

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 軟骨に特異的な遺伝子機能による軟骨分化制御の解明

2 研究者氏名: 浅原 弘嗣

3 研究の狙い:

発生学において、形作りの巧緻性および多様性は、HOXをはじめとした、DNA 結合型の転写因子に加え、それら転写因子活性の細かな調節によって制御されていると考えられる。本研究では発生を制御する新しいパラメーターとして、DNA とヒストンの複合体であるクロマチンとその制御ファクターに注目する。特にstem細胞および四肢発生の分化制御をモデルとして、その新しい分子生物学に参入、その研究のなかから、新しいクロマチン制御機構の発見とstem細胞の分化に関わるクロマチン修飾ファクターの同定をおこなう。以上の研究を遂行することで、基礎研究分野において、さらにクロマチンを介した発生制御のメカニズムの解明をすすめると同時に、その臨床応用、特に外科、整形外科領域における移植、再生技術への応用を推進し、発生分子生物学の用(患者、社会への還元)と美(他の学問との競争、またより純粋なサイエンスのテーマ)を追求する。

4 研究成果:

遺伝子発現と遺伝子複製が転写コアクティベーターと転写因子の同期発現によって統合制御されることを示し、そのメカニズムを明らかにした(Mol.Cell.Biol.2002、Nat Cell Biol. 2003)。転写コアクティベーターである CBP/p300 が、軟骨分化において必要である転写因子 Sox9 と複合体を形成し遺伝子発現に関与するという仮説をたて、CBP/p300 と Sox9 の相互作用を生化学的に検証、さらにこの二つの因子が複合体を形成することで軟骨特異的遺伝子である II 型コラーゲンなどの転写活性化を引き起こすことを明らかにした。また、タンパク質間の相互作用を阻害するペプチドを同定し、それをアデノウイルスによって間葉系幹細胞に発現させるシステムを開発した。このシステムを用いて Sox9/CBP 複合体形成を阻害したところ、軟骨への分化がおこらなくなることを明らかにした(JBC, 2003)。このモデルにより、CBP/p300 の変異による骨格形成異常を部分的に説明できると考える。さらに、軟骨初期分化に必要な TGF-beta による Smad2/3 を介したシグナルは、Sox9 の転写活性を促進させ、II 型コラーゲンのエンハンサー領域において Sox9 と CBP/p300 複合体の形成を調節することで軟骨分化を促進することを明らかにした(JBC, 2005)。また、これまで PPAR- など核内レセプターのコファクターとされてきた PGC-1 は、マウス胚の四肢特に軟骨部位に発現し、ニワトリ胚の肢芽に PGC-1 を過剰発現させると、軟骨特異的遺伝子の産生が高まり、Sox9 と PGC-1 を同時に過剰発現させると、さらに強い作用を示し軟骨基質量が増大した。そして、ヒト間葉系幹細胞を用いた軟骨への分化誘導においても Sox9 や PGC1 単独に比べて、Sox9 と PGC-1 を同時に過剰発現させると軟骨基質量が増大し、軟骨細胞への分化が促進されることを明らかにした。PGC-1 は、軟骨発生・分化において Sox9、p300 と結合し、II 型コラーゲンの発現を促進することから、Sox9 の転写コアクティベーターとして、軟骨特異的遺伝子発現と軟骨分化誘導に関わることを示した(PNAS, 2005)。すなわち、この一連の研究成果で、転写コアクティベーターは、軟骨分化特異的な発現とその機能解析を通して、発生・分化を制御する新しい分子パラメーターであること、また、それによって引き起こされるクロマチン修飾の重要な役割を果たしていることを提唱した。

5 自己評価:

発生を制御する新しいパラメーターとして、クロマチン制御ファクターに注目し、発生、生理学的意義とその分子メカニズムの解明においては、一連の研究結果をもって、新しいサイエンスに貢献できたと思う。同時期にこの分野は、多くの研究者の参入もあり、また、いろんな研究報告、情報が錯綜して混沌としている感がある。さらなる発展のための今後の研究指針として、より深く、分子メカニズムを解析する準備をおこない、クロマチンを再構成させた系においた試験管内転

写実験と個体でのフェノタイプを比較検討する実験が現在進行中である。

また、ここで得られた組織特異的発現機構のモデルは、全組織、全遺伝子において、スクリーニングをおこなっており、さらなる公理の発見を目指している。

本研究は、スタート間もない時点で、研究のオリジナリティーを確立するため、出身研究室指導教官と十分な話し合いのもと、本プロジェクトの遂行ということで、他施設に独立ラボを開く事ができた。研究の速さと量の面では、かなりマイナス面もあったが、さきがけ研究の趣旨を自分なりに解釈して、結果として、世界の多くの先輩研究者にオリジナリティーの面での評価もいただくことができた。

さきがけ研究発表会での、領域アドバイザーの厳しく、素晴らしい指導のもと、サイエンスに対する姿勢についても多く考えさせられた。また、以上の研究がまとまることで評価を頂き、アメリカ NIH、アメリカウマチ基金、厚生労働省などの研究費審査もお手伝いできる機会にめぐまれ、日米のサイエンスを支えるグラントシステムについても勉強させて頂いた。

3年という期間をあたえられて、やっと研究の基盤らしきものができてきた。これより行う研究こそが、自身においても外部からも厳しい評価をうけるべきものと思う。37歳になった今、30代の残り3年で、本プロジェクトから真の公理を導き出す事ができるかどうか、研究に集中したい。

#### 6 研究総括の見解:

軟骨形成をモデル系とし、研究成果の医療への活用を強く意識しつつ、クロマチン構造の制御といった独創性の高い視点から軟骨に特異的な遺伝子発現の解明に取り組んだ。実に積極的かつ精力的に研究を展開し、日米にわたる共同研究を推進しつつ、目的を超える成果を得つつある。将来の発展の方向性が本領域の目標とは必ずしも完全には一致しないとしても、期待できる成果の重要性はきわめて大きく、正にさきがけ的研究の典型として高く評価したい。

#### 7 主な論文等:

##### 主な論文

1. Kawakami Y, Tsuda M, Takahashi S, Taniguchi N, Esteban CR, Zemmyo M, Furumatsu T, Lotz M, Belmonte JC, Asahara H. Transcriptional coactivator PGC-1 $\{\alpha\}$  regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(7):2414-9, 2005.
2. Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi N, Tajima Y, Asahara H. Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CBP/p300 recruitment. *J Biol Chem*. In press 2005.
3. S. Omoto, K. Nishida, Y. Yamaai, M. Shibahara, T. Nishida, T. Doi, H. Asahara, T. Nakanishi, H. Inoue, M. Takigawa. "Expression and localization of connective tissue growth factor (CTGF/Hcs24/CCN2) in osteo-arthritic cartilage" *Osteoarthritis Cartilage*, 12(10):771-8, 2004.
4. K. Nishida, T. Komiyama, S. Miyazawa, Zheng-Nan Shen, T. Furumatsu, H. Doi, A. Yoshida, J. Yamada, M. Yamamura, Y. Ninomiya, H. Inoue, H. Asahara. "Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via re-gulation of p16INK4a and p21 (WAF1/Cip1) expression" *Arthritis Rheum*, 50(10):3365-76, 2004.
5. M. Tsuda, S. Takahashi, Y. Takahashi, H. Asahara. "Transcriptional co-activators CBP/p300 regulate chondrocyte specific gene expression via association with Sox9" *J Biol Chem*, 18;278(29):27224-9, 2003.
6. Y. Kawakami, J. Rodriguez-Leon, C. M. Koth, D. Buscher, T. Itoh, A. Raya, J. K. Ng, C. Rodriguez Esteban, S. Takahashi, D. Henrique, M. F. Schwarz, H. Asahara, J. C. Belmonte. "MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb" *Nat Cell Biol*, 5(6):513-9, 2003.
7. H. Asahara, S. Tartare-Deckert, T. Nakagawa, T. Ikehara, F. Hirose, T. Hunter, T. Itoh, M. Montminy. "Dual roles of P300 in chromatin assembly and transcriptional activation in cooperation with

nucleosome assembly protein 1 in vitro." *Mol cell Biol*, 22(9), 2974-83, 2002.

主な口頭発表・招待講演

Keystone Symposia

January 29, 2002 Albuquerque, New Mexico, USA

A transcriptional switch mediated by co-factor methylation

W. Xu, H. Chen, H. Asahara, K. Du, M. Tini, B. M. Emerson, M. Montminy, R. M. Evans

American College of Rheumatology 66th Annual Scientific Meeting

October 26-29, 2002 New Orleans, Louisiana, USA

Dual roles of CBP and NAP-1 complex in chromatin assembly and transcriptional activation.

S. Takahashi, M. Tsuda, T. Ito, S. Tartare-Deckert, H. Asahara.

Arthritis Research Conference

June 26-28, 2003 Keystone, Colorado, USA

The Transcriptional complex Creb/CBP regulates chondrocytes differentiation

H. Asahara (招待講演)

3rd World Congress of the Global Arthritis Research Network: International Arthritis Summit

September 14-17, 2003 Miyazaki, Japan

(Symposium)

Transcriptional mechanism of chondrogenesis

H. Asahara (招待講演)

ACR/ARHP Annual Scientific Meeting

October 24-28, 2003 Orlando, USA

Transcriptional co-activator CBP/p300 regulate chondrocyte specific gene expression via association with Sox9

M. Tsuda, S. Takahashi, N. Taniguchi, T. Furumatsu, Y. Takahashi, H. Asahara

The 48<sup>th</sup> Annual General Assembly and Scientific Meeting of Japan College of Rheumatology and

The 13<sup>th</sup> International Rheumatology Symposium

April 15-17, 2004 Okayama, Japan

(Symposium)

Molecular mechanism of chondrogenesis via chromatin modifications (招待講演)

ACR/ARHP Annual Scientific Meeting

Transcriptional co-activator PGC-1 regulates chondrogenesis via association with Sox9

M. Tsuda, N. Taniguchi, Y. Kawakami, S. Takahashi, T. Furumatsu, T. Ito, K. Yoshida, S. Miyaki, S. Yokoyama, M. Hashimoto, C.R. Esteban, M. Lotz, J.C. I. Belmonte, H. Asahara

October, 2004 San Antonio, USA

第 16 回日本軟骨代謝学会

平成 15 年 3 月 7 日

岡山

(シンポジウム)

Transcriptional regulation of Chondrogenesis

浅原弘嗣 (招待講演)

第 16 回日本軟骨代謝学会 平成 15 年 3 月 8 日 岡山  
(ランチョンセミナー)  
関節軟骨研究の用と美 - クロマチンレベルでの研究を通して -  
浅原弘嗣 (招待講演)

第 19 回日本整形外科学会 基礎学術集会 平成 16 年 10 月 21,22 日 東京  
(シンポジウム)  
クロマチンを標的にした RA 治療戦略  
浅原弘嗣 (招待講演)

第 48 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 第 13 回国際リウマチシンポジウム 平成 16 年 4 月  
15-17 日  
(ランチョンセミナー)  
クロマチン制御を介した関節軟骨の保護と再生  
浅原弘嗣(国立成育医療センター研究所) (招待講演)