

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006-2009

課題番号：18209047

研究課題名（和文）軟骨内骨化を統合的に制御する分子ネットワークの解明

研究課題名（英文） Research of the Molecular Network Regulating Endochondral Ossification

研究代表者

川口 浩（KAWAGUCHI HIROSHI）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40282660

研究成果の概要（和文）：軟骨細胞の発生分化に必須である転写因子 SOX ファミリーのうち、SOX6 を強力に誘導する分子として転写因子 p63 を同定した。本研究では p63 があらゆる分化段階の軟骨細胞に発現し、p63 をノックアウトすると四肢の軟骨細胞の発生分化が著しく抑制されること、軟骨の初期分化や軟骨基質産生、増殖、骨組織への置換などあらゆるステップに重要であることなどを、マウスや培養細胞を用いた解析によって明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We identified a transcription factor p63 as the potent inducer of SOX6, a member of SOX family essential for chondrocyte generation and differentiation. In this study, we revealed that p63 was extensively expressed in chondrocytes, that p63 was indispensable for development of limb cartilage, and that p63 played important roles in every differentiation stages of chondrocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
18 年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
19 年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
20 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
21 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
総計	37,800,000	11,340,000	49,140,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化に伴って、変形性関節症に代表される運動器疾患への対策は焦眉の課題となってきた。しかしながら、変性した関節軟骨を修復・再生する技術は確立されておらず、鎮痛剤や関節内注射、更には人工関節手術など、きわめて姑息的あるいは侵襲的な

治療に頼るしかないのが現状である。自家培養軟骨細胞や骨髄由来間葉系幹細胞を用いた軟骨再生治療が試みられているが、健常組織と同レベルの基質産生能力をもつ軟骨細胞を分化誘導・維持することは困難で、実用化されるには程遠い。

申請者らは従来より、変形性関節症の画期的治療法の実現を目指して、骨格の発生・分化

における軟骨形成のメカニズムを分子レベルで解明すべく基礎研究を続けてきた。その結果、軟骨形成に必須の転写因子である SOX ファミリーの強力な誘導因子が、p53 関連分子でアポトーシスや癌化抑制に関与する転写因子 p63 であることを見出した

2. 研究の目的

本研究は軟骨における p63 の役割を解明するため、具体的に以下のサブテーマについて解析を行った。

(1) 軟骨内骨化における p63 シグナルネットワークの解明

① 既知の軟骨内骨化シグナルにおける p63 の関与の検討

② p63 の発現調節機構の解明

③ p63 の作用調節分子および下流分子の検索

(2) 変形性関節症における p63 シグナルの関与の検討

3. 研究の方法

(1) 軟骨内骨化における p63 シグナルネットワークの解明 においては、遺伝子改変マウスと培養細胞をベースに、正常状態、あるいは p63 の強制発現系、発現抑制系などにおける mRNA やタンパクの発現解析を行った。また p63 タンパクに詳細な mutation を加えて、p63 を修飾するシグナル群の解析も行った。下流分子の誘導メカニズムについては luciferase reporter assay, EMSA, ChIP アッセイなどを行った。

(2) 変形性関節症における p63 シグナルの関与の検討 においては、p63 ヘテロノックアウトマウスを用いて変形性関節症モデルを作成して組織学的に結果を検討した。

4. 研究成果

(1) 軟骨内骨化における p63 シグナルネットワークの解明

p63 のノックアウトマウスの骨格系を *in situ hybridization* で評価すると発生中期の E11-13 では軟骨がほとんど形成されず SOX6, SOX9, II 型コラーゲンの発現が著しく低下、E17 では小さな軟骨塊が形成されるが正常胎仔にくらべ分化マーカーの発現は低かった。一方 BrdU の取り込みに大きな差はなく軟骨分化障害により四肢の伸張が阻害されていると考えられた。また X 型コラーゲン陽性の肥大軟骨細胞層は E17 でも完全に欠落しているかその横径が著しく狭小化しており一連の軟骨分化のシークエンスに必須の転写因子であると判断された。

SOX6, SOX9, II 型コラーゲン, X 型コラーゲンについてはそれぞれのプロモーター解析を行い、SOX6, SOX9, II 型コラーゲンについ

ては近位プロモーターから 5' UTR の転写開始点近傍に、また肥大分化マーカーである X 型コラーゲンについてはイントロン 1 の中央に p63 が直接結合することが明らかになった。

p63 には N 末端には TA と deltaN の 2 タイプ、C 末端には α 、 β 、 γ の 3 タイプ、計 6 タイプのアイソフォームが知られている。これらの発現についてそれぞれの特異的なプライマーセットを作成して検討したところ、軟骨細胞では Tap63 α と Tap63 γ のみが発現しており、主に α が初期から中期、 γ は中期から後期分化段階に発現していた。Tap63 α は SOX や II 型コラーゲンなど、軟骨細胞の初期から中期に重要な遺伝子の発現を強く誘導するのに対し、Tap63 γ は X 型コラーゲンやタンパク分解酵素など、中期から後期にかけて重要な遺伝子の発現を強く誘導した。これらの結果は、アイソフォーム特異的な siRNA によっても裏付けられた。さらに 2 型コラーゲンプロモーターによる TAp63 α の軟骨特異的トランスジェニックマウスでは増殖軟骨層と肥大軟骨層の両者が拡大したのに対して、2 型コラーゲンプロモーターによる TAp63 γ の軟骨特異的トランスジェニックマウスでは肥大軟骨層のみが拡大した。これらの結果より、軟骨初期分化においては TAp63 α が、後期分化においては TAp63 γ が、それぞれ主要な役割を担っていることが明らかとなった。

p63 のプロモーターの組織特異的活性を検討したところ、軟骨においては転写活性化ドメインを持つアイソフォームの発現を制御する上流側のプロモーターが選択的に活性化されていることが明らかになった。このプロモーターの活性化因子として Notch, T-box family, NF-YA などの転写因子群が同定された。

p63 のリン酸化による制御の検討のためセリン・スレオニン変異体を作成し検討したところ転写活性化ドメイン内の複数のセリン・スレオニン残基の変異により PTHrP-Gs-PKA シグナル、及び TAK1-MKK3/6-p38MAPK シグナルによる軟骨マーカープロモーターの転写活性化が阻害され、p63 の軟骨分化制御メカニズムにリン酸化が深く関与していることが示唆された。p63 の転写共役因子のうちとくに GATA5 と C/EBP β の発現局在が p63 と一致すること、また p63 と GATA5 及び SOX9 が蛋白レベルでコンプレックスを形成することが明らかとなった。

(2) 変形性関節症における p63 シグナルの関与の検討

マウス変形性関節症モデルを用いた検討では、p63 ヘテロノックアウトマウスにおいて変形性関節症の進展が遅延する傾向があることが示唆された。

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 65 件)

査読のある英語論文の中から代表的なものを抜粋。

1. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, Kawaguchi H. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 α during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med* (in press).
2. Fukai A, Kawamura N, Saito T, Oshima Y, Ikeda T, Kugimiya F, Higashikawa A, Yano F, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Akt1 in murine chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiologic and pathologic conditions. *Arthritis Rheum*. 2010 Mar;62(3):826-36.
3. Shinoda Y, Kawaguchi H, Higashikawa A, Hirata M, Miura T, Saito T, Nakamura K, Chung UI, Ogata N. Mechanisms underlying catabolic and anabolic functions of parathyroid hormone on bone by combination of culture systems of mouse cells. *J Cell Biochem*. 2010 Mar 1;109(4):755-63.
4. Kan A, Ikeda T, Saito T, Yano F, Fukai A, Hojo H, Ogasawara T, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Screening of chondrogenic factors with a real-time fluorescence-monitoring cell line ATDC5-C2ER: identification of sorting nexin 19 as a novel factor. *Arthritis Rheum*. 2009 Nov;60(11):3314-23.
5. Ota N, Takaishi H, Kosaki N, Takito J, Yoda M, Tohmonda T, Kimura T, Okada Y, Yasuda H, Kawaguchi H, Matsumoto M, Chiba K, Ikegami H, Toyama Y. Accelerated cartilage resorption by chondroclasts during bone fracture healing in osteoprotegerin-deficient mice. *Endocrinology*. 2009 Nov;150(11):4823-34.
6. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, Kawasaki Y, Saito T, Yano F, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. C/EBPbeta Promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57. *PLoS One*. 2009;4(2):e4543. Epub 2009 Feb 20.
7. Higashikawa A, Saito T, Ikeda T, Kamekura S, Kawamura N, Kan A, Oshima Y, Ohba S, Ogata N, Takeshita K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type X collagen gene. *Arthritis Rheum*. 2009 Jan;60(1):166-78.
8. Muraki S, Akune T, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, Saika A, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N. Association of occupational activity with radiographic knee osteoarthritis and lumbar spondylosis in elderly patients of population-based cohorts: a large-scale population-based study. *Arthritis Rheum*. 2009 Jun 15;61(6):779-86.
9. Sato S, Kimura A, Ozdemir J, Asou Y, Miyazaki M, Jinno T, Ae K, Liu X, Osaki M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kawaguchi H, Haro H, Shinomiya K, Karsenty G, Takeda S. The distinct role of the Runx proteins in chondrocyte differentiation and intervertebral disc degeneration: findings in murine models and in human disease. *Arthritis Rheum*. 2008 Sep;58(9):2764-75.
10. Shinoda Y, Ogata N, Higashikawa A, Manabe I, Shindo T, Yamada T, Kugimiya F, Ikeda T, Kawamura N, Kawasaki Y, Tsushima K, Takeda N, Nagai R, Hoshi K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Kruppel-like factor 5 causes cartilage degradation through transactivation of matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem*. 2008 Sep 5;283(36):24682-9. Epub 2008 Jul 10.
11. Kawasaki Y, Kugimiya F, Chikuda H, Kamekura S, Ikeda T, Kawamura N, Saito T, Shinoda Y, Higashikawa A, Yano F, Ogasawara T, Ogata N, Hoshi K, Hofmann F, Woodgett JR, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Phosphorylation of GSK-3beta by cGMP-dependent protein kinase II promotes hypertrophic differentiation of murine chondrocytes. *J Clin Invest*. 2008 Jul;118(7):2506-15.
12. Ohba S, Kawaguchi H, Kugimiya F, Ogasawara T, Kawamura N, Saito T, Ikeda

- T, Fujii K, Miyajima T, Kuramochi A, Miyashita T, Oda H, Nakamura K, Takato T, Chung UI. Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. *Dev Cell*. 2008 May;14(5):689-99.
13. Yamakawa K, Kamekura S, Kawamura N, Saegusa M, Kamei D, Murakami M, Kudo I, Uematsu S, Akira S, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H. Association of microsomal prostaglandin E synthase 1 deficiency with impaired fracture healing, but not with bone loss or osteoarthritis, in mouse models of skeletal disorders. *Arthritis Rheum*. 2008 Jan;58(1):172-83.
14. Kawamura N, Kugimiya F, Oshima Y, Ohba S, Ikeda T, Saito T, Shinoda Y, Kawasaki Y, Ogata N, Hoshi K, Akiyama T, Chen WS, Hay N, Tobe K, Kadowaki T, Azuma Y, Tanaka S, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling. *PLoS One*. 2007 Oct 24;2(10):e1058.
15. Ogata N, Kawaguchi H, Chung UI, Roth SI, Segre GV. Continuous activation of G alpha q in osteoblasts results in osteopenia through impaired osteoblast differentiation. *J Biol Chem*. 2007 Dec 7;282(49):35757-64.
16. Kugimiya F, Kawaguchi H, Ohba S, Kawamura N, Hirata M, Chikuda H, Azuma Y, Woodgett JR, Nakamura K, Chung UI. GSK-3beta controls osteogenesis through regulating Runx2 activity.
17. Saito T, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. S100A1 and S100B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes. *EMBO Rep*. 2007 May;8(5):504-9.
18. Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Lichtler AC, Nakamura K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Identification of a potent combination of osteogenic genes for bone regeneration using embryonic stem (ES) cell-based sensor. *FASEB J*. 2007 Jun;21(8):1777-87.
19. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint

instability. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug;54(8):2462-70.

20. Yamada T, Kawano H, Koshizuka Y, Fukuda T, Yoshimura K, Kamekura S, Saito T, Ikeda T, Kawasaki Y, Azuma Y, Ikegawa S, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Kato S, Kawaguchi H. Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification. *Nat Med*. 2006 Jun;12(6):665-70.

[学会発表] (計 102 件)

国際学会の中から代表的なものを抜粋。

1. Kawaguchi H, Molecular backgrounds of cartilage degeneration during osteoarthritis progression (Special Lecture: OARSI-KORS Co-sponsored Symposium). The 35th Annual Meeting of the Korean Orthopaedic Research Society. 2009.10.14. Seoul, Korea
2. Kawaguchi H, Transcriptional regulation of osteoarthritis progression. The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2008). 2008. 9.23-27. Yokohama.
3. Ikeda T, et al. p63 Plays a Central Role in Cartilage Development by Directly Regulating Key Genes for Chondrogenesis. ASBMR 29th Annual Meeting. 2007. 9. 18. Hawaii, USA

[図書] (計 1 件)

1. Hiroshi Kawaguchi, et al. OPLL - Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament - 2nd Edition". edited by K. Yonenobu, T. Nakamura, and Y. Toyama. Springer-Verlag Tokyo. 2006, 1023p.

[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
<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/ortho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 浩 (KAWAGUCHI HIROSHI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：40282660

(2) 研究分担者

鄭 雄一 (UNG-IL CHUNG)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号：30345053

中村 耕三 (NAKAMURA KOZO)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：60126133

池田 敏之 (IKEDA TOSHIYUKI)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：80322759

齋藤 琢 (SAITO TAKU)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：30456107

(3) 連携研究者

なし