

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 24 年 5 月 21 日現在

機関番号： 12601
 研究種目： 挑戦的萌芽研究
 研究期間： 2010～2011
 課題番号： 22659265
 研究課題名（和文）細胞質内輸送タンパク SNX による軟骨誘導リガンドの応答性調節機構の解明

研究課題名（英文）Research of molecular mechanisms regulating responsiveness to chondrogenic cytokines by intracellular trafficking protein SNX.

研究代表者

竹下 克志 (TAKESHITA KATSUSHI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30262009

研究成果の概要（和文）：

SNXファミリーは25サブタイプから構成される輸送タンパクであり、特にSNX19は軟骨細胞で高発現していた。Snx19は各分化段階で軟骨細胞に広く発現していた。SNX19は軟骨の基質産生能を高める作用があることが確認されたが、その詳細な分子メカニズムは検討中である。

研究成果の概要（英文）：

SNX19, a member of the SNX family of intracellular trafficking proteins, was highly expressed in chondrocytes through their differentiation. SNX19 enhanced the production of cartilage matrix like Col2a1; however, the molecular mechanism underlying the enhancement was still unrevealed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

我々は軟骨細胞の分化誘導を効率的に行うための条件検討として、軟骨細胞の生理的分化に関与する分子の検討を行ってきた。特に軟骨特異的マーカー2型コラーゲンや、その上流分子 SOX9 の転写解析を通じていくつかの軟骨分化誘導能を持つ遺伝子を同定しており、今回はさらにその2型コラーゲンのエンハンサーとプロモーターを組み合わせた

蛍光レポーターカセットを未分化軟骨系細胞株に導入し、軟骨分化をリアルタイムにモニタリングできるシステムを構築した (ATDC5-G2ER 細胞)。このモニタリング細胞を用いて我々は低分子化合物のスクリーニングなども行ってきたが、今回は cDNA ライブラリーを用いた発現クローニングを行い、軟骨分化誘導能を有する輸送タンパク SNX19 を同定した。

2. 研究の目的

軟骨細胞における SNX family の発現、機能を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

マウス軟骨細胞および軟骨細胞株を用いて、リアルタイム RT-PCR、Western Blotting、細胞免疫染色などで発現を解析した。レトロウイルスベクターや siRNA を用いて SNX 遺伝子を強制発現もしくは発現抑制した。

4. 研究成果

SNX ファミリーは 25 サブタイプから構成される輸送タンパクであり、これらのヒト組織 cDNA パネルを用いた逆転写リアルタイム PCR による軟骨での発現を確認したところ、SNX19 が軟骨細胞で最も高く発現していた。これをレトロウイルスにて ATDC5-C2ER 細胞に導入し、特異的な赤い蛍光がみられることを確認した。また同時に COL2A1 遺伝子の発現上昇がみられることもリアルタイム RT-PCR で確認した。in vivo での発現パターンを免疫化学染色、whole mount in situ hybridization にて確認したところ、Sox9 と類似した発現パターンであり、軟骨の初期から後期分化にかけて広く発現し、徐々に増強する傾向があることが分かった。

リガンド、受容体を介する既知軟骨分化シグナル伝達系には、TGF- β /BMP2-SMAD 経路、TGF- β /BMP2-TAK1-MKK6-p38 経路、PTHrP-PTHr1-Gs-PKA 経路、FGF-FGFR3-RAS-ERK 経路、SHH-Ptch/Smo-GLI 経路などが存在するが、スクリーニングで得られた SNX19 とこれらシグナル伝達分子との関係を、過剰発現系においてウェスタンブロットングにて評価したところ、特定のシグナル経路に強く関与する傾向はつかめなかった。SNX は輸送タンパクであるが、このような上流の特定の分子を輸送するものではない可能性が高く、SOX9 を中心とした転写レベルに近いところが作用点である可能性が考えられる。これまで転写因子として RUNX, HIF, CEBP, SOX, GATA, Sp, Klf, Hes/Hey, MEF など既知の軟骨分化に関与するものとの関係について検討を行っているところであるが、SNX との分子相互作用を証明するには至っていない。

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) ※すべて査読あり

1. Kato S, Takeshita K, et al. Neurological recovery after posterior decompression

surgery for anterior dural compression in paralytic spinal metastasis. Arch Orthop Trauma Surg. E-pub 2012.

2. Tonosu J, Takeshita K, et al. The normative score and the cut-off value of the Oswestry Disability Index (ODI). Eur Spine J. E-pub 2012.
3. Chikuda H, Yasunaga H, Horiguchi H, Takeshita K, et al. Mortality and morbidity in dialysis-dependent patients undergoing spinal surgery: analysis of a national administrative database in Japan. J Bone Joint Surg Am. 94:433-8, 2012.
4. Kato S, Fukai A, Takeda H, Taketomi S, Nakayama S, Hirota J, Nakajima K, Nakamura K, Nakagawa T. Immunohistological analysis of extracted anterior cruciate ligament graft impinged against posterior cruciate ligament. Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol. 3:26, 2011.
5. Taketomi S, Hiraoka H, Nakagawa T, Miyamoto Y, Kuribayashi S, Fukuda A, Takeda H, Fukai A, Hirota J, Nakajima K, Haga N, Nakamura K. Osteochondral autograft for medial femoral condyle chondral lesions in a patient with multiple epiphyseal dysplasia: long-term result. J Orthop Sci. 2011 [Epub ahead of print]
6. Kanetaka M, Sugita S, Chikuda H, Takeshita K, et al. Use of Doppler ultrasonography to detect an elusive communication of a spinal extradural arachnoid cyst. J Clin Neurosci. 18:63-4, 2011.
7. Takeda H, Nakagawa T, Nakamura K, Engebretsen L. Prevention and management of knee osteoarthritis and knee cartilage injury in sports. Br J Sports Med. 45:304-9, 2011.
8. Hirata M, Nakagawa T, et al. C/EBP β and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 α as the inducer in chondrocytes. Hum Mol Genet. 21:1111, 2012.
9. Fukai A, Nakagawa T, et al. Lack of a chondroprotective effect of cyclooxygenase 2 inhibition in a surgically induced model of osteoarthritis in mice. Arthritis Rheum 64:198, 2012.
10. Takeshita K, et al. Is a right pedicle screw always away from the aorta in scoliosis? Spine (Phila Pa 1976). 36:E1519-24, 2011
11. Chikuda H, Seichi A, Takeshita K, et al.

Acute cervical spinal cord injury complicated by preexisting ossification of the posterior longitudinal ligament: a multicenter study. Spine (Phila Pa 1976). 36:1453-8, 2011.

12. Takeshita K, et al. Aorta movement in patients with scoliosis after posterior surgery. Spine (Phila Pa 1976). 35:E1571-6,2010.
13. Saito T, Nakagawa T, et al. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. Nat Med 16:678,2010.

〔学会発表〕（計 1 件）

1. Takeshita K, et al. Predictability of surgical correction of scoliosis by supine, side-bending, fulcrum and traction radiographs 17th International Meeting on Advances Spine Techniques 2010. 7 21 Toronto, Canada

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 克志 (TAKESHITA KATSUSHI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30262009

(2) 研究分担者

中川 匠 (NAKAGAWA TAKUMI)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90338385

廣田 仁聡 (HIROTA JINSO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30570733
(H22)

(3) 連携研究者

特になし