

共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：国立成育医療研究センター研究所
システム発生・再生医学研究部

職名：部長

氏名：浅原 弘嗣

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題： 腱、軟骨の再生を促す分子ネットワークの解明と応用
2. 再生医科学研究所共同研究者： 戸口田 淳也
3. 研究期間： 短期研究課題 ・ 長期研究課題
(平成22年4月1日～平成23年3月31日)

4. 研究経過及び研究成果：

腱、軟骨および筋肉の発生・分化に関与する遺伝子を同定するために、約1,600の転写制御因子の Whole mount *in situ* hybridization(WISH)データベース"EMBRYS"を構築した(Yokoyama et al., 2009)。その結果、四肢で特徴的な発現をしている複数の因子を同定した。また、ヒト軟骨細胞の網羅的な遺伝子プロファイリングを行い、軟骨細胞で発現の高い遺伝子を同定した。これらの機能解析や、因子間のネットワークを解析し、腱や軟骨などの発生メカニズムの解明を目指した。

ヒト軟骨細胞の網羅的な遺伝子プロファイルにて得られた遺伝子の中で、ヒト間葉系幹細胞に比べ発現が高い miRNA を同定し、Real Time PCR にて同様にヒト軟骨細胞で発現が高いことを観察した。この miRNA は霊長類でのみ同定されており、戸口田研究室との共同研究にて、ヒト間葉系幹細胞を用いた軟骨分化モデルで発現の増減を解析し、強制発現、発現抑制の実験にてこの miRNA の軟骨分化への影響を調べることを計画し、現在検討中である。

WISH データベースより腱に発現する転写因子としてホメオボックス遺伝子であ

る Mohawk (Mkx)が同定された。この遺伝子のノックアウトマウスを作製・解析した結果、腱の低形成が観察され、Mkx が腱分化に重要な転写因子であることを示した (Ito et al., 2010)。さらにこの転写因子の腱発生・再生における機能について解析するために、Cre 特異的に Mkx を過剰発現するように遺伝子を改変したマウスを作製し、11 ラインのマウスを取得した。これらについて Cre が、腱前駆体マーカである Scx と同じ発現様式を示す ScxCre マウスと掛け合わせ、Mkx の発現を Real Time PCR 等により調査し、腱組織で Mkx を高発現するラインの選択を現在行っている。

WISH データベースより筋特異的に発現する転写抑制因子 RP58 についてノックアウトマウスの作製・解析し、RP58 が筋分化に重要な因子で、筋分化を阻害する遺伝子で癌にも関わることが示唆されている Id 遺伝子を抑制していることを明らかにした (Yokoyama et al., 2009)。この RP58 が、癌に関わることが示唆されている Id 遺伝子の抑制に働くことから、小児悪性腫瘍で軟部悪性腫瘍としては小児期で最も頻度の高い疾患である横紋筋肉腫との関連について調査するために、横紋筋肉腫サンプルの収集と RT-PCR 等による RP58 の発現量の調査を計画した。

5. 研究成果の公表

※発表論文リスト (掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可)、学会発表等

- 1 Ito Y, Toriuchi N, Yoshitaka T, Ueno-Kudoh H, Sato T, Yokoyama S, Nishida K, Akimoto T, Takahashi M, Miyaki S, Asahara H. The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(23): 10538-10542.
- 2 Yokoyama S, Ito Y, Ueno-Kudoh H, Shimizu H, Uchibe K, Albin S, Mitsuoka K, Miyaki S, Kiso M, Nagai A, Hikata T, Osada T, Fukuda N, Yamashita S, Harada D, Mezzano V, Kasai M, Puri PL, Hayashizaki Y, Okado H, Hashimoto M, Asahara H. A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58. *Dev Cell*. 2009; 17(6): 836-848.