

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462375

研究課題名(和文)骨組織におけるコラーゲン線維形成コア分子の発現機構の解明と再生医療への応用

研究課題名(英文) Analysis of core fibril-forming collagen gene regulation in bone for application of regenerative medicine

研究代表者

吉岡 秀克 (Yoshioka, Hidekatsu)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00222430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織にはI型をはじめ、V型、XII型コラーゲン分子等が発現し、コラーゲン線維を形成する。本研究ではI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子のプロモーターについて解析した。骨芽細胞において、-160 Sp1結合部位に骨特異的転写因子であるSp1/Osterixが結合し、作用していることを見出した。また、V型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子の3'UTRについて、転写後の発現調節について解析した。その結果、miR-29が結合し、発現を抑制していることが明らかになった。この抑制は骨芽細胞ばかりでなく線維芽細胞でも見られた。以上の結果は、これらの因子が骨粗鬆症等の骨系統疾患の再生医療への応用が可能であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：The extracellular matrix of bone is composed of collagen, primary type I collagen with other type of collagen such as type V and type XII collagen. In the present study, we examined whether specific transcription factor regulates the pro- $\alpha 2(1)$ collagen gene (Col1a2) in bone. Sp7/Osterix induced the Col1a2 gene expression via the proximal promoter in osteoblastic cells. MicroRNA (miR)s regulate gene expression by binding to the 3'-untranslated region (3'UTR) of specific target mRNA. We examined the regulation of $\alpha 1(V)$ collagen gene (Col5a1) expression by miR in culture cells. miR-29 is involved in the down-regulation of Col5a1 gene expression in osteoblastic cells and fibroblasts. The results suggest that these factors might be applied for regenerative medicine such as therapy of osteoporosis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：骨代謝 コラーゲン 遺伝子発現 転写因子 マイクロRNA 再生医療

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックス分子であるコラーゲンは体タンパク質の約3割を占め、骨、皮膚、軟骨、歯牙等の主成分である。骨、皮膚、象牙質ではI型コラーゲン、軟骨ではII型コラーゲンを主体に、量的に少ないが、線維の中心部に存在するV/XI型コラーゲン、及び線維の表層に存在するFACITコラーゲン分子が高分子会合体を作り、コラーゲン線維を形成する。

私達は現在まで、長年、コラーゲンの遺伝子発現及びそのタンパクの機能について解析を行ってきた。特にマイナーコラーゲンであるXI型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖について、その一次構造を決定し、その遺伝子発現や機能に関する研究を行ってきた。軟骨形成不全のため生直後に死亡するchoマウスでは、この α 鎖が欠損していることを明らかにし、このコラーゲン分子が線維形成に必須であることを証明した。

V/XI型コラーゲン分子を構成する α 鎖の遺伝子の転写調節機構について解析し、XI型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子、V型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子、V型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖遺伝子の近位プロモーター領域に転写因子CBF/NF-Yが結合し、正に発現を調節していることを見出し、共通の因子によるV/XI型コラーゲン α 鎖遺伝子の調節が行われていることを明らかにした。

間葉系幹細胞は種々の刺激の影響を受けて、骨芽細胞、軟骨細胞、象牙芽細胞、筋芽細胞等に分化する。細胞が分化する過程において、組織特異的な細胞外マトリックス分子が発現する。その中で骨芽細胞特異的転写調節機構について解析を行ったところ、骨芽細胞の分化を特異的に制御しているSp7/OsterixがV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子、V型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖遺伝子の近位プロモーター領域に結合し、

活性を増加させていることを見出した。

2. 研究の目的

骨組織はハイドロキシアパタイトと細胞外マトリックスタンパクよりなる。マトリックスタンパクはコラーゲンとプロテオグリカン等の非コラーゲンよりなる。その中でコラーゲン分子としてはI型、V型、XII型、XIV型コラーゲン等が骨芽細胞に発現している。本研究では

- 1) 骨芽細胞におけるI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子の転写調節機構に關与する特異因子の同定
- 2) 骨芽細胞におけるmicroRNA (miR)による翻訳レベルでの制御機構の解析を行い、骨疾患治療への応用を目指すための基礎データにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 細胞培養：線維芽細胞 (NIH 3T3)、骨芽細胞 (MC3T3-E1) 由来の細胞株を用いて各種実験を行った。
- 2) RT-PCR、リアルタイム RT-PCR：各遺伝子の発現を定性的、定量的に調べるために行った。
- 3) DNA コンストラクト作製：各遺伝子のプロモーター領域の DNA 断片をルシフェラーゼ遺伝子に結合させ、或いは 3'-UTR の DNA 断片を結合させたコンストラクトを作製した。さらに、DNA 配列に変異を行った。これらのコンストラクトはルシフェラーゼアッセイに用いた。
- 4) 細胞への遺伝子導入及びルシフェラーゼアッセイ法：種々のコンストラクトを用いて、細胞に導入し、ルシフェラーゼの活性を測定した。
- 5) 強制発現実験：關与する転写因子、或いはマイクロ RNA を細胞に導入し、コラーゲン遺伝子の変化を調べた。
- 6) siRNA 阻止実験：關与する因子の siRNA を細胞に導入し、遺伝子発現の阻止を行っ

た。

7)CHIP アッセイ法:転写因子の細胞内(in vivo)での結合を調べるために行った。

4. 研究成果

1)Sp7/Osterix による I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子の転写調節機構の解析

本研究では骨芽細胞を用いて、マウス I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子における、骨芽細胞特異的に発現する転写因子の同定を行った。まず、データベース上、プロモーター近傍における骨芽細胞特異因子である Sp7/Osterix 及び Runx2 の結合部位を調べた。これらの転写因子の結合が予想される領域について、DNA コンストラクトを作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ルシフェラーゼ活性がみられる -410 ~ +59 領域に Sp1 ファミリーの結合部位が 5 か所見られた。それらの部位に変異をいれてルシフェラーゼアッセイを行った。骨芽細胞においては -160 Sp1 部位 (塩基配列 CCTCCC) に変異を加えると、著明な活性の低下を認めた。一方、線維芽細胞においては、著明な変化は認められず、4 か所において、活性の低下傾向が見られたのみであった。骨芽細胞に Sp1 及び Sp7/Osterix を強制発現させると I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖 mRNA の増加がみられた。ルシフェラーゼ活性についても同様に両転写因子の導入で増加が見られたが、-160 Sp1 部位に変異を加えた場合、その活性の増加は見られなかった。逆に、Sp1 及び Sp7/Osterix の siRNA を用いると、I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖 mRNA 及びルシフェラーゼ活性は低下し、変異を入れたコンストラクトではルシフェラーゼ活性が回復した。次に骨芽細胞を培養し、8 日間分化させて、転写因子との関連を調べた。細胞の分化につれ、I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖 mRNA は増加する。同様に Sp1、Sp7/Osterix の mRNA も増

加するが Sp7/Osterix の増加は著明であった。また、ルシフェラーゼ活性も増加したが、-160 Sp1 部位に変異を加えた場合、活性の増加は見られなかった。最後に CHIP アッセイにより、転写因子の結合を調べると、分化前には近位プロモーターに軽度の Sp1 の結合が見られるが、培養 8 日には Sp7/Osterix の結合が明瞭に見られた。

以上のことより、骨芽細胞において、I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子の近位プロモーター領域に骨芽細胞特異因子である Sp7/Osterix が結合し、特異的に転写調節に関与していることが認められた。

2)マイクロ RNA による V 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子の転写後調節機構の解析

V 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子の 3'UTR の遺伝子発現に対する影響をみるため、同領域を PCR でクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に結合し、上流には SV40 及び V 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子 (-231 - +1)プロモーターを使用したルシフェラーゼコンストラクトを作製した。これを用いてルシフェラーゼアッセイを骨芽細胞 (MC3T3-E1) により行った。その結果、いずれのプロモーターを用いた実験においても活性の低下を認めた。さらにこの領域を三つに分けてその活性をみると、3'UTR の +822 - +1,622 に活性を低下させる領域が存在した。この領域に結合することが予想されるマイクロ RNA をデータベースで検索し、それらの部位に変異を入れたコンストラクトを作製した。その中で miR29 結合部位に変異を入れた場合、活性の回復を認める傾向があったため、miR29 結合が予想される三か所に同時に変異をいれると明らかに活性の回復が認められた。また、miR29 を強制発現させると活性は低下し、siRNA を導入すると活性は増加した。骨芽細胞 (MC3T3-E1) を

CRISPR/Cas9 システムを用いて miR29b 遺伝子をノックアウトした細胞でも活性の回復がみられた。同様に線維芽細胞 (NIH 3T3) を用いた実験においても、同 3'UTR に活性の低下が見られ、miR29 結合部位に変異をいれることによって、活性の回復をみた。以上より、V 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子の発現調節に miR29 が関与していることが示唆された。

これら二つの骨芽細胞を用いたコラーゲン遺伝子の発現機構の解析結果は、転写因子やマイクロ RNA を治療に用いる可能性を示すものであり、骨粗鬆症をはじめとする骨系統疾患の再生医療への応用への道を拓くものであると考える。

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 1 件)

1) Yano H, Hamanaka R, Nakamura-Ota M, Adachi S, Zhang JJ, Matsuo N, Yoshioka H: Sp7/Osterix induces the mouse pro- $\alpha 2(I)$ collagen gene (*Col1a2*) expression via the proximal promoter in osteoblastic cells. BBRC 452, 531-536, 2014. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 矢野博之、濱中良志、中村三紀、足立佐和子、張娟娟、松尾哲孝、吉岡秀克: Sp7/Osterix は、骨芽細胞におけるマウス I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子の発現を、基本プロモーターを介して誘導する: 第 47 回日本結合組織学会学術大会 平成 27 年 5 月 15 - 16 日 コクヨホール (東京都・港区)

2) Juan Juan Zhang, Hiroyuki Yano, Noritaka Matsuo, Hidekatsu Yoshioka: Regulation of type V collagen production by microRNA in cultured

mouse osteoblasts. : 第 48 回日本結合組織学会学術大会 平成 28 年 6 月 24 - 25 日 長崎大学医学部 (長崎県・長崎市)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 秀克 (YOSHIOKA HIDEKATSU)
大分大学・医学部・教授
研究者番号: 00222430

(2) 研究分担者

松尾 哲孝 (MATSUO NORITAKA)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号: 10284788

佐々木 隆子 (SASAKI TAKAKO)
大分大学・医学部・助教
研究者番号: 30133193

矢野 博之 (YANO HIROYUKI)
大分大学・全学研究推進機構・教務員
研究者番号: 50448552

濱中 良志 (HAMANAKA RYOUJI)
大分大学・医学部・客員研究員
研究者番号: 60274750