

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06248

研究課題名(和文) 軟骨組織の再生に必要な基質産生の制御

研究課題名(英文) Control of extracellular matrix production required for cartilage tissue regeneration

研究代表者

篠村 多摩之 (Shinomura, Tamayuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：70206118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症などで見られる軟骨組織の破壊を修復するには、II型コラーゲンとアグリカンを中心とする軟骨基質の産生を促進させることが必須の要件である。そこで本研究では、II型コラーゲン遺伝子の発現制御機構を明らかにすることを目的として研究を進めた。その結果、この遺伝子の発現は複数のエンハンサーによって調節されていること、またそれぞれのエンハンサーの働きはエピゲノム修飾によって調節されていることを突き止めた。更に、それぞれのエンハンサー(あるいはプロモーター)に特異的に結合する転写因子として、ARID5B、KLF4、および SHOX2を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨基質の発現制御機構を理解することは、軟骨組織の修復再生を制御する上で、非常に重要な課題である。軟骨基質の主要成分であるII型コラーゲンおよびアグリカンの発現制御については、既にSOX9が深く関わっていることは解っているが、その一方でSOX9が発現している膵臓等の組織ではII型コラーゲンやアグリカンの発現は全く認められない。したがって、軟骨基質の発現に必要な条件を明らかにすることは、軟骨組織の修復再生に向けた新たな治療法を開発する上で非常に重要な課題である。本研究を通じ、II型コラーゲンの発現制御機構について新たな側面が明らかになったことは、学術的にも社会的にも大きな意義を持っている。

研究成果の概要(英文)：In order to repair the cartilage tissue damaged in disease such as osteoarthritis, it is essential to promote the production of cartilage matrix containing II collagen and aggrecan as the main components. Therefore, in this study, we focused on the type II collagen gene and proceeded to elucidate the control mechanism of its expression. As a result, we found that multiple enhancers are involved in the regulation of this gene expression, and that the function of each enhancer is regulated by epigenetic modification. In addition, we identified ARID5B, KLF4, and SHOX2 as transcription factors that specifically bind to enhancers or promoter. However, further studies are required to fully understand the mechanism that regulate the expression of this gene.

研究分野：生化学

キーワード：軟骨 再生 転写制御 II型コラーゲン アグリカン 転写因子

1. 研究開始当初の背景

国内に於ける変形性関節症の患者数は年々増加し、その数は現在、潜在的な患者数を含めると数千万人に上ると見積もられている。この疾患の主な原因は、加齢に伴う軟骨組織の変性と摩耗にあると考えられているが、侵襲性の低い有効な治療法は未だ無いのが現状である。

軟骨組織が担う生理機能の多くは、豊富な細胞外基質（軟骨基質）の存在とその性質に大きく依存している。従って変性あるいは消失した軟骨組織の修復・再生には、また加齢に伴う基質産生の低下を補うためにも、まずは軟骨基質の産生を促進させることが必須の要件である。しかし軟骨基質の代謝および構築のメカニズムについては依然として不明な点が多く、従ってその代謝を人為的にコントロールすることは非常に難しいのが現状である。例えば、軟骨基質の主成分である II 型コラーゲンの転写制御機構は、1997 年前後に遺伝子のエンハンサー配列とそれに結合する転写因子、SOX9 が見つかったことで、分子レベルでの研究が本格的に始まった(参考文献 1)。そしてその後の多くの研究により、これらのエンハンサーと SOX9 は II 型コラーゲンの転写制御にとって必要条件であることが確認されてきた。しかしその一方で、SOX9 の発現が必ずしも軟骨特異的でないことから、我々は当初見つかったエンハンサーと SOX9 だけでは不十分で、II 型コラーゲン遺伝子の発現を制御する為の必要十分条件にはなっていないと考えてきた。

こうした状況の中で我々は、軟骨基質の主成分である II 型コラーゲンとアグリカンのゲノム DNA を改めて解析した結果、新たなエンハンサー配列の存在を明らかにすることができた(参考文献 2)。そこでこうした新たな成果を踏まえ、II 型コラーゲンおよびアグリカンの転写制御機構の徹底解明を目指して本研究を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究では、軟骨基質の合成制御機構に関する包括的な理解を深め、その上で最終的に軟骨細胞の基質産生を制御可能なレベルに持って行くことが目的である。一般によく知られているように、硝子軟骨に於いては II 型コラーゲンとアグリカンが、組織乾燥重量のおおよそ 8 割を占めている。従ってまずは II 型コラーゲンおよびアグリカンに焦点を当て、それぞれの遺伝子の転写制御機構について、エンハンサーに結合する転写制御因子の解明とエピジェネティックな制御の実態を明らかにすることを目的とした。そしてその上で、遺伝子発現を活性化する為に必要な条件を明らかにし、軟骨基質の産生を制御する為の方策を明らかにしていくことを長期目標とした。

我々はこれまでの研究から、両遺伝子にはそれぞれ異なった 2 つのエンハンサーが存在しており、その強さには差があることを明らかにしてきた(参考文献 2)。そしてこのことは、それぞれのエンハンサー領域で形成されるエンハンサーオソームに差があり、それぞれのエピゲノム修飾も異なっていることを強く示唆していた。しかしその一方で、II 型コラーゲンおよびアグリカンの転写制御に関するこれまでの研究の多くは、それぞれの遺伝子のプロモーター領域に焦点を当てた研究が多く、エンハンサーに直接結合する転写因子については、信頼に足る情報は非常に少なかった。そこでまずは、各エンハンサー領域の特性を理解し、その上で結合する転写因子の同定を進めることを当面の目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、軟骨細胞としての性質を安定に保持し、且つ取り扱いが非常に容易なラット軟骨肉腫細胞 (RCS 細胞) を用いて研究を進めた。またこの細胞を用いて遺伝子発現を解析するにあたり、独自に開発した Silent Reporter System を用いた(参考文献 2)。このシステムは、安定発現系を利用して RCS 細胞のゲノム DNA の一定の位置で目的のレポーター遺伝子を構築し、その発現を解析できるようにしたシステムである。このシステムの大きな利点は、一旦プラットホーム細胞を樹立しておけば、長さの違うプロモーターや異なったエンハンサーを持つレポーター遺伝子を、同じ染色

体の同じ位置で構築できる点である。このことは、レポーター遺伝子のコピー数やそれが挿入された染色体の位置効果を気にせず、異なったプロモーターやエンハンサーの活性を、同一条件下でシステムチックに比較解析ができるということである。そしてもう一つの利点は、安定発現系を利用することで、通常のレポーターアッセイ(一過性発現によるルシフェラーゼアッセイ等)では難しい、エピジェネティックな修飾についての解析が可能な点にある。例えばII型コラーゲン遺伝子の発現解析用に3種類のレポーター細胞(2つのエンハンサー、E1とE2をそれぞれ独立に、あるいは両者を同時に持ったレポーター遺伝子を内包する細胞)を用意し、次にそれらの細胞に対して種々の薬剤を作用させることで、遺伝子発現に関わるシスエレメントとエピジェネティックな修飾の効果との関連をシステムチックに解析ができる。

本研究ではさらに、Silent Reporter System を用いて作成したレポーター細胞に対し、野生型およびドミナントネガティブ型の転写因子を強制発現させることで、レポーター遺伝子の発現と転写因子との相関性を調べた。

4. 研究成果

まずII型コラーゲン遺伝子の発現制御に焦点を絞り、2つのエンハンサーが異なった働きをしていることを確認するために、それぞれのエンハンサーに対するエピジェネティックな修飾の違いについて解析を行った。その結果、以下の2点が明らかになった。

II型コラーゲンの2つのエンハンサー (E1とE2) は、2種類のヒストンデアセチラーゼ (Sirtuin 6 および HDAC10) によってその活性が調節されている。Sirtuin 6 は、両エンハンサー (E1 と E2) 領域に結合しているヒストンタンパク質の脱アセチル化を促進し、遺伝子発現を負に制御している。一方、HDAC10 は エンハンサー (E2)領域にのみ作用して遺伝子発現を制御している。

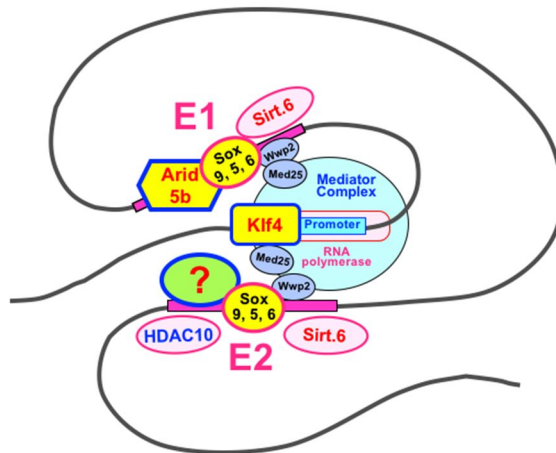
以上の結果は、今後、加齢に伴う遺伝子発現の低下を解析していく上で、非常に重要な意味を持つものと考えられる。またヒストンデアセチラーゼには DNA に対する直接的な結合性は見られないので、それぞれの酵素が持つエンハンサー特異性は、各エンハンサーに特異的に結合している転写因子を介して決められていると考えられる。そこで次のステップとして、各エンハンサーに特異的に結合する転写因子の同定を進めた。

まず総数約 1,500 種類あると見積もられている全転写因子の内、現在把握できている約 1,000 種類の転写因子について、E1 と E2 の各エンハンサーに特異的に結合する可能性が高い因子の絞り込みを行った。絞り込みには、幾つかのデータベースを併用し、各エンハンサーの塩基配列に親和性がありそうで、さらに軟骨組織での発現が認められるもの、あるいは軟骨細胞の分化と関連があると報告されているものを中心に、最終的に15種類の候補因子を絞り込んだ。次にそれぞれの転写因子が、確かにII型コラーゲンの遺伝子に結合し、その発現を制御していることを多角的に確認するために、以下の解析を行った。

- (1) 各転写因子に対する特異抗体を用いた ChIP-PCR 解析
- (2) 対象とする転写因子の過剰発現による II型コラーゲン遺伝子の発現に及ぼす効果の解析
- (3) エンハンサーの塩基配列および転写因子をコードするcDNAの塩基配列に変異を導入し、その効果についての解析

以上の解析から、最終的に3つの転写因子、ARID5B、KLF4、および SHOX2 が、II型コラーゲン遺伝子のエンハンサー領域あるいはプロモーター近傍領域に特異的に結合し、転写を促進していることが確認できた(結果は図1にまとめた)。ただし、SHOX2については、その結合部位を確認中である。また本研究を通して分かったことは、現在利用可能なデータベースの多くは、不完全なものであり、偽陽性のものが非常に多いということである。従って、データベースの利用にあたっては、得られた結果を異なった方法で再検証することが必須である。

図 1. II型コラーゲンの転写複合体



最後に、本研究では、エンハンサー E2 に特異的に結合して機能している転写因子を同定することはできなかった。また、軟骨分化あるいはII型コラーゲンの転写に関わると報告されてきた転写因子の多くが、必ずしもII型コラーゲン遺伝子に直接結合して機能しているものではないことも明らかになった。従って、これらの点については、今後再解析あるいは再検証が必要である。また、ヒストンのアセチル化に加え、ゲノム DNA のメチル化による転写の修飾については、解決すべき今度の課題として残っている。いずれにせよ、II型コラーゲンの転写制御機構を明らかにするためには、更なる研究が必要であり、その上で形成されるエンハンサーオソームの機能を人為的にコントロールするための薬剤の探索が必要である。

< 参考文献 >

- (1) Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V. R., Goodfellow, P. N., and de Crombrughe, B. (1997) Sox9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the proalpha1(II) collagen gene. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2336–2346
- (2) Ito, K., and Shinomura, T. (2016) Development and application of a new Silent reporter system to quantitate the activity of enhancer elements in the type II Collagen Gene. *Gene* **585**, 13-21

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nham Giang Thi Hien, Zhang Xiang, Asou Yoshinori, Shinomura Tamayuki	4. 巻 704
2. 論文標題 Expression of type II collagen and aggrecan genes is regulated through distinct epigenetic modifications of their multiple enhancer elements	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 134 ~ 141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2019.04.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamada Shunsuke, Nishida Yoshihiro, Zhuo Lisheng, Shinomura Tamayuki, Ikuta Kunihiro, Arai Eisuke, Koike Hiroshi, Kimata Koji, Ushida Takahiro, Ishiguro Naoki	4. 巻 36
2. 論文標題 Suppression of hyaluronan synthesis attenuates the tumorigenicity of low-grade chondrosarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research?	6. 最初と最後の頁 1573 ~ 1580
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.23794	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Yumiko, Horie Akihito, Tani Hirohiko, Ueda Masashi, Okunomiya Asuka, Suginami Koh, Kondoh Eiji, Baba Tsukasa, Konishi Ikuo, Shinomura Tamayuki, Sato Yukiyasu	4. 巻 157
2. 論文標題 Versican V1 in human endometrial epithelial cells promotes BeWo spheroid adhesion in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 53 ~ 64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/REP-18-0333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Giant Thi Hien Nham, Xiang Zhang, Tamayuki Shinomura
2. 発表標題 Expression of type II collagen and aggrecan genes is regulated through distinct epigenetic modifications of their multiple enhancer elements
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zhang Xiang, Nham T.H. Giant, Tamayuki Shinomura
2. 発表標題 Identification of an enhancer-specific transcription factor regulating type II collagen gene expression
3. 学会等名 The 6th Tri-University Consortium on Oral Science and Education (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 張 響、ジャン ニャン、篠村 多摩之
2. 発表標題 II型コラーゲンの遺伝子発現を制御するエンハンサー特異的転写因子の同定
3. 学会等名 日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tamayuki Shinomura
2. 発表標題 Expression of type II collagen and aggrecan genes is regulated through the distinct epigenetic modification of multiple enhancer elements
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Cartilage Biology and Pathology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------