

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659667

研究課題名(和文) MAML を基点とする軟骨細胞肥大分化制御ネットワークの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the MAML-focused network system of hypertrophic differentiation in chondrocytes.

研究代表者

小野 貴司 (Ono, Takashi)

東京大学・医学部附属病院・届出診療医

研究者番号：00506248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円、(間接経費) 840,000 円

研究成果の概要(和文)：軟骨細胞分化の各過程における各MAML family の発現パターンを胎児軟骨成長板において確認したところ、肥大軟骨層においてMAML1およびMAML2がやや強く発現している傾向がみられた。未分化軟骨細胞株ATDC5を用いた分化誘導系において、各段階における発現パターンを解析したところ、後期分化においてMAML1およびMAML2の発現が上昇していた。各MAML分子の未分化軟骨系細胞ATDC5およびマウス初代関節軟骨細胞における過剰発現系とRNAiによる抑制系を作成し、培養細胞内における機能解析を行ったところ、過剰発現系においてはMmp13の発現上昇がみられた。

研究成果の概要(英文)：We checked the expression patterns of MAML family in mouse embryonic limb cartilage and found that MAML1 and MAML2 expressed in chondrocytes in hypertrophic zone. We further examined the expression patterns of MAML family by real-time RT-PCR during differentiation of cultured mouse chondrogenic cell line ATDC5 in the presence of insulin. The m-RNA levels of MAML1 and MAML2 were increased in their terminal differentiation stages. Overexpression of MAML1 and MAML2 in ATDC5 cells and immature murine articular chondrocytes stimulated Mmp13 expression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：軟骨細胞 肥大分化

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症などの運動器変性疾患は高齢者の生活の質を低下させるロコモティブシンドロームの中心的な疾患であり、関節軟骨の変性予防や、修復・再生といった本質的な治療技術は緊喫の社会的要請となっている。我々は長年軟骨細胞を制御するシグナル群の解明に取り組み、軟骨内骨化の後期にみられる肥大分化の過程が変形性関節症においてもみられること、また肥大分化促進分子を抑制することによって変形性関節症の発症・進展を抑えられることを証明してきた。(Nature Med16:678,2010; Arthritis Rheum 62:826,2010; PLoS One 4:e4543, 2009; J Clin Invest 118:2506,2008; Dev Cell 14:689,2008; Gene 416:53,2008; EMBO Rep 8:504,2007; Nature Med 12:665,2006; Arthritis Rheum 54:2462,2006; Genes Dev 18:2418,2004 )

肥大分化については PTHrP/Ihh, Wnt, MEF2C など数多くのシグナル・分子が関与することが知られているが、それぞれが個別に解析されるばかりで、それぞれの間でどのような調整機構が存在するのかわかっていない。肥大分化過程を変形性関節症の治療標的シグナルとするにはこれらの相互調節機構の解明が必要不可欠と考えられる。

分子生物学的研究において研究の中心は特定のシグナルであることが多く、ある現象の中でその対象シグナルがどのように作用するかを解析するスタイルが一般的である。軟骨内骨化の研究も同様で、これまで軟骨内骨化の制御に関する研究は盛んに行われ、数多くのシグナルが関与することが明らかとなっているが、それぞれのシグナルを結ぶ横のつながりについてはあまり注意が払われてこなかった。軟骨内骨化は軟骨細胞が整然と配列した状態で分化し、関連するシグナルが障害されるとその配列は容易に乱れることから、軟骨内骨化は極めて繊細な制御を受けていることが推測される。そうすると当然お互いのシグナルを結ぶ調節機構があるはずであるが、現時点ではそのようなネットワークを示唆する研究報告はない。

我々は、最近取り組んでいる Notch シグナルの共役分子である Mastermind-like (MAML) family 分子が、NF- $\kappa$ B, Wnt, Runx2, MEF2C などの多くの肥大分化制御シグナル・分子とも共役することに注目し、MAML family 分子を切り口にこれらの相互調節機構の解明に挑戦する計画を立てた。本研究ではシグナルの主役を担う分子ではなく、転写共役分子というシグナルの脇役に焦点を当てている。特に MAML family は Notch, NF- $\kappa$ B, Wnt, Runx2, MEF2C などの多くの肥大分化制御シグナル・分子とも共役することが知られており、肥大分化に関わるほとんどのシグナルと繋がりうる可能性を秘めている。さらに MAML family 分子は細胞のアポトーシスを誘導する癌抑制遺伝

子 p53 遺伝子の転写共役分子としても知られており、肥大分化のみならずその後のアポトーシスをも制御する可能性がある。

### 2. 研究の目的

軟骨内骨化の後期にみられる肥大分化の過程は近年多くのシグナルの関与が解明されてきており、また変形性関節症において軟骨細胞で起きている病的な肥大分化と共通する過程としても注目されている。MAML family 分子は、肥大分化を制御することが *in vivo* で証明されている Notch, NF- $\kappa$ B, Wnt, Runx2, MEF2C との関与がそれぞれ報告されている転写共役分子であるが、MAML 自身に焦点を当てた軟骨領域での目立った研究報告はない。

これまで我々はマウス変形性関節症モデルを用いた検討によって、肥大分化制御シグナルは骨格の成長を司るだけでなく、変形性関節症の治療標的にもなりうる可能性を報告してきた。しかしながらこれらの多くの関連分子の中から治療標的を絞り込む上で、その分子を修飾した結果どのような生体現象がみられるかを予測するため、影響の及ぶシグナルを予め知る必要がある。

本研究によって肥大分化制御シグナルの相互調節機構が解明されれば、これまで知られていなかったシグナルや分子の関与が芽づる式に解明される可能性があり、発生学的においても骨格形成を理解する上でブレークスルーとなりうるが、変形性関節症の治療標的として最も効果的で、かつ副作用の少ない分子を選別する際にも大きく貢献すると考えられる。本研究は新規性ある MAML という分子を研究対象とするだけでなく、これらの肥大分化制御シグナルの相互調節機構を解明することで変形性関節症発症メカニズムの詳細を明らかにし、治療標的候補分子を見つけることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず MAML family 分子に焦点を当て、軟骨細胞における機能を解析するとともに、クロマチン免疫沈降シーケンシング法 (ChIP-seq) により肥大分化過程での MAML family の標的とするシグナルや分子をスクリーニングし、さらにそれを実験的に検証する。これらの作業により、肥大分化制御シグナルの横のつながりを網羅的に解明することを目指した。

具体的には以下のテーマに分けて検討を行った。

#### (1) MAML family 分子の発現パターンの解析

まず四肢軟骨内骨化過程における MAML family 分子の発現解析を行った。軟骨細胞分化の各過程における各 MAML family 分子の発現パターンを胎児軟骨成長板において、免疫組織染色および *in-situ* hybridization によ

り、それぞれの family 分子の発現局在を同定した。

また in vitro においても、未分化軟骨細胞株 ATDC5 を用いたインスリンおよびリンによる分化誘導系において、各段階における発現パターンをリアルタイム PCR にて解析した。

野生型マウスを用いた変形性関節症モデル膝関節切片において、経時的な MAML family 分子の発現検討を行った。

(2) MAML family 分子の軟骨における in vitro、in vivo での機能解析

上記(1)にて同定された軟骨細胞の分化過程において発現している各 MAML family 分子の未分化軟骨系細胞 ATDC5 およびマウス初代関節軟骨細胞における gain of function としたの過剰発現系と loss of function としたの RNAi による抑制系を作成し、リアルタイム PCR にて培養細胞内における発現解析を行った。

(3) ChIP-seq 法を応用した MAML family 分子の標的シグナル・分子の探索

次に各分化段階において、MAML family 分子と共役・複合体を形成するとされている既知の分子との実際の in vivo での相互作用についての検討を行った。具体的には Notch、NF- $\kappa$ B、Wnt、Runx2、MEF2c、p53 といった分子と、in vivo で機能的なタンパク複合体を形成しているかを確認すべく、胎児軟骨成長板組織切片上にて in-situ proximity ligation assay を行い、各分化段階において実際に MAML family 分子と複合体を形成しているタンパクの同定を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) まず四肢軟骨内骨化過程における MAML family 分子の詳細な発現解析を行ったところ、主に軟骨細胞内では MAML1、MAML2 が多く発現し、MAML3 も少ないながら発現していることを確認した。軟骨細胞分化の各過程における各 MAML family 分子の発現局在を胎児軟骨成長板において免疫組織染色および in-situ hybridization により確認したところ、増殖細胞層でも発現はみられていたが、特に肥大軟骨層において MAML1 および MAML2 がやや強く発現している傾向がみられた。MAML3 の発現は各分化段階においてほとんどみられなかった。

未分化軟骨細胞株 ATDC5 を用いたインスリンおよびリンによる分化誘導系にて、各段階における MAML family 分子の発現パターンをリアルタイム PCR にて解析したところ、MAML1 は分化の初期段階においても発現していた。また、Mmp13 や Vegfa といった後期分化過程において発現が上昇する分子と同様に、後期分化において MAML1 および MAML2 の発現が上昇していた。

(2) 未分化軟骨系細胞 ATDC5 およびマウス初代関節軟骨細胞においてレトロウイルスおよびアデノウイルスによる各 MAML family 分子の過剰発現系を作成し、培養細胞内における機能解析を行ったところ、MAML1 および MAML2 それぞれの過剰発現系において、型コラーゲンの発現が軽度上昇し、また Mmp13 の発現上昇がみられた。RNAi による抑制系は現在実験中である。

(3) MAML family 分子と共役・複合体を形成するとされている既知の分子との in vivo での相互作用についての検討は、現在共役パートナー候補分子との結合確認実験中である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小野 貴司 (ONO TAKASHI)  
東京大学・医学部附属病院・届出診療医  
研究者番号：00506248

##### (2) 研究分担者

乾 洋 (INUI HIROSHI)  
東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60583119