

平成 22 年 6 月 13 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ~ 2009

課題番号：19390116

研究課題名 (和文) プロテオグリカンがつくる統合的細胞外環境とシグナル制御

研究課題名 (英文) The extracellular microenvironment and its signal regulations operated by proteoglycans

研究代表者 渡辺 秀人 (WATANABE HIDETO)

愛知医科大学・分子医科学研究所・教授

研究者番号：90240514

研究成果の概要 (和文)：

細胞外マトリックスの構築と機能の中心的役割を担うと推測されるプロテオグリカン、バーシカンの生体内機能を、同分子のコンディショナルノックアウトマウスを用いて解析した。その結果、同分子が心臓形成初期の内皮細胞上皮間葉転換、中期の心筋細胞分化および中隔形成の各過程に必須であること、軟骨の初期発生と関節形成において重要な役割を果たすことがわかった。その作用は BMPs ならびに TGF β のシグナル伝達制御を通じて発揮されることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

To understand *in vivo* function of versican, a large proteoglycan in the extracellular matrix, we generated analyzed its conditional knockout mice. Through their analyses, we found that versican regulates BMP- and TGF β -mediated signaling and plays crucial roles in several steps of cardiac development, chondrogenesis, and joint morphogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：糖鎖、細胞・組織、プロテオグリカン、細胞外マトリックス、シグナル伝達、遺伝子改変マウス、バーシカン

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックスは細胞を支持するのみならず、増殖・分化等の細胞の営みに必要

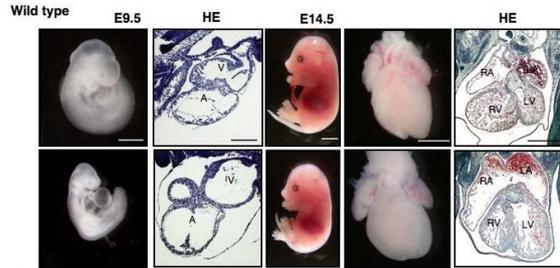
な環境を提供している。細胞外マトリックスは、コラーゲンを主体とする線維成分とプロテオグリカンおよびその他の糖蛋白質より

成り、線維成分がマトリックスの骨格を形成する一方、プロテオグリカンが線維の間隙を埋め、各組織に物理的特性を与えている。この物理的機能に加え、近年、細胞外マトリックスには様々な増殖成長因子やモルフォゲンを蓄え、局所的な濃度勾配を作るなどして標的細胞に適切なシグナルを伝達する作用があることが明らかとなってきた。細胞外マトリックスが持つこのダイナミックな機能は、プロテオグリカンやその他の糖蛋白質の様々な生理活性分子との特異的結合によって発揮される。例えば軟骨組織においてはII型コラーゲンを主体とする線維成分が組織骨格をつくり、巨大なコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして知られるアグリカンが軟骨に弾力性を付与しているが、さらにこのアグリカンを中心とするプロテオグリカン会合体が種々の軟骨細胞分化制御因子と結合することによって軟骨細胞の分化を調節している。真皮を初めとする結合組織においても軟骨アグリカンに相当する大型のプロテオグリカンが存在して細胞外マトリックスのダイナミズムを司っていると推測されていたが、約20年前、同分子が申請者の所属する研究グループによってPG-Mとして同定され、時を待たずして同分子の遺伝子クローニングが行われ、バーシカン(versican、以下Vcan)と名付けられた。

Vcanは分子量約40万の巨大なマトリックス型プロテオグリカンで、同分子コアタンパク質N-末端のG1ドメインはヒアルロン酸と、C-末端のG3ドメインはテネイシン(tenascins)、フィブリリン(fibrillins)、フィビュリン(fibulins)等とそれぞれ結合し、中央のCSドメインには5-20本のコンドロイチン硫酸が共有結合している。同分子は、組織発生、器官形成の際に一過性に高発現し、恐らく大規模な組織改築に重要な機能を発揮すると考えられる。しかし、Vcanに関するこれまでの研究の殆どは各ドメインの培養細胞の接着、増殖、分化における影響を検討したものに留まっており、同分子の生体内におけるダイナミックな機能と機能発揮の機構は殆どわかっていなかった。

Vcanのノックアウトマウスは胎生10.5日前後に心形成不全により致死となるため、胎生後期や生後発育成長過程における同分子の生体内機能は明らかにされていない。申請者らは近年、G1ドメイン内のAサブドメインが欠失したノックインマウスを作製し、その詳細な解析を通じて、AサブドメインがVcanの細胞外マトリックスへの安定な沈着に必須であること、Vcanのマトリックス沈着の減少を示す同ノックインマウスは胎生期に心拡大、大動脈形成不全、真皮形成不全を呈し、出生期までに死亡することを見出した(図1、投稿中)。さらにこれらの変異発症

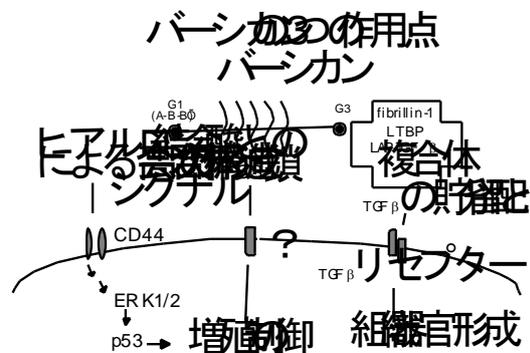
機構の解析を通じて、Vcanがフィブリリン-1やlatent TGFβ-binding protein (LTBP)-1との複合体形成を介してTGFβをマトリックス内に貯留し、そのシグナル伝達を調節していることを明らかにした(Suwan K, et al., 2009, 申請時論文投稿準備中)。



Cspg2^{Δ3/Δ3} exhibits dilated heart

<図1> Vcanの心形成における役割

また、同ノックインマウスの胎児線維芽細胞が足場非依存的(anchorage-independent)自己増殖能を獲得し、ヌードマウス内に移植すると線維肉腫を形成することを見出した。同細胞の自己増殖能獲得機構について検討したところ、ヒアルロン酸高次構造形成障害がCD44を介したERK1/2へのシグナル伝達を変化させ、その下流に位置するp53の発現の低下が自己増殖能獲得へと導いたものと考えられ、さらにコンドロイチン硫酸によるシグナル伝達への直接の関与も推測された(Suwan K, et al., 2009, 申請時論文投稿準備中)。



<図2> Vcanの3つの作用点

これらの観察結果から、Vcanには、(1) G1ドメインによるヒアルロン酸高次構造形成を介したシグナル伝達、(2)コンドロイチン硫酸によるその結合性生理活性分子あるいはそのリセプターを介した作用、(3) G3ドメインと他のマトリックス分子の複合体による成長因子の貯留と分配、という3つの作用点が存在し、同分子はこれらの作用点を通じてマトリックス構築と細胞挙動制御を行っていると考えられる。Vcanは、器官形成等の組織が変容する際、各機能ドメインが種々のマトリックス構成体を繋ぎつつ、一

定の統合的微小環境を維持しながらこれらの作用点を通じて細胞挙動を制御し、秩序だった組織構築を可能にしていると推測できるのである。

上記ノックインマウスの解析から *Vcan* の生体内機能に関する多くの情報が得られたが、各作用点を介した機能の詳細を解明するためには、生体環境を維持したまま、さらに巧妙な工夫を導入することが必要である。そこで申請者は、同分子のコンディショナルノックアウトマウスと各ドメインの遺伝子導入技術を用いて大々的に解析を展開することによって、*Vcan* を中心とした細胞外マトリックス高次構造の形成とこれに基づく細胞制御機構を解明する、という研究計画を立案した。

2. 研究の目的

研究目的

本研究の目的は、「*Vcan* が各々の作用点を介してどのようにして特異的機能を発揮するのかを、同分子のコンディショナルノックアウトマウスとアデノウイルス遺伝子導入技術を駆使することによって明らかにすること」である。コンディショナルノックアウトマウス調製用 *Vcan*^{flx/flx} マウスは既に作製済みであり、薬剤を用いて同分子発現の欠失を誘導できる *Vcan*^{flx/flx}:CAG-CreER も樹立済みである。また、マウスの各組織へのアデノウイルス遺伝子導入技術も既に取得済みである。研究期間内に主としてマウスの解析を行い、*Vcan* がどの作用点を介して生体内機能を発揮するのかを明らかにする。また、生体内における変化と細胞培養系から得られる解析結果を比較検討し、生体でなければ作り得ない機能的細胞外マトリックスの本体を明らかにする。

本研究の学術的な特色、独創的な点及び予想される結果と意義

細胞外マトリックス分野における従来の研究は、その構成分子の同定や各分子の性状解析が主体であった。一部のマトリックス分子に対する遺伝子操作マウスを用いた研究が行われているとはいえ、細胞外マトリックスの高次構造形成機構は解明されたとはいえない。一方、細胞培養系を用いて組織を構築する試みも行われているが、生体内の微小環境を再現しうるまでの組織構築には及んでいない。研究時間的・空間的に自在に *Vcan* の発現を制御しうる遺伝子操作マウスを用いる点が、本研究の大きな利点である。マトリックスの構造と機能がどのように変化するかを、生体という統合的微小環境を維持した状態で詳細に検討する点が本研究の特色であり、従来の研究にはなかった独創的な点である。本研究によって細胞外マトリックスの高次構造とその構造によって発揮される

シグナル伝達制御機構の詳細を明らかにすることができるものと期待される。本研究の成果は、細胞外マトリックスのダイナミックな機能の解明という点で高い意義を持つ。

3. 研究の方法

Vcan ノックインマウスの胎児線維芽細胞は自律性増殖を示すが、同ノックインマウスの胎児では細胞の自律性増殖はみられない。このことは、生体内でしか作り得ない細胞外マトリックス構造が生体の細胞制御に決定的な役割を果たしていることを示している。

当該研究は、

(1) *Vcan* コンディショナルノックアウトマウスの解析、

(2) *Vcan* 欠損細胞培養系を用いた検討を並行しておこない、一定の結果が出た段階で、各々の解析結果の差異に関して考察を加える。

(1) *Vcan* コンディショナルノックアウトマウスの解析

Vcan コンディショナルマウスの元のマウス系列 *Vcan*^{flx/flx} は既に作製済みである。同マウスと各種プロモーターによって Cre 酵素を発現するトランスジェニックマウスとを交配させ時空間的に特異的に *Vcan* を欠失したコンディショナルノックアウトマウスを作製し、解析する。

作製されたコンディショナルノックアウトマウスは以下の方法を用いて解析する。

●マウスの行動変化、形態学的変化を肉眼的に観察する。

●全身臓器・組織の組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色、アルシヤンブルー染色等の一般的染色にて組織形態学的変化を検討する。

●さらに免疫染色にて、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、テネイシン、フィブリリン、フィビュリン等、各細胞外マトリックス分子の発現分布に関して検討を加える。またヒアルロン酸の分布に関しては標識ヒアルロン酸結合性分子を用いて検討を加える。

●各マトリックス分子の発現量をウェスタンブロット法、ELISA 法、定量的 RT-PCR 法、In situ hybridization 法等を用いて検討する。

●*Vcan* 発現の欠如した組織の細胞増殖を BrdU の取り込みと抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色にて検討する。また、各細胞の分化に関しても種々の分化マーカーを指標に評価する。

また、タモキシフェンの投与によって全身に Cre 酵素を発現する CAG-CreER マウスと *Vcan*^{flx/flx} とを交配させた *Vcan*^{flx/flx} CAG-CreER マウス系列も既に樹立済みである。同マウスにタモキシフェンを投与するこ

とによってパーシカンの発現は欠失すると考えられる。

まず、各成長発育段階の $Vcan^{flox/flox}$ CAG-CreER マウスにタモキシフェンを投与し、免疫染色、ウェスタンブロット法、定量的 RT-PCR 法を用いてパーシカン発現の欠失を確認する。

タモキシフェン投与によりパーシカン発現は欠失するはずであるが、時空間的な発現制御が自在に操作できない場合はインターフェロンによって Cre 酵素発現誘導可能な $Mx1-Cre$ マウスを入手し、 $Vcan^{flox/flox}$ と交配させてインターフェロン誘導系のパーシカンコンディショナルノックアウトマウスを可及的速やかに樹立して研究を行う。

(2) $Vcan$ 欠損細胞培養系を用いた検討

$Vcan$ ノックインマウスの胎児線維芽細胞は自律性増殖を示す。従ってパーシカン欠損胎児線維芽細胞は、同様の異常を示すことが予測される。本細胞培養実験では、まず、線維芽細胞が自律性増殖を示すか否かを検討し、自律性増殖を示す場合、その機構を解明する。

4. 研究成果

(1) $Vcan$ コンディショナルノックアウトマウスの解析

①CAG-Cre: $Vcan^{flox/flox}$ マウスの解析

$Vcan$ のノックアウトマウスはジーントラップ法にて既に得られており、 hdf (heart defect) マウスとして報告されている。 hdf マウスの遺伝子変異部位は明らかにされているが同マウスが本当に $Vcan$ 発現を完全に欠失しているかどうかはわかっていない。そこで我々は、 $Vcan^{flox/flox}$ と CAG-Cre マウスとの交配により $Vcan$ 完全欠失マウス (CAG-Cre: $Vcan^{flox/flox}$) を作製し、同マウスの解析を行った。ヘテロ接合体には有意な表現型が見つからなかったがホモ接合体は全く出生しなかった。胎児死亡時期を検索したところ、全例 E10.5 前後に心形成異常を呈して死亡することが確認された。この表現型は hdf マウスの表現型と一致しており、 hdf マウスは $Vcan$ 完全欠失マウスと評価してよいと考えられた。

②Prx1-Cre: $Vcan^{flox/flox}$ マウスの解析

$Vcan$ は発生期四肢間充織に一過性に発現し、軟骨の初期発生に重要な役割を果たすと推測されている。しかし生体系を用いて当該の役割を詳細に解析した報告はない。そこで我々は、四肢間充織に発現する転写因子 Prx1 のプロモーターによって Cre 酵素を発現する Prx1-Cre トランスジェニックマウスと $Vcan^{flox/flox}$ マウスとの交配により Prx1-Cre: $Vcan^{flox/flox}$ を作製し、その解析を通じて同分子の軟骨発生における役割を検討した。

Prx1-Cre: $Vcan^{flox/flox}$ は正常に出生し妊

性にも異常はないが、四肢指に変形・湾曲が認められた。この異常はマウス系統の遺伝子的背景に関係なく全例で観察された。新生児の組織学的解析を行ったところ、肥大軟骨細胞から成る成長板内の結節、関節表面の傾斜、ならびに内軟骨骨化の遅延が認められた。これら異常の発症に関して胎生期軟骨の検索を行ったところ、肥大軟骨結節は関節表面の傾斜による軟骨細胞柱状構配列の変化によるものと判明した。さらに検討を進めたところ、同マウスにおいては関節間隙の前駆領域として知られるインターゾーンの拡大が観察され、上記の3つの異常は軟骨分化の遅延が原因と考えられた。 $Vcan$ 欠損による軟骨分化遅延機構を解明する目的で、E10.5-E11.5 マウス肢芽間葉系細胞の micromass culture を用いて軟骨初期分化に関与するシグナル分子の変化を検討したところ、野生型の細胞凝集塊において $Vcan$ と TGF β が形成途上の軟骨結節辺縁部に共局在していたのに対し、Prx1-Cre: $Vcan^{flox/flox}$ の結節辺縁部においてパーシカンは認められず TGF β の細胞外沈着が顕著に低下していた。以上の結果は $Vcan$ が TGF β を軟骨の初期発生部位に局在させることによって軟骨分化を促進することを示唆している (Choocheep K, et al, 2010)。

③Sm22-Cre: $Vcan^{flox/flox}$ マウスの作製と解析

大動脈の形成における $Vcan$ の役割を明らかにするために Sm22-Cre: $Vcan^{flox/flox}$ マウスを作製した。現在同マウスの解析を遂行している。

(2) $Vcan$ 欠損細胞培養系を用いた検討

胎生期 CAG-Cre: $Vcan^{flox/flox}$ マウスから胎児線維芽細胞の樹立を試みたが、その殆どは継代が不可能であり、また形態学的にも多様であった。そこで $Vcan^{flox/flox}$ マウスから胎児線維芽細胞ではなく皮膚線維芽細胞を獲得樹立し、培養系において Cre 酵素を発現させ $Vcan$ 欠失細胞の樹立を試みている。

一方で $Vcan$ ノックインマウスから獲得・樹立した胎児線維芽細胞の詳細な性状解析を行い、以下の $Vcan$ によるヒアルロン酸シグナル制御に関する以下の研究成果が得られた。

$Vcan$ の N-末端側 G1 ドメイン内の A サブドメインは $Vcan$ のヒアルロン酸との結合を補強する機能を持つ。私達は当該 A サブドメインの欠失した $Vcan$ を発現するノックインマウスを作製し、胎児線維芽細胞の培養系を用いて、A サブドメインの機能を検討した。野生型の培養系ではヒアルロン酸と $Vcan$ の十分な沈着が観察されたがノックイン細胞では両分子とも沈着が著減していた。また、ノックインの線維芽細胞は増殖が遅く継代 5 頃には早老症を呈した。マウス早老症には

ERK1/2 の持続的活性化が関与することが知られているが、当該細胞においても同シグナル分子の持続的活性化が観察された。同培養系において野生型細胞をヒアルロニダーゼあるいはヒアルロン酸オリゴ糖にて処理すると ERK1/2 のリン酸化が亢進した。ノックイン線維芽細胞に CD44 の機能阻害性抗体を投与すると ERK1/2 の活性化は抑制された。これらの結果は、Vcan がヒアルロン酸の細胞外マトリックスへの沈着を促進し、ヒアルロン酸のシグナル伝達を制御していることを示唆している (Swan K, 2009)。

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 13 件)

1. Choocheep K, Hatano S, Takagi H, Watanabe H, Kimata K, Kongtawelert P, Watanabe H: Versican facilitates chondrocyte differentiation and regulates joint morphogenesis. *J Biol Chem*, 2010, in press. (査読有)
2. Ito T, Yamashita H, Uekawa N, Umemoto T, Motoyoshi S, Imai H, Takahashi K, Watanabe H, Yamada M, Ueda K: Crucial role of vinexin for keratinocyte migration and epidermal wound healing in vivo. *Exp Cell Res*, 316, 1728-1738, 2010. (査読有)
3. Sugiura N, Baba Y, Kawaguchi Y, Iwatani T, Suzuki K, Kusakabe T, Yamagishi, K, Kimata K, Kakuta Y, Watanabe H: The Glucuronyl transferase activity of KfiC from *Escherichia coli* strain K5 requires association of KfiA: the essential enzymes for production of K5 polysaccharide, *N*-acetylheparosan. *J Biol Chem*, 285 1597-1606, 2010. (査読有)
4. Muramatsu K, Kusafuka K, Watanabe H, Mochizuki T, Nakajima T: Ultrastructural immunolocalization of a cartilage-specific proteoglycan, aggrecan, in salivary pleomorphic adenomas. *Med Mol Morphol*, 42, 47-54, 2009. (査読有)
5. Suwan K, Hatano S, Kongtawelert P, Pothachaloen P, Watanabe H: Alteration of chondroitin sulfate composition on proteoglycan produced by knockin mouse embryonic fibroblasts whose versican lacks the A-subdomain. *Ups J Med Sci*, 114, 73-81, 2009. (査読有)
6. Suwan K, Choocheep K, Hatano S, Kongtawelert P, Kimata K, Watanabe H: Versican/PG-M assembles hyaluronan into extracellular matrix and inhibits CD44-mediated signaling toward premature senescence in embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, 284, 8596-8604, 2009. (査読有)
7. Kusafuka K, Muramatsu K, Kasami M, Kuriki K, Hirobe K, Hayashi I, Watanabe H, Hiraki Y, Shukunami C, Mochizuki T, Kameya T: Cartilaginous features in matrix-producing carcinoma of the breast: four cases report with histochemical and immunohistochemical analysis of matrix molecules. *Modern Pathol*, 21, 1282-1292, 2008. (査読有)
8. Sugiura N, Shimokata S, Minamisawa T, Hirabayashi J, Kimata K, Watanabe H: Sequential synthesis of chondroitin oligosaccharides by immobilized chondroitin polymerase mutants. *Glycoconj J*, 25, 521-530, 2008. (査読有)
9. Zhu L, Zhuo L, Watanabe H, Kimata K: Equivalent involvement of inter- α -trypsin inhibitor heavy chain isoforms in forming covalent complexes with hyaluronan. *Conn Tiss Res*, 49, 48-55, 2008. (査読有)
10. Watanabe H, Shionyu M, Kimura T, Kimata K, Watanabe H: Splicing factor 3b subunit 4 binds BMPR-IA and inhibits osteochondral cell differentiation. *J Biol Chem*, 282, 20728-20738, 2007. (査読有)
11. Sugiura N, Shimokata S, Watanabe H, Kimata K: MS analysis of chondroitin polymerization: Effects of Mn²⁺ ions on the stability of UDP-sugars and chondroitin synthesis. *Anal Biochem*, 365, 62-73, 2007. (査読有)
12. Kusafuka K, Watanabe H, Kimata K, Hiraki Y, Shukunami C, Kameya T: Minute pleomorphic adenoma of the submandibular gland in the patient with oral malignancy: a report of two cases with histological and histochemical examination. *Histopathology*, 51, 258-261, 2007. (査読有)
13. Sakai K, Kimata K, Sato T, Gotoh M, Narimatsu H, Shinomiya K, Watanabe H: Chondroitin sulfate *N*-acetylgalactosaminyltransferase-1 plays a critical role in chondroitin sulfate synthesis in cartilage. *J Biol Chem*, 282, 4152-4161, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. Watanabe H, Suwan K, Choocheep K, Hatano S, Kongtawelert P, Kimata K
Versican/PG-M assembles hyaluronan into the extracellular matrix and inhibit CD44-mediated signaling toward premature senescence in embryonic fibroblasts
8th Panpacific connective Tissue Societies Symposium
2009年6月5日(湘南)
2. Watanabe H, Suwan K, Choocheep K, Hatano S, Kongtawelert P, Kimata K
Versican/PG-M assembles hyaluronan into the extracellular matrix and inhibit CD44-mediated signaling toward premature senescence in embryonic fibroblasts
第 61 回日本細胞生物学会大会
2009年6月2日(名古屋)
3. 渡辺秀人
バーシカン/PG-M の多彩な生体内機能
BMB2008 第 31 回分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同大会
2008年12月10日(神戸)
4. Watanabe H
In vivo function of versican/PG-M: analysis of knockin mice
13th Gordon Research Conference on Proteoglycans
2008年7月8日(Andover, NH, U.S.A.)
5. 渡辺秀人
コンドロイチン硫酸: 多様な糖鎖構造と合成機構
第 40 回日本結合組織学会学術大会・第 55 回マトリックス研究会大会合同学術集会(東京)
2008年5月30日
6. 坂井頭一郎、木全弘治、佐藤隆、後藤雅式、成松久、四宮謙一、渡辺秀人
CSGalNAcT-1 は軟骨組織におけるコンドロイチン硫酸合成に主要な役割を果たす
第 21 回日本軟骨代謝学会(京都)
2008年3月22日
7. 渡辺秀人
軟骨のプロテオグリカン会合体
第 21 回日本軟骨代謝学会(京都)
2008年3月21日
8. Watanabe H
In vivo function of versican: analysis of knockin mice
Panpacific Connective Tissue Society Symposium
(ケアンズ、オーストラリア)
2007年10月30日
9. 渡辺秀人
生体内におけるバーシカン/PG-M の機能

日本炎症再生医学会(東京)

2007年8月2日

[図書] (計 1 件)

1. Kimata K, Habuchi O, Habuchi H, Watanabe H: Knockout mice and proteoglycans. *In* Comprehensive Glycoscience, Volume IV, pp159-191, (Ed., Kamerling, J. P., et al., Elsevier, Amsterdam, 2007).

[その他]

ホームページ等

<http://nashi1/homepage2/topmenu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 秀人(WATANABE HIDETO)
愛知医科大学・分子医科学研究所・教授
研究者番号: 90240514

(2) 研究分担者

幡野その子(HATANO SONOKO)
愛知医科大学・分子医科学研究所・助教
研究者番号: 40434625
(H19→H21: 連携研究者)