

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：東京医科歯科大学大学院

医歯学総合研究科

システム発生・再生医学講座

職名：教授

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23年4月1日～平成24年3月31日)

4. 研究経過及び研究成果：

これまでに我々は軟骨、腱および筋肉の発生・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"EMBRYNS"を構築しているが(Yokoyama et al., 2009)、EMBRYNSのデータより軟骨細胞で発現する遺伝子を再検索した結果、軟骨分化において発現する転写因子として Fox ファミリー遺伝子を同定した。これら遺伝子の軟骨分化における *in vivo* での機能を明らかにするために、ノックアウトマウスの作製準備を現在行っている。

我々は軟骨細胞特異的な miRNA である miR-140 を同定し、軟骨分化および関節炎における機能をノックアウトマウスの解析により明らかにしてきたが (Miyaki et al., 2009)、この miR-140 の発現制御メカニズムを明らかにするために、ルシフェラーゼアッセイおよびトランスジェニックマウスによる解析を行った。その結果、miR-140 の発現を制御する約 700bp のエンハンサー領域を同定した (Yamashita et al., リバイス中)。また、軟骨細胞のマスター遺伝子である SOX9 の下流にある miRNA

を同定するために、軟骨細胞における SOX9 の過剰発現により発現上昇する miRNA をスクリーニングした。その結果、miR-140 と新規の miRNA を同定した。この miRNA は、軟骨細胞で発現が高く、過剰発現により炎症性サイトカインの発現を抑えることが明らかになった。今後は当該 miRNA の軟骨分化における機能について調査する。

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) を同定し、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明らかにするために、その標的遺伝子のスクリーニングを、ノックアウトマウスを用いたマイクロアレイにより試みた。その結果、Mkx が軟骨細胞分化に関わる遺伝子を抑制している可能性が示唆され、現在詳細な解析を行っている。

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., *et al.* (2010). The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
2. Miyaki, S., Nakasa, T., Otsuki, S., Grogan, S.P., Higashiyama, R., Inoue, A., Kato, Y., Sato, T., Lotz, M.K., and Asahara, H. (2009). MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis Rheum* *60*, 2723-2730.
3. Yokoyama, S., Ito, Y., Ueno-Kudoh, H., Shimizu, H., Uchibe, K., Albin, S., Mitsuoka, K., Miyaki, S., Kiso, M., Nagai, A., *et al.* (2009). A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58. *Dev Cell* *17*, 836-848.
4. Yamashita, S. *et al.* (2012). リバイス中