The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	軟骨細胞分化過程における転写因子Arid5bの役割の解明
Author(s)	高島, 利加子
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59280
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【17】

氏　　名	高　島　利加子（たかしま りかこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯学）
学　位　記　番　号	第　２５０２５　号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学　位　論　文　名	軟骨細胞分化過程における転写因子 Arid5b の役割の解明
論文審査委員	（主査） 教　授　前田　芳信 （副査） 教　授　米田　俊之　　講　師　山田　　聡　　講　師　佐藤　　淳

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

ヒトの骨の大部分は、軟骨原器、次いで軟骨の形成を経て、骨組織に置き換わる内軟骨性骨化と呼ばれる様式により造られる。内軟骨性骨化の主体をなす軟骨細胞は、未分化間葉系細胞から分化誘導され、その分化過程においては HMG ファミリーに属する転写因子 Sox9 が必須的役割を果たしていることが示されている。ヒトにおける SOX9 遺伝子の変異は、著しい骨格異常を呈する湾曲肢異形成症を呈し、また、軟骨細胞特異的 Sox9 ノックアウトマウスでは、軟骨組織が全く形成されないことが報告されている。しかしながら、未分化間葉系細胞株に Sox9 を導入しても必ずしも軟骨細胞分化が誘導されないことから、軟骨細胞分化には Sox9 と、Sox9 の機能を調節する別の因子の両者の存在が不可欠と考えられる。

本研究においては、内軟骨性骨化の分子メカニズム解明を目的として、Sox9 と協調し、かつ Sox9 の機能制御に関与する新規軟骨細胞分化調節因子の同定とその機能的役割の解明を行った。

【方法】

1. 新規軟骨細胞分化調節因子の同定

軟骨細胞分化能の高い未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞と、分化能の低い未分化間葉系細胞株 NIH3T3 細胞から mRNA を採取し、超高速シークエンサーSolexa を用いて遺伝子発現プロファイリングを行った。C3H10T1/2 細胞において 2 倍以上の高い発現が見られた転写因子を新規の軟骨細胞分化調節因子として同定した。

2. 軟骨細胞分化の検討

胎生期肢芽における新規軟骨細胞分化調節因子の発現を、Whole Mount *In Situ Hybridization* (WISH)法により検討した。軟骨細胞分化に対する新規軟骨細胞分化調節因子の役割は、軟骨細胞分化マーカーであるⅡ型コラーゲン(Col2a1)、11 型コラーゲン(Col11a1)およびアグリカン遺伝子の発現、またアルシアンブルー染色により評価した。

3. Sox9 の機能制御に対する役割の検討

新規に同定された軟骨細胞分化調節因子と Sox9 の相互関係は、His-Sox9 を用いたプルダウンアッセイにより検討した。Sox9 の転写活性能に対する効果は、Col2a1 遺伝子のエンハンサー領域に存在する Sox9 結合配列を用いたレポーターアッセイにより評価した。

【結果】

1. 新規軟骨細胞分化調節因子 Arid5b の同定

超高速シークエンサーSolexa を用いた遺伝子プロファイリング解析を行った結果、C3H10T1/2 細胞に高発現する転写因子として Arid5b(AT rich interactive domain 5b) を同定した。胎生 12.5 日齢のマウスを用いた WISH 法の結果、Arid5b は肢芽にその発現が認められ、その局在は Col2a1 および Sox9 と一致していた。さらに、免疫組織染色により Arid5b はマウス成長板の増殖軟骨層に発現していることが示された。

2. 軟骨細胞分化における Arid5b の役割

C3H10T1/2 細胞にアデノウィルスシステムを用いて Arid5b を過剰発現させた場合、Sox9 の発現に変化は見られなかったが、Sox9 誘導性の Col2a1 mRNA の発現が顕著に促進された。この結果に一致して、Arid5b は Sox9 の転写活性能を増加させることが、レポーターアッセイにより明らかとなった。さらに Arid5b は Col2a1 遺伝子プロモーター上に存在する AT rich 配列(CATAT)に直接結合し、この結合配列の変異は Arid5b による Col2a1 遺伝子プロモーター活性の促進を低下させた。次に Sox9 と Arid5b の相互関係を検討するために、His-Sox9 を用いた pull-down ならびに Two-Hybrid 解析を実施したところ、Arid5b は C 末端領域を介して Sox9 と結合することが見出された。Arid5b の DNA 結合領域のみを有するドミナントネガティブ型 Arid5b(DN-Arid5b)は C3H10T1/2 細胞およびマウス初代肢芽細胞の軟骨細胞分化を抑制した。Prx-1 遺伝子プロモーターを用いた DN-Arid5b のトランスジェニックマウスは、Col2a1、Col11a1 およびアグリカン遺伝子の発現低下と脛骨の短縮を示した。

次に Arid5b が軟骨細胞分化を促進する詳細な分子メカニズムの解明を行った。近年、Arid5b がヒストン脱メチル化酵素 Phf2(PHD finger protein 2)と複合体を形成し、遺伝子発現を制御することが報告されている。C3H10T1/2 細胞に Arid5b を過剰発現させ ChIP アッセイを行った結果、Arid5b は Col2a1 遺伝子プロモーターの TSS 領域への Phf2 誘導ならびに、H3K9me2 の脱メチル化を促進することが明らかとなった。

3. Arid5b 遺伝子欠損マウスの解析

胎生 14.5 日齢 Arid5b 遺伝子欠損マウス（Arid5b KO）は野生型に比較して Col2a1、Col11a1 およびアグリカン遺伝子の発現低下が認められた。さらに詳細な組織学的検討の結果、Arid5b KO マウスの内軟骨性骨化は胎生期において遅延していることが明らかとなった。出生後においては、Arid5bKO マウスは四肢の短縮と低身長を示し、成長板軟骨におけるⅡ型コラーゲン陽性領域の長さも短縮していた。Arid5b KO マウスより採取した初代培養軟骨細胞では、Sox9 依存性の Col2a1 発現誘導が野生型に比較して著明に減少していた。これらの結果に一致して、Col2a1 遺伝子プロモーターの TSS 領域への Phf2 誘導ならびに H3K9me2 の脱メチル化は、Arid5b KO マウスの初代培養軟骨細胞において有意に抑制されていた。

【結論・考察】

本研究結果より転写因子 Arid5b は、Sox9 と物理的に結合し、その転写機能を促進すること、さらに Arid5b はヒストン脱メチル化酵素 Phf2 を介した Col2a1 遺伝子プロモーターのヒストン修飾を制御することにより、軟骨細胞分化を促進することが明らかとなった。近年、様々な生物現象や疾患に関与する新たな制御機構としてエピジェネティックスの重要性が注目されている。この点において、本研究結果は内軟骨性骨化による骨格形成メカニズムの解明に新展開をもたらすのみならず、軟骨疾患の治療法の模索において重要な指針になると期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究においては，内軟骨性骨化の分子メカニズムの解明を目的として，軟骨細胞分化に必須の転写因子 Sox9 の転写共役因子の同定を試み，さらにその機能的役割の検討を行った。その結果，新規の転写因子 Arid5b を同定し、Arid5b は Sox9 と物理的に結合し，標的遺伝子のヒストン脱メチル化を制御することにより軟骨細胞分化を促進することが示された。

以上の結果は，軟骨細胞分化のエピジェネティックな制御機構を初めて明らかにしたものであり，内軟骨性骨化の分子制御メカニズムを理解するうえで新たな視点を提供するきわめて重要な結果である。よって，博士（歯学）の学位を授与するに値すると認める。