

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題
「軟骨に特異的な遺伝子機能による
軟骨分化制御の解明」

研究期間：平成16年12月1日～
平成20年3月31日

浅原弘嗣
(国立成育医療センター研究所、部長)

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. 研究実施の概要

軟骨細胞は生物をかたちどる骨格形成をつかさどり、かつ生物をして動物たらしめるロコモーターシステム（運動器）に必須の関節軟骨組織を形成する。その分化発生異常は四肢形成不全に関わる小児疾患を来すほか、軟骨組織の関節炎による破壊は患者にはかりしれない苦痛を与え、軟骨移植、再生を含む根本的治療の開発が待たれている。しかしながら、軟骨発生分化を制御する分子メカニズムは、依然はっきりと分かっていない。すなわち、筋肉の MyoD、脂肪細胞の PPAR γ などと違って、現在までのところ、軟骨ではその発現で分化誘導ができるような単一の転写因子が同定されず、未知の分化メカニズムが関与していることが示唆されてきた。また、発生学においては、HOXをはじめとした、DNA 結合型の転写因子が形態形成において中心的な役割を果たすことが明らかとなっているが、その発現パターンは種を超えて、保存されていることから、それら転写因子の活性の細かな調節が形態形成の多様性の鍵を握っていると考えられる。私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してきた。クロマチンのアセチル化、メチル化、リン酸化修飾は遺伝子発現制御において DNA コドンに勝るとも劣らないインパクトを持っていることから、そのクロマチン暗号の解読が待たれている。本 JST さきがけ研究において、私は軟骨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、その研究の中から、発生における新しいクロマチン制御機構の発見と軟骨組織の分化に関わるクロマチン修飾ファクターの同定、その機能解析を行った。

これまでの PREST での研究によって、Sox9 の転写活性は、その C 末端にある転写活性ドメインを介して、転写コアクチベーター CBP/p300 と会合することが重要であることが分かった (Tsuda *et al*, *J Biol Chem* 2003)。CBP/p300 は、クロマチンにおけるヒストンをアセチル化し、遺伝子発現を強力に誘導することが知られており、Sox9 のが単独としてでなく、複合体として細胞分化を調節していることが示唆された。しかしながら、この CBP/p300 の転写活性能に重要なヒストンをアセチル化 (HAT) 活性が Sox9 依存的遺伝子発現に重要であるかどうかは不明であった。また、CBP/p300 はユビキタスに存在するため、Sox9 の時空間的な活性を調節するメカニズムとして、更なるコファクターの存在や、シグナル依存的な Sox9 の複合体の構成が予想された。

本研究では、まず、CBP/p300 の内因性 HAT 活性が Sox9 依存的な遺伝子発現制御機構に重要であることを、*in vitro* クロマチン再構成系を用いて生化学的に検証し、CBP/p300 と Sox9 の会合だけでなく、CBP/p300 の HAT 活性がクロマチンを介した転写活性に必須であることを証明した。

また、これまで、間葉系幹細胞からの軟骨分化誘導に必須である TGF- β の下流シグナルが軟骨分化においてどのようなメカニズムで軟骨特異的な遺伝子発現を制御するかについての方向は少なかった。本研究では、TGF- β のシグナルが間葉系幹細胞および軟骨細胞においては、Sox9 の活性を高めることに注目し、二つの分子を結ぶメカニズムとして、Smads に着目した。間葉系幹細胞を TGF- β で刺激したところ、TGF- β の下流シグナルを担い、転写コファクターとしての機能も報告されている Smad2,3 が核内に移行後、Sox9 の C 端の転写活性化部位に結合すること、この会合が Sox9 の TGF- β 依存的な転写活性化機構の一部を担っていること、また、Smad2,3 と Sox9 の会合が、上記 CBP/p300 の結合を安定化させることを示した。

さらに、Sox9 と協調するコファクターを探索する目的で、TGF- β 下流のターゲットの一つと考えられた転写因子 CREB に着目した。ニワトリの肢芽に TGF- β を含ませたビーズを埋め込むことで軟骨分化を *vivo* で誘導できるが、CREB のドミナントネガティ

ブフォームをアデノウイルスで発現させたところ、軟骨分化は阻害された。CREB の下流遺伝子はそのプロモーターに TGACGTCA を持つことが予想されることから、バ イオインフォマティクスで絞り込まれた CREB ターゲットの軟骨分化における遺伝 子発現を Whole mount *in situ* hybridization (WISH) を用いて解析していくなかで、 脂肪細胞で重要な役割を報告されている転写コファクターPGC-1 α が、マウスの肢芽に おける軟骨凝集で Sox9 と同じ発現パターンを示すことが分かった。さらに、ニワトリ の肢芽を用いた、*in vivo* の系とヒト間葉系幹細胞を用いた *in vitro* の系で、Sox9 と PGC-1 α が軟骨特異的遺伝子発現および軟骨分化に協調的、相乗的に働くことが分かっ た。

さらに、アルギニンをメチル化する転写コファクターである CARM1 が軟骨発生分化 において、Sox9 と複合体をなして、軟骨分化において機能を発揮することを、CARM1 ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスを用いて検証し、この因子もまた、 Sox9 とともに軟骨分化に重要であることを示した。

また、Sox9 は HMG ドメインを持つ転写因子であるが、HMG ドメインを持つファミ リーの一つで、転写コファクターとして報告されている HMGB1 に着目した。HMGB1 のノックアウトマウスでは内軟骨性骨化が阻害されていた。HMGB1 の発現はユビキ タスであるが、HMGB1 タンパクの局在は、内軟骨性骨化において増殖層の軟骨細胞 では核に、肥大層の軟骨では細胞質に移動することが明らかとなった。さらに、組織培 養を用いた実験では、HMGB1 が発生時期特異的に軟骨細胞から細胞外へ放出される ことが示唆された。また、これら細胞外の HMGB1 には報告のあった血管内皮細胞を 引き寄せる機能に加え、破骨細胞をリクルートすることを *in vitro* の実験系で明らかに した。

これらの成果は、本研究を発展する形で、網羅的な転写因子の WISH データの作成や、 転写因子の活性を調節する遺伝子を細胞レベルで機能的かつシステムティックに解析 するハイスループットトランスフェクションスクリーニング系を構築するプロジェクト の一部に貢献し、システム研究の概念を取り入れた新しい研究につながっている。

これらの研究は、Sox9 というマスタージーンの存在は必要であるが、十分でない、あ るいは、複数の転写因子が同時に活性化される必要があるといった、軟骨分化の分子メ カニズムに明快な説明を導く可能性がある。発生分化を制御するクロマチンを介した新 しい遺伝子発現基本メカニズムを提唱し、転写制御に新たな時間軸、空間軸を与えるこ とができる。

将来的な目標として、この軟骨分化制御メカニズムを利用することでより効率的かつ生 体に近く、広範囲の軟骨組織をも再生させる技術の開発による再生医療への応用も期待 される。

3. 研究構想

軟骨分化において Sox9 と転写コファクターが複合体を形成し、軟骨細胞特異的遺伝子 の転写活性化を引き起こすという分子メカニズムを明らかにするため、幹細胞からの軟 骨分化システム、ニワトリへの遺伝子過剰発現、ノックアウトマウスを用い、それぞ れの分化ステージにおける アセチル化、メチル化といったクロマチン修飾状態の関係を 検討し、タイプ II コラーゲンなどの軟骨特異的遺伝子発現がクロマチンレベルで調節 されていることを解析する。また、複合体を構成する他の因子やさらなる転写コファク ターの存在の関与を解明するため、軟骨細胞分化過程における遺伝子発現スクリーニ ングをマウス胚ホールマウントおよび組織 *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、その 発現様式を確認する。さらに、クロマチンの試験管内での再構成系を用いて、Sox9 と コファクターの会合がターゲットとなる遺伝子発現に重要であることを生化学的に検 証する。

また、これらの研究の成果より、**Sox9** と協調して遺伝子発現を行う遺伝子のクラスターを同定することの重要性、そのためには従来のマイクロアレイでは十分な解像度が得られないため、**WISH** をシステムティックかつ網羅的に行うことの必要性が認識され、**WISH** データベース構築という新たなプロジェクトにつながっていった。また、**Sox9** の活性が分子パートナーや **TGF- β** などの外界からの刺激によって制御されることから、細胞ベースでのトランスフェクションを指標としたハイスループットスクリーニングの構築と応用という新たな目標につながっている。さらには、本研究で条件設定された、**Sox9** に対するクロマチン免疫沈降の結果、条件をもとに、これら **Sox9** が当初の目標で検討された **Col2a1** などよく知られた遺伝子以外に、ゲノムワイドに標的遺伝子を探索する **ChIP on Chip** 法を用いた解析につながっている。

4. 研究実施内容

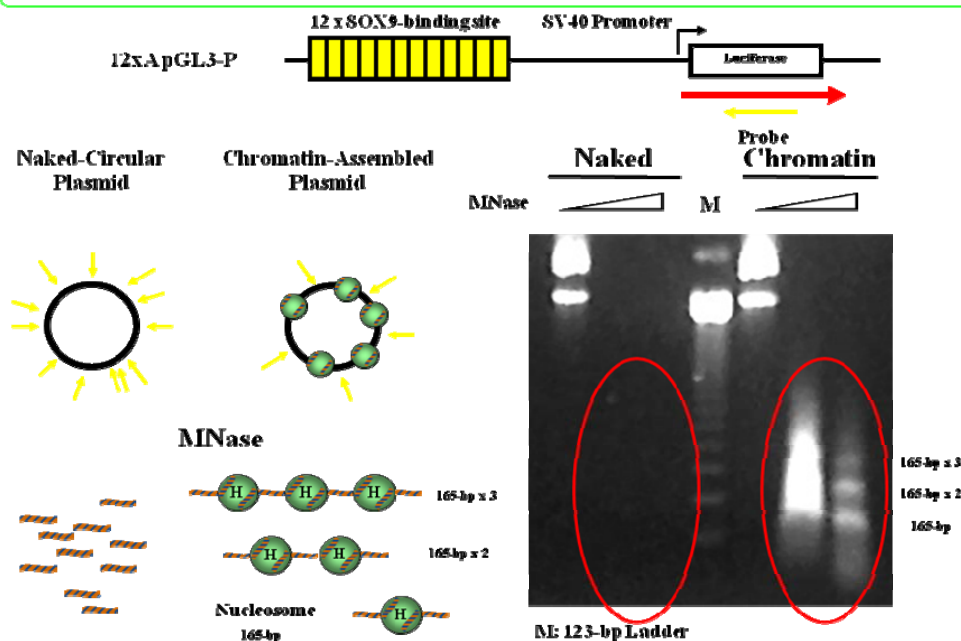
(1)実施の内容

1. 軟骨特異的な遺伝子発現における *in vitro* 転写系の構築による **Sox9** と **P300** のクロマチンテンプレートにおける協調作用

目的：我々は、ヒストンアセチル化活性を持つ転写コアクチベーターである **cAMP response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP)/p300** が、**Sox9** とともに **Col2a1** のプロモーター領域で複合体を形成し、その転写を促進することを明らかにしている。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、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、軟骨への分化が起こらなくなることを明らかにした。これらをもとに、本研究では試験管内にてクロマチン再構成を行い、**CBP/p300** の内因性 **HAT** 活性が **Sox9** 依存的な遺伝子発現制御機構に重要であることを、*in vitro* クロマチン再構成系を用いて生化学的に検証し、**Sox9** 転写因子との複合体形成、複合体によるクロマチンアセチル化を介した遺伝子発現制御メカニズムを解析する。**CBP/p300** の **HAT** 活性がクロマチンを介した転写活性に必須であるかどうか検証する。

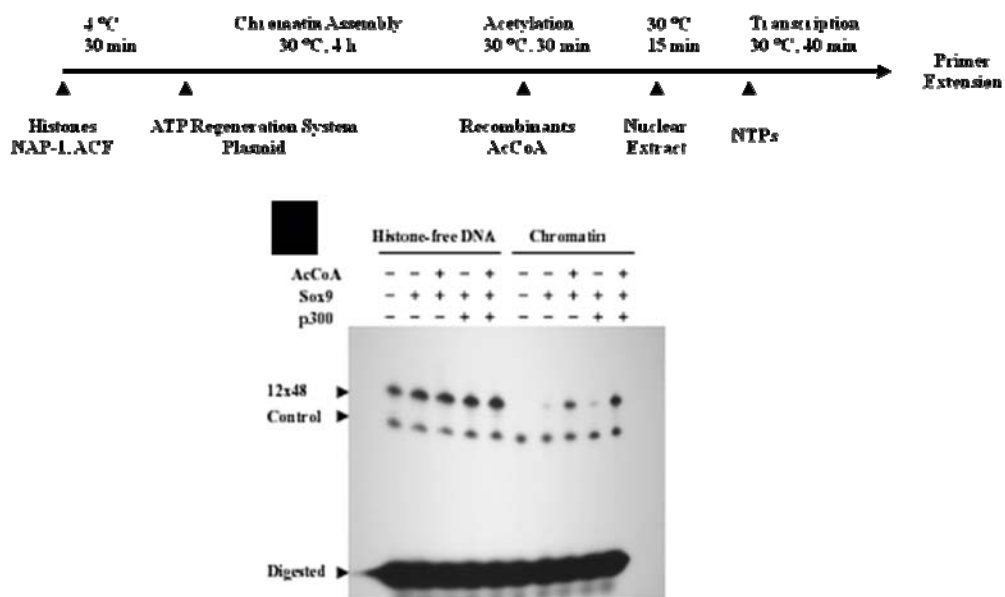
1-1. **Sox9** 結合サイトを 12 ケタンDEMつなぎ、**Luciferase** で転写活性を測定できるようにデザインしたレポーターをクロマチン化するため、コアヒストンを **Hela** 細胞から精製、また **Nap1** などのクロマチンアセンブリーに必須のタンパクをバキュロウイルスシステムで産生、生成した。これらのコンポーネントを用いて、**Sox9** レポータープラスミドをクロマチン化し、マイクロコッカスクレアーゼアッセイによって、等間隔にプラスミドがクロマチン化されていることを確認した。以降の実験ではこのクロマチン化プラスミドとクロマチン化されていない **Naked** プラスミドを用いた。(下図参照)

Chromatin Assembly & Micrococcal Nuclease (MNase) Assay



1-2. 上記プラスミドをテンプレートとして、バキュロウイルスシステムで作られた Sox9 および p300 タンパクを用いて、*in vitro* transcription assay を行った。クロマチン化されていないテンプレート (Naked plasmid) 上では Sox9 が p300 の必要なく強い転写活性を示したが、クロマチンテンプレートでは Sox9 単独では弱い活性しか示さず、p300 の添加によって初めて強い転写活性を得た。(下図参照)

In vitro Chromatin Template Transcription Assay Reveals the Essential Role of p300 and its HAT for Sox9 Activity



1-3. これらの転写アッセイ系において AcCoA の添加が必須であることから、p300

の内因性の HAT 活性が重要であることを示した。

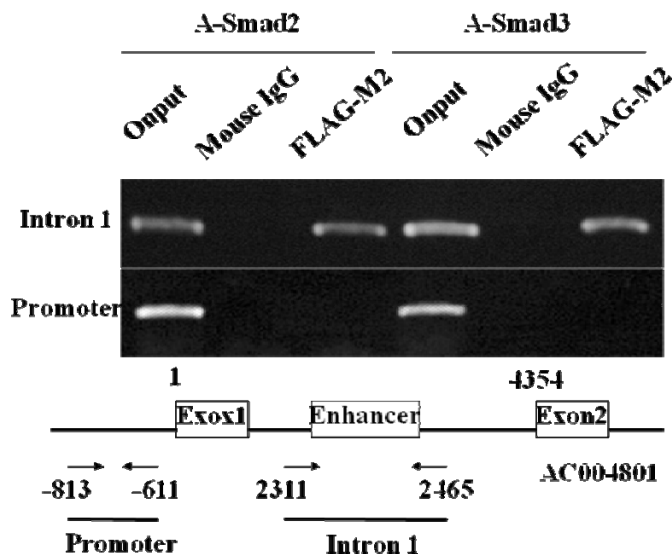
1-4. これら転写活性がヒストンのアセチル化を伴うか検証するために、*in vitro* transcription 中のサンプルを用いて、アセチル化ヒストンに対する特異的抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。結果、p300 はクロマチン上で Sox9 の存在するときのみ、コアヒストンをアセチル化することが分かった。Sox9、p300 単独ではクロマチンテンプレートのコアヒストンをアセチル化することができなかった。p300 はクロマチン化されていないフリーのヒストンを Sox9 の存在なしに、アセチル化することができることから、クロマチンにおけるヒストンは Sox9 のガイダンスによる p300 の誘導が必要であることが示唆された。

2. 軟骨細胞分化における TGF- β の下流シグナルによる Sox9 転写活性の制御機構

目的: 以上より、p300 と Sox9 の結合の重要性が示されたが、細胞外刺激が Sox9 によるクロマチンを介した遺伝子発現制御にどのように関わるか明らかでなかった。特に、軟骨発生制御に重要な役割を示す TGF- β の刺激は軟骨発生に重要な役割を示すことが知られていたが、その下流シグナルと Sox9 とのクロストークについては十分な研究が行われていなかった。我々は、軟骨初期分化に必要な TGF- β による Smad2/3 を介したシグナルが Sox9 の転写活性を調節するメカニズムを提唱するため以下の実験を行った。

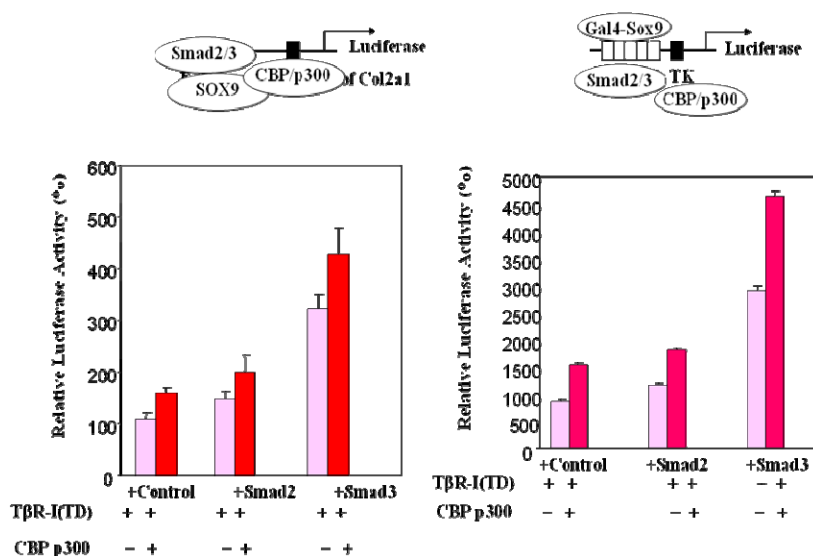
2-1. 間葉系幹細胞を TGF- β で刺激すると、リン酸化された Smad2/3 が核内に移行することを免疫細胞染色で確認した。さらに、これら Smad2/3 が Col2a1 の Sox9 結合領域に結合することがクロマチン免疫沈降を用いて示された。(下図参照)

Smads sit on SOX9 binding site of Col2a1



2-2. Smad2/3 の核内移行とそれに伴う、Col2a1 エンハンサー領域への結合というデータに基づき、Sox9 レポーターを用い、Smad2/3 のコアクチベーター活性を検討したところ、Smad2/3 は p300 と共に、Sox9 レポーター活性を上昇させることが示された。(下図参照)

Smads and p300 enhance Sox9 activity



2-3. Sox9 と Smad2/3 の結合を免疫沈降によって確認した。さらに、それぞれの結合ドメインをミュータントを用いて検討した。さらに、p300 も加えた検討によって、Smad2/3 が Sox9 と p300 の結合を安定化させることが免疫沈降レベルで示唆された。

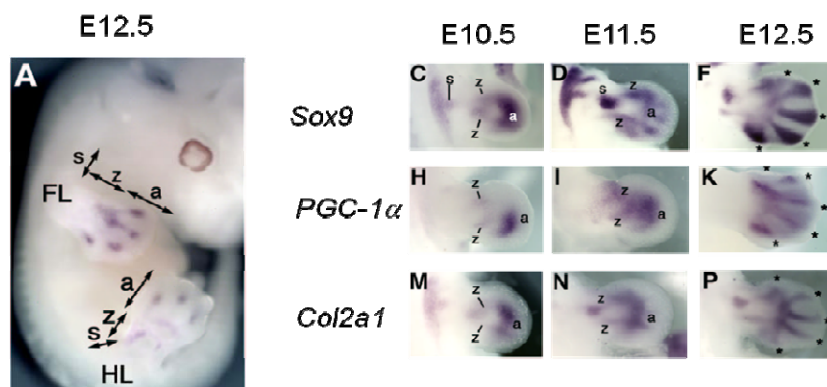
2-4. アデノウイルスを用いた発現系で、Smad2/3 は Sox9 と協調して間葉系幹細胞からの軟骨誘導と Col2a1 などの軟骨特異的遺伝子発現を相乗的に誘導することが明らかとなった。

3. 軟骨分化における PGC-1 α と Sox9 の協調作用

3-1. 軟骨分化においてその発現に変動が見られた転写因子・転写コファクターについてマウス胚を用いた WISH を行い、軟骨発生領域に発現する既知、機能未知因子を同定した。その中で、特に軟骨形成に重要な役割を果たす Sox9 と同じ時期領域に発現する PGC1 に注目し研究を行った。(下図参照)

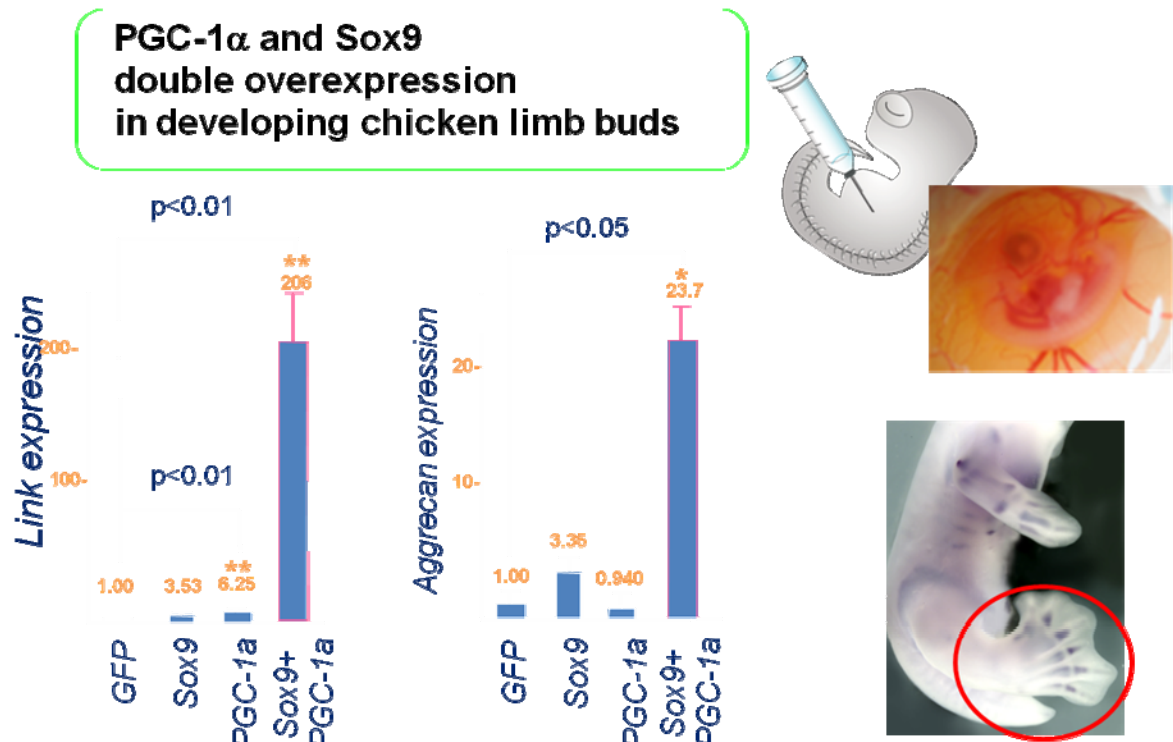
(Kawakami *et al*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005)

Co-activator PGC-1 α and Sox9 syn-expression at chondrogenic area



3-2. 間葉系幹細胞を用いた軟骨分化誘導系において、PGC-1 α は Sox9 と相乗的に軟

骨分化誘導と軟骨組織特異的な遺伝子発現の促進を促した。また、ニワトリ肢芽発生を用いた *ex vivo* の系においても、同様に両因子の軟骨分化誘導における相乗効果が見られた。(下図参照)



3-3. 上記結果をもとに、Sox9 と PGC-1 α の結合を GST プルダウンおよび免疫沈降法を用いて検証し、Sox9 の転写活性領域を介して PGC-1 α がリクルートされることを検証した。また、Col2a1 エンハンサー領域に PGC-1 α がリクルートされることをクロマチン免疫沈降法を用いて検証した。

4. 内軟骨性骨化における HMGB1 の役割

HMGB1 は、転写コファクターとして研究されてきたが、そのノックアウトマウスを解析したところ、内軟骨性骨化が著しく阻害されていることが明らかとなった。*in situ* ハイブリダイゼーションを用いた検討より、HMGB1 のノックアウトマウスにおいては、軟骨細胞、骨芽細胞の分化マーカーに異常はないが、破骨細胞、血管内皮細胞の侵入が遅れていた。また、HMGB1 は内軟骨性骨化の後期分化の軟骨細胞において細胞質に染まること、さらに軟骨組織培養によって培養液中に HMGB1 が析出されることが明らかとなった。軟骨細胞を凝集させ分化誘導をかけた系においても、HMGB1 が細胞外に出されることが分かった。精製された HMGB1 は VEGF 同様の破骨細胞、血管内皮細胞のリクルート活性を持つことがボイデンチャンバーを用いた *in vitro* の系で証明された。以上の結果より、HMGB1 は発生において転写系のみならず細胞外因子としての役割を持つことが示唆された。

(Taniguchi *et al. Mol Cell Biol* 2007)

5. 軟骨分化におけるアルギニンメチル化酵素 CARM1 の役割

後期軟骨分化においては、Sox9 とアルギニンメチル化酵素 CARM1 が同期して軟骨に発現することが明らかとなった。CARM1 の軟骨の後期分化における役割を検討するな

かで、**CARM1** が **Sox9** と会合、**Sox9** の HMG ドメインをメチル化することが分かった。**CARM1** のノックアウトマウスを解析したところ、骨格は著しく小さく、軟骨細胞の増殖が阻害されていた。また **CARM1** トランスジェニックでは逆に骨格が大きくなることが分かった。ノックアウトマウス細胞、および **Sox9** のメチル化サイトのミュータントを使った実験により、**CARM1** は **Sox9** のメチル化を介して、軟骨細胞周期を制御していることが示唆されている（投稿中）。

(2)得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

I. クロマチンを介した **Sox9** の転写調節機構

Sox9 は DNA 構造を彎曲することが出来ると言われる HMG box を有することから、古くから DNA 構造またはクロマチン構造の制御が転写における本質的な分子機構ではないかとの推論がなされてきた。現在までにそれらを *in vivo* で証明することは出来ていないが、前述した **Sox9** の転写パートナー因子に加え、クロマチンとその制御因子が、時間的・空間的な遺伝子発現を細やかに制御していることが今回の我々の結果と次章で述べる国内外の研究成果により明らかになりつつある。

今後、各分化ステージの細胞より **Sox9** と複合体を形成する因子を解析し、それぞれのステージにおいて、複合体形成とタイプ II コラーゲンのクロマチン修飾の状態をクロマチン免疫沈降アッセイによって検討し、軟骨特異的遺伝子発現がクロマチンレベルで調節されていることを調べるのが重要となる。

これらの研究が将来的な関節軟骨の再生医療および関節炎における軟骨保護療法の基盤となる可能性がある。

II. **Sox9** の標的遺伝子を探す

Sox9 はマトリックス遺伝子という軟骨が軟骨であるための遺伝子発現のみならず、発生段階のいろいろなステージを規定するネットワークを作ることが予想された。我々の今回の研究成果である、**Sox9** が **Col2a1** のエンハンサーに結合することを示すクロマチン免疫沈降の条件を指標に、軟骨細胞における転写因子 **Sox9** の標的遺伝子を網羅的に探索するために ChIP-chip 解析を行うことを計画している。ChIP-chip 法とはクロマチン免疫沈降(Chromatin Immunoprecipitation: ChIP)とマイクロアレイを組み合わせた解析法であり、転写因子のゲノム上での結合位置を網羅的に解析する方法である。その網羅性はマイクロアレイのゲノム領域のカバー率により限定されるが、近年の高密度ヌクレオチドアレイの目覚ましい発展により、文字通りゲノムワイドに探索することが可能になっている。これらの研究戦略は軟骨細胞特異的な **Sox9** の制御遺伝子の選択メカニズムを明らかにし、発生分化を調節するネットワークを解明することにつながると思われる。

III. 発生における全転写因子発現カタログの作成

発生の全容解明には全遺伝子の発現情報を知る必要があるが、哺乳類の胚で全身における全遺伝子の発現データはまだ整備されていない。時空間的に発現パターンの重なる遺伝子クラスターを同期発現遺伝子群 (syn-expression group) と呼び、同じクラスターに属する遺伝子群は時期、組織特異的なチームとして協調的に作用することが予測される。今回の研究成果を発展させる形で、我々は全身における発生時期特異的な同期発現遺伝子群を同定できるデータを、WISH によって完成させるプロジェクトをスタートさせた。

戦略としては哺乳類マウス胚 3 ステージにおいて、転写因子、転写コファクターについて包括的に WISH を行い、発現画像データベースである EMBRYS (Embryonic

Mouse in Bioinformative System) を構築する。将来的には、web 上で画像データに annotation を付加できるような参加型データベースにして、各臓器の専門家を招いたコンソーシアムを立ち上げ、Web2.0 的なプラットフォームとして発生研究の発展に寄与したい。

IV. 細胞ベースのハイスループット機能スクリーニングによる軟骨分化研究

こうして得られた軟骨特異的な転写因子、細胞外シグナル因子、組織分化マーカー等の発現がどのような因子によって調節されているかを探索するため、細胞分化制御を機能的、高速かつシステムティックに検討するアッセイ系として、細胞ベースのハイスループット機能スクリーニングを構築している。具体的な手法は、注目する遺伝子の転写調節領域をルシフェラーゼや GFP などのレポーターにつないだもの（レポーターベクター）を作製する。レポーターベクターと共に cDNA 発現クローン（約 16,000 クローン）をそれぞれ個別に細胞に導入し過剰発現させる。発現させたクローンが注目する遺伝子の転写調節領域に及ぼす作用をルシフェラーゼ活性などで評価する。さらにこのレポーターアッセイ系を 384 ウェルプレートで高密度に行うことでハイスループット化し、16,000 クローンを一度にスクリーニングする。

5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

2002 年、Sox9 が thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) 複合体の構成要素である TRAP230 と結合することが報告された。さらに、ゼブラフィッシュの機能的な大規模遺伝子スクリーニングによって、Sox9 の変異体と非常によく似た表現型を示す個体が TRAP230/Med12 の変異を持つことが報告され、これにより Trap230/Med12 が Sox9 のコアクチベーターとして機能し、神経冠、軟骨、耳の発生を制御していることが明らかにされた。今後、今回同定された、Smad,p300 などのコファクターと合わせて、Sox9 が総体としてどのような複合体を形成するのか同定することで、Sox9 の転写調節メカニズムが明らかになると思われる。

今村らは軟骨特異的に発現する基質タンパクである Cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (CD-RAP) の発現が Sox9、CBP/p300、C/EBP β のバランスによって制御されていることが示された。Cd-rap のプロモーター領域には C/EBP β と Sox9 が結合し、この両者の結合によって Sox9 の DNA 結合能が向上し転写が活性化されること、また C/EBP β が結合すると転写が抑制されるが、CBP/p300 と C/EBP β の結合により C/EBP β の DNA へ結合が阻害され、その結果転写抑制が解除されることが示された。このように、複数の転写因子間でのコファクターのやり取りが遺伝子発現のクロストークを制御する視点からも研究が進むものと思われる。

軟骨分化における起点ともなる転写因子 Sox9 においては、軟骨組織特異的なマトリックス遺伝子であるタイプ II コラーゲン、COMP などがその直接のターゲットであることがわかっていた。しかし、Crombrughe 研究室の秋山らは特定の遺伝子欠損をマウス個体内で時期および組織特異的に誘導する Cre recombinase/loxP recombination system を用い、間葉系細胞凝集前と凝集後の軟骨細胞においてそれぞれ Sox9 遺伝子を欠失したマウスを作製し、このマウスを用いて Sox9 が軟骨分化にどのように関与しているかを解析した結果、①間葉系細胞の凝集前に Sox9 を欠損したマウスでは、予想通り軟骨形成の最初のステップである間葉系細胞の凝集が起らず、軟骨細胞に分化することができなかった。実際、軟骨細胞のマーカーとなる Col2a1、アグリカン等の発現は認められなかった。②一方、間葉系細胞の凝集後に Sox9 を欠損させた場合、増殖軟骨細胞の欠損と軟骨特異的なマトリックス産生が著しく減少し、重篤な軟骨形成不全の症状が観察された。この結果は、本研究の成果と合わせて、軟骨細胞分化過程の主要な段階において Sox9 が厳密な時間的・空間的遺伝子制御を行っていることを強く示唆

している。

6. 研究実施体制

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
浅原 弘嗣	国立成育医療 センター	部長	研究総括	平成 16 年 12 月～ 平成 20 年 3 月
田中 輝幸	国立成育医療 センター	室長	複数の転写因子の Luc アッセイ	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
橋本 徳	国立成育医療 センター	研究員	軟骨細胞および幹細胞 における ChIP アッセイ	平成 17 年 10 月～ 平成 20 年 3 月
味八木 茂	国立成育医療 センター	研究員	<i>in vitro</i> 転写系のデータ 取得	平成 17 年 10 月～ 平成 20 年 3 月
工藤 寛枝	国立成育医療 センター	研究員	ノックアウトマウス 作製による転写因子、 コファクターの解析	平成 17 年 10 月～ 平成 20 年 3 月
横山 成俊	派遣先	JST 研究 員	発生生物学実験	平成 17 年 10 月～ 平成 20 年 3 月

7. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
該当なし				

(2) 招聘した研究者等

氏 名（所属、役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
該当なし			

8. 発展研究による主な研究成果

(1) 論文発表（英文論文 8 件 邦文論文 0 件）

- 1 ○T. Furumatsu, M. Tsuda, N. Taniguchi, Y. Tajima, H. Asahara, “Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CBP/p300 recruitment”. *J Biol Chem*, 280(9): 8343-50, 2005.
- 2 ○Y. Kawakami, M. Tsuda, S. Takahashi, N. Taniguchi, C.R. Esteban, M. Zemmyo, T. Furumatsu, M. Lotz, J.C. Belmonte, H. Asahara, “Transcriptional coactivator PGC-1 α regulates chondrogenesis via association with Sox9”. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(7): 2414-9, 2005.
- 3 ○T. Furumatsu, M. Tsuda, K. Yoshida, N. Taniguchi, T. Ito, M. Hashimoto, T. Ito, H. Asahara. “Sox9 and p300 cooperatively regulate chromatin-mediated transcription”. *J Biol Chem*, 280(42): 35203-8, 2005.
- 4 Sato K, Suematsu A, Nakashima T, Takemoto-Kimura S, Aoki K, Morishita Y, Asahara H, Ohya K, Yamaguchi A, Takai T, Kodama T, Chatila TA, Bito H, Takayanagi H. “Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway”. *Nat Med*, 12(12):1410-1416, 2006.
- 5 ○Taniguchi N, Yoshida K, Ito T, Tsuda M, Mishima Y, Furumatsu T, Ronfani L, Abeyama K, Kawahara KI, Komiya S, Maruyama I, Lotz M, Bianchi ME, Asahara H. “The stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification”. *Mol Cell Biol*. 2007; 27(16):5650-63.
- 6 Manabe H, Nasu Y, Komiyama T, Furumatsu T, Kitamura A, Miyazawa S, Ninomiya Y, Ozaki T, Asahara H, Nishida K. “Inhibition of Histone Deacetylase Down-Regulates the Expression of Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor by Rheumatoid Synovial Fibroblasts”. *Inflamm Res*. 2008; 57(1): 4-10.
- 7 ○Yokoyama S, Hashimoto M, Shimizu H, Ueno-Kudoh H, Uchibe K, Kimura I, Asahara H. “Dynamic gene expression of Lin-28 during embryonic development in mouse and chicken”. *Gene Expr Patterns*. 2008; 8(3): 155-60.
- 8 Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, Asahara H. “Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue”. *Arthritis Rheum*. 2008. (in press)

(2)口頭発表

①学会

国内 19件, 海外 5件

②その他

国内 25件, 海外 0件

(3)特許出願 (SORST 研究の成果に関わる特許 (出願人が JST 以外のものを含む))

	件数
国内出願	0
海外出願	0
計	0

(4)その他特記事項

- 1 平成17年 日本リウマチ学会 奨励賞 受賞
- 2 平成18年 文部科学大臣表彰 若手科学者賞 受賞
- 3 平成18年4月12日 日経産業新聞掲載、科学技術賞に鉄道総研など／文科省が表彰

- 4 平成 18 年 5 月 8 日 日本経済新聞掲載、「科学」欄／マウス胎児体を形成 遺伝子画像を DB 化／成育医療センター／無償で公開
- 5 平成 18 年 5 月 8 日 日経産業新聞掲載、「先端技術」欄／遺伝子の相互作用／分析時間 1/20／国立成育医療研／手作業を自動化
- 6 平成 18 年 5 月 11 日 日経産業新聞掲載、「21 世紀の気鋭」欄／画像を蓄積、観察を容易に／臓器形成遺伝子を操る

9. 結び

本研究は **Sox9** とそのコファクターに注目し、クロマチンを介した遺伝子発現制御機構の生化学的な検証と、幹細胞から軟骨細胞分化のメカニズムの一端を解明することができた。これらをアンカーとして、現在、新しいポストゲノム研究を推進している。戦略的創造研究推進事業の目標の一つであろう、サイエンスそのものをサイエンスするような研究姿勢を本プロジェクト期間に学ばせていただいた。個人研究として一人で始めた **PRESTO** が現在、多くの仲間との共同研究に発展したことに感謝するとともに、今後の研究の発展に責任を持って取り組みたい。

