

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10460

研究課題名(和文) 治療標的分子探索を目指したNF- κ Bシグナルの関節軟骨維持・変性制御機構の解明研究課題名(英文) Mechanism of maintenance of articular chondrocyte by NF- κ B signaling.

研究代表者

小林 寛 (Kobayashi, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20407951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、関節軟骨におけるNF- κ Bシグナルの作用をin vivo, in vitroの両面から詳細に解析し、その全貌を明らかにするとともに、関節軟骨の変性予防・修復・再生の実現への道筋を切り開くことを目的として研究を行った。その結果、Relaホモノックアウトマウスでは、アポトーシスの亢進とともに軟骨の変性が進行していること、一方、ヘテロノックアウトマウスでは、軟骨基質分解酵素の抑制がみられ、変形性関節症の進行は抑制されていた。IKK阻害剤により適度にNF- κ Bシグナルを抑制することで変形性関節症の進行が抑制できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined the function of NF- κ B signalling in articular chondrocyte both in vitro and in vivo to realize the prevention of degeneration and regeneration of articular chondrocyte. We analyze in vivo functions of RelA in embryonic limbs and adult articular cartilage, and find that RelA protects chondrocytes from apoptosis through induction of anti-apoptotic genes. In articular cartilage, homozygous knockout of RelA at 7 weeks leads to marked acceleration of osteoarthritis through enhanced chondrocyte apoptosis, whereas heterozygous knockout of RelA results in suppression of osteoarthritis development through inhibition of catabolic gene expression. Haploinsufficiency or a low dose of an IKK inhibitor suppresses catabolic gene expression, but does not alter anti-apoptotic gene expression. The biphasic regulation of chondrocytes by RelA contributes to understanding the pathophysiology of osteoarthritis.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：NF- κ Bシグナル 変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

社会の急速な高齢化により、変形性関節症を始めとした運動器変性疾患の予防や新規治療法の開発は整形外科に課せられた急務の課題となっている。申請者らはこのような画期的治療法の実現にはまず軟骨細胞を制御するシグナル群の解明が先決と考え、主に軟骨内骨化における軟骨細胞発生分化制御メカニズムについて転写因子を中心に行ってきた (Proc Natl Acad Sci U S A.110:1875,2013, J Clin Invest 118:2506,2008, Dev Cell 14:689,2008, EMBO Rep 8:504,2007, Nat Med 12:665,2006, Arthritis Rheum 54:2462,2006, Arthritis Rheum 50:3561,2004, Genes Dev 18:2418,2004)。その過程で申請者らは、NF- κ B シグナルの主要転写因子 RelA (p65) は、GSK3 による活性制御を受け軟骨発生・分化の主要因子である Sox9 を直接転写誘導し、軟骨細胞の基質産生を促すことを見出した (J Biol Chem 287:29227,2012, Osteoarthritis Cartilage 17:1065,2009)。一方で、RelA は、軟骨後期分化および変性の強力な誘導因子である Hif2 α (Nat Med 16:678,2010) や軟骨基質分解酵素の主要因子である Adamts5 を直接転写誘導することも明らかにした (J Biol Chem E-pub ahead of print, 2013)。さらに、RelA は、軟骨細胞においてリガンド非依存性に活性化され、抗アポトーシス作用を有することも報告されている (Nat Cell Biol 9:287,2007)。このように、RelA は軟骨基質合成、変性、抗アポトーシス作用など多彩かつ相反する生理作用に関与している。肝臓や腸管など他組織においても NF- κ B シグナルの多様な作用が報告されている。なかでも、古典的 NF- κ B シグナルを活性化する IKK β のホモノックアウトマウスは炎症刺激により腸管上皮のアポトーシスが生じる (Nat Med 9:575, 2003) のに対して、NF- κ B シグナルの阻害剤による適度な NF- κ B シグナルの抑制は、アポトーシスを惹起せず、抗炎症作用のみを示したと報告されている (J Immunol 179:2681, 2007)。このことは、NF- κ B シグナルの量的な下流分子の制御の可能性を示唆する。さらに、早老症を呈するマウスにおいて適度な NF- κ B シグナルの抑制は、酸化ストレスによる DNA 障害を減弱させ、老化の進行を抑制するという報告がある (J Clin Invest 122:2601, 2012)。変形性関節症は、軟骨基質の合成および変性、軟骨のアポトーシス、細胞老化が病態として関与しており、これまでの知見から NF- κ B シグナル、特に古典的 NF- κ B シグナルの主要因子である IKK β 、RelA は変形性関節症の治療標的となりうると思われる。また新規創薬の潮流として、G タンパク共役型受容体やリン酸化酵素などを標的とした低分子化合物の設計が盛んに行われているが、このような上流の受容体や修飾酵素に関して NF- κ B は他に類を

みないほど豊富な知見が蓄積されている。以上のような背景・基礎検討に基づき、創薬の標的分子の探索を目標として、本研究では NF- κ B シグナルによる軟骨の包括的制御機構の解明のための研究を、生体レベルから分子レベルまで多角的に行う。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでの研究から、NF- κ B シグナルは軟骨発生・分化を促進する反面、関節軟骨変性を促進する酵素を誘導するという、一見相反する多彩な作用を有することを明らかにしてきた。本研究では、関節軟骨における NF- κ B シグナルの作用を in vivo, in vitro の両面から詳細に解析し、その全貌を明らかにするとともに、NF- κ B 関連の膨大なシグナルネットワークの蓄積を活用して新規創薬の標的分子を探索し、関節軟骨の変性予防・修復・再生の実現への道筋を切り開くことを目的とする。

3. 研究の方法

変形性関節症の進行過程における NF- κ B シグナルの時間空間的な活性化パターンを把握し、NF- κ B シグナルの標的遺伝子の網羅的解析を行いながら、RelA、IKK ノックアウトマウスの変形関節症モデルおよび関節炎モデルの解析から NF- κ B シグナルの関節軟骨における作用を生体レベルで検討する。次に軟骨細胞および軟骨器官培養を用いて、マウスモデルの解析で明らかになった NF- κ B の作用や軟骨基質合成、変性、アポトーシス、細胞老化などへの関与を詳細に検討する。このように生体レベルから分子レベルまでの多角的な検討により NF- κ B シグナルの生理的作用の全貌を解明した上で、関節軟骨維持や変性予防に有効な創薬標的候補分子を探索し、その作用を実験的に検証する。

(1) 変形性関節症における NF- κ B シグナル活性化の解析

NF- κ B シグナルの活性化は RelA の発現上昇と核内移行を伴うため、RelA GFP ノックインマウスを用いて NF- κ B の活性化の解析を行う。申請者らは、マウスの変形性関節症モデルを確立しており (Osteoarthritis Cartilage 13:632, 2005)、このモデルおよび自然発症モデルを用いて関節軟骨における NF- κ B シグナル活性化の時間空間的な活性化パターンの推移を解析する。また、関節軟骨を LMD 法により採取し、NF- κ B の活性化の経時的発現変化について遺伝子発現レベルにおいてもリアルタイム RT-PCR 法によって解析する。

(2) ChIP シーケンスとマイクロアレイによる NF- κ B シグナルの標的遺伝子の網羅的解析

NF- κ B シグナルは多彩な作用を有すると考えられるため、ChIP シーケンスとマイクロアレイを用いて網羅的に標的遺伝子の探索を行う。ヒト軟骨肉腫細胞株である SW1353 に RelA を強制発現し、DNA および mRNA を回収し、ChIP シーケンスおよびマイクロアレイ

イによる網羅的解析を行う。ChIP シーケンスにおいて *in vivo* での RelA の転写調節領域への結合があり、さらにマイクロアレイにおいて遺伝子発現変化がある遺伝子を抽出して、NF- κ B シグナルの標的遺伝子を絞り込む。(1)の変形性関節症の進行過程で発現の継時的変化がみられる遺伝子と網羅的解析により得られた RelA の標的候補遺伝子を統合し、変形性関節症に関連した RelA 標的遺伝子の絞り込みを行う。

(3)ノックアウトマウスを用いた NF- κ B シグナルの関節軟骨の維持・変性への関与の検討

RelA^{flox} マウスはすでに有しており、IKK^{flox} マウスを生物資源バンクから入手する。これらと

タモキシフェン誘導型軟骨特異的 Cre 作動マウス (Col2a1-CreERT) と交配し、ホモおよびヘテロノックアウトマウス、さらに両者の交配で得られる種々ダブルノックアウトマウスを作成し、軟骨特異的、かつ時期特異的に対象遺伝子をノックアウトし、変形性関節症モデルを外科的に作成して解析を行う。組織切片を用いて軟骨の変性の評価と免疫学的組織染色による軟骨基質合成・変性マーカー、アポトーシス、細胞老化の解析、(2)で候補に挙げた遺伝子の発現解析をタンパクレベルで行う。

(4) NF- κ B シグナルによる多彩な関節軟骨制御機構の全貌解明

NF- κ B シグナルの標的遺伝子の網羅的解析と、*in vivo* での変形性関節症モデルの解析結果から、軟骨基質産生・変性、アポトーシス、細胞老化を含めた NF- κ B シグナルの関節軟骨における様々な作用が明らかになると予想される。本項では、これらの作用を初代培養軟骨細胞および軟骨器官培養を用いて詳細に解析する。特に NF- κ B シグナルの量的な変化によってこれらの作用がどのように変化するかを厳密に検証する。

(4)-1 初代培養軟骨細胞を用いた解析

軟骨特異的 RelA, IKK^{flox} ホモおよびヘテロノックアウトマウスとコントロールマウスから初代培養軟骨細胞を採取・培養し、IL-1 や TNF α などの炎症性サイトカイン、peroxynitrite などの酸化ストレス誘発剤による刺激を行う。刺激開始後 24 時間で細胞を採取し、mRNA、タンパクを回収して、(2)、(3)で候補に挙げた遺伝子発現量を RT-PCR で解析する。また、アポトーシスの検出をウェスタンブロッティングで、H2AX や MitoSox を用いて DNA 障害について免疫細胞染色により解析する。

(4)-2 軟骨器官培養を用いた解析

(4)-1 で用いたノックアウトマウスから大腿骨頭を採取し、それぞれのノックアウトマウスの 3 群で炎症性サイトカイン刺激下に 72 時間培養を行い、軟骨基質の変性について培養液中に漏出した軟骨基質の成分であるグリコサミノグリカン定量を行う

(Nat protoc 6:388, 2011)。反応に違いが見られた場合には、使用した大腿骨頭をホモジェナイズして、mRNA を回収し、(4)-1 と同様に遺伝子発現の解析を多面的に行う。

(5) 関節軟骨の維持、変性予防を目指した NF- κ B シグナルの修飾化合物の探索

過去の膨大な研究によって、成長因子、TNF、IL-1 といった数多くのリガンドとその受容体、また多種多様な修飾酵素群からなる分子ネットワークによって NF- κ B シグナルを活性化することが明らかとなっている。このようなリガンド、受容体、修飾酵素は現在のドラッグデリバリーシステムによって干渉することが可能である。本学においては、10 万を超える化合物の中から適切なスクリーニングを経て目的の生物機能制御活性を有するヒット化合物を迅速に見出すことが可能である「生物機能制御化合物ライブラリー機構」が整備されている。前項までに明らかとなる関節軟骨の維持や変性に対する NF- κ B シグナルの作用メカニズムと、既知の豊富な分子ネットワークをあわせた統合的な知見の中から適切な標的分子を選択し、生物機能制御化合物ライブラリー機構の協力のもと化合物スクリーニングを行い、変形性関節症に対する新規治療薬を作出する。

(6) 培養細胞系、器官培養系とマウスモデルを用いた治療効果の検討

(5)で創薬の標的候補としたものについて、その標的分子を過剰発現あるいは発現抑制、機能抑制することによってどのような現象が起きるかを検討するため、軟骨細胞や軟骨器官培養系を用いて *in vitro* で基質合成・変性、アポトーシス、細胞老化について解析を行う。*In vitro* で期待された作用が認められた場合には、マウス変形性膝関節症誘導モデルにアデノウイルスベクターや siRNA、阻害剤や増強剤を局所投与あるいは全身投与し、変形性関節症の進行予防や、変性軟骨の修復など期待された作用が *in vivo* でも認められるかを実験的に検証する。その際は、投与量による治療効果の変化や関節周辺の組織や全身の主要臓器も組織学的に詳細に解析し、その分子を干渉したときに生じる様々な副作用について十分に基礎検討しておく。

4. 研究成果

まず、変形性膝関節症モデルを用いて、NF- κ B シグナルの活性化を経時的に解析した。変形性関節症モデルでは、おおよそ 8 - 12 週程度で関節軟骨が強く変性してくるので、変性を起こす前段階の状態を解析するために 2、4、6、8 週の時点で解析を行った。それぞれ 3 検体ずつ解析し、組織の解析を行った。変形性関節症が経時的に進行していることを確認した上で、免疫染色を行い、NF- κ B シグナルの活性化について時間的、空間的なパターンを把握した。これに伴い、関節軟骨の変性に関与する Adamts5, Hif2a, Mmp13 などについても同時に解析した。この結果、変

形性関節症モデルマウスでは、関節軟骨において NF- κ B シグナルが早期から活性化し、その下流因子である軟骨基質分解酵素も発現上昇していることが明らかとなった。

次に、タモキシフェン誘導型軟骨特異的 Cre 作動マウスを用いて、Rela のホモ、ヘテロノックアウトマウスを作成した。これを用いて変形性関節症モデルを作成し、Rela が軟骨変性に与える影響について解析した。その結果、Rela ホモノックアウトマウスでは、コントロールと比較して軟骨の変性が優位に進行していた。ホモノックアウトマウスでは、予想通り軟骨基質分解酵素の発現低下がみられたが、軟骨変性が進行していた。その原因として、関節軟骨のアポトーシスが更新していることが明らかとなった。一方、ヘテロノックアウトマウスでは、関節軟骨のアポトーシスの亢進はみられず、ヘテロノックアウトマウスにおいて軟骨基質分解酵素の発現抑制がみられ、変形性関節症の進行は抑制されていた。これらの現象について ex vivo でマウス大腿骨頭を用いた解析によって実証した。さらに in vitro においても Rela ホモノックアウトおよびヘテロノックアウトマウスから採取した初代軟骨細胞を用いて解析をおこなったところ、ホモノックアウトマウス由来の軟骨細胞は TNF 刺激下でアポトーシスが亢進していることがわかった。一方、ヘテロノックアウトマウス由来の軟骨細胞ではアポトーシスの誘導がみられなかった。これらの結果から Rela は抗アポトーシス因子を誘導している可能性を考えマイクロアレイを行なった。その結果、Rela によって誘導される抗アポトーシス因子を同定した。その中で P85 が Rela によって直接転写誘導されることを明らかにした。ヘテロノックアウトマウスでアポトーシスの亢進が生じなかった理由として、これら下流遺伝子の発現調節は、Rela の発現量が少量でも抗アポトーシス因子が誘導されることが関係していると考えられた。

NF- κ B シグナルの適度な抑制により変形性関節症の信仰を抑制しようという仮定のもと、IKK 阻害剤など NF- κ B シグナルを抑制剤の関節内注射モデルによる解析を行った。マウス変形性ひざ関節症モデルにおいて、関節不安定性惹起後に関節注射を行い、継時的にマウスひざ関節を組織学的に評価した。この際、IKK 阻害剤の至適濃度を明らかにするために様々な濃度で解析を行った。その結果、濃度依存性に変形性関節症の進行が抑制できる傾向にあった。一方、高濃度では変形性関節症の進行が促進していた。これらの結果から、IKK 阻害剤による適度な NF- κ B シグナルの抑制によって、変形性関節症の進行を抑制することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Kobayashi H, Chang SH, Mori D, Itoh S, Hirata M, Hosaka Y, Taniguchi Y, Okada K, Mori Y, Yano F, Chung UI, Akiyama H, Kawaguchi H, Tanaka S, Saito. Biphasic regulation of chondrocytes by Rela through induction of anti-apoptotic and catabolic target genes. *Nat Commun.* 2016 Nov 10;7:13336. doi: 10.1038/ncomms13336. PMID: 27830706
2. Taniguchi Y, Kawata M, Ho Chang S, Mori D, Okada K, Kobayashi H, Sugita S, Hosaka Y, Inui H, Taketomi S, Yano F, Ikeda T, Akiyama H, Mills AA, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, Saito T. Regulation of Chondrocyte Survival in Mouse Articular Cartilage by p63. *Arthritis Rheumatol.* 2017 Mar;69(3):598-609. doi: 10.1002/art.39976. PMID: 27792866

〔学会発表〕(計 1 件)

村橋靖ら I kappa B alpha キナーゼ阻害剤の関節内投与は NF kappa B の制御を介して変形性関節症モデルマウスの病態進行を抑制する 軟骨代謝学会 2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林寛 (Kobayashi Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20407951

(2) 研究分担者

澤田良子 (Sawada Ryoko)

東京大学・医学部附属病院・病院診療医

研究者番号：30648308

矢野文子 (Yano Fumiko)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：80529040

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし