

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日 現在

機関番号：14301  
 研究種目：基盤研究B  
 研究期間：2009 ～ 2011  
 課題番号：21390421  
 研究課題名（和文） 軟骨形成・分化にかかわる骨形成因子関連シグナルの解明と軟骨修復  
 研究課題名（英文） Analysis of BMP-mediated cartilage formation and differentiation, and cartilage repair  
 研究代表者  
 妻木 範行(TSUMAKI NORIYUKI)  
 京都大学iPS細胞研究所 教授  
 研究者番号：50303938

## 研究成果の概要（和文）：

Sox9は軟骨形成に必須であることが知られているが、軟骨ができた後の軟骨細胞におけるSox9の機能はわかっていなかった。軟骨細胞に分化し後に軟骨細胞特異的にSOX9を欠失するコンディショナルノックアウトマウスを作製して解析した。SOX9は細胞の生存に必須であることが判明した。その作用機序は、SOX9がPik3a-Akt経路を活性化することで細胞の生存を支えていることが判明した。また、Salt-inducible kinase 3 (SIK3)ノックアウトマウスでは、軟骨細胞の肥大化のステップが障害されていることを発見した。免疫組織学的解析では、SIK3ノックアウトマウスでは、増殖軟骨細胞のマーカーであるII型コラーゲンの発現が続き、肥大軟骨細胞のマーカーであるX型コラーゲンの発現が抑制されていた。細胞生物学、生化学的解析により、SIK3は細胞質に存在し、HDAC4と結合して、HDACの核外移行を促進することが判明した。軟骨細胞の肥大化は、転写因子MEF2Cによって促進される。軟骨細胞はSIK3を発現し、HDAC4を核外移行させて、MEF2CをHDAC4による抑制から解放することによって、肥大化すると考えた。これらの結果から、SIK3が軟骨細胞を増殖から肥大化分化へスイッチする、キー分子であると考えた。

## 研究成果の概要（英文）：

Sox9 in mesenchymal progenitors is important for their differentiation into chondrocytes, but its functions after differentiation into chondrocytes have not been determined. To investigate Sox9 function in chondrocytes precisely, we deleted Sox9 genes after differentiation into chondrocytes in mice. Sox9 inactivation in chondrocytes resulted in apoptosis. Molecular analysis revealed that Sox9 sustains chondrocyte survival through the p110 $\gamma$ -Akt pathway. As for searching new molecules which are involved in chondrocyte differentiation, we discovered that chondrocyte hypertrophy was markedly delayed in the growth plate cartilage in mice lacking salt-inducible kinase 3 (SIK3). SIK3 was required for anchoring HDAC4 in the cytoplasm, thereby releasing MEF2C, a critical facilitator of chondrocyte hypertrophy, from suppression by HDAC4 in the nuclei. From these results, we concluded that SIK3 facilitates chondrocyte hypertrophy during formation and maintenance of cartilage.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
平成22年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
平成23年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
平成24年度			
年度			
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

研究分野：整形外科学

科研費の分科・細目 骨・軟骨代謝学

キーワード：軟骨細胞、内軟骨性骨化、ノックアウトマウス、細胞分化、HDAC4

## 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。しかし軟骨細胞は高度に分化した細胞で、損傷部位の自然修復は期待できず、根治的な治療方法は無い。変性した軟骨を回復させて関節機能の回復を目指すためにも、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。軟骨形成・分化については、BMPシグナルの下流でSOX9が働いているとされる。SOX9は未分化間葉系細胞が軟骨細胞に分化する時には必須であることが分かっているが、分化した軟骨における機能は良くわかっていない。また、軟骨分化を制御する未知の因子が存在するであろう。これら既知の因子の詳細な解析及び、未知の因子を見つけて軟骨形成・分化制御機構を明らかにすることが、変性した軟骨を修復する方法の開発につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

研究の全体構想は、軟骨形成/分化の制御メカニズムを分子レベルで明らかにし、そこで得た知見をもとに、病的に変性・破壊された軟骨を修復する方法を開発することにある。その中で本研究の目的は、骨形成因子(BMP)シグナルの下流で働くSOX9の、成熟した軟骨細胞で働く仕組みを分子レベルで明らかにすることにある。また、軟骨分化制御に係る未知の因子を調べ、その機能を分子レベルで明らかにすることである。Sox9は軟骨細胞において、軟骨マトリックス遺伝子の転写に重要な役割を果たすことが知られている。遺伝子改変マウスの結果からSox9は軟骨形成に必須であることが知られているが、軟骨ができた後の軟骨細胞におけるSox9の本当の機能はわかっていない。これらのマウスでは軟骨が形成されないため、軟骨の解析が出来ないことがその理由である。また、軟骨細胞分化を制御する新たな因子としてSIK3を同定し、その作用機序を分子レベルで解析する。

## 3. 研究の方法

軟骨細胞にコミットした後のSOX9の機能を調べるために、Col11a2 prom-Cre; Sox9f/f conditional knockout mice (CKO)を作製し、胎子を種々のステージで解析する。Col11a2 prom-Creは、軟骨にコミットした後にCreリコンビナーゼ活性を表す。解析は胎子の軟骨の組織学的解析、遺伝子発現解析、アポトーシスの解析を行う。SOX9が軟骨細胞の生存維持にかかわるメカニズムを調べるために、Sox9とPtenのダブルのcKOを作製して解析した。Akt経路がかかわることが分り、さらにその下流を転写制御解析、クロマチン免疫沈降法などの分子生物学的手法を用いて調べた。軟骨細胞分化におけるSalt-inducible kinase 3 (SIK3)の機能を調べるために、SIK3ノックアウトマウスを解析した。組織学的、細胞生物学的、分子生物学的解析を行い、SIK3が軟骨細胞分化を制御するメカニズムを調べた。

## 4. 研究成果

1) 我々が開発したCol11a2 prom-Cre transgenic miceは増殖軟骨細胞以降のステージの軟骨細胞でCre recombinaseを発現する。Col11a2 prom-Cre; Sox9f/f conditional knockout mice (CKO)を作製し、胎子を種々のステージで解析した。交配後14.5日目のCKO上腕骨軟骨原基では、軟骨細胞の前肥大化および肥大が認められず、その部位の軟骨細胞は腔泡化し、細胞数が減少していた。in situ hybridizationでIhh およびCol10a1の発現は消失していた。免疫組織学的解析においてSox9はround proliferative chondrocyteに発現していたが、flat proliferative chondrocyteでは発現が消失していた。Sox9の発現消失部位に一致して、Col2a1 mRNAの発現が低下していた。腔泡化した軟骨細胞はcleaved caspase 3を発現し、タネル染色陽性であった。コントロールマウスの軟骨ではcleaved caspase 3の発現は認めず、タネル染色は陰性であった。これらの結果からSox9が欠失すると軟骨細胞は肥大軟骨細胞に分化せずに腔泡化し、アポトーシスに陥ると考えた。Sox9は軟骨形成だけでなく、その後の軟骨形質の維持および軟骨細胞の生存にも必須であると結論した。

2) さらに、SOX9が軟骨細胞の生存維持にかかわるメカニズムを調べた。この細胞のシグナルを調べたところ、MAPK関連の分子のリン酸化は保たれていたが、Aktのリン酸化が低下していた。そこで、Sox9とPtenのダブルのcKOを作製してAktのリン酸化を強制的に行ったところ、アポトーシスの程度が减弱し、Sox9 cKOの表現型がレスキューされた。このことから、Sox9はAkt経路を通じて軟骨細胞の生存を支えていると考えた。さらに、Sox9のターゲット遺伝子を探索したところ、PI3Kサブユニットの一つであるPik3caの発現がSox9 cKOで低下していることがわかった。さらに、ルシフェラーゼアッセイやクロマチン免疫沈降法を用いた解析により、Pik3caのプロモーターにSox9が結合し、発現レベルを調節していることが判明した。このことから、Sox9の軟骨細胞における機能は、Pik3a-Akt経路を活性化することで、軟骨細胞の生存を支えることが判明した。

3) 四肢及び体幹の骨格は内軟骨性骨化の過程を経て形成される。即ち、未分化間葉系細胞は凝集し、凝集間葉系細胞は軟骨細胞へと分化する。軟骨細胞は増殖しながら軟骨細胞外マトリックスを構築して、軟骨原基を作る。軟骨原基の中心部では、軟骨細胞の増殖が止まり、肥大化が始まる。肥大軟骨細胞はやがてアポトーシスに陥り、骨組織に置換されて、骨格が形成される。この過程は正常な骨格の形成に必須の過程である。我々はSalt-inducible kinase 3 (SIK3)ノックアウトマウスでは、軟骨細胞の肥大化のステップが障害されていること

を発見した。SIK3ノックアウトマウスは軟骨が増大し、骨格の内部は軟骨で充填されていた。生後のSIK3ノックアウトマウスの関節軟骨は著しく肥厚していた。免疫組織学的解析では、SIK3ノックアウトマウスでは、増殖軟骨細胞のマーカーであるII型コラーゲンの発現が続き、肥大軟骨細胞のマーカーであるX型コラーゲンの発現が抑制されていた。SIK3の発現は増殖軟骨細胞で低く、前肥大軟骨細胞と肥大軟骨細胞で高かった。野生型コントロールマウスの軟骨細胞ではHDAC4は核外に局在していたが、SIK3ノックアウトマウスの軟骨細胞では、HDAC4が核内に存在していた。細胞生物学、生化学的解析により、SIK3は細胞質に存在し、HDAC4と結合して、HDACの核外移行を促進することが判明した。軟骨細胞の肥大化は、転写因子MEF2Cによって促進される。軟骨細胞はSIK3を発現し、HDAC4を核外移行させて、MEF2CをHDAC4による抑制から解放することによって、肥大化すると考えた。これらの結果から、SIK3が軟骨細胞を増殖から肥大化分化へスイッチする、キー分子であると考えた。

#### 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8件)

- ① Suzuki D, Yamada A, Amano T, Yasuhara R, Kimura A, Sakahara M, Tsumaki N, Takeda S, Tamura M, Nakamura M, Wada N, Nohno T, Shiroishi T, Aiba A, Kamijo R、Essential mesenchymal role of small GTPase Rac1 in interdigital programmed cell death during limb development.、Dev. Biol.、査読有、335、2009、396-406
- ② Sasagawa, S., Takemori, H., Uebi, T., Ikegami, D., Hiramatsu, K., Ikegawa, S., Yoshikawa, H. and Tsumaki, N.、SIK3 is essential for chondrocyte hypertrophy during skeletal development in mice, Development、査読有、139 巻、2012、1153-1163、DOI10.1242/dev.072652
- ③ Okamoto, M., Murai, J., Imai, Y., Ikegami, D., Kamiya, N., Kato, S., Mishita, Y., Yoshikawa, H. and Tsumaki, N.、Conditional deletion of Bmpr1b in differentiated osteoclasts increases osteoblastic bone formation, increasing volume of remodeling bone in mice.、J. Bone Miner. Res.、査読有、26巻、2011、2511-22、DOI:10.1002/jbmr.477
- ④ Outani, H., Okada, M., Hiramatsu, K., Yoshikawa, H and Tsumaki, N.、Induction of chondrogenic cells from dermal fibroblast culture by defined factors does not involve a pluripotent state.、Biochem. Biophys. Res. Commun.、査読有、411巻、2011、607-12、DOI:10.1016/j.bbrc.2011.06.194

[学会発表] (計8件)

- ① 妻木範行、Regulatory sequences of the  $\alpha 2$ (XI) collagen chain gene and chondrogenesis、6th Meeting of Bone Biology Forum、2009/8/21、静岡市
- ② Noriyuki Tsumaki、Directed induction of hyaline chondrogenic cells from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors、Korean Society Of Osteoporosis、2011/4/30-5/1、Seoul, Korea
- ③ 妻木範行、軟骨細胞リプログラミングと軟骨マトリックス遺伝子発現、日本整形外科学会基礎学術集会、2011/10/20-21、群馬、前橋市
- ④ Noriyuki Tsumaki、Directed induction of chondrogenic cells from mouse dermal fibroblast culture、1st Bio-Rheumatology International、2011/11/14-16、東京

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称： 軟骨疾患治療薬のスクリーニング方法および軟骨疾患治療用改変軟骨細胞

発明者： 妻木範行

権利者： 大阪大学医薬基盤研究所

種類： 特願

番号： 2011-121788

出願年月日： 2011/5/31

国内外の別： 国内

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

[http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/tsumaki\\_summary.html](http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/tsumaki_summary.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

妻木範行 ( TSUMAKI NORIYUKI)

京都大学iPS細胞研究所・教授

研究者番号 : 50303938

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :