

平成 22 年 6 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 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

研究成果の概要：

軟骨細胞分化における BMP シグナルの役割を詳細に解析するために、Smad7 を軟骨細胞分化の各段階で過剰発現させる conditional transgenic mouse システムを開発し、解析した。その結果、Smad7 は軟骨形成阻害し、その原因として、BMP によって活性化される MAPK 経路の Smad7 による抑制が示唆された。また、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。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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 7305 骨・軟骨代謝学

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. 研究開始当初の背景

加齢とともに関節軟骨の変性は進行し、高齢化社会への流れとともに、変形性関節症の患者数は急増している。変性した軟骨を修復し関節機能の回復を目指す上においても、軟骨形成・分化の制御メカニズムを分子レベルで解明することは必要である。軟骨組織では細胞外マトリックスの中に軟骨細胞が散在し

ている。軟骨組織の主たる機能は組織支持性であり、物理的なものである。軟骨組織の物理的特性は細胞外マトリックスの構造によって規定され、マトリックス蛋白は軟骨細胞が産生している。軟骨細胞による軟骨組織の代謝は種々の液性因子によって制御されており、骨形成因子（BMP）はその一つである。BMP は細胞表面の受容体に結合し、細胞

内の Smad 蛋白が活性化されることで細胞内シグナルとして伝達される。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。そしてその知見を元に、特定のシグナルを操作して変性した軟骨を修復するための道筋をつけたい。

2. 研究の目的

本研究課題としては、特に 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ことを目的とする。まず軟骨特異的発現をもたらす XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子 (*Col11a2*) プロモーター/エンハンサーを用いて、軟骨特異的に Smad シグナルを不活化させた遺伝子改変マウスを作製し、軟骨形成・分化に対する作用を解析する。軟骨特異的マトリックス遺伝子の発現量およびパターンを解析し、Smad がマトリックス遺伝子転写制御に与える影響を調べる。MAP キナーゼによる制御メカニズムについて検討する。

またさらに、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については、*Col11a2* 遺伝子の軟骨特異的エンハンサーが近隣のユビキタスに発現する遺伝子に働かないことに着目し、エンハンサーブロックとしてのインスレーター機能の探索を行う。インスレーター配列を中心にヒストンのメチル化や DNA のメチレーションが制御されていることが推測され、その解析を行う。そして軟骨エンハンサーブロックにかかわる *Col11a2* 遺伝子のインスレーター配列やプロモーター配列に mutation を導入した遺伝子改変マウスを作製し、軟骨形成・分化におけるこれら配列の機能を解析する。

3. 研究の方法

Smad7 conditional transgenic mice の作製

TGF- β /BMP ファミリーメンバーは軟骨形成に重要であり、そのシグナルは抑制型 Smad である Smad6/7 によって抑制される。軟骨発生の各段階における Smad7 の役割を調べるために、未分化間葉系細胞あるいは増殖軟骨細胞の各ステージから Smad7 を過剰発現するコンディショナルトランスジェニックマウス

を作製した。軟骨特異的発現をもたらす XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子 (*Col11a2*) プロモーターに、floxed LacZ DNA を介在させて Smad7 cDNA (lox-Smad7) を結合した。この floxed LacZ-Smad7 コンストラクトを導入したトランスジェニックマウス (Tg) と、種々の Cre Tg を作製/用意した。

Col11a2 インスレーター機能の探索

XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子 (*Col11a2*) は極めて軟骨特異的に発現するが、その発現制御には第 1 イントロンが軟骨組織特異的エンハンサー/サイレンサーとして機能している。一方 *Col11a2* のすぐ上流に存在する Retinoid-X-receptor β 遺伝子 (*Rxrb*) は種々の組織で発現する。ゲノムには隣接する遺伝子へのエンハンサー効果をブロックする塩基配列 (insulator) の存在が信じられ、その結合蛋白として CTCF 蛋白が報告されている。そこで EMSA により、CTCF 結合領域を探索した。次に、*RXR β / COL11A2* locus を含む 150kb のヒト BAC DNA を用意し、CTCF 結合領域周囲 507 bp を欠失させたクローン (Del)、14bp の変異を導入したクローン (Mut) と、変異のないクローン (Wt) を作成した。それぞれのクローンで *RXR β* 全体を *LacZ* に置き換えたトランスジーンを用意した。マイクロインジェクション法でそれぞれの DNA を導入したトランスジェニックマウスを作製し、受精後 13.5 日のマウス胎仔を X-gal 染色し、*LacZ* の発現パターンを解析した。

4. 研究成果

Smad7 conditional transgenic mice の解析

Prx1 promoter-Cre Tg を交配して得た double Tg では、四肢軟骨が著しく低形成であった。このマウスでは四肢の間葉系細胞で Cre を発現し、*Col11a2* プロモーター活性に従って間葉系細胞凝集のステージから Smad7 が発現する。*Col11a2* promoter/enhancer-Cre を交配して得た double Tg では、増殖軟骨細胞層は形成されたが、その後の軟骨細胞肥大化の遅延と骨化の遅延が認められた。*LacZ* の発現パターンより、このマウスでは早期の増殖軟骨細胞のステージで Smad7 を過剰発現していると考えた。一方 *Col11a2* promoter-Cre Tg と交配して得た double Tg では軟骨細胞肥大化、骨化の遅延を認めたが、*Col11a2*-Cre-Int との double Tg と比べてそ

の程度は軽度であった。晩期増殖軟骨細胞での Cre による組み換えと Smad7 の過剰発現が示唆された。Smad7 は間葉系細胞から軟骨細胞への分化, 増殖軟骨細胞から肥大軟骨細胞への分化の両方のステージにおいて抑制的に働くと考えた。

次に、Smad6 と Smad7 の機能の比較をするために、Prx1-Cre; Smad7 conditional Tg と Smad6 Tg の胎生 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- β 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。

Col11a2 インスレーター機能の探索

Col11a2/Rxrb 遺伝子間に CTCF 結合領域を同定した。Wt トランスジェニックマウス (Wt-tg) は 4 匹中 4 匹で体全体が X-gal に染色された。組織像でも *LacZ* の発現場所に組織特異性は認めなかった。Wt-tg では *LacZ* が *RXR β* プロモーター下に発現していると考えた。Mut-tg と Del-tg では 7 匹中 4 匹が軟骨特異的に *LacZ* を発現していた。*COL11A2* の発現パターンは軟骨特異性を保ったままだった。CTCF 結合領域を失ったために、*COL11A2* イントロンエンハンサー/サイレンサーが隣接する遺伝子の発現に影響を与えたと考えた。

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. 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 *Rxrb* 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)

1. 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)

1. 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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

吉川秀樹 (YOSIKAWA HIDEKI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：60191558

(3) 連携研究者

無し