

平成 30 年 6 月 18 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：15K10462

研究課題名(和文) 転写因子群C/EBPファミリーによる関節疾患制御

研究課題名(英文) Regulation of articular joint diseases by transcription factor family C/EBP

研究代表者

森崎 裕 (Morizaki, Yutaka)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30508099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CCAAT/エンハンサー結合タンパク質(C/EBP) betaは軟骨細胞の分化増殖を制御することが知られているが、今回我々は軟骨細胞における他のC/EBPファミリー分子の作用を解明すべく本研究を実施した。転写活性化ドメインを有するC/EBPファミリー分子ではCebpb、Cebpdの発現が豊富であった。軟骨細胞株による解析により、Cebpa、Cebpb、Cebpdには軟骨同化分子を抑制し、変性関連分子を誘導することが明らかになった。C/EBP共通のドミナントネガティブフォームであるACEBPは、これらと反対に軟骨細胞の同化を促進し、変性を抑制することが分かった。

研究成果の概要(英文)：CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta regulates chondrocyte differentiation and proliferation during endochondral ossification. In the present study, we examined expression and function of other C/EBP family members in chondrocytes. Among four members with transactivation domain, expression of Cebpb and Cebpd was abundant compared to Cebpa. C/EBPs suppressed expressions of early differentiation markers including Col2a1, aggrecan and Sox9, enhanced those of late differentiation markers including Mmp13, Vegfa and Col10a1, and decelerated cell proliferation, indicating their overlapped functions in chondrocytes. In contrast, A-CEBP, which exerts a dominant-negative effect against all C/EBPs, increased expressions of early differentiation markers and decreased those of late differentiation markers.

研究分野：整形外科学

キーワード：整形外科学 変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

近年の社会高齢化に伴い変形性関節症を筆頭とする運動器関節疾患の罹患数は急増しており、本大学で実施した日本最大のコホート調査 (ROAD プロジェクト) によると、我が国でのレントゲン上での変性疾患患者は延べ6千万人以上、有症状者だけでも約2千万人と推定されている。臨床現場では長年の間、人工関節置換術やリハビリテーションなどの侵襲的あるいは姑息的な対症療法が主体となっており、高齢者の生活の質を著しく低下させる軟骨変性疾患について抜本的な治療となる軟骨再生医療の開発が待望久しい。近年話題性に富む人工幹細胞による軟骨再生は、進捗はあるものの当面机上の域を出ない。変形性関節症の成因の解明とその抑制手段の開発は、人工幹細胞による軟骨再生が可能となる近未来を待てない高齢者にとって必要不可欠と言える。

現在までに我々は変形性関節症発症の大きな要因が、永久軟骨である関節軟骨の肥大分化であることを見出してきた (*Arthritis Rheum* 50:3561, 2004、*Nat Med* 12:665, 2006、*Arthritis Rheum* 54:2462, 2006、*EMBO Rep* 8:504, 2007、*J Clin Invest* 118:2506, 2008、*Nat Med* 16:678, 2010、*Proc Natl Acad Sci USA* 110:1875, 2013、*J Biol Chem* 288:28620, 2013)。しかし、現在のところ軟骨肥大分化を抑制し得る画期的な方策は未だ確立されていない。我々はこれまでに転写因子 CCAAT/エンハンサー結合タンパク質 (C/EBP) が肥大分化を促進し、軟骨基質分解酵素を誘導することを報告した (*Hum Mol Genet* 21:1111, 2012、*PLoS One* 4:e4543, 2009)。また C/EBP ノックアウトマウスでは骨格系や重要臓器に異常が生じないにも関わらず、変形性関節症モデルを作成すると軟骨基質分解が抑制されることを確認した。また関節リウマチに代表される炎症性関節疾患も、患者数の多い重大な疾患であるが、疾患の主体となる関節滑膜の炎症を惹起する中心作用を担う因子の一つである IL-6 の転写制御を司るのが転写因子 C/EBP であることも古くから知られている。

C/EBP は C/EBP ファミリーに属する転写因子である。このファミリーは共通のロイシンジッパードメイン構造を持つ $\text{C/EBP}\alpha$, $\text{C/EBP}\beta$, $\text{C/EBP}\delta$, $\text{C/EBP}\epsilon$ の6種から成り、炎症、細胞増殖、分化など様々な細胞で多岐に渡る役割を果たすことが知られており、ファミリー間でヘテロダイマーを形成して相互作用を示す報告や、重複した機能を示す報告が相次いでいる。関節軟骨では C/EBP に関する報告ばかりであるが、C/EBP ファミリーが包括的に軟骨細胞を制御し、変形性関節症や炎症性関節疾患の発症・進行に関わる可能性も十分考えられる。そこで我々は基礎検討を行ったところ、C/EBP ファミリーの複数の分子が関節軟骨に豊富に発現し、炎症やアポトーシスに関連する遺伝子を強力に誘導しうることを突き

止めた。即ち、C/EBP ファミリーは変形性関節症のみならず、炎症やアポトーシスを主病態とする関節リウマチなどの炎症性関節疾患にも関与することが示唆され、そのメカニズムの解明は幅広い関節疾患の病態解明に繋がる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究では、変形性関節症と炎症性関節疾患における C/EBP ファミリー個々の発現を詳細に調べ、培養細胞レベル、生体レベルでそれらの機能を解明するとともに、ファミリー分子間の相互作用を検証し、さらに標的遺伝子についても網羅的に解析する。これらの研究を通じて、変形性関節症と炎症性関節疾患における C/EBP ファミリー全体の包括的な役割を明らかにする。

3. 研究の方法

C/EBP ファミリー転写因子のうち、転写活性化ドメインを有する分子について、マウス、ヒト軟骨細胞における発現を mRNA レベルで確認した。またマウス変形性関節症モデルマウスの時系列サンプルを用いて、タンパクレベルでの発現も確認した。次に軟骨細胞株 ATDC5 やマウス培養軟骨細胞にこれらの分子を強制発現して、細胞増殖、分化におけるそれぞれの機能を解析した。機能喪失実験としては、C/EBP 共通のドミナントネガティブフォームである A-C/EBP を作成し、強制発現した。効果の強い分子についてはトランスジェニックマウスを作成した。

4. 研究成果

C/EBP ファミリー分子のうち、転写活性化ドメインを有する Cebpa, Cebpb, Cebpd, Cebpe の4つについて発現を調べたところ、マウス関節軟骨では、Cebpb の発現が最も豊富であり、Cebpd の発現がその半分程度であった。これらの2分子と比べると Cebpa は1桁ほど発現量が低く、Cebpe の発現はほとんどみられなかった。ヒト関節軟骨細胞でもほぼ同様の傾向であることが分かった。

次にマウス胎児骨端軟骨を用いて、軟骨内骨化における発現変化を解析した。Cebpb タンパクは未分化な関節周囲軟骨細胞層から増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層に至るまで十分な発現量を示していたが、Cebpd は増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層での発現は Cebpb と比して弱かった。Cebpa も Cebpd と同様の傾向であった。

さらに ATDC5 の分化過程における発現量についても解析した。Cebpb, Cebpd, Cebpa のいずれも、分化初期から発現が増加する傾向がみられ、マウス胎児骨端軟骨の免疫組織染色での傾向とは若干の相違を見せた。

マウス変形性関節症モデルを用いた解析では、関節軟骨変性に伴ってこれらの分子の発現はいずれも初期には増加し、末期には減少していた。ヒト患者サンプルでの解析でも同

様の結果が得られ、C/EBP ファミリーは変性初期に病態に関与している可能性が考えられた。

次に、培養細胞を用いて機能解析実験を行った。Cebpa, Cebpb, Cebpd を軟骨細胞株 ATDC5 に DOX 誘導性レンチウイルスを用いて強制発現させたところ、軟骨基質 2 型コラーゲンの分解酵素 matrix metalloproteinase 13 (MMP13) や、血管誘導因子 vascular endothelial growth factor (VEGF)、肥大軟骨細胞の特異的マーカー 10 型コラーゲン (COL10A1) が誘導される一方、2 型コラーゲンやアグリカン、転写因子 SOX9 といった軟骨の維持に必須の分子の発現が低下した。またこの 3 分子を強制発現させた細胞を用いて増殖アッセイを行ったところ、細胞株の増殖の速度が低下することも分かった。

次に機能喪失実験を行うため、C/EBP 共通のドミナントネガティブフォームである A-CEBP を作成した。A-CEBP が C/EBP ファミリー分子の上記の作用に拮抗することを実験的に確認した。その上で同様に DOX 誘導性レンチウイルスを用いて強制発現させたところ、上記の結果とは反対に、2 型コラーゲン、アグリカン、SOX9 の発現を誘導し、MMP13、VEGF、COL10A1 の発現を抑制した。細胞増殖についても C/EBP の強制発現と反対に、有意に促進することが分かった。

A-CEBP が変動させる遺伝子についてマイクロアレイを用いて解析したところ、A-CEBP は軟骨基質や軟骨細胞の成熟を促す分子の発現を促進し、反対に中胚葉マーカーとされる分子の発現を抑制していた。

現在は A-CEBP が生体レベルでどのような作用を発揮するかを調べるため、Cre 存在下に A-CEBP を発現するトランスジェニックマウスを作成し、検証を行っている。

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 13 件)

1. Miyamoto H, Morizaki Y, Kashiyama T, Tanaka S. Grey-scale sonography and sonoelastography for diagnosing carpal tunnel syndrome. *World J Radiol.* 2016 Mar 28;8(3):281-7. doi:10.4329/wjr.v8.i3.28.
2. Kodama R, Muraki S, Oka H, Iidaka T, Teraguchi M, Kagotani R, Asai Y, Yoshida M, Morizaki Y, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T, Yoshimura N. Prevalence of hand osteoarthritis and its relationship to hand pain and grip strength in Japan: The third survey of the ROAD study. *Mod Rheumatol.* 26:767-73, 2016. doi: 10.3109/14397595.2015.1130673
3. Makii Y, Asaka M, Setogawa S, Fujiki S, Hosaka Y, Yano F, Oka H, Tanaka S, Fukui N, Yanagihara D, and Saito T. Alteration of gait parameters in a mouse model of surgically-induced knee osteoarthritis. *J Orthop Surg (Hong Kong)* May-Aug;26:2309499018768017, 2018. doi: 10.1177/2309499018768017.
4. Oichi T, Taniguchi Y, Soma K, Chang SH, Yano F, Tanaka S, and Saito T. A Mouse Intervertebral Disc Degeneration Model by Surgically-Induced Instability. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2017 Oct 9. doi: 10.1097/BRS.0000000000002427. [Epub ahead of print]
5. Huang KC, Yano F, Murahashi Y, Takano S, Kitaura Y, Chang SH, Soma K, Ueng S, Tanaka S, Ishihara K, Okamura Y, Moro T, and Saito T. Sandwich-type PLLA-nanosheets loaded with BMP-2 induce bone regeneration in critical-sized mouse calvarial defects. *Acta Biomaterialia* 59:12-20, 2017. doi: 10.1016/j.actbio.2017.06.041.
6. Kawata M, Taniguchi Y, Mori D, Yano F, Ohba S, Chung UI, Shimogori T, Mills SS, Tanaka S, and Saito T. Different Regulation of Limb Development by p63 Transcript Variants. *PLoS One* 12:e0174122, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0174122.
7. Taniguchi Y, Kawata M, Chang SH, 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, and Saito T. Regulation of Chondrocyte Survival in Mouse Articular Cartilage by p63. *Arthritis Rheumatol.* 69:598-609, 2017. doi: 10.1002/art.39976.
8. 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, and Saito T. Biphasic regulation of chondrocytes by Rela through induction of anti-apoptotic and catabolic target genes. *Nat Commun.* 7:13336, 2016. doi: 10.1038/ncomms13336.
9. Chang SH, Yasui T, Taketomi S, Matsumoto T, Kim-Kaneyama J, Omiya T, Hosaka Y, Inui H, Omata Y, Yamagami R, Mori D, Yano F, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Comparison of mouse and human ankles and establishment of mouse ankle osteoarthritis models by surgically-induced instability. *Osteoarthritis Cartilage.* 24:688-97, 2016. doi: 10.1016/j.joca.2015.11.008.

10. Saito T, Yano F, Mori D, Kawata M, Hoshi K, Takato T, Masaki H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Chung UI, Tanaka S. Hyaline Cartilage Formation and Tumorigenesis of Implanted Tissues Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Biomed Res.* 36:179-86, 2015. doi: 10.2220/biomedres.36.179.
 11. Sugita S, Hosaka Y, Okada K, Mori D, Yano F, Kobahashi H, Taniguchi Y, Mori Y, Okuma T, Chang SH, Kawata M, Taketomi S, Chikuda H, Akiyama H, Kageyama R, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, Ohba S, Saito T. Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112:3080-5, 2015. doi: 10.1073/pnas.1419699112.
 12. Okuma T, Hirata M, Yano F, Mori D, Kawaguchi H, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Regulation of Mouse Chondrocyte Differentiation by CCAAT/Enhancer-binding Proteins. *Biomed Res.* 36:21-9, 2015. doi: 10.2220/biomedres.36.21.
 13. Moro T, Takatori Y, Kyomoto M, Ishihara K, Kawaguchi H, Hashimoto M, Tanaka T, Oshima H, Tanaka S. Wear resistance of the biocompatible phospholipid polymer-grafted highly cross-linked polyethylene liner against larger femoral head. *J Orthop Res.* 2015 Jul;33(7):1103-10. doi: 10.1002/jor.22868.
- [学会発表](計 38 件)
1. 牧井勇磨, 矢野文子, 他: 転写因子 HIF-2A は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第31回日本軟骨代謝学会、名古屋、2018.3.2
 2. 玄峰俊, 矢野文子, 他: -catenin シグナルは関節軟骨最表層の維持に必須である 第31回日本軟骨代謝学会、名古屋、2018.3.2
 3. 村橋靖崇, 矢野文子, 他: 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 第31回日本軟骨代謝学会、名古屋、2018.3.2
 4. 村橋靖崇, 矢野文子, 他: 頭蓋冠臨界欠損モデルにおける rhBMP-2 担持ナノシートの骨形成促進効果 第39回日本バイオマテリアル学会、東京、2017.11.20 (ポスター)
 5. 牧井勇磨, 矢野文子, 他: 転写因子 HIF-2a は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第32回日本整形外科学会基礎学術集会、那覇、2017.10.27
 6. 玄峰俊, 矢野文子, 他: -catenin シグナルは関節軟骨最表層の維持に必須である 第32回日本整形外科学会基礎学術集会、那覇、2017.10.27
 7. 相馬一仁, 矢野文子, 他: 頸椎後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子 RSP02 の検討 第32回日本整形外科学会基礎学術集会、那覇、2017.10.27
 8. 村橋靖崇, 矢野文子, 他: 頭蓋冠臨界欠損モデルにおける rhBMP-2 担持ナノシートの骨形成促進効果 第32回日本整形外科学会基礎学術集会、那覇、2017.10.27
 9. 村橋靖崇, 矢野文子, 他: 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 第32回日本整形外科学会基礎学術集会、那覇、2017.10.26
 10. 村橋靖崇, 矢野文子, 他: 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 第35回日本骨代謝学会、大阪、2017.7.29
 11. 玄峰俊, 矢野文子, 他: -catenin シグナルは関節軟骨最表層の維持に必須である 第35回日本骨代謝学会、大阪、2017.7.28
 12. 牧井勇磨, 矢野文子, 他: 転写因子 HIF-2a は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第35回日本骨代謝学会、大阪、2017.7.28
 13. 村橋靖崇, 矢野文子, 他: 頭蓋冠臨界欠損モデルにおける rhBMP-2 担持ナノシートの骨形成促進効果 第35回日本骨代謝学会、大阪、2017.7.28
 14. 村橋靖崇, 矢野文子, 他: 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 第3回日本骨免疫学会、石垣、2017.6.29
 15. Oichi T, Yano F, et al. A Mouse Intervertebral Disc Degeneration Model by Surgically-induced Instability. Annual meeting of the Orthopaedic Research Society. San Diego 2017.3.21 (ポスター)
 16. Soma K, Yano F, et al. Roles Of R-spondin2; The Susceptibility Gene For Ossification Of Posterior Longitudinal Ligament. Annual meeting of the Orthopaedic Research Society. San Diego 2017.3.20 (ポスター)
 17. 玄峰俊, 矢野文子, 他: -catenin シグナルは関節軟骨最表層の維持に必須である 第30回日本軟骨代謝学会、京都、

- 2017.3.4
18. 牧井勇磨、矢野文子、他：転写因子 HIF-2a は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第 30 回日本軟骨代謝学会、京都、2017.3.4
 19. Xuan F, Yano F, et al. Gait analyses of surgically induced osteoarthritis model mice by motion capture system. 2016 Cold Spring Harbor Asia Conference on Bone & Cartilage, Suzhou, China, 2016.10.24-28 (ポスター)
 20. Yano F, Saito T, et al. Runx1 contributes to articular cartilage maintenance through enhancement of cartilage matrix production and suppression of hypertrophic differentiation. 2016 Cold Spring Harbor Asia Conference on Bone & Cartilage, Suzhou, China, 2016.10.24-28 (ポスター)
 21. 玄峰俊、矢野文子、他：-catenin シグナルは関節軟骨最表層の維持に必須である 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡、2016.10.13
 22. 矢野文子、齋藤琢、他：Runx1 による軟骨分化制御機構 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡、2016.10.13
 23. 相馬一仁、矢野文子、他：後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子 RSP02 の検討 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡、2016.10.13
 24. 牧井勇磨、矢野文子、他：転写因子 HIF-2A は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡、2016.10.13
 25. Makii Y, Yano F, et al. Transcription factor HIF-2alpha is expressed in superficial zone of articular cartilage, and contributes to joint homeostasis. Australian and New Zealand Bone and Mineral Society. Gold Coast. 2016.8.21
 26. 相馬一仁、矢野文子、他：後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子 RSP02 の検討 第 16 回東京骨関節フォーラム、東京、2016.7.30
 27. 矢野文子、齋藤琢、他：Runx1 による軟骨分化制御機構 第 34 回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2016.7.22
 28. 相馬一仁、矢野文子、他：後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子 RSP02 の検討 第 34 回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2016.7.21 (ポスター)
 29. 玄峰俊、矢野文子、他：-catenin シグナルは関節軟骨最表層の維持に必須で

- ある 第 34 回日本骨代謝学会学術集会、大阪 2016.07.21 (ポスター)
30. 牧井勇磨、矢野文子、他：転写因子 HIF-2 α は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第 34 回日本骨代謝学会学術集会、大阪 2016.07.21 (ポスター)
 31. 相馬一仁、矢野文子、他：後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子 RSP02 の検討 第 2 回日本骨免疫学会、沖縄、2016.7.6
 32. 牧井勇磨、矢野文子、他：転写因子 HIF-2A は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第 2 回日本骨免疫学会、沖縄、2016.7.8
 33. 玄峰俊、矢野文子、他：-catenin シグナルは関節軟骨最表層の維持に必須である 第 2 回日本骨免疫学会、沖縄、2016.7.7
 34. 張成虎、矢野文子、他：Gremlin1 は過剰なメカニカルストレスで誘導され軟骨変性を促進する 第 2 回日本骨免疫学会、沖縄、2016.7.7
 35. 矢野文子、齋藤琢、他：Runx1 による軟骨分化制御機構 第 2 回骨免疫学会、沖縄、2016.7.6
 36. Kawata M, Yano F, et al. Different regulation of limb development by p63 transcript variants. Annual meeting of the Orthopaedic Research Society. Orlando 2016. 3. 8
 37. 張成虎、矢野文子、他：マウス変形性足関節症モデルの確立 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 富山 2015.10.22-23
 38. 矢野文子、齋藤琢、他：Runx1 による軟骨分化制御機構 第 16 回運動器科学研究会、鹿児島、2015.9.12

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

東京大学医学部整形外科
<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森崎 裕 (MORIZAKI Yutakta)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30508099

(2) 研究分担者

田中 健之 (TANAKA Takeyuki)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00583121

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

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()