

## 内軟骨性骨形成過程における転写制御ネットワークシステムの統合的理解

Integrative Study of transcriptional network systems during enchondral ossification

米田 俊之 (TOSHIYUKI YONEDA)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授



### 研究の概要

脊椎動物の骨格の大部分の形成に関わる内軟骨性骨形成は、複雑かつ巧緻にコントロールされている。本研究計画では、内軟骨性骨形成に必要な分子群がどのように発現制御されているかを解明し、究極的には、変形性関節症などの関節疾患に対する治療法の開発に必要な分子基盤の確立を目指す。具体的には、内軟骨性骨形成に必須である Sox9 や Runx2 の転写因子群の転写ネットワークシステムを統合的に理解することを試みる。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：内軟骨性骨形成、転写因子、Sox9、Runx2

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の骨格の大部分は、内軟骨性骨形成により形成されている。内軟骨性骨形成は、未分化間葉系細胞の凝集に始まり、軟骨細胞の増殖、分化、成熟、アポトーシスを経て、軟骨組織への血管侵入ならびに骨組織への置換にて完結する。このように内軟骨性骨形成は、非常に複雑かつユニークな生物学的現象である。また高齢化社会の到来に伴って、骨関節炎やリウマチ性関節炎などの関節疾患の増大が著しく、軟骨分化に関する研究は、社会的にも重要視されており、軟骨疾患に対する、“科学的に有効な対策”を講じる必要がある。その実現には、軟骨細胞の分化調節機構を分子、細胞、そして個体レベルで包括的に理解する必要性が求められている。

### 2. 研究の目的

近年、内軟骨性骨形成の制御には、転写因子 Sox9 ならびに Runx2 が必須的役割を果たしていることが明らかにされ、分化過程を経る軟骨細胞の分化調節機構の理解が深まりつつある。しかしながら、多彩かつ巧緻に調節されている軟骨細胞の分化機構を統合的に理解するには至っていない。本研究計画では、この研究成果を基盤にして、Sox9 の転写制御メカニズムの *in vivo* における検討と、さらに Sox9 の上流ならびに下流のシグナル、および Sox9 と Runx2 の時空的関連について研究を展開し、内軟骨性骨形成過程を制御する転写ネットワークシステムを時系列で解

明し、軟骨細胞の分化機構を統合的に理解することを目的として研究を遂行する。

### 3. 研究の方法

#### 1) 内軟骨性骨形成の制御分子のクローニング方法

研究代表者らが開発した発現クローニングシステム、マイクロアレイ解析、次世代シーケンサーによる網羅的解析、クロマチン免疫沈降法と Solexa 解析を複合させたクローニングシステムなどを活用して実施する。

#### 2) *in vitro* での解析

同定された分子群の軟骨細胞分化に対する役割は、アデノウイルスを用いた過剰発現実験および遺伝子ノックダウン実験により検討する。クローニングされた分子の生化学的解析は、免疫共沈降法、免疫化学染色、分子イメージング解析、クロマチン免疫法、プロモーターレポーターアッセイにより行う。特に Sox9、Runx2 との相互関係を中心に検討を実施する。

#### 3) *in vivo* での解析

トランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスを作製し、その表現型を組織学的、細胞生物学的、分子生物学的に検討する。トランスジェニックマウスは、Prx1 遺伝子プロモーター、2型コラーゲン遺伝子プロモーター、10型コラーゲン遺伝子プロモーターを用いて作製する。また適宜、Cre-LoxP システムを用いて、マウスの作製に工夫を施す。

ノックアウトマウスの作製は、原則的には、

Cre-LoxP システムにより、グローバルノックアウトマウスおよびコンディショナルノックアウトマウスの双方を作製できる手法を確立している。グローバルノックアウトマウスは、CAG-Cre トランスジェニックマウスと交配し、flox アリルを完全に欠失させてから、BL57 野生型マウスと再度交配し、Cre 遺伝子を除去してから、解析用の交配に用いる。

#### 4) レスキュー実験

in vitro あるいは in vivo で得られた実験結果は、下流遺伝子を再導入して表現型がレスキューされるか否かを検討し、検証する。

#### 4. これまでの成果

##### 1) 内軟骨性骨形成における p54<sup>nrB</sup> の重要性

Sox9 と転写因子を形成する分子の一つとして、p54<sup>nrB</sup> の同定に成功し、p54<sup>nrB</sup> が Sox9 標的遺伝子の転写とスプライシングに重要であることを見出した。p54<sup>nrB</sup> の in vivo における重要性を検討するために、p54<sup>nrB</sup> のスプライシング機能を特異的に欠失する変異型 p54<sup>nrB</sup> を軟骨細胞で特異的に発現するトランスジェニックマウスを詳細に解析した。その結果、同トランスジェニックマウスでは、内軟骨性骨形成が著明に遅延していることが明らかになった。

##### 2) 内軟骨性骨形成の後期過程に対する Sox9 のネガティブフィードバック機構の解明

内軟骨性骨形成の後期過程における Sox9 の関与を検討した結果、Sox9 は、軟骨細胞の肥大化および石灰化を強く阻害することを見出した。この作用は、PTHrP の発現誘導を介していることも明らかにした。したがって、Sox9-PTHrP Axis が内軟骨性骨形成の制御において重要な役割を果たしていると考えられた。

##### 3) Sox9-Runx2 のリリーススイッチング機構

Sox9 および Runx2 の発現様式ならびに機能は全く異なっており、軟骨細胞形成、基質産生から肥大化、石灰化を連携する分子が存在すると考えられた。Sox9 を活用したマイクロアレイ解析の結果、Sox9 と Runx2 を連携する分子 Dmrt2 の同定に成功し、Dmrt2 が Sox9 の機能を抑制し、Runx2 の発現および機能を促進させることを明らかにした。

#### 5. 今後の計画

1) 平成 21 年度までに作製したノックアウトマウスをさらに詳細に解析する。

2) Sox9-Runx2 のリリーススイッチング機構に関する in vivo の検討を進める。

3) 平成 21 年度に同定された Runx2 の標的分子の機能を in vivo にて解析する。

#### 6. これまでの発表論文等

1) Saito A, Hino S, Murakami T, Kondo S, Kanemoto S, Sekiya H, Saitoh M, Nishimura R, Yoneda T, Furuichi T, Ikegawa S, Ikawa M, Okabe M, Imaizumi K (2009) Regulation of ER stress response by BBF2H7/Sec23a

pathway is essential for chondrogenesis. *Nature Cell Biol* 11: 1197-1204

2) Amano K, Hata K, Suigita A, Takigawa Y, Ono K, Wakabayashi M, Kogo M, Nishimura R, Yoneda T (2009) Sox9 family members negatively regulate maturation and calcification of chondrocytes through up-regulation of PTHrP. *Mol Biol Cell* 20: 4541-45514

3) Murakami T, Saito A, Hino S, Kondo S, Kanemoto S, Chihara K, Sekiya H, Tsumagari K, Ochiai K, Yoshinaga K, Saitoh M, Nishimura R, Yoneda T, Kou I, Furuichi T, Ikegawa I, Ikawa M, Okabe M, Wanaka A, Imaizumi K (2009) The signaling mediated by the ER stress transducer. OASIS is involved in bone formation. *Nature Cell Biol* 11: 1205-1211

4) Nishimura R (2009) A Novel Role for TGF-β1 in Bone Remodeling. *IBMS BoneKey* 6: 434-438

5) Hata K, Nishimura R, Muramatsu S, Matsuda A, Matsubara T, Amano K, Ikeda F, Harley VR, Yoneda T (2008) Paraspeckle protein p54<sup>nrB</sup> links Sox9-mediated transcription with RNA processing during chondrogenesis in mice. *J Clin Invest* 118: 3098-3108.

6) Nishimura R, Hata K, Ikeda F, Ichida F, Shimoyama A, Matsubara T, Wada W, Amano K, Yoneda T. (2008) Signal transduction and transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation. *J Bone Miner Metab* 26: 203-212.

7) Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T (2008) BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 283: 29119-29125

8) Amano K, Ichida F, Sugita A, Hata K, Wada M, Takigawa Y, Nakanishi M, Kogo M, Nishimura R, Yoneda Y (2008) Msx2 stimulates chondrocyte maturation by controlling Ihh expression. *J Biol Chem* 283: 29513-29521

9) Ono K, Hata K, Nakamura E, Sugita A, Amano K, Nakanishi M, Takigawa Y, Nishimura R, Takenoshita S, Yoneda T (2008) Transcription Factor Dmrt2 Controls Endochondral Ossification Through Regulating Type 10 Collagen (Col10a1) Gene Expression. *30th ASBMR Young Investigator Award*

ホームページ等

なし