The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	軟骨細胞分化のエピジェネティック制御機構
Author(s)	高島, 利加子
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2015, 59(2), p. 65-67
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/60663
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

阪大歯学誌　59(2)：65 ～ 67，2015

軟骨細胞分化のエピジェネティック制御機構

高　島　利加子*

（平成 27 年 1 月 30 日受付）

はじめに

ヒトの骨格を形成する骨の大部分は，軟骨組織が形成された後に骨組織に置き換わる内軟骨性骨化と呼ばれる骨化様式により形成される。顎顔面領域では下顎頭軟骨，鼻中隔軟骨，脳頭蓋底骨が内軟骨性骨化により形成される。脳頭蓋底の前後軸の成長には軟骨結合が重要な役割を担っており，特に蝶後頭軟骨結合は 12 ～ 16 歳まで存在することから，出生後の頭蓋底の主要な成長部位の一つになっている。したがって，顎顔面領域における内軟骨性骨化の異常は軟骨結合の成長障害を引き起こし，顎顔面骨格形成異常の原因となる。

内軟骨性骨化の主体となる軟骨細胞は未分化間葉系細胞から分化誘導されるが，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（SRY-box 9）が必須的役割を果たしている。ヒトにおける *SOX9* 遺伝子の変異または転座によるハプロ不全は，著しい骨格異常および XY 雌性化を特徴とする Campomelic dysplasia の原因となり [1]，また *SOX9* 遺伝子の発現調節領域の変異は下顎骨の低成長や口蓋裂をきたすピエールロバン症候群の原因となる [2]。骨格形成における *Sox9* の重要性はマウスジェネティクスを用いたアプローチによっても証明されている。すなわち軟骨細胞特異的 *Sox9* 遺伝子欠損マウスでは軟骨組織が全く形成されず重篤な骨格形成異常を示すとともに [3]，頭部神経堤細胞特異的 *Sox9* 遺伝子欠損マウスでは口蓋裂および上下顎骨の劣成長が観察される [4]。

このように軟骨細胞分化における Sox9 の重要性が明らかにされているにもかかわらず，軟骨細胞分化における Sox9 の機能調節メカニズムは未だ不明な点が多く残されている。実際，間葉系細胞株に Sox9 を過剰発現しても必ずしも軟骨細胞分化は誘導されない。したがって，軟骨細胞分化過程において Sox9 の機能を調節する軟骨細胞分化調節因子の存在とその重要性が推察される。さらに，近年では DNA メチル化やヒストン修飾など DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構，すなわちエピジェネティクスの重要性も明らかにされつつある。

エピジェネティクスの分子機構

エピジェネティクスとは DNA 塩基配列の変異を伴わない遺伝子発現制御機構であり，現在までエピゲノム因子としてとして DNA メチル化，ヒストン修飾，non-coding RNA が報告されている。DNA のメチル化は，CpG ジヌクレオチド内のシトシン（C）の 5 位炭素に，DNA メチル基転移酵素によってメチル基が付加されることにより起こる。DNA メチル化は転写因子の結合阻害や転写不活性なクロマチンの形成を誘導することから遺伝子発現を阻害する。ヒストンは八量体として DNA に巻き付いてヌクレオソーム構造をとり，その N 末端がヒストンテールとしてアセチル化，メチル化などの修飾を受ける。ヒストンはクロマチン構造形成の主体をなすことから，ヒストンの化学修飾はヌクレオソームの構造や機能に大きく影響し遺伝子発現制御に深く関与する。例えば，ヒストンの N 末端テール領域には正電荷を持つリジン残基が多数存在し負の電荷を持つ DNA と強い相互作用を有している。そのため転写

＊　大阪大学大学院歯学研究科　顎口腔機能再建学講座　有床義歯補綴学・高齢者歯科学分野

因子や RNA ポリメラーゼが標的遺伝子のプロモーター領域にアクセスすることができず，転写は抑制された状態にある。しかし，ヒストンのアセチル化修飾はこの正電荷を中和することによりヒストンと DNA の相互作用を減弱させ，RNA ポリメラーゼを含む転写関連因子を転写の場へリクルートすることが可能となり，標的遺伝子の転写が促進される。

遺伝子発現制御におけるヒストンアセチル化の重要性は古くから報告されてきたが，近年のエピジェネティック研究の進歩に伴って，ヒストンメチル化修飾の重要性が明らかとなってきた。しかし，アセチル化修飾と異なって，メチル化は複数の修飾状態（モノ，ジ，トリメチル化）が存在すること，さらにメチル化修飾部位によって転写の抑制や活性化に対する作用が異なることなどから，詳細な制御機構は明らかとなっていない。特に，骨や軟骨をはじめとする硬組織においては，ヒストンメチル化修飾による遺伝子発現制御機構はほとんど研究がなされていないのが現状であった。

軟骨細胞分化制御におけるヒストンメチル化修飾

そこで本研究においては，軟骨細胞分化のエピジェネティクス制御機構の解明を目的に，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。まず我々は，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間葉系細胞株 NIH3T3 細胞に着目した。NIH-3T3 細胞に Sox9 を過剰発現させても軟骨細胞分化は誘導されないことから，NIH3T3 細胞はエピジェネティックに軟骨細胞分化が抑制されていること，そして C3H10T1/2 細胞には軟骨細胞分化を促進するエピジェネティック因子が高発現しているとの仮説を立てた。C3H10T1/2 細胞および NIH3T3 細胞から RNA 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い，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強く発現していることが示された。

C3H10T1/2 細胞にアデノウィルスシステムを用いて Arid5b を過剰発現させると，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 *Col2a1* 遺伝子プロモーター活性を抑制した。さらに 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。

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[5]。そこで，C3H10T1/2 細胞に Arid5b を過剰発現させ抗 H3K9 ジメチル化抗体を用いた 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していることが明らかとなった。

軟骨細胞における Arid5b の役割をさらに解明するために *Arid5b* 遺伝子欠損マウス（Arid5bKO）の解析を行った，Arid5bKO マウスは出生時より四肢の短縮と低身長を示した。胎生 14.5 日齢 Arid5b KO マウスは野生型に比較しての脛骨の長さが短縮しているのみならず，内軟骨性骨化が遅延していることが，組織学的検討により明らかとなった。また，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ることが明らかとなった（図 1）[6]。

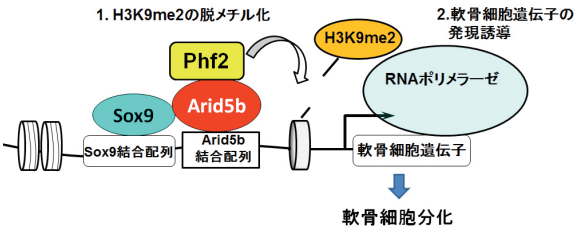

図 1　本研究結果より明らかとなった，軟骨細胞分化における転写因子 Arid5b の役割とその分子メカニズムの模式図

軟骨細胞特異的遺伝子のプロモーター領域に直接結合する転写因子 Arid5b はヒストン脱メチル化酵素 Phf2 を遺伝子プロモーター領域にリクルートすることにより H3K9 ジメチルの脱メチル化を促進する。その結果軟骨細胞遺伝子の転写がオンになり，Sox9 との物理的結合を介して協調的に作用することにより軟骨細胞分化を促進する。

おわりに

本研究結果より転写因子 Arid5b は，Sox9 と物理的に結合して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してい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。したがって，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考えられる。

謝　辞

本研究の遂行にあたり，多大なる御協力と御助言を頂きました大阪大学大学院歯学研究科生化学教室および顎口腔機能再建学講座　有床義歯補綴学・高齢者歯科学分野の教室員各位に厚く御礼申し上げます。

文　献

1）Foster, J. W., Dominguez-Steglich, M. A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P. A., Stevanovic, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I. D., Goodfellow, P. N., Brook, J. D., and Schafer, A. J.（1994）Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* **372**, 525-530

2）Benko, S., Fantes, J. A., Amiel, J., Kleinjan, D. J., Thomas, S., Ramsay, J., Jamshidi, N., Essafi, A., Heaney, S., Gordon, C. T., McBride, D., Golzio, C., Fisher, M., Perry, P., Abadie, V., Ayuso, C., Holder-Espinasse, M., Kilpatrick, N., Lees, M. M., Picard, A., Temple, I. K., Thomas, P., Vazquez, M. P., Vekemans, M., Roest Crollius, H., Hastie, N. D., Munnich, A., Etchevers, H. C., Pelet, A., Farlie, P. G., Fitzpatrick, D. R., and Lyonnet, S.（2009）Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. *Nature genetics* **41**, 359-364

3）Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A., and de Crombrugghe, B.（2002）The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & development* **16**, 2813-2828

4）Mori-Akiyama, Y., Akiyama, H., Rowitch, D. H., and de Crombrugghe, B.（2003）Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 9360-9365

5）Baba, A., Ohtake, F., Okuno, Y., Yokota, K., Okada, M., Imai, Y., Ni, M., Meyer, C. A., Igarashi, K., Kanno, J., Brown, M., and Kato, S.（2011）PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B. *Nature cell biology* **13**, 668-675

6）Hata, K., Takashima, R., Amano, K., Ono, K., Nakanishi, M., Yoshida, M., Wakabayashi, M., Matsuda, A., Maeda, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., Whitson, R. H., Nishimura, R., and Yoneda, T.（2013）Arid5b facilitates chondrogenesis by recruiting the histone demethylase Phf2 to Sox9-regulated genes. *Nature communications* **4**, 2850