

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15546

研究課題名(和文) 軟骨再生戦略のための軟骨最表層細胞 lineage と運命の解明

研究課題名(英文) Analysis of zonal lineage of articular chondrocyte for cartilage regeneration

研究代表者

木村 友厚 (KIMURA, Tomoatsu)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：80167379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：各層軟骨細胞の役割を知るために、中深層、表層軟骨細胞を標識化したマウスを作製し軟骨変性時の細胞の lineage を検討した。その結果、軟骨の中深層細胞由来の Col10 陽性 YFP 陽性軟骨細胞が、軟骨変性の進行とともに軟骨深層と tidemark 下に出現した。このことから tidemark 下の肥大軟骨細胞も中深層の軟骨細胞に由来する。次に軟骨細胞肥大化にかかわる sik3 を中深層で欠損するマウスを作成し、軟骨変性誘導を行い解析した結果、軟骨細胞の肥大化が各層・tidemark 下でも見られず、各層が良好に維持されていた。sik3 経路の抑制で軟骨細胞の肥大化を抑制し軟骨変性を阻止できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have produced mouse lines with genetic labelling of chondrocyte in surface-deeper zones. After induction of cartilage degeneration by DMM method, YFP+ cells of mid-deep cartilage zone origin appeared as col10+ hypertrophic chondrocytes in the deep zone and calcified zones, indicating these hypertrophic cells were originated from mid-deep zone chondrocytes.

We then, produced sik3 conditional KO mouse in cartilage. After induction of degeneration by DMM, the mouse did not show apparent hypertrophic chondrocyte formation neither in deep zone or calcified zone, suggesting that the inhibition of the sik3 pathway may become a therapeutic target to prevent cartilage degeneration.

研究分野：整形外科学

キーワード：関節病学 軟骨細胞 軟骨変性 変形性関節症 起源 分化 再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節軟骨は軟骨細胞と豊富な細胞外マトリックスにより形成されており、一見すると非常に単純な関節内構造物である。しかしそのマトリックスの微細構造は複雑であり、表層と中間層・深層では細胞形質も異なり、関節軟骨組織は異方性を有している。関節軟骨の中でその最表層は線維性の lamina splendens と直下の tangential zone の扁平細胞で構成されており、この最表層は細胞・マトリックスともに特異的で、またルプリシン (Prg4) などの軟骨保護・潤滑蛋白を発現している。一方深部では軟骨マトリックスは石灰化しており、石灰化軟骨層を形成し、軟骨下骨に繋がっている。このような最表層から深層に至る特異的な軟骨層の存在は、摺動やショック吸収という関節軟骨の機能にとって必須である。しかしその層を構成する細胞の起源は、例えば最表層は滑膜細胞と同じ lineage ではないか、などと推測されてはきたものの、未だ詳細は不明であった。さらに軟骨変性過程では中層から深層にかけて肥大軟骨細胞が出現するが、その origin についても十分に明確にはなっていない。

(2) 変性や破壊を受けた関節軟骨を再生する観点からは、細胞移植、すなわち軟骨細胞や幹細胞移植などによる種々の再生法が試みられ、既に一定の成果を示している。しかし多くの場合は単なる“軟骨組織と軟骨下骨の再生”に留まり、最表層と石灰化軟骨層を含む軟骨各層の再構築、すなわち真の関節軟骨再生が達成されていない。そのため、一旦修復されてもその後の変性進行が避けられない。軟骨各層の重要性は、実際に最表層と分泌蛋白 Prg4 を欠く疾患では、著しい関節変性を発症することからも明らかである (Jay GD, Warman ML, et al. PNAS 2007;104:6194 ほか)。真の関節軟骨再生や軟骨変性治療のためには、軟骨各層の再生を達成するか、あるいは軟骨各層を破綻させない治療戦略が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、関節軟骨の細胞起源と肥大軟骨細胞の出現を明らかにし、軟骨再生や軟骨変性阻止に向けて、最表層細胞や肥大軟骨細胞をターゲットとした治療戦略を目指す

3. 研究の方法

(1) 軟骨細胞特異的に Cre を発現するマウスを作成する。2 種類のマウス (細胞種特異的 Cre 発現マウスと 2 つの loxP 配列を備えたレポーターマウス) を準備し、交配によってその両方を持つ個体を得る事により、in vivo で細胞の運命追跡 (lineage 解析) を行う。各細胞の細胞系譜解析には、軟骨細胞、滑膜/軟骨最表層細胞、各々の genomic DNA に特異的に目印つけるために、Col11a2, Prg4 の各プロモーター/エンハンサーを使用する。これ

らのマウスに tamoxifen を腹腔内投与し、tamoxifen 誘導性に Cre recombinase 活性を導いて、標的細胞とその子孫となる全細胞に標識する。

得られた各マウス系統について、膝関節組織での各レポーターの部位特異的発現を蛍光顕微鏡で解析する。合わせて免疫染色によるマトリックス遺伝子発現解析を行う。

(2) 軟骨変性における軟骨細胞分化の関与を知るために、作成した Col11a2-CreER; R26-stopfllox-EYFP マウス (Col112a-YFP マウス) を用い、lineage tracing を行う。8w 齢の Col112a-YFP マウスに tamoxifen を投与後、緩徐に関節軟骨変性を誘導するために、一側の膝関節の半月板を不安定化する DMM 手術を行い、他側膝には sham 手術を行う。手術後 8 ~ 12 週後に、関節軟骨の変性進行を組織学的に解析する。また関節軟骨細胞の異常分化 (肥大化) を Col10 などの発現と免疫組織化学で検討する。さらに YFP の発現をトレースし、YFP 陽性細胞と軟骨変性経過中の各層軟骨細胞、出現した肥大軟骨細胞との関連を明らかにする。

(3) 軟骨変性過程における軟骨細胞の肥大化に関与する可能性のある salt-inducible kinase 3 (sik3) を目的分子とし、軟骨細胞特異的に sik3 を欠失する conditional KO マウスを作成する。本マウスに tamoxifen 誘導性に sik3 を欠損させた後に、実験的軟骨変性を DMM 法にて作成し、関節軟骨各層の細胞がどうなるか、軟骨細胞の肥大化が抑制できるか、さらに軟骨変性の進行が阻止できるかを明らかにする。もし sik3 欠損による軟骨細胞肥大化抑制や軟骨変性抑制効果が明らかとなれば、引き続き sik3 経路を抑制できる compound の検索を開始する。

4. 研究成果

(1) 軟骨変性における軟骨細胞の関与を知るために、まず関節軟骨細胞の lineage tracing を行うための Col11a2-CreER; R26-stopfllox-EYFP マウス (Col112a-YFP マウス) を作製した。8w 齢の Col112a-YFP マウスに tamoxifen を投与後、一側膝に関節軟骨変性を誘導する DMM 手術、他側膝に sham 手術を行った後、YFP と軟骨細胞肥大化のマーカーである Col10 の発現を検討した。その結果、軟骨変性の進行とともに、Col10 の発現が tidemark より浅層の肥大化した軟骨細胞にも認められた。さらに tidemark 下の石灰化軟骨層内での肥大軟骨細胞が顕在化した。YFP の発現を trace すると、Col10 を周囲に発現する YFP 陽性細胞が、関節軟骨変性の進行とともに、tidemark の浅層と深層の両方で観察された。このことから、これらの肥大軟骨細胞は、tidemark 下に出現した細胞も含めて、軟骨変性が生じる前の中間層 ~ 深層の軟

骨細胞に由来することが、初めて明らかとなった。この肥大軟骨細胞が tidemark 下に移動するメカニズムは不明であるが、単なる tidemark の上昇のみならず、軟骨下骨からの血管侵入と石灰化軟骨基質分解とリンクしている可能性が考えられるに至った。一方、Prg4 プロモーター-/エンハンサーなどを用いた lineage 解析については、引き続きマウス系統を作成中であり、今後、軟骨修復や軟骨変性の進行過程における、表層細胞の動態が明らかになるものと考えている。

(2) 発生時の成長軟骨では salt-inducible kinase 3(sik3)が軟骨細胞の肥大分化に関与していることが知られている。そこで、上記の結果で見られたような、軟骨変性に伴って出現する深層ならびに石灰化軟骨層内の肥大軟骨細胞を制御する分子候補の1つとして、sik3 が考えられた。本分子が関節軟骨における軟骨細胞肥大にも関与していることを明らかにするために、タモキシフェン誘導性の関節軟骨特異的 sik3 欠失マウスを作成した。本マウスに tamoxifen 誘導性に sik3 を欠損させた後に、膝関節に DMM 手術を行って解析した結果、sik3 欠損マウスでは関節軟骨細胞の肥大化が関節軟骨の表層～深層に出現することはなく、また tidemark 下での出現や遊走も見られなかった。また sik3 欠損マウスでは関節軟骨の各層が維持され、軟骨マトリックスの各遺伝子発現も正常に近く、変性進行がほとんど認められなかった。これらのことから、sik3 経路のノックダウンまたは抑制が、関節軟骨細胞の肥大化を抑制し、ひいては軟骨変性を効果的に阻止できることが明らかとなった。したがって、この軟骨肥大化関連分子である sik3 経路が、関節軟骨変性を抑制する治療のターゲットとなりうることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Yahara Y, Takemori H, Okada M, Kosai A, Yamashita A, Kobayashi T, Fujita K, Itoh Y, Nakamura M, Fuchino H, Kawahara N, Fukui N, Watanabe A, Kimura T, Tsumaki N. Pterostatin B prevents chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis in mice by inhibiting Sik3. *Nat Commun.* 2016;24;7:10959. DOI: 10.1038/ncomms10959.
Nogami M, Kimura T, Seki S, Matsui Y, Yoshida T, Koike-Soko C, Okabe M, Motomura H, Gejo R, Nikaido T. A human amnion-derived extracellular matrix-coated cell-free scaffold for cartilage repair: In vitro and in vivo

studies. *Tissue Engineering Part A*, 2016;22:680-8, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2015.0285>
Hamazaki K, Kawaguchi Y, Nakano M, Yasuda T, Seki S, Hori T, Hamazaki T, Kimura T. Mead acid (20:3n-9) and n-3 polyunsaturated fatty acids are not associated with risk of posterior longitudinal ligament ossification: results of a case-control study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2015;96:31-6. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2015.01.003>
Nakamura Y, Kikugawa S, Seki S, Takahata M, Iwasaki N, Terai H, Matsubara M, Fujioka F, Inagaki H, Kobayashi T, Kimura T, Kurahashi H, Kato H. PCSK5 mutation in a patient with the VACTERL association. *BMC Res Notes.* 2015; 9:228. DOI: 10.1186/s13104-015-1166-0

〔学会発表〕(計 8 件)

Makino H, Seki S, Kawaguchi Y, Yahara Y, Nogami M, Watanabe K, Kimura T. Vitamin D binding protein (DBP) is increased in adolescent idiopathic scoliosis patients with thoracolumbar/lumbar curvatures. Orthopaedic Research Society, 2017, March 19-21, San Diego, CA.
野上 真紀子, 木村 友厚, 関 庄二, 吉田 淑子, 元村 拓, 岡部 素典, 相子 千加, 二階堂 敏雄. 軟骨再生治療における羊膜由来細胞と細胞外マトリックスの有用性. 第 16 回再生医療学会, 2017, 3.7-9, 宮城県・仙台市.
箭原 康人, 竹森 洋, 岡田 稔, 高才 東, 山下 晃弘, 小林 与人, 藤田 香里, 伊東 裕美, 中村 正裕, 淵野 裕之, 川原 信夫, 福井 尚志, 渡辺 亮, 木村 友厚, 妻木 範行. 骨代謝と軟骨代謝の接点: SIK3 をターゲットとした変形性関節症の治療. 第 34 回日本骨代謝学会学術集, 2016, 7.20-2, 大阪府・大阪市.
箭原 康人, 竹森 洋, 岡田 稔, 高才 東, 山下 晃弘, 小林 与人, 藤田 香里, 伊東 裕美, 中村 正裕, 淵野 裕之, 川原 信夫, 福井 尚志, 渡辺 亮, 木村 友厚, 妻木 範行. 軟骨細胞特異的な Sik3 の欠失は関節軟骨の厚みを増大させる. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016, 7.13-14, 福岡県・福岡市.
Yahara Y, Seki S, Makino H, Motomura H, Nogami M, Shiozawa S, Tsumaki N, Kimura T. Anti-degenerative effect of

selective c-Fos/AP-1 inhibitor, T-5224, for mouse intervertebral discs. Orthopaedic Research Society, 2016, March 5-8, Orland, FL.

Makino H, Seki S, Kawaguchi Y, Nogami M, Watanabe K, Kimura T. Differential proteome analysis of serums from adolescent idiopathic scoliosis patients. Orthopaedic Research Society, 2016, March 5-8, Orland, FL.

Makino H, Seki S, Motomura H, Yahara Y, Nogami M, Watanabe K, Shunich S, Kimura T. Selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1 inhibits the gene expression of catabolic factors and protects the progression of intervertebral disc degeneration. Orthopaedic Research Society, 2016, March 5-8, Orland, FL.

筋原 康人, 竹森 洋, 木村 友厚, 妻木 範行. Sik3 経路阻害剤は変形性関節症の進行を抑制する. 第 29 回日本軟骨代謝学会, 2016, 2.19-20 広島県・広島市.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 友厚 (KIMURA, Tomoatsu)

富山大学大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：80167379

(2)研究分担者

関 庄二 (SEKI, Shoji)

富山大学大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：00432112

野上 真紀子 (NOGAMI, Makiko)

富山大学附属病院・助教

研究者番号：30750202

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし