

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18469

研究課題名（和文）骨・軟骨特異的に発現する線維性コラーゲンの発現調節機構の解明と組織再生への応用

研究課題名（英文）Transcriptional regulation of the fibrillar collagen genes (type V/XI/XXIV/XXVII) in osteoblasts and chondrocytes

研究代表者

樋田 真理子 (Hida, Mariko)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10737224

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：線維性コラーゲン分子は、細胞外マトリックス分子の主要構成成分であり、骨や軟骨形成をはじめとする骨格形成の制御に深く関与している。本研究では、各組織における細胞分化や機能維持の分子メカニズムについて明らかにするため、遺伝子発現調節機構の解析を行った。

軟骨組織において、XI型・XXVII型コラーゲン遺伝子では、ともに軟骨特異的エンハンサーが見出されたが、XI型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性に関与しているSp1と同様の配列が存在しているにも関わらず、XXVII型コラーゲン遺伝子では、Sp1による活性は認められず、異なる転写調節機構の存在が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線維性コラーゲン分子は、発生や分化・再生過程において、機能維持の制御といった重要な役割を担っているため、適切な細胞環境が維持されていない場合、骨・軟骨形成異常等の疾患を引き起こす要因となる。そこで、骨・軟骨組織における転写調節機構の解析を行うとともに関与する転写因子の同定を行い、その作用機序を解明することによって、疾患の早期の診断や治療への応用に役立つ新たな知見を得ることができるほか、再生医療への応用へもつながるのではないかと考える。

研究成果の概要（英文）：The fibrillar collagen genes are major components of the extracellular matrix. They has an important role in regulating the bone formation. This study analyzed the transcriptional regulation of these fibrillar collagen genes (type V/XI/XXIV/XXVII) in osteoblasts and chondrocytes.

Type XI and XXVII collagen genes indicated the cartilage-specific enhancer regions in chondrocytes. However, there are different transcriptional regulation systems between type XI and XXVII collagen genes. The promoter region of type XI collagen gene is activated by transcriptional factor Sp1 but, the promoter region of type XXVII collagen gene is not activated by Sp1 though type XXVII collagen gene has same sequences like GC-rich.

研究分野：分子生物学

キーワード：コラーゲン 骨 軟骨 転写

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックス分子は、高分子会合体を形成し、支持組織に機械的強度や柔軟性をもたらすとともに、細胞とのシグナル伝達を通じて、組織の発生過程における組織形成や分化・再生過程における機能維持等の制御に深く関与している。

また、線維性コラーゲン分子は、細胞外マトリックス分子の主要構成成分であり、骨や軟骨といった組織特異的に発現し、骨格形成において重要な役割を担っている。それゆえ、適切な細胞外の環境を保持する制御機構に問題が生じると骨・軟骨形成異常等の疾患を引き起こす要因となる。

そこで、発現量は少ないもののコラーゲン線維の直径を調節している V 型・XI 型コラーゲン遺伝子、骨・軟骨組織に局限して発現している XXIV 型・XXVII 型コラーゲン遺伝子に着目し、各コラーゲン遺伝子における組織特異的発現調節機構やトランスクリプトームによる転写・翻訳調節機構の解析を行い、分子メカニズムの解明および骨・軟骨形成異常等の疾患の診断、さらには再生医療への応用について検討することとした。

これまでに、XI 型コラーゲン遺伝子が転写因子 NF-Y によって制御されており、同様に V 型コラーゲン遺伝子においても NF-Y による制御が認められていることから、異なる遺伝子間において共通する発現調節機構の存在が明らかとなっている。また、組織特異的発現については、XI 型・XXVII 型コラーゲン遺伝子において、網羅的スクリーニング法により、軟骨特異的エンハンサーが見出されている。本研究では、こうした各コラーゲン遺伝子において共通する発現調節機構あるいは異なる発現調節機構の解析を通じて、包括的な線維性コラーゲン分子の作用機序を明らかにすることにより、骨・軟骨形成異常をはじめとする骨格形成に関与する疾患への治療法に対して新たな知見を得ることができるよう取り組むこととした。

2. 研究の目的

遺伝子発現は、基本転写調節機構であるプロモーター領域および組織特異的転写調節機構であるシスエレメント領域の相互作用によって制御されている。そこで、骨組織における V 型・XXIV 型コラーゲン遺伝子、軟骨組織における XI 型・XXVII 型コラーゲン遺伝子に着目し、各コラーゲン遺伝子の転写調節機構について検討を行うとともに、関与する転写因子を同定することによって、骨格形成における線維性コラーゲン分子の役割を明らかにできるように解析を進めた。

また、転写因子と複合体を形成し発現を調節する long ncRNA 等の各コラーゲン分子への関与についてあわせて検討を行い、転写・翻訳調節機構をはじめとするコラーゲン分子のトランスクリプトームによる作用機序を明らかにすることが、骨・軟骨組織の分化や機能維持における分子メカニズムの解明につながるのではないかと考え検証を試みることにした。

3. 研究の方法

転写調節機構を解析するにあたり、プロモーター解析については、長さの異なるルシフェラーゼコンストラクトを作製し、各種細胞へ導入後ルシフェラーゼアッセイを行った。さらに、活性が認められた領域を絞り込むため、欠失や変異を加えたルシフェラーゼコンストラクトを組み合わせることによって基本プロモーター領域の特定を試みた。また、プロモーター活性に関与する転写因子を同定するために、データベースを用いて配列より想定される転写因子の候補の検討を行った。

シスエレメント解析については、網羅的スクリーニング法により明らかとなったエンハンサー及びその近傍に位置するサイレンサーについて、プロモーターとイントロンをつないだルシフェラーゼコンストラクトを作製し、ルシフェラーゼアッセイを行い活性・抑制部位および関与する転写因子の特定を試みた。さらに、生体内での作用機序を明らかにするために発現ベクター等を用いた遺伝子導入実験において細胞内での発現パターンの検証を行った。

4. 研究成果

(1) 基本転写調節機構(プロモーター解析)について

発現量は少ないものの軟骨組織に局限して発現している XXVII 型コラーゲン遺伝子に着目すると、2つの選択的スプライシング産物が存在している。その組織局在は、下流に位置する転写産物では、皮膚組織に発現しており、上流に位置する転写産物では軟骨組織に発現が認められて

いるが、転写調節機構はそれぞれ異なっている。そこで、軟骨組織に発現している上流の転写産物について解析を進めると、そのプロモーター活性は、約 300bp の領域内に存在していることが明らかとなった。さらに、プロモーター領域を絞り込むため、同じく軟骨組織に発現している XI 型コラーゲン遺伝子において、転写因子 NF- κ B がプロモーター活性に関与しているほか、転写因子 Sp1 も関与していることが明らかとなっていることから、GC-rich の配列に着目し解析を進めることとした。XXVII 型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性領域である 300bp 内の GC-rich の配列に、変異を加えたルシフェラーゼコンストラクトを用い、ルシフェラーゼアッセイを行ったが、そのプロモーター領域を絞り込むことはできなかった。さらに、欠失したルシフェラーゼコンストラクトや、10bp ごとに変異を組み込んだルシフェラーゼコンストラクトを用いて、ルシフェラーゼアッセイを行ったが領域の特定および転写因子の同定には至っていない。そのためデータベースを用いて、配列から想定される転写因子の候補の選定を引き続き進めている。

一方で、V 型・XXIV 型コラーゲン遺伝子は、ともに骨組織に発現しており、V 型コラーゲン遺伝子については、転写因子 NF- κ B による制御のほか、骨分化誘導因子である Sp7/Osterix によって発現が増強することが明らかとなっている。また、XXIV 型コラーゲン遺伝子は、特に下顎骨においてシグナルを示すことが判明しているが、その生体内での発現調節機構については明らかにすることができなかったため、発現ベクターやノックダウンベクターを用いて引き続き検討を行う予定である。

(2) 組織特異的転写調節機構 (シスエレメント解析) について

軟骨組織において、XI 型コラーゲン遺伝子では、プロモーター領域の上流にエンハンサー活性領域を見出すことができた。さらに、関与する転写因子を同定するため、活性が認められた領域に長さの異なるルシフェラーゼコンストラクトを作製し、20bp ごとに欠失したルシフェラーゼコンストラクトを用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、約 40bp ほどに領域を特定することができた。また XXVII 型コラーゲン遺伝子の軟骨特異的シスエレメント領域については、軟骨に発現する上流の転写産物とイントロンを順につないだルシフェラーゼコンストラクトを用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果、エンハンサー領域を特定することができた。XI・XXVII 型コラーゲン遺伝子ともに、関与する転写因子の作用機序については、引き続き検討を行っている。

また、V 型・XXIV 型コラーゲン遺伝子については、骨特異的シスエレメント領域を明らかにするために骨芽細胞において網羅的スクリーニング法により検討を行ったが、骨特異的シスエレメント領域の特定には至らなかった。

今後は、long ncRNA 等の各コラーゲン遺伝子のプロモーターへの関与について解析を進めるとともに、骨や軟骨特異的なシスエレメントが分化過程に及ぼす影響について検討を行う予定である。具体的には、エンハンサーに関しては、骨・軟骨分化誘導機能について未分化幹細胞を用いて解析を行うほか、サイレンサーについては軟骨脱分化の制御機能について初代軟骨細胞を用いて解析を行い、再生医療への応用の可能性について検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Yano Hiroyuki, Hamanaka Ryoji, Zhang Juan Juan, Yano Mami, Hida Mariko, Matsuo Noritaka, Yoshioka Hidekatsu	4. 巻 60
2. 論文標題 MicroRNA-26 regulates the expression of CTGF after exposure to ionizing radiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radiation and Environmental Biophysics	6. 最初と最後の頁 411 ~ 419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00411-021-00915-9	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 矢野博之、濱中良志、樋田真理子、松尾哲孝、吉岡秀克	4. 巻 52
2. 論文標題 放射線誘発線維症における非コードRNAの関与	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 512-514
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 0件）

1. 発表者名 樋田真理子、矢野博之、吉岡秀克、松尾哲孝
2. 発表標題 軟骨特異的に発現するXXVII型コラーゲン 1鎖遺伝子(Co127a1)のプロモーター解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢野真美、矢野博之、濱中良志、樋田真理子、松尾哲孝、吉岡秀克
2. 発表標題 放射線による 型コラーゲン発現調節機構における長鎖非コード(lnc)RNAの機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋田真理子、矢野博之、松尾哲孝
2. 発表標題 プロモーター解析 XXVII型コラーゲン 1鎖遺伝子(CoI27a1)の軟骨特異的転写調節機構
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋田真理子 矢野博之 佐々木隆子 吉岡秀克 松尾哲孝
2. 発表標題 XXVII型コラーゲン 1鎖遺伝子(CoI27a1)の転写調節機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
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
---------	---------