

# TGF- $\beta$ -Smad3 経路と転写因子 Sox9 による軟骨細胞分化調節

古松 毅之<sup>a,b\*</sup>, 尾崎 敏文<sup>a</sup>, 浅原 弘嗣<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 整形外科学, <sup>b</sup>スクリプス研究所 分子実験医学,

<sup>c</sup>国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部

キーワード: chondrogenesis, epigenetic regulation, Smad3, Sox9, TGF- $\beta$

## TGF- $\beta$ -Smad3 pathway activates Sox9-dependent chondrogenesis

Takayuki Furumatsu<sup>a,b\*</sup>, Toshifumi Ozaki<sup>a</sup>, Hiroshi Asahara<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, <sup>b</sup>Department of Molecular and Experimental Medicine, The Scripps Research Institute, <sup>c</sup>Department of Systems BioMedicine, National Research Institute for Child Health and Development

### 緒 言

筋骨格系の構築は間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) の分化により制御されており, これまでに MSC から軟骨・骨・筋・腱・靭帯・半月板・滑膜・脂肪組織が誘導されることが確認されている<sup>1-4</sup>). 軟骨の発生・成熟から骨組織への置換という秩序だった骨格形成においては, MSC が凝集塊を形成し, さまざまな転写因子と成長因子が各分化段階において複雑に作用することが重要である. 中でも, MSC 凝集後の軟骨細胞分化初期段階において, その主要な DNA 結合型転写因子とされる Sry-type high-mobility-group box (Sox) を中心とした転写制御機構は重要な役割を担う<sup>5</sup>). また, 成長因子 transforming growth factor

(TGF)- $\beta$  も, 軟骨細胞分化の促進に必須とされる<sup>5</sup>). これまでに我々は, 転写因子 Sox9 と転写複合体を構成する転写共役因子 (コファクター) が軟骨細胞分化の促進において重要であることを報告した<sup>6-9</sup>). また, 成長因子 TGF- $\beta$  はその細胞内シグナル伝達因子である Smad3 を介して, 軟骨細胞分化を調節していることを明らかにした<sup>7</sup>).

一方, ヒトゲノムが解読され遺伝情報が明らかとなった現在, DNA に組み込まれたジェネティックな情報 (DNA コード) を必要に応じて引き出すためのエピジェネティックな (ジェネティックの上流という意) 転写制御機構 (ヒストンコード) の存在が注目を集めている<sup>10,11</sup>). 通常, 2 本鎖 DNA はヒストン 8 量体に巻き取られ, 凝集したクロマチン構造をとる. クロマチンが凝集した状態では, その領域の遺伝子転写活性は抑制されている. 転写を活性化するためにはクロマチン構造を弛緩させねばならず, そのためには DNA を巻き取っているヒストンがアセチル化される必要があると考えられている<sup>12-14</sup>). これまでに我々は, TGF- $\beta$

平成22年4月受理

\*〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7273 FAX: 086-223-9727

E-mail: matino@md.okayama-u.ac.jp



プロフィール

古松 毅之

昭和48年11月30日生

平成10年3月 岡山大学医学部卒業

平成14年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科修了

平成14年4月 高知県立中央病院整形外科 レジデント

平成15年4月 The Scripps Research Institute (California, USA) Research Scholar

平成17年4月 岡山医療センター整形外科 レジデント

平成18年4月 岡山大学医学部・歯学部附属病院整形外科 医員

平成19年4月 岡山大学医学部・歯学部附属病院整形外科 助教

現在に至る

の細胞内シグナル伝達因子である Smad3 が、ヒストンアセチル化活性をもつコファクター p300 とともに Sox9 を介した転写活性を増強し、軟骨細胞分化を促進することを報告した<sup>6,7)</sup>。また、p300 が Sox9 と転写複合体を形成し、Sox9 結合配列周辺のヒストンをアセチル化することでクロマチン構造の弛緩が誘導され、Sox9 に制御される遺伝子の発現が活性化されるというエピジェネティックな転写制御機構の一端を明らかにした<sup>15)</sup>。しかし、軟骨細胞分化に必須とされる TGF- $\beta$  のエピジェネティックな転写調節機構については不明であった。本研究では、*in vitro* クロマチン再構成モデルを用いて、TGF- $\beta$  刺激により活性化された Smad3 が、Sox9 と p300 を介したエピジェネティックな転写制御機構にどのように関与しているのかを解析した。

## 材料と方法

SW1353細胞（ヒト軟骨肉腫細胞株）を用い、Sox9・Smad3・Smad3 siRNA (si-Smad3)・p300・活性化型 TGF- $\beta$  receptor I [T $\beta$ R-I (TD)]<sup>7)</sup> の遺伝子導入効果を、ルシフェラーゼアッセイにより検討した。Sox9 に制御される II 型コラーゲンプロモーター・エンハンサー領域を含む pGL3-585E<sup>16)</sup> と Sox9 結合配列を組み込んだ 12 $\times$ 48-pGL3-P<sup>15)</sup> をレポータープラスミドとした。

クロマチンを再構成するために必要なタンパク (NAP-1・ISWI・Acf-1) は、baculovirus を用いて Sf9 細胞に強制発現させ精製した<sup>15)</sup>。Sox9・Smad3/4・p300 は、FLAG タグを利用して同様に精製した<sup>15)</sup>。Smad3/4 は精製直前に TGF- $\beta$ 3 処理を行うことで、リン酸化された活性化型 Smad3/4 複合体として精製した<sup>16)</sup>。コアヒストンは HeLa 細胞より抽出した<sup>15)</sup>。クロマチン再構成に必要なタンパクとコアヒストンを ATP 存在下で環状プラスミド (12 $\times$ 48-pGL3-P) と反応させ人工的にクロマチンとして再構成し、micrococcal nuclease (MNase) アッセイによりクロマチン化の状態を評価した<sup>16)</sup>。クロマチン化された 12 $\times$ 48-pGL3-P を、精製した Sox9・p300 と <sup>14</sup>C-アセチル CoA (AcCoA) の存在下で反応させ、histone acetyltransferase (HAT) アッセイによりクロマチンを構成するヒストンのアセチル化活性を定量した<sup>15)</sup>。*In vitro* 転写反応を進行させるための核抽出液は SW1353細胞より回収した<sup>15)</sup>。クロマチン化された 12 $\times$ 48-pGL3-P を、精製した Sox9・Smad3/4・p300 および SW1353細胞

核抽出液と、AcCoA 存在下で反応させ、*in vitro* 転写反応により RNA を合成した。合成された RNA に特異的に結合する <sup>32</sup>P 標識プローブをアニーリングさせ、S1 nuclease 処理する (RNA に結合していない過剰な 1 本鎖プローブは分解される) ことで、クロマチン化されたプラスミドからの転写産物を定量的に評価した<sup>16)</sup>。

## 結 果

### 1. TGF- $\beta$ -Smad3 経路による Sox9 を介した転写増幅作用

pGL3-585E を用いたルシフェラーゼアッセイにおいて、Smad3 は Sox9 の存在下にレポータープラスミドの転写活性を増強した (図 1 A)。また、Smad3 は TGF- $\beta$  刺激 [T $\beta$ R-I (TD)] 依存性に Sox9 を介した転写活性を増幅した (図 1 A)。12 $\times$ 48-pGL3-P を用いた場合も同様に、Sox9・Smad3・T $\beta$ R-I (TD) による転写増強の相乗効果を認めた (図 1 B)。Smad3 による濃度依存性の転写増強効果は、si-Smad3 により抑制された (図 1 C, D)。

### 2. Sox9-p300-Smad3/4 転写複合体によるヒストンアセチル化とクロマチンからの転写活性化

精製した NAP-1・ISWI・Acf-1 とコアヒストンを混合することで環状プラスミド (12 $\times$ 48-pGL3-P) はクロマチン化され、MNase アッセイにより 165bp リピートが確認された (図 2 B)。ヒストンが DNA 上に配置されクロマチン化されたプラスミドでは、HAT アッセイにおいて Sox9 と p300 がともに存在する条件でのみヒストンのアセチル化が誘導された (図 2 C 上段)。また、*in vitro* 転写-S1 nuclease アッセイにおいて、TGF- $\beta$  刺激により活性化された Smad3/4 を Sox9・p300 とともに添加することで、Sox9 を介したクロマチンからの転写発現が増強された (図 2 D)。

## 考 察

TGF- $\beta$  は、初期の軟骨細胞分化を誘導する重要な成長因子であるが<sup>5)</sup>、肥大軟骨細胞の成熟をはじめとする後期分化を抑制することが知られている<sup>17)</sup>。同様に、転写因子 Sox9 は Sox5・Sox6 とともに MSC 凝集をはじめとする軟骨細胞初期分化を誘導するが<sup>18)</sup>、肥大軟骨細胞への後期分化を阻害する<sup>5)</sup>。しかし、軟骨細胞分化における TGF- $\beta$  と Sox9 の両面的なはたらきについては、その詳細が不明であった。これまでに我

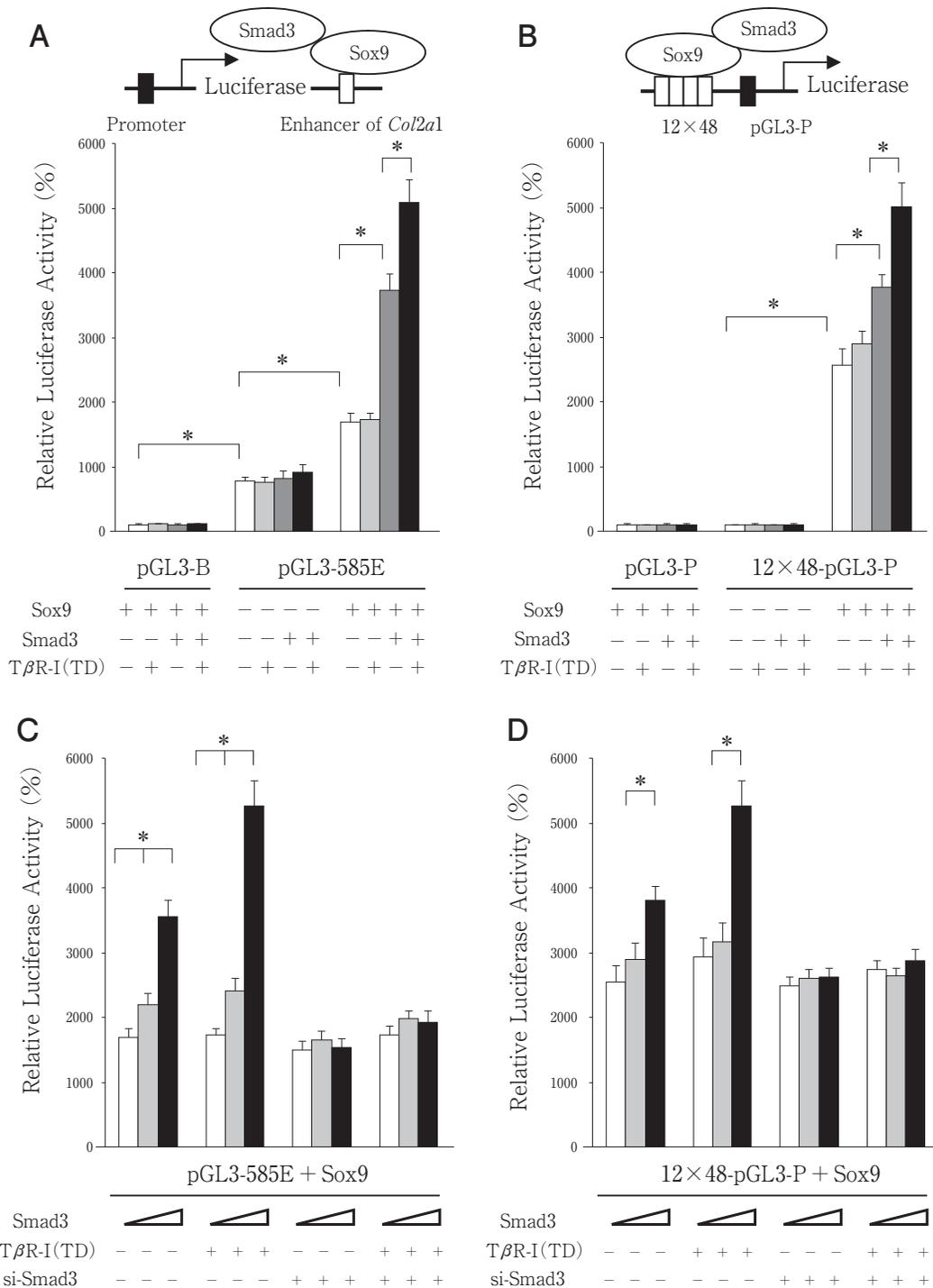


図1 Sox9を介した転写活性に対するTGF- $\beta$ とSmad3の影響

(A, B) SW1353細胞を用いたルシフェラーゼアッセイ。Sox9存在下に、Smad3と活性化型TGF- $\beta$  receptor I [T $\beta$ R-I (TD)]による転写増強効果を認めた。(C, D) Smad3による濃度依存性の転写増強効果は、Smad3に対するsiRNA (si-Smad3)により抑制された。\* $p < 0.05$  (Mann-Whitney  $U$ -test)。

々は、Smad3によりSox9-p300転写複合体の形成が促進され、Sox9を介した転写発現が活性化されることを報告した<sup>7)</sup>。本研究では、TGF- $\beta$ とSox9による軟骨細胞分化誘導において、Smad3やp300を介してのエ

ピジェネティックな転写制御機構が存在することを証明した(図2D)。また、Sox9に制御される遺伝子の発現において、クロマチンからの転写発現が活性化されるためには、ヒストンアセチル化をはじめとするヒ

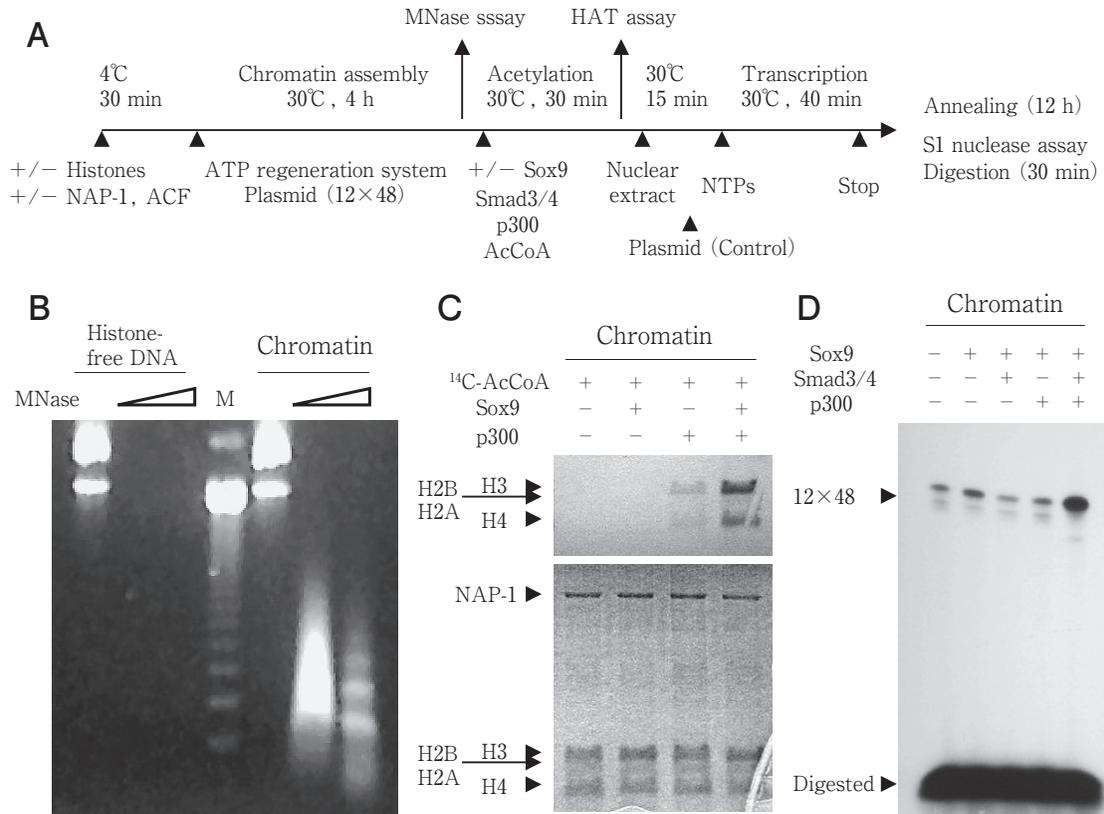


図2 Sox9・p300・Smad3/4によるエピジェネティックな転写活性化

(A) クロマチン再構成, MNase アッセイ, HAT アッセイ, *in vitro* 転写-S1 nuclease アッセイの実験プロトコル。(B) クロマチン再構成後の MNase アッセイ。クロマチン構造をとらないプラスミドは, MNase により完全に消化された。ヒストンが付加されたクロマチン化 DNA では, MNase による完全な断片化を免れ, 165bp リピートを構成するバンドパターンが検出された。(M, 123bp ラダー)。(C 上段) HAT アッセイ。クロマチン再構成後の 12×48-pGL3-P に対し, Sox9 とともに p300 を添加することで, クロマチン上のヒストンアセチル化が促進され, AcCoA の<sup>14</sup>C が取り込まれた。(C 下段) 銀染色により, 添加したコアヒストンが等量であることが確認された。(H2A, H2B, H3, H4: ヒストン 8 量体)。(D) Sox9・p300・活性化型 Smad3/4 の添加により, クロマチンからの転写活性が相乗的に増強された (12×48)。(Digested, *in vitro* 転写産物にアニーリングできず S1 nuclease により断片化された<sup>32</sup>P 標識プロンプ)。

ストン修飾が重要であることを明らかにした (図 2 C)。これらの結果から, 軟骨細胞の分化段階に応じた TGF- $\beta$  と Sox9 の両面的なはたらきは, Smad3 や p300 を介するクロマチン構造の変化に起因する可能性が示唆された。

本研究は, TGF- $\beta$  が Smad3 を活性化することを介して, Sox9 に制御される遺伝子の転写発現を, クロマチンレベルで調節していることをはじめて明らかにしたものである。これらの結果は, TGF- $\beta$  によるエピジェネティックな軟骨細胞分化誘導が, ヒストン修飾に励起されたクロマチンの構造変換により制御されている可能性を示唆している。また, 軟骨細胞分化の促進においては, TGF- $\beta$ -Smad3 経路とは別に TGF- $\beta$ -MAPK 経路の重要性についても指摘されており<sup>19)</sup>, 今後は Sox9 転写複合体と MAPK の相互作用を解析

し, クロマチンからの転写発現をどのように調節しているのかを検討する必要がある。

## 謝 辞

本研究は, 日本学術振興会 (18890115, 20791040), 成育医療研究委託事業, 内視鏡医学研究振興財団, 両備禮園記念財団からの研究助成により遂行されたものであり, ここに感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science (1999) 284, 143-147.
- 2) Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, Murakami T, Kobayashi E: Intra-articular

- Injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem Cells* (2009) 27, 878-887.
- 3) Nixon AJ, Goodrich LR, Scimeca MS, Witte TH, Schnabel LV, Watts AE, Robbins PD: Gene therapy in musculoskeletal repair. *Ann N Y Acad Sci* (2007) 1117, 310-327.
  - 4) Furumatsu T, Hachioji M, Saiga K, Takata N, Yokoyama Y, Ozaki T: Anterior cruciate ligament-derived cells have high chondrogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun* (2010) 391, 1142-1147.
  - 5) Ikeda T, Kawaguchi H, Kamekura S, Ogata N, Mori Y, Nakamura K, Ikegawa S, Chung UI: Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J Bone Miner Metab* (2005) 23, 337-340.
  - 6) Tsuda M, Takahashi S, Takahashi Y, Asahara H: Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9. *J Biol Chem* (2003) 278, 27224-27229.
  - 7) Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi, Tajima Y, Asahara H: Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *J Biol Chem* (2005) 280, 8343-8350.
  - 8) Kawakami Y, Tsuda M, Takahashi S, Taniguchi N, Rodriguez Esteban C, Zemmyo M, Furumatsu T, Lotz M, Izpisua Belmonte JC, Asahara H: Transcriptional coactivator PGC-1  $\alpha$  regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) 102, 2414-2419.
  - 9) Furumatsu T, Shukunami C, Amemiya-Kudo M, Shimano H, Ozaki T: Scleraxis and E47 cooperatively regulate the Sox9-dependent transcription. *Int J Biochem Cell Biol* (2010) 42, 148-156.
  - 10) Jenuwein T, Allis CD: Translating the histone code. *Science* (2001) 293, 1074-1080.
  - 11) Furumatsu T, Ozaki T: Epigenetic regulation in chondrogenesis. *Acta Med Okayama* (2010) 64, 155-161.
  - 12) Wolffe AP, Hayes JJ: Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res* (1999) 27, 711-720.
  - 13) Strahl BD, Allis CD: The language of covalent histone modifications. *Nature* (2000) 403, 41-45.
  - 14) Quina AS, Buschbeck M, Di Croce L: Chromatin structure and epigenetics. *Biochem Pharmacol* (2006) 72, 1563-1569.
  - 15) Furumatsu T, Tsuda M, Yoshida K, Taniguchi N, Ito T, Hashimoto M, Ito T, Asahara H: Sox9 and p300 cooperatively regulate chromatin-mediated transcription. *J Biol Chem* (2005) 280, 35203-35208.
  - 16) Furumatsu T, Ozaki T, Asahara H: Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. *Int J Biochem Cell Biol* (2009) 41, 1198-1204.
  - 17) Ferguson CM, Schwarz EM, Reynolds PR, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ: Smad2 and 3 mediate transforming growth factor- $\beta$ 1-induced inhibition of chondrocyte maturation. *Endocrinology* (2000) 141, 4728-4735.
  - 18) Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B, Lefebvre V: The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* (2001) 1, 277-290.
  - 19) Stanton LA, Underhill TM, Beier F: MAP kinases in chondrocyte differentiation. *Dev Biol* (2003) 263, 165-175.