

平成 21 年 2 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18390415

研究課題名 (和文) 軟骨細胞シグナリングとマトリックス転写制御による軟骨形成・分化の解明

研究課題名 (英文) Analysis of cartilage formation and differentiation through regulation of chondrocyte signaling and transcription of matrix genes

研究代表者

妻木 範行 (TSUMAKI NORIYUKI)

大阪大学・医学系研究科・独立准教授

研究者番号 50303938

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：内軟骨性骨化、軟骨発生、骨形成因子、トランスジェニックマウス

## 1. 研究計画の概要

骨形成因子(BMP)は軟骨形成に必須である。BMPの細胞内シグナルは、主に Smad 経路が伝達し、Smad6/7はこの経路を抑制する。また BMPは MAP kinase (MAPK)経路も活性化する。本年度は BMPによって誘導される軟骨形成における Smad6/7の役割を解析した。

研究の全体構想は、軟骨細胞に働く種々のシグナルが、軟骨細胞の分化やマトリックス遺伝子の発現制御に作用し、結果として軟骨の形態や機能に及ぼす影響をトータルに分子レベルで解明することである。その中で本研究課題では、BMP及びTGF- $\beta$ の下流に存在する、Smadシグナルによる軟骨代謝の制御と、軟骨コラーゲン遺伝子のエピジェネティックな転写制御のメカニズムを明らかにする。Smadシグナルの解析については、抑制型 Smad7を内軟骨性骨化の各段階で発現をコントロールするためにコンディショナルトランスジェニックマウスを開発する。

## 2. 研究の進捗状況

凝集間葉系細胞と軟骨細胞に特異的に Smad6、Smad7を過剰発現させたトランスジェニックマウス (Tg)を作製した。胎生 12.5日のマウス肢芽間葉系細胞を調整し、BMP2存在下で micromass 培養を行い軟骨様結節を誘導した。この結節形成は TGF- $\beta$  inhibitor である SB431542を添加しても抑制されず、BMPで誘導されたと考えた。Smad6 Tgでは軟骨は形成されたが、Smad7 Tgでは軟骨の形成が抑制された。micromass 培養において、Smad6 Tgの肢芽間葉系細胞では BMPで誘導される軟骨様結節が正常に

形成された。一方、Smad7 Tgの肢芽間葉系細胞ではこの結節形成が著しく障害され、Sox9の発現が低下していた。BMPで誘導される軟骨様結節の形成は、MAPキナーゼ経路の阻害剤を加えた場合に抑制されたことから、この形成には MAPK経路が関与すると考えた。MAPK経路の downstream target である ATF2のリン酸化は、アデノウイルスを用いた Smad7の過剰発現によって抑制されたが、Smad6の過剰発現では抑制されなかった。これらの結果から、Smad7は MAP kinase 経路を抑制することで、BMPによって誘導される軟骨様結節の形成を阻害すると考えた。Smad7の過剰発現により Tgの軟骨形成は阻害される。その原因として、BMPによって活性化される MAPK経路の Smad7による抑制を考えた。

軟骨コラーゲン遺伝子のエピジェネティックな転写制御のメカニズムについては XI型コラーゲン遺伝子のプロモーター領域にインシュレーターを発見し、ゲノム上の隣接遺伝子の転写制御に関与していることを明らかにした。

## 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

BMPシグナルの解析に関して、コンディショナルトランスジェニックマウスの開発に成功した。これにより内軟骨性骨化の各段階でトランスジーンを発現をコントロールすることが出来、研究がスムーズに進捗した。また、コラーゲン遺伝子の転写制御については、BACトランスジーンの出産に成功し、隣接遺伝子の影響を解析することが可能となった。

#### 4. 今後の研究の推進方策

軟骨細胞のシグナルについては JBC, 283, 27154-27164, 2008 に、コラーゲン遺伝子転写制御については JBC, 283, 27677-27687, 2008 に発表した。引き続き全体構想である、軟骨細胞シグナルとマトリックス遺伝子転写制御の統合的理解に向けて、研究を進展させる。基盤 (B) の、研究計画最終年度前年度の応募を行っている。

#### 5. 代表的な研究成果

(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. Iwai, T., Murai, J., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N.: Smad7 Inhibits Chondrocyte Differentiation at Multiple Steps during Endochondral Bone Formation and Down-regulates p38 MAPK Pathways. *J Biol Chem*, 283:27154-27164, 2008. 査読有
2. Murai, J., Ikegami, D., Okamoto, M., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N.: Insulation of the Ubiquitous Rxb Promoter from the Cartilage-specific Adjacent Gene, *Col11a2*. *J Biol Chem*, 283:27677-27687, 2008. 査読有
3. Nampei, A., Hashimoto, J., Koyanagi, J., Ono, T., Hashimoto, H., Tsumaki, N., Tomita, T., Sugamoto, K., Nishimoto, N., Ochi, T., and Yoshikawa, H.: Characteristics of fracture and related factors in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*, 18:170-176, 2008. 査読有
4. Iwai, T., Harada, Y., Imura, K., Iwabuchi, S., Murai, J., Hiramatsu, K., Myoui, A., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N.: Low-intensity pulsed ultrasound increases bone ingrowth into porous hydroxyapatite ceramic. *J Bone Miner Metab*, 25:392-399,

2007. 査読有

5. Sugiki, T., Uyama, T., Toyoda, M., Morioka, H., Kume, S., Miyado, K., Matsumoto, K., Saito, H., Tsumaki, N., Takahashi, Y., Toyama, Y., and Umezawa, A.: Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem*, 100:1240-1254, 2007. 査読有
6. Okamoto, M., Murai, J., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N.: Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J Bone Miner Res*, 21(7): 1022-1033, 2006. 査読有
7. Hirao, M., Tamai, N., Tsumaki, N., Yoshikawa, H., and Myoui, A.: Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem*, 281(41): 31079-31092, 2006. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

T. Iwai, J. Murai, H. Yoshikawa, N. Tsumaki: Role of Smad7 during endochondral bone formation. March 4-9, 2007 Gordon Research Conference, Cartilage Biology & Pathology, Ventura, CA USA

[図書] (計 1 件)

最新整形外科学体系 1 運動器の生物学と生体力学 越智隆弘 総編 中村利孝、吉川秀樹 編、骨形成 pp30-37、2008 年第 1 版、中山書店

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]