

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592221

研究課題名(和文) 癌関連蛋白スノーエヌの変形性関節症制御標的分子としての機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of an oncogene SnoN as a target molecule to regulate progression of osteoarthritis.

研究代表者

前田 真吾 (Maeda, Shingo)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：60353463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症(OA)は、患者の活動性を奪い、生命をも脅かすロコモティブ・シンドロームの主因である。その抑制機構としてTGF-βシグナルに注目し、その下流で誘導されるSnoNについて治療標的分子としての可能性について検討した。関節軟骨細胞は分化進行を止めているが、OAでは異常に分化成熟が起こる。SnoNは正常関節軟骨には発現せず、軟骨細胞が肥大成熟すると発現し、OA軟骨で誘導されていた。SnoNが軟骨細胞分化を進めるBMPシグナルを抑制する事で、結果として軟骨細胞成熟を制御する事が分かった。SnoNの機能を強めるとTGF-β添加と同じ結果になったので、OA予防・治療の標的と成りうる。

研究成果の概要(英文)：Osteoarthritis (OA) suppresses activity of patients, which conditions often lead patients to death. Loss of TGF-beta signaling in mice promotes hypertrophic maturation of chondrocytes in articular cartilage, the phenotype of OA. Among the downstream molecules of TGF-beta signaling, we focused on SnoN to examine its roles in chondrocyte maturation and pathogenesis of OA. SnoN was not expressed in human normal articular cartilage or immature chondrocytes of mice, while it was detected in human OA cartilage as well as in matured mouse chondrocytes. During BMP-induced chondrogenesis in vitro, SnoN suppressed BMP signaling to inhibit the chondrocyte maturation. Gain-of-function of SnoN mimicked the effects of TGF-beta application, therefore, SnoN was suggested to be a novel molecular target in treatment or prevention of OA.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：変形性関節症 TGF-β BMP SnoN

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は、関節軟骨の変性による関節機能破綻が患者の活動性を奪い、結果として生命を脅かすロコモティブ・シンドロームの主因の一つである。関節軟骨を形成する静止軟骨細胞の分化が異常に進行し、成熟した肥大軟骨細胞に分化進行する事が、発症トリガーとしてクローズアップされている。その中でも Transforming growth factor- β (TGF- β)シグナルの役割は重要で、マウスにおけるその破綻モデルは、共に膝関節のOAを自然発症し、関節軟骨の異所性肥大軟骨分化を伴うことから、TGF- β シグナルは関節静止軟骨細胞の肥大分化抑制を介して、OAの発症・進展を制御していると示唆されている。従ってTGF- β シグナルの関節軟骨での人為的増強は、OAの予防や治療に有利な方向に働くと予想出来るので、TGF- β シグナルの下流でOA制御に関わる直接的メカニズムを明らかにし、それを分子標的としてピンポイントに調節する事で、軟骨肥大化抑制にのみ働く画期的なOA治療法開発に結びつく可能性を探る。

2. 研究の目的

TGF- β と同じファミリーに属し、シグナル伝導システムの一部を共有するBone morphogenetic protein (BMP)が、TGF- β と逆に軟骨細胞肥大化を促進する事がわかっているため、”TGF- β で誘導されるBMPシグナル抑制因子が軟骨細胞肥大化抑制に関わる”という仮説を立てた。我々は既に前駆軟骨細胞ATDC5を用いた先行スクリーニング研究で、既知のBMPシグナル阻害因子(Smad6, Smad7, Noggin, Chordin, Dan, Cerberus, Smurf1, Smurf2, Ski, SnoN)のうち、ATDC5においてTGF- β で誘導され、TGF- β シグナル阻害剤SB431542で発現が抑制される遺伝子候補として、転写抑制因子SnoNを同定した。SnoNとOAを関連づけた研究・報告はまったく無く、SnoNの新たな機能を発掘し、OA治療の新たな展望につなげる。

3. 研究の方法

SnoNの軟骨分化過程、特に分化成熟肥大化におけるSnoNの発現パターン(mRNAレベル及び蛋白レベル)を*in vitro*と*in vivo*で検討し、この際軟骨細胞においてもSnoNのTGF- β 誘導性が保たれているか評価した。SnoNのgain of functionとloss of functionによる軟骨分化変化を、

特にBMPシグナルへの影響に注視しつつ*in vitro*で検討した。ヒトOA軟骨、特に異所性肥大軟骨形成部位におけるSnoN発現の変化が観られないか、免疫組織化学的に検討し、ヒトOAにおけるSnoN発現・プロファイルを収集した。マウス胎仔軟骨培養系に、SnoNの発現ウイルスを誘導して、SnoNの軟骨肥大化への影響を検証した。

4. 研究成果

まずマウス胎仔軟骨培養系及び軟骨細胞培養系に、BMP-2を加えて軟骨肥大成熟が進行したところに、TGF- β 1を加えるとこれがキャンセルされ、TGF- β 阻害剤にて回復した。この時、内因性のTGF- β 1の発現が増加し、このTGF- β シグナルの亢進が、内因性BMPシグナルを抑制していた。BMP-2で誘導する軟骨細胞分化系において、後期成熟期にSnoNの発現が増加する事をmRNAと蛋白レベルで確認した。またSnoN蛋白は、マウス成長軟骨においては前肥大層から肥大層の成熟軟骨細胞に強く発現していた。それまでSnoNはTGF- β シグナルを抑える転写抑制因子として知られていたが、BMPレポーター・アッセイ等からBMPシグナルも抑える事が分かった。軟骨細胞でSnoNをノックダウンすると、BMPシグナルと軟骨細胞成熟(*Col10a1*と*Alp*の発現)が亢進した。マウス胎仔軟骨培養系にSnoN発現レンチウイルスを導入すると、BMP-2添加によって促進した軟骨肥大成熟が抑制された。ヒトOA軟骨における免疫染色では、SnoNは正常関節軟骨には発現しないが、中等度OAの軟骨においては、肥大マーカーX型コラーゲン発現細胞の近傍で重複せずに発現しており、SnoNがOA進展に抑制的に働いている可能性が示唆された。以上の成果は、論文[Kawamura I, Maeda S (corresponding) *et al.*, *J Biol Chem*, 287: 29101-29113, 2012]に報告した。その後、さらに同様の機構により軟骨細胞成熟を抑制する分子としてSmpd3を同定し、報告した[Kakoi H, Maeda S (equally first, corresponding) *et al.*, *J Biol Chem*, 289: 8135-8150, 2014]。

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3件)

1. Human Immunodeficiency Virus Type I Enhancer Binding Protein 3 is Essential for the Expression of Asparagine-linked Glycosylation 2 in the Regulation of

Osteoblast and Chondrocyte Differentiation. Imamura K, Maeda S (corresponding), Kawamura I, Matsuyama K, Shinohara N, Yahiro Y, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S. J Biol Chem 289: 9865-9879, 2014 査読有り

2. BMP signaling upregulates neutral sphingomyelinase 2 to suppress chondrocyte maturation via the Akt signaling pathway as a negative feedback mechanism. Kakoi H, Maeda S (corresponding), Shinohara N, Matsuyama K, Imamura K, Kawamura I, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S. J Biol Chem 289: 8135-8150, 2014 査読有り
3. SnoN suppresses maturation of chondrocytes by mediating signal cross-talk between transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein pathways. Kawamura I, Maeda S (corresponding), Imamura K, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S. J Biol Chem 287 : 29101-29113, 2012 査読有り

〔学会発表〕(計 13 件)

(国際)

Orthopaedic Research Society 2013 Annual Meeting 【San Antonio, TX, USA】 January 26-29, 2013

1. TGF- β signaling is highly active to induce SnoN in ectopically hypertrophying chondrocytes in degenerating osteoarthritis cartilage. - Evaluating SnoN as a molecular target for regulating progression of chondrocyte maturation -
^{1,2}Kawamura, I; ¹Maeda, S; ^{1,2}Imamura, K; ²Yokouchi, M; ¹Ishidou, Y; ^{1,2}Komiya, S
¹Department of Medical Joint Materials, Kagoshima University, Kagoshima, JAPAN
²Department of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University, Kagoshima, JAPAN

The 2nd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program“Cooperative International Framework in TGF- β Family signaling” 【Tokyo, Japan】 October 29-30, 2012

2. SnoN mediates a signal crosstalk between TGF- β and BMP pathways in chondrocytes to prevent hypertrophic maturation
Department of Medical Joint Materials, Kagoshima University

Maeda S, Kawamura I, Imamura K, Ishidou Y, Komiya S
Department of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University
Kawamura I, Imamura K, Yokouchi M, Komiya S

1st Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting with Australian and New Zealand Bone and Mineral Society (ANZBMS) 22nd Annual Scientific Meeting 【Perth, Australia】 September 2-5, 2012

3. SnoN mediates a crosstalk between TGF- β and BMP signaling to suppress hypertrophic maturation of chondrocytes
Department of Medical Joint Materials, Kagoshima University, Kagoshima, Japan
Kawamura I, Maeda S, Imamura K, Ishidou Y, Komiya S

The 22nd Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium 【Nikko-Tochigi, Japan】 June 7-9, 2012

4. Endogenous TGF- β -induced SnoN prevents BMP signaling and subsequent hypertrophic differentiation of chondrocytes
Department of Medical Joint Materials, Kagoshima University, Kagoshima, Japan
Kawamura I, Maeda S, Imamura K, Ishidou Y, Komiya S
Department of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University, Kagoshima, Japan
Kawamura I, Imamura K, Yokouchi M, Komiya S

58th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 【San Francisco, CA, USA】 February 4-7, 2012

5. SnoN prevents BMP-induced hypertrophic conversion of chondrocytes
Department of Medical Joint Materials, Kagoshima University, Kagoshima, Japan
Kawamura I, Ishidou Y, Imamura K, Komiya S, Maeda S
Department of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University, Kagoshima, Japan
Kawamura I, Imamura K, Yokouchi M, Komiya S

1st Bio-Rheumatology International Congress 【Urayasu, Japan】 November 14-16, 2011

6. TGF- β signaling induces SnoN to suppress BMP-induced hypertrophic maturation of chondrocytes

Maeda S, Kawamura I, Ishidou Y, Imamura K, Yokouchi M, Komiya S

(国内)

第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会【名古屋市】2012 年 10 月 26 日~27 日(名古屋市立大学大学院医学研究科整形外科学)

7. 軟骨細胞肥大分化過程における TGF- β シグナル標的遺伝子 SnoN の機能解析と変形性関節症との関連
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座
河村一郎, 前田真吾, 今村勝行, 石堂康弘, 小宮節郎
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学
河村一郎, 今村勝行, 横内雅博, 小宮節郎

第 30 回日本骨代謝学会学術集会【東京都】2012 年 7 月 19 日~21 日(東京大学分子細胞生物学研究所骨関節疾患制御研究分野)

8. 軟骨細胞肥大分化成熟期における TGF- β シグナルと BMP シグナルのクロストーク
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座
河村一郎, 前田真吾, 今村勝行, 石堂康弘
鹿児島大学大学院運動機能修復学講座整形外科学
河村一郎, 今村勝行, 横内雅博, 小宮節郎

第 25 回日本軟骨代謝学会【名古屋市】2012 年 3 月 9 日~10 日(藤田保健衛生大学医学部整形外科学教室)

9. TGF- β シグナル標的遺伝子 SnoN の軟骨細胞成熟過程における役割と変形性関節症との関連
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座
河村一郎, 石堂康弘, 今村勝行, 前田真吾, 小宮節郎
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学
河村一郎, 今村勝行, 横内雅博, 小宮節郎

第 34 回日本分子生物学会年会【横浜市】2011 年 12 月 13 日~16 日(学習院大学理学部)

10. SnoN mediated a signal crosstalk between TGF- β and BMP in maturing chondrocytes
Department of Medical Joint Materials,

Kagoshima University, Kagoshima, Japan / Department of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University, Kagoshima, Japan
Kawamura I, Imamura K, Yokouchi M, Komiya S

Department of Medical Joint Materials, Kagoshima University, Kagoshima, Japan
Ishidou Y, Maeda S

第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会【前橋市】2011 年 10 月 20 日~21 日(群馬大学大学院医学系研究科器官機能制御学講座整形外科学)

11. 軟骨細胞肥大分化過程における SnoN の機能解析と変形性関節症との関連
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座/
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学
河村一郎, 今村勝行, 小宮節郎
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座
石堂康弘, 前田真吾
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学
横内雅博

第 29 回日本骨代謝学会学術集会【大阪市】2011 年 7 月 28 日~30 日

12. 軟骨細胞分化成熟における SnoN の発現と機能
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座
河村一郎, 今村勝行, 石堂康弘, 前田真吾
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学
横内雅博, 小宮節郎

第 24 回日本軟骨代謝学会【福岡市】2011 年 3 月 4 日~5 日(九州大学医学部整形外科)

13. Oncogene SnoN の軟骨細胞成熟肥大過程における機能解析と変形性関節症との関連
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学
河村一郎, 今村勝行, 山元拓哉, 善明美千久, 井尻幸成
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座/鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学
石堂康弘, 前田真吾
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科運動機能修復学講座整形外科学/鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医療関節材料開発講座
小宮節郎

〔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.orthop-kagoshima-u.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田真吾 (MAEDA SHINGO)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：60353463

(2) 研究分担者

小宮節郎 (KOMIYA SETSURO)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30178371

石堂康弘 (ISHIDOU YASUHIRO)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：10300740

(3) 連携研究者 なし