocrinology,
185C: 44-56, 2013. (査読有) doi:
10.1016/j.ygcen.2013.01.015.

[学会発表](計 29 件)

1. 今野紀文、島崎祐希、中町智哉、松田恒
平
ベタの攻撃行動と繁殖行動は脳内性ホルモ
ンレベルにより制御される
平成 27 年度日本動物学会中部支部大会、2015
年 11 月 28 日 - 29 日、三重大学総合研究棟

2. 今野紀文、海谷啓之
非哺乳類を用いた比較研究からウロテンシ
ンの新機能を探る

第 6 回ペプチド・ホルモン研究会、2015 年
10 月 16 日 - 17 日、金沢大学臨海実験施設

3. 内山 実、小宮山牧子、上田雪絵、清水
則雄、今野紀文
水陸両生魚ヨダレカケの陸生適応機構
日本動物学会第 86 回大会、2015 年 9 月 17 日
- 19 日、新潟コンベンションセンター 朱鷺
メッセ

4. 熊谷知泰、柴田治希、坂下 敦、今野紀
文、中町智哉、松田恒平
キンギョとゼブラフィッシュにおける Y 字迷
路による学習試験法の確率
日本動物学会第 86 回大会、2015 年 9 月 17 日
- 19 日、新潟コンベンションセンター 朱鷺
メッセ

5. 南 和希、浜口晃吉、今野紀文、中町智
哉、小林牧人、松田恒平
キンギョにおける黒色素胞に及ぼすソマト
ラクチンの影響
日本動物学会第 86 回大会、2015 年 9 月 17 日
- 19 日、新潟コンベンションセンター 朱鷺
メッセ

6. 今野紀文、島崎祐希、中町智哉、松田恒
平
闘魚ベタの攻撃行動は脳内エストラジオー
ルレベルの増加により減弱する
日本動物学会第 86 回大会、2015 年 9 月 17 日
- 19 日、新潟コンベンションセンター 朱鷺
メッセ

7. 山口陽子、海谷啓之、今野紀文、宮里幹
也、内山 実、兵藤 晋
下垂体後葉ホルモン受容体の分子進化
日本下垂体研究会 第 30 回学術集会、2015
年 8 月 5 日 - 10 日、黒部市宇奈月国際会館セ
レネ

8. 飯沼直人、中町智哉、今野紀文、松田恒
平
キンギョの情動行動に及ぼすコレシストキ
ニン脳内投与の影響
日本下垂体研究会 第 30 回学術集会、2015
年 8 月 5 日 - 10 日、黒部市宇奈月国際会館セ
レネ

9. 南 和希、浜口晃吉、東 森生、小林牧人、
今野紀文、中町智哉、松田恒平
キンギョ黒色素胞に及ぼす組換えキンギョ
ソマトラクチン (SL) の影響
日本下垂体研究会 第 30 回学術集会、2015
年 8 月 5 日 - 10 日、黒部市宇奈月国際会館セ
レネ

10. 今野紀文
抗利尿ホルモンの機能からみた脊椎動物の
進化

日本下垂体研究会 第 30 回学術集会、2015 年 8 月 5 日 - 10 日、黒部市宇奈月国際会館セレネ

11. 清水駿介、中町智哉、今野紀文、松田恒平

ウシガエル幼生におけるオレキシン A の摂食亢進作用

平成 26 年度日本動物学会中部支部大会、2014 年 11 月 23 日、能登勤労者プラザ

12. 今野紀文、今江春香、内山 実、中町智哉、松田恒平

ウロテンシン による軟骨基質形成の可能性

平成 26 年度日本動物学会中部支部大会、2014 年 11 月 23 日、能登勤労者プラザ

13. 海谷啓之、今野紀文、内山 実、寒川賢治、宮里幹也

アフリカ産肺魚のグレリン受容体

第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日-13 日、東北大学

14. 浜口晃吉、東 森生、今野紀文、中町智哉、小林牧人、松田恒平

キンギョ下垂体のソマトラクチン産生細胞は背景色に应答する

第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日-13 日、東北大学

15. 今野紀文、小池俊貴、岩田恵理、内山 実、松田恒平

闘魚ベタの攻撃行動と脳内バソトシン発現との関連

第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日-13 日、東北大学

16. 松田恒平、西口 諒、横堀絵里、中町智哉、今野紀文

神経ペプチドによるゼブラフィッシュの摂食行動の調節

第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日-13 日、東北大学

17. 飯沼直人、柴田治希、今野紀文、中町智哉、松田恒平

キンギョの精神運動活性に及ぼすコレシストキニン脳内投与の影響

第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日-13 日、東北大学

18. 富山詩織、内山 実、中町智哉、松田恒平、今野紀文

ウロテンシン はアフリカツメガエルにおいて白血球遊走とサイトカイン合成に關与する

第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日-13 日、東北大学

19. Eri Iwata, Tasuku Yoshida, Koutaro Kaneko, Norifumi Konno, Koji Masuda, Kataaki Okubo

Female partner preference affects male sexual maturation in monogamous teleost false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*).

The International Congress of Neuroendocrinology 2014 including the 18th Annual Meeting of the Society for Behavioural Neuroendocrinology, 17-20 August, 2014, Hilton Sydney, Australia

20. 海谷啓之、今野紀文、内山 実、寒川賢治、宮里幹也

アフリカ産肺魚のグレリン受容体

第 11 回 GPCR 研究会、2014 年 5 月 9 日-10 日、日本科学未来館

21. 今野紀文、花立 守、加藤 明、兵藤 晋、内山 実

魚類のバソトシン V2a 受容体は腎臓においていかなる機能をもつか？

第 24 回バソプレシン研究会、2014 年 1 月 11 日、慶応義塾大学病院

22. 岩田恵理、今野紀文、飯村竜也

カクレマノミの攻撃性と AVT 受容体に対するエストラジオールの影響

第 38 回日本比較内分泌学会、2013 年 10 月 24 日 - 26 日、宮崎市民プラザ

23. 小池俊貴、岩田恵理、松田恒平、内山 実、今野紀文

闘魚（ベタ）の攻撃行動と神経葉ホルモン発現との相関

第 38 回日本比較内分泌学会、2013 年 10 月 24 日 - 26 日、宮崎市民プラザ

24. 富山詩織、松田恒平、内山 実、今野紀文

アフリカツメガエルにおいてウロテンシンとそのアナログ URP は白血球遊走に働く

第 84 回日本動物学会、2013 年 9 月 26 日 - 9 月 28 日、岡山大学

25. 垣内祐貴、丸山剛史、今野紀文、Narin Preya, Chaitip Wanichanon、内山 実

カニクイガエル幼生および成体の尿素による汽水環境適応

第 84 回日本動物学会、2013 年 9 月 26 日 - 9 月 28 日、岡山大学

26. 内山 実、金田篤幸、宇都宮壮健、野上智史、今野紀文

グリーンアノールの摂食・節水による窒素代謝と尿酸輸送体

第 84 回日本動物学会、2013 年 9 月 26 日 - 9 月 28 日、岡山大学

27. 上田雪絵、清水則雄、今野紀文、内山 実
岩礁棲両生魚ヨダレカケの環境変動時にお
ける体液酸塩基平衡
第 84 回日本動物学会、2013 年 9 月 26 日 - 9
月 28 日、岡山大学

(2)研究分担者
()

研究者番号 :

28. Norifumi Konno
How did bony fish adapt from water to land
and from sweater to freshwater?
第 35 回日本比較生理生化学会 3 学会合同シ
ンポジウム (招待講演) 2013 年 7 月 14 日、
兵庫県立大学 (招待講演)

(3)連携研究者
()

研究者番号 :

29. 今野 紀文
硬骨魚類の腎臓におけるバソトシンの作用
と環境適応 : 肺魚とメダカの違いについて
東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会
「海洋生物のさまざまな適応戦略」
2013 年 6 月 21 日-22 日、東京大学大気海洋
研究所 (柏キャンパス) (招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

今野 紀文 (KONNO NORIFUMI)
富山大学大学院理工学研究部 (理学)・講
師
研究者番号 : 50507051