

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21186

研究課題名(和文) 軟骨内骨化におけるレチノイン酸シグナルの機能解析

研究課題名(英文) The role of retinoic acid signaling in endochondral ossification

研究代表者

内部 健太(Uchibe, Kenta)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20584618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、レチノイン酸シグナルの軟骨内骨化における役割の解明を目的として、細胞レベルあるいは実験動物レベルでの検討を行った。結果、軟骨細胞で主な役割を果たすレチノイン酸受容体 RAR を活性化させることで、軟骨細胞の増殖や分化が阻害されることが判明した。また、逆に RAR を抑制することで軟骨細胞の成熟が進み、動物レベルでは軟骨内骨化が促進され、骨形成の増進が認められた。更にこの過程では、多くの分子の関与が確認された。

研究成果の概要(英文)：We performed in vitro and in vivo experiments to understand the role of retinoic acid signaling in endochondral ossification. Stimulation of RAR signaling inhibited chondrocyte differentiation. Pharmacological inhibition of RAR stimulated endochondral ossification both in vitro and in vivo, resulting in enhanced bone formation. Variety of signaling molecules are found to be involved in this process.

研究分野：解剖学

キーワード：レチノイン酸 軟骨内骨化

1. 研究開始当初の背景

我々の体の成長は、その大部分を軟骨内骨化が担っている。すなわち、長管骨端部に形成される成長板において軟骨細胞が増殖と分化を繰り返し、これにより形成された軟骨組織が骨組織に置き換わることで骨格の成長が達成される。骨折などの治癒においても同様に、軟骨内骨化が主要な治癒メカニズムであり基本的な分子メカニズムも共通している。

レチノイン酸 (RA) はビタミン A の活性型代謝産物であり、生体においてはレチノイン酸レセプター、および (RAR、RAR、RAR) を介して多くの生物学的現象を制御することが知られている。RAR はレチノイド X 受容体 (RXR) とヘテロダイマーを形成し、特定の DNA 配列に結合することで標的遺伝子の発現を制御する。また RAR は、リガンド存在下では転写アクティベーターとして働く一方、リガンド非存在下においてはコファクターと共に転写リプレッサーとして機能することが知られており、各レセプターサブタイプの発現とリガンドの分布パターンによって、その多彩かつ緻密な機能制御を行っている。骨格形成においては、RAR のリガンド非依存的機能、すなわち転写リプレッサーとしての RAR が軟骨細胞分化に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。しかし、古くより RA は過剰摂取のみならずその欠乏によっても骨格形成に異常をきたす事が知られており、リガンドが結合した状態での RAR も何かしらの機能を有しているものと考えられてきた。近年、RA の代謝酵素である Cyp26 の遺伝子欠損マウスにおいて骨格に異常が生じることが報告され、骨格系組織においても他と同様に、リガンドである RA の結合により発揮される機能、すなわち転写活性因子としての RAR が正常な骨格形成過程の制御に重要である事が示唆された。しかし、RAR の転写アクティベーターとしての機能は未だ不明で、現状では軟骨内骨化とレチノイン酸シグナルの関係性について包括的な理解には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、軟骨内骨化における RAR の機能を包括的に理解する事を最終的な目的とした。このため、現在明らかにされていない転写アクティベーターとしての役割の解明を中心とした研究に取り組んだ。更に、得られた知見から疾患の治療法開発への発展の可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 軟骨内骨化における RAR の転写アクティベーターとしての機能解析

これまでに明らかとなっている転写リプレッサーとしての機能に加え、リガンド存在下での RAR の機能を解析した。すなわち、初代培養のマウス軟骨細胞を用いて、RAR

アゴニスト添加による影響を経時的に解析した。解析方法としては、細胞形態の変化や増殖活性の観察等に加え、各分化ステージの軟骨分化マーカー遺伝子の発現を定量 PCR によって評価した。また、2 週齢マウスに RAR アゴニストを投与し、その後の成長に対する影響を解析した。解析項目は身長や体重の変化等の肉眼的評価に加え、長管骨成長板における軟骨細胞の増殖や、軟骨細胞マーカー遺伝子の発現パターン解析を含む、組織学的評価を行った。さらに、成長板直下の一次海綿骨の形成量についてマイクロ CT および組織学的に評価を行った。いずれの実験においても、アゴニストの非特異的作用、すなわちオフターゲット効果による影響を除外するため、RAR 遺伝子欠損マウスおよびそこから分離した軟骨細胞を用いて同時に実験を行った。

(2) 軟骨細胞における RAR によって制御される遺伝子の探索

リガンドが供給されることで、RAR は核内で RXR とともに標的配列である RARE に結合し多くの遺伝子の発現を制御する。この他にも、ノンジェノミックな機序により幅広い因子の活性に影響をもたらすことが予想される。そしてこれら全ての影響を総合した結果が、実際の生体内での細胞の動向に発現する。従って、RAR シグナルのスイッチがオンとなった後に引き起こされる、あらゆる変化を網羅的に把握する必要がある。そこで、上記実験 1 と同様に軟骨細胞を野生型および RAR 欠損マウスから採取し、RAR アゴニストもしくはコントロールとして溶媒のみを添加、RNA を回収した。そして次世代シーケンサーにより発現している RNA を読み込むことで、網羅的にかつ定量性を持って変動因子の探索を行った。

(3) 骨再生法への応用の検討

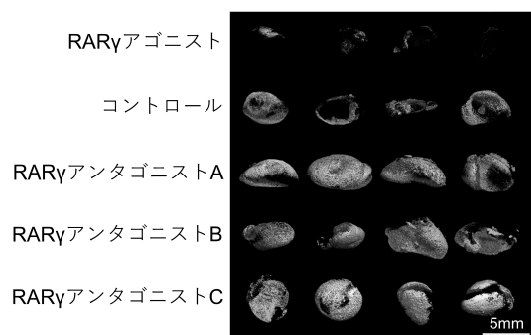
本研究において、リガンドと結合した RAR のアクティベーター機能が軟骨内骨化に対して積極的な働きを有する事が明らかとなった為、内在性リガンドに拮抗して作用するアンタゴニストは骨格系疾患に対して有望な治療薬となり得る。この可能性を検証するため、マウス異所性骨化モデルおよび骨折治癒モデルを用いて RAR アンタゴニスト投与の効果を検証した。異所性骨化モデルでは、足場となるマトリゲルとともにリコンビナント BMP-2 タンパクを皮下移植することで簡便かつ高い再現性を持って軟骨内骨化を観察できるため、この過程における薬剤の効果を定量的に評価するためには最適なモデルといえる。さらに、より臨床に近い骨折モデルを用いることで実際の病的状態からの治癒に対する効果を検証できる。アンタゴニストの投与経路としては、臨床においても簡便に用いることのできる経口投与を採用した。この際、全身的な影響を評価するため血液検

査も行い、主要臓器における副作用の有無についても確認した。

4. 研究成果

RAR の成長版における発現を組織学的に確認した結果、成長板軟骨の幅広い範囲で発現が確認され、特に肥大軟骨層で強いシグナルを検出した。マウス軟骨細胞を用いた実験では、RAR アゴニスト処理により細胞形態の変化が認められ、Sox9 や Aggrecan などの初期軟骨分化マーカーの発現を抑制し、Col10 や MMP13 などの成熟期マーカーの発現を亢進することが明らかとなった。次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンスにおいても同様に、MMPs 等のマトリックスプロテアーゼの発現の亢進が確認された。マウスに同アゴニストを投与すると、成長が阻害され成長板の構造に大きく変化が見られた。また、この影響は カテニン欠損マウスでは軽減される事が確認された。RAR および RAR アゴニストではこれらの影響はほとんど見られなかった。以上のように、成長板軟骨において、RAR は軟骨マトリックス関連因子の発現を抑制し、分解酵素の発現を亢進することが明らかとなった。同時に石灰化関連因子の発現も亢進させる事から、軟骨細胞成熟の促進および骨への置換の過程において重要な役割を担っていることが示唆された。また、メカニズムのひとつとして Wnt- カテニンシグナルを介していることが示唆された。

次に、RAR シグナルの阻害による軟骨内骨化の促進作用について検討を行った。マウス脛骨に作製した骨欠損の治癒モデルでは、野生型マウスに比較して RAR ノックアウトマウスでは骨の治癒が促進している事が確認された。マトリゲルと BMP-2 を用いた異所性骨化の実験においては、RAR アンタゴニスト投与群において有意に軟骨形成およびその後起こる骨形成が促進されていた(図)。また、培養細胞にアンタゴニストを投与した実験においては、アンタゴニスト投与によって BMP シグナルの促進が生じていた。以上のことより、RAR を阻害することで軟骨形成が促進され、それに伴い軟骨内骨化による骨形成も増進される事が明らかとなった。また、この影響の少なくとも一部は BMP シグナルを介していることが分かった。



以上の結果をまとめると、リガンド結合に

より RAR は軟骨形成に抑制的な機能を有していることが明らかとなった。そしてこの作用を利用し、RAR を阻害することで軟骨内骨化を促進させることが可能であると判断した。今後は、より詳細なメカニズムを検証するとともに、RAR アンタゴニストの臨床応用への可能性を更に追求する必要がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Masatake Matusoka, Kenta Uchibe, Ivan Alferiev, Joshua M. Abzug, Min Liu, Motomi Enomoto-Iwamoto, Michael Chorny, Masahiro Iwamoto, Drug-Based Growth Restriction of the Targeted Bone by Synthetic Retinoid Nanoparticles, ORS 2018 Annual Meeting, 2018年3月10日、11日、New Orleans(USA)

内部健太、池亀美華、岡村裕彦、RAR シグナリングは成長板軟骨細胞分化・成熟を制御する、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017年9月17日、松本歯科大学(長野県塩尻市)

Masatake Matusoka, Kenta Uchibe, Ivan Alferiev, Joshua M. Abzug, Min Liu, Motomi Enomoto-Iwamoto, Michael Chorny, Masahiro Iwamoto, Controlling Targeted Bone Growth by Retinoic Acid Receptor Gamma Agonist, ASBMR 2017 Annual Meeting, 2017年9月9日、Denver(USA)

〔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

内部 健太 (UCHIBE, Kenta)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20584618

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()