

## 論 文 要 旨

# SnoN Suppresses Maturation of Chondrocytes by Mediating Signal Cross-talk between Transforming Growth Factor- $\beta$ and Bone Morphogenetic Protein Pathways

*SnoN* は TGF- $\beta$  と BMP のシグナル・クロストークを  
構成して軟骨細胞成熟を抑制する

河村 一郎

### 【序論および目的】

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) family の一員である骨形成因子 Bone morphogenetic protein (BMP) は、内軟骨性骨化過程の軟骨細胞初期分化から肥大成熟と基質石灰化まで一貫して促進的に働く。対照的に TGF- $\beta$  シグナルは後期成熟分化を *in vitro* と *in vivo* で抑制する。本来分化成熟しない関節軟骨における分化の異常亢進は変形性関節症 (OA) につながる。TGF- $\beta$  シグナルを genetic に破綻させたマウスモデルでは、関節軟骨が異所性に分化成熟肥大化して OA を自然発症するため、TGF- $\beta$  シグナルが軟骨細胞分化成熟を抑制することで OA に抑制的にはたらく事が示唆されている。しかし TGF- $\beta$  シグナル役割の下流の表現型は多種多彩であり、軟骨細胞成熟抑制における役割は全く不明である。

我々は TGF- $\beta$  シグナルによって誘導される軟骨細胞分化成熟制御責任分子を検索し、その機能解析を行った。

### 【材料および方法】

ATDC5 軟骨細胞、及びマウス初代関節軟骨細胞とマウス胎仔中足骨培養系を BMP-2 で分化誘導を行い、TGF $\beta$  シグナル I 型受容体抑制剤 SB431542(以下 SB)を用いて、内因性 TGF $\beta$  シグナルの関与とその標的遺伝子の機能解析を、Real-time PCR、immunoblotting や alcian blue/alizarin red 染色行い検討した。SnoN が BMP シグナルに与える影響を BMP シグナルレポーターである BRE-luc を用いルシフェラーゼアッセイで評価した。

SnoN の loss of function 解析には siRNA による knock down を、gain of function 解析には SnoN の stable transfection とレンチウイルスを使用し、軟骨細胞肥大分化に与える影響を検討した。

SnoN の tissue distribution については、3ヶ月齢マウスの各組織を Real-time PCR 評価し、成長軟骨板における SnoN の局在は胎生 17.5 日のマウス上腕骨における免疫染色で評価し、ヒト関節軟骨は手術にて摘出された大腿骨頭の切片を免疫染色にて検討した。

### 【結 果】

マウス胎仔中足骨を器官培養し alcian blue/arizalin red 染色を行ったところ、BMP-2 単独で誘導される軟骨の成熟石灰化は、SB 添加により有意に促進された。また ATDC5 軟骨細胞分化系において、SB は軟骨成熟マーカーである type X collagen (*Col10a1* がコード)と Mmp13 の両者の mRNA と蛋白レベル

を発現促進させた。この ATDC5 軟骨細胞分化過程とマウス上腕骨成長板軟骨の前肥大軟骨層で TGF- $\beta$  リガンド遺伝子の一つ *Tgfb1* の発現亢進と、TGF- $\beta$  型 Smad の Smad2 のリン酸化亢進が観られたので、軟骨細胞分化過程において内因性 TGF- $\beta$  シグナルが活性化されている事が分かった。

ここで BMP シグナルと TGF- $\beta$  シグナルが軟骨細胞成熟に対して相反する作用を示す事に着目し、BMP シグナルによって活性化された内因性 TGF- $\beta$  シグナルが誘導する何らかの *de novo* 因子が、negative feedback 的に BMP シグナルを抑制すると仮説を立てた。BMP 型 Smad である Smad1/5/8 のリン酸化レベルは SB 添加でも不変であったが、その下流の BMP シグナル直接標的遺伝子である *Id-1* の発現は SB により有意に促進され、これは TGF- $\beta$ 1 添加によって逆に抑制された。TGF- $\beta$  が誘導する BMP シグナル抑制候補因子の mRNA 発現を解析した結果、*SnoN* が BMP-誘導軟骨細胞分化成熟に伴い誘導され、SB によりこれがキャンセルされることがわかった。

*SnoN* は Smad2/3 と Smad4 に結合してその転写活性を阻害し TGF- $\beta$  シグナルを抑制する protooncogene として同定されたが、正常組織における役割の報告も散見される。マウス成獣における *SnoN* の tissue distribution を定量的 RT-PCR で確認すると、*SnoN* は確かに関節軟骨で高発現しており、マウス胎仔関節軟骨においては、肥大軟骨細胞の手前の前肥大軟骨層で高発現していた。

*SnoN* siRNA を ATDC5 軟骨細胞分化系に作用させると、*Id1* と *Coll10a1* の発現が増強、すなわち BMP シグナルと軟骨細胞肥大化の両者の促進が観られ、逆に *SnoN* の過剰発現はこれらを抑制した。*SnoN* が BMP シグナルを Smad4 を介して抑制する事は理論上可能だが、実際に *SnoN* が BMP シグナルを抑制する事を示した論文は無かった。そこで BMP シグナル・レポーターを用いて確認すると、*SnoN* は用量依存的にこの活性を抑制した。さらに ATDC5 細胞において *SnoN* と Smad4 が共局在する事を確認している (data not shown in paper)。

ヒト関節軟骨の免疫染色で、*SnoN* は正常軟骨では表層軟骨のみしか局在しないが、中等度 OA では type X collagen 陽性の異所性肥大軟骨の周囲に強く発現する様になり、ここに実際に TGF- $\beta$ 1 とリン酸化 Smad3 の亢進発現が観られた事から、*SnoN* が関節軟骨において TGF- $\beta$ -シグナルにより誘導され、BMP シグナルと抑制的にクロストークすることにより肥大軟骨細胞分化を制御し OA の進展を抑制している可能性が示唆された。

#### 【結論及び考察】

本研究結果から、軟骨細胞成熟肥大化過程において、*SnoN* が TGF- $\beta$  シグナルと BMP シグナルの橋渡しをして、肥大軟骨分化の fine tuning という新しい重要な役割を演じている事が分かった。

進行期の変形性関節症治療は人工関節を含めた手術治療が中心であり、関節軟骨変性を抑制する薬剤の開発が期待されている。また軟骨再生医療において軟骨培養移植の治療も進められているが、移植した軟骨細胞が肥大分化してしまい、良質な関節軟骨の品質が維持できない問題がある。

今回の結果は *SnoN* 機能の調節が、変形性関節症や内軟骨性骨化異常に関連する疾患の治療標的遺伝子として、また現時点ではその再生や分化維持が困難である関節軟骨の再生医療の効率化に有用であると考えられ、さらに応用を進めていく必要がある。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 238 号	学位申請者	河村 一郎
審査委員	主査	橋口 照人	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	岸田 昭世	副査 松口 徹也
	副査	小澤 政之	副査 谷本 昭英

### SnoN Suppresses Maturation of Chondrocytes by Mediating Signal Cross-talk between Transforming Growth Factor- $\beta$ and Bone Morphogenetic Protein Pathways

(SnoN は TGF- $\beta$  と BMP のシグナルクロストークを構成して軟骨細胞成熟を抑制する)

内軟骨性骨化過程において Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) family の一つである骨形成因子 Bone morphogenetic protein (BMP) は初期軟骨細胞分化から肥大成熟石灰化まで一貫して促進的に働き、対照的に TGF- $\beta$  シグナルは肥大成熟分化を抑制することが報告されている。関節軟骨における内軟骨性骨化の異常亢進が変形性関節症 (以下: OA) の病態と関連しており、また TGF- $\beta$  シグナルが軟骨細胞分化成熟を抑制することで OA に抑制的に作用する可能性が示唆されている。しかし TGF- $\beta$  シグナルが軟骨細胞の成熟を抑制する分子メカニズムについては明らかではない。そこで学位申請者らは TGF- $\beta$  シグナルによって誘導される軟骨肥大分化制御標的分子を検索し、軟骨組織における機能と OA との関連を検討した。

ATDC5 軟骨細胞及びマウス関節軟骨細胞初代培養とマウス胎仔中足骨培養系を BMP-2 で分化誘導を行い、TGF- $\beta$  シグナル I 型受容体抑制剤 SB431542 を用いて軟骨細胞成熟過程における内因性 TGF- $\beta$  シグナルの関与とその標的遺伝子の機能解析を real-time PCR、ウエスタンブロットやアルシアンブルーとアリザリンレッド染色を行い検討した。標的遺伝子が TGF- $\beta$  と BMP シグナルに与える影響をルシフェラーゼアッセイで解析した。標的遺伝子である SnoN の loss of function 解析には siRNA を用いて knock down を行い、また gain of function 解析には stable transfectant の cell culture とレンチウイルスを使用し軟骨細胞肥大分化に与える影響を検討した。マウス組織における SnoN の組織局在については組織を real-time PCR にて解析し、成長軟骨板における局在についてはマウス上腕骨を用い、ヒト関節軟骨については大腿骨頭を用いて免疫染色し検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかとなった。

- 1) 軟骨細胞分化成熟に伴い内因性 TGF- $\beta$  シグナルが活性化され、肥大分化に抑制的に作用していた。
- 2) TGF- $\beta$  シグナルの下流で軟骨細胞肥大分化を抑制している因子を検索した結果、SnoN を同定した。
- 3) SnoN は軟骨細胞成熟過程で内因性 TGF- $\beta$  シグナルにより導入され、その発現は促進された。
- 4) SnoN は軟骨細胞成熟過程において Smad4 と共局在し、BMP シグナルを抑制した。
- 5) SnoN は ATDC5 細胞において BMP 刺激にて早期に誘導されたが、その発現は一過性であった。
- 6) SnoN はマウス関節軟骨において高発現していた。
- 7) SnoN は TGF- $\beta$  シグナルが活性化されている前肥大軟骨層において高発現していた。
- 8) SnoN は BMP シグナルを抑制し、その結果、肥大軟骨細胞分化を抑制した。
- 9) ヒト OA 軟骨では、肥大軟骨様に分化している細胞周囲で TGF- $\beta$  シグナルが活性化していた。
- 10) ヒト OA 軟骨では、TGF- $\beta$  シグナル活性化部位と SnoN の発現は重なっていた。

内軟骨性骨化過程において TGF- $\beta$  シグナルの下流で SnoN が肥大軟骨細胞分化を制御していることが明らかとなった。OA 軟骨においても肥大軟骨様細胞周囲で TGF- $\beta$  シグナルが活性化されており SnoN が高発現していた。以上の結果より OA 病態進行に伴い SnoN は抑制的に作用していることが示唆された。今後 SnoN の OA のみならず内軟骨性骨化を病態とする疾患における機能を解明し、臨床応用の可能性を追求していきたいと考える。

本研究は軟骨細胞成熟過程における TGF- $\beta$  シグナルの役割を検討したものであり、その因子として SnoN を同定し、機能解析した。SnoN を介して TGF- $\beta$  シグナルと BMP シグナルがクロストークすることで、軟骨細胞肥大分化を制御するメカニズムがあることを示した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 238 号	学位申請者	河村 一郎
審査委員	主査	橋口 照人	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	岸田 昭世	副査 松口 徹也
	副査	小澤 政之	副査 谷本 昭英

主査および副査の5名は、平成25年3月11日、学位申請者 河村 一郎 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) SnoNが転写を抑制するメカニズムは何か。

(回答) SnoNはHDACと結合し、ヒストン脱アセチル化を誘導して転写を抑制する。

質問2) SnoNはどのような構造のタンパク質か。

(回答) SnoNはN末端にSmad2とSmad3の結合部位をもち、middle portionのinteraction-loopを通じてSmad4と結合する構造をとる。

質問3) SnoNにはSmad結合部位以外に活性部位があるのか。

(回答) HDACやNCoR等のrepressorの結合ドメインがある。

質問4) SnoNと構造の近いファミリーはあるのか。

(回答) c-skiである。

質問5) SnoNはヘテロダイマーとしてR-Smadとの結合を抑制しているのか、それとも三量体と結合して転写を抑制するのか。

(回答) SmadはR-Smad2分子とSmad4の三量体を形成し転写因子として働く。SnoNはSmad4に結合しSmad三量体の形成を阻害し、さらに転写抑制因子をSmad4にリクルートして転写を抑制する。

質問6) TGF- $\beta$ シグナルにより誘導されるSnoNはTGF- $\beta$ シグナルとBMPシグナルのどちらに強い効果をもたらすか。

(回答) ルシフェラーゼアッセイの結果からすると、TGF- $\beta$ シグナル抑制効果がより強いと考える。その理由としてSnoNはTGF- $\beta$ シグナルではSmad2,3とSmad4に結合できるが、BMPシグナルではSmad4としか結合できないからである。

質問7) SnoNの誘導にSmadはどう関与しているか。

(回答) SmadはSnoNプロモーター上に3カ所あるTGF- $\beta$  responsible CAGA Smad-binding elementを介してSnoNを直接誘導している。

質問8) SnoNはBMPシグナルにも反応するのか。

(回答) SnoNはearly phaseでBMPシグナルに反応している。SnoNのプロモーター領域はGGCACC or GGCGCGを有し、BMP-Smad responsible motifであるGGCGCCと1塩基の違いしかないため反応すると思われる。BMPがSnoNを直接誘導したことは今回の新規な発見である。

質問9) SnoNのタンパク質量の増減は必ず細胞内シグナルの強弱とリンクすると考えるのか。

(回答) 今回の実験ではリンクしていると考えて遂行した結果、SnoNを同定した。

質問10) Fig.4CにおいてSnoNのバンドは2本抽出されるべきなのか。

(回答) SnoNにはSnoNとSnoN2の2つのisoformがあり2本のバンドとなる。

質問11) SnoNの免疫染色やウエスタンブロットにおいてプロテアソームを使用した理由は何か。

(回答) SnoNのプロテアソームでの蛋白分解を抑制しないと蛋白検出は困難とされている為使用した。

## 最終試験の結果の要旨

質問 1 2) 正常関節軟骨での SnoN の発現レベルはどの程度か。

(回答) 表層に弱いシグナルを認めるのみである。

質問 1 3) SnoN は変形性関節症 (以下: OA) に対してどの様に関与しているか。

(回答) SnoN は関節軟骨細胞が肥大分化している細胞周囲に出現しており、その進行を抑制するために発現していると考えられる。

質問 1 4) SnoN が異所性肥大軟骨分化を抑えようとしている、即ち OA 変化を抑制していることを証明する方法は何が考えられるか。

(回答) ノックアウトマウスでの解析が妥当と思われるが、SnoN ノックアウトマウスは E3.5 の早期胎生致死であるため関節軟骨における役割は証明できない。そのためコンディショナルノックアウトマウスの作成が必要と考える。

質問 1 5) OA の免疫染色は何症例行ったか。

(回答) 正常関節軟骨が 2 例、中程度 OA が 3 例、重度 OA が 3 例である。

質問 1 6) SnoN が関与する疾患にはどのようなものがあるか。

(回答) 肺や腸管の腫瘍での報告はあるが、軟骨に関連した報告はない。

質問 1 7) 軟骨細胞分化の早期分化と後期分化の違いはどの過程で区切るのか。

(回答) 増殖期までが早期分化、前肥大軟骨～肥大軟骨～石灰化期までが後期分化である。

質問 1 8) Mmp13 は軟骨細胞分化において、どんな役割をしているのか。

(回答) 軟骨細胞分化の石灰化期に関与する。

質問 1 9) TGF- $\beta$  シグナルの中で Mmp13 の発現に関与する転写因子は何か。

(回答) Smad7 等の転写因子である。

質問 2 0) 9xCAGA と BRE のプロモーター領域のカセットの違いは何か。

(回答) TGF- $\beta$  のプロモーター領域のカセットは CAGA の 9 回繰り返し配列、BRE に関しては BMP のダイレクトターゲットである Id-1 のプロモーター領域の CAGC を含む領域にエンハンサーを連結した構造である。

質問 2 1) 成長軟骨板の TGF  $\beta$  1 免疫染色で肥大軟骨層より深層にある領域が陽性にみえるが、どう解釈しているか。

(回答) リン酸化 Smad2 のシグナルは同部位には認めず、実際のシグナルは活性化されていないと考える。この領域に近い骨芽細胞は TGF- $\beta$  を産生し周囲の骨基質に豊富に分泌しており、その部分が陽性として観察したと考える。

質問 2 2) ATDC5 細胞の分化に insulin/transferrin/selenium は必須であるのか。

(回答) 必須である。

質問 2 3) Micromass culture と monolayer culture との違いは何か。

(回答) Micromass culture は軟骨細胞を micromass として培養する培養法であり、monolayer culture に比べ、細胞が 3 次元的に濃縮され分化を促進しやすい培養法といえる。

質問 2 4) マウス中足骨の器官培養の実験ではいつまで細胞が生存しているのか。

(回答) 今回の実験では 3 日培養を行ったが、その間に中足骨は肥大し成長するので、軟骨細胞は生存している。10 日以上培養した報告もある。骨髄細胞はこの系では存在していない。

質問 2 5) 器官培養へのレンチウイルスへの感染方法はどのようにおこなったか。 また MOI はどう判断したか。

(回答) レンチウイルスを培養液に直接添加した。器官培養での細胞数は測定できないので、MOI は測定できない。ただ、感染させたサンプルの免疫染色結果からすると十分効果のある MOI と考えられる。

質問 2 6) TGF- $\beta$  1 と BMP-2 のリガンドの濃度は適切なのか。

(回答) これまでの文献にある濃度であり適量である。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力と識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。