

令和 元年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0296

研究課題名（和文）軟骨保護・再生因子Runx1をターゲットとした変形性関節症の治療標的分子の探索（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Runx1 contributes to articular cartilage maintenance by enhancement of cartilage matrix production and suppression of hypertrophic differentiation(Fostering Joint International Research)

研究代表者

矢野 文子 (Yano, Fumiko)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：80529040

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,600,000円

渡航期間：13ヶ月

研究成果の概要（和文）：関節軟骨最表層のマーカとしてPrg4（ルブリシン）に着目し、Prg4タモキシフェン(TM)作動性ノックインマウスPrg4EGFPCreErt2とDTA(ジフテリアトキシン) floxマウスを掛け合わせ、Prg4発現細胞を殺すマウス系統を作成した。胎生期から生後7日齢までに計6回のTMを投与し、Prg4を完全にDTA処理するマウス群を作成した。これらのマウスを2か月齢と6か月齢で観察した結果、胎生期におけるPrg4発現細胞は関節軟骨組織形成において重要であり、その影響は成体期における関節軟骨のターンオーバーにも影響し、Prg4が関節表層におけるStemnessの役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症は軟骨の変性を主体とした退行性疾患であり、痛みや関節機能の低下を来して生活の質を著しく低下させる。Prg4は関節軟骨最表層や滑膜で高発現し、関節に潤滑性を与えるが、近年Prg4発現細胞には軟骨細胞のプロジェニターが含まれることが分かってきた。国際共同研究強化の支援を受けて共同研究先のハーバード大学医学部・ボストン子供病院、整形外科のProf. Warman研究室に所属し、胎生期から成体期における関節軟骨に発現するPrg4の研究を行った。組織学的解析だけでなく関節軟骨表層を3D共焦点顕微鏡で可視化して定量的に解析することで、関節軟骨におけるPrg4発現細胞の役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To reveal the roles of Prg4 expressed cells as progenitor in developmental process, we observed how it cause defect in joint formation when Prg4+ cells are prevented from having progeny by DTA (Prg4-EGFP-CreERT2/+ ;R26DTA/+). To determine whether Prg4 expressing cells are required for articular cartilage formation during embryonic and/or early postnatal stage, these Prg4-EGFP-CreERT2/+ ;R26DTA/+ mice were injected by both of pre-and post-natal TM 6 times injection. When we analyzed The Prg4GFPCreERT2/+R26DTA /+mice at 2months or 6 months of the age that received tamoxifen (i.e., DTA ablated) showed fewer superficial chondrocytes, thinner cartilage and less subchondral bone compared to controls. Prg4-expressing cells located at the joint surface in the embryo serve as a progenitor population for all deeper layers of the mature articular cartilage.

研究分野：骨・軟骨代謝学

キーワード：ルブリシン Runx1 Prg4 変形性膝関節症

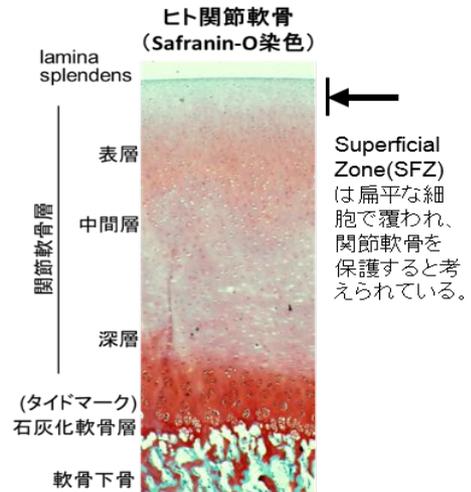
様式 F - 19 - 2

1. 研究開始当初の背景

最近では関節軟骨組織の最表層(SFZ)(右図)の破綻がOA発症のトリガーであること、SFZ細胞はルブリシン(Prg4)など潤滑成分を多く分泌して関節の滑動性を担保し、その深層の関節軟骨全体を保護する作用があることなどが明らかとなってきた。

若手研究A、平成25-27年度、研究課題名「軟骨保護・再生因子Runx1をターゲットとした変形性関節症の治療標的分子の探索」(研究代表者:矢野文子、直接経費総額:18,900千円)は、関節軟骨保持・形成作用を持つ転写因子Runx1について、最新のin vivoシステムを用いて関節軟骨における作用を詳細に分析するとともに、Runx1を取り巻くシグナル群を最先端の分子生物学的手法で網羅的に解析した結果、Runx1とBapx1(Runx1の下流分子と示唆)が関節軟骨層だけでなく、変形性膝関節症発症のきっかけとなるSFZに発現していることから、そこにおける保護作用がOA発症のメカニズムに関与するのではないかと示唆された。

Harvard大学・Children's Hospital・Dr.Warman氏ら(アメリカ・ボストン)は、OA発症のメカニズム解析には関節軟骨深層と最表層を区別すべき概念を打ち出し、Prg4EGFPCreERt2マウスを独自に作出し、このマウスを用いて、Prg4の関節軟骨層における保護作用と関節表層再生のメカニズムと最表層細胞の運命決定、OA発症関連シグナルとの相互作用の解析を行っている。世界的に最先端のOA研究を行っているDr.Warman氏の研究室でin vivo/in vitroの解析方法を学ぶことで、Runx1を基点とした、本研究の成果を飛躍的に変形性膝関節症のメカニズムや予防、治療薬の開発にまで飛躍的に発展させる可能性がある。



2. 研究の目的

当初は、Prg4EGFPCreERt2-Runx1flox マウス作出を行い、Runx1の軟骨における作用をin vivo, in vitroの最新技術を駆使して解析し、得られた知見から候補分子を選定し、マウスモデル上での治療効果検討も行う予定であった。

具体的には(1)-(5)のサブテーマ(3頁目参照)に分けて(1)Runx1の関節軟骨最表層における保護作用の解析の研究を遂行していた。

- (1) 組織・時期特異的のノックアウトマウスを用いた変形性膝関節症モデルの解析
- (2) エピゲノムの手法を用いたRunx1の標的分子群の網羅的検索
- (3) プロテオミクスの手法を用いたRunx1の修飾分子群の網羅的検索
- (4) 候補分子群の発現解析とin vitroでのRunx1のシグナル相互作用の検討
- (5) Runx1のin vivoでの治療効検討

しかしながら、所属研究室にてある程度、解析と論文と学会発表に必要なデータが得られていたため、今回、国際共同研究強化として、ハーバード大学・Children's Hospital・Dr.Warman氏らは関節軟骨の発生から病態モデルの解析において、最先端の解析と開発したマウスの提供をおこなっているため、本研究ではPrg4の発現と機能解析を軸に、胎生期の発現から関節形成、OA発症に関わるメカニズムまで関節軟骨最表層におけるPrg4の制御機構の全体像をIn vivo, In vitroの最新技術を駆使して解明する。具体的には以下の3つのサブテーマに分けて研究を遂行

することを目的とした。

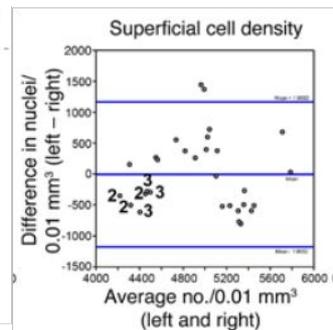
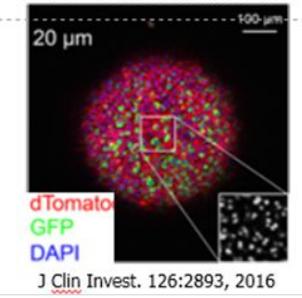
- (1) 関節形成期における Prg4 発現細胞の役割の解析
- (2) Prg4 の初期 OA 発症に関わるメカニズム
- (3) 関節維持・変性における Prg4 発現細胞の役割の解析

3 . 研究の方法

関節軟骨最表層のマーカとして Prg4 (ルブリシン) に着目し、Prg4 タモキシフェン作動性

ノックインマウス Prg4EGFPCreErt2 と DTA(ジフテリアトキシン) flox マウスを掛け合わせることで、Prg4 発現細胞自体を殺すマウスを作成し、解析した。さらにこのマウスには mTmG 遺伝子も組み込み、Prg4 発現細胞をタモキシフェン投与でコントロールし、その発現は GFP/Tomato の蛍光で遺伝子組み換え率を確認でき、かつ、DTA で Prg4 の発現細胞を殺すことで、時期的特異的 Prg4

コンフォーカルを用いた定量的解析



ノックアウト細胞を観察することができる。この3つのトランスジェーンを持ったマウスを用いて、組織学的解析だけでなく、Confocal Microscopy を用いて、GFP/Tomato の蛍光を検出することで、3次元画像解析と絶対的定量評価が可能となる。

- (1) 関節形成期における Prg4 発現細胞の役割の解析

関節形成期の解析では、Prg4 は胎生 15 日齢頃より関節表層に発現し始めるため、Prg4CreERT2; mTmG マウスに胎生 13.5 日齢から段階的に TM を投与して Prg4 発現細胞とその系譜細胞の広がり解析するとともに、Prg4CreERT2; mTmG; DTA マウスに各段階で TM を投与して Prg4 発現細胞を死滅させ、関節形成に与える影響を解析する。時系列に 2 次骨化中心形成の前後 (3 週齢)、関節形成成熟期 (8 週齢)、Aging 期 (半年齢) でサンプリングを行う。解析には従来の組織学的手法に加えて、3D コンフォーカル定量解析技術 (前述) も用いる。

- (2) Prg4 の初期 OA 発症に関わるメカニズム

(1) に述べた Prg4CreERT2; mTmG flox/flox を使って、マウス膝 OA モデル (DMM モデル) を用い (Osteoarthritis Cartilage 15:1061, 2007)、OA モデル作成直前にタモキシフェンを投与することで、OA 初期発症から中期、晩期にかけての、Prg4 発現細胞を GFP で標識できる。解析方法は(1)と同様に組織学的解析と 3D コンフォーカルを用いた定量的解析技術で関節表層全体における Prg4 発現細胞の OA モデルにおける Prg4 の発現変化を解析することができる。

- (3) 関節維持・変性における Prg4 発現細胞の役割の解析

関節維持・変性における Prg4 発現細胞の役割を解析するために、上記に述べた Prg4CreERT2; DTA マウスは Prg4 発現細胞の機能喪失の解析に用いる。骨格成長後に TM を投与し、生後 2 年まで加齢による変化を解析するほか、トレッドミル強制走行負荷、外科的 OA モデル、抗コラーゲン抗体による関節炎モデルを解析する。滑膜、軟骨など微小領域の発現解析には適宜 Laser MicroDissection(LMD)を使用する。

4 . 研究成果

- (1) 関節形成期における Prg4 発現細胞の役割の解析

胎生期の骨格成長における Prg4 の役割を解析するために Prg4 が発現する胎生 14 日齢(E14)の、1日前の E13 と E15 でタモキシフェンを投与し、さらに生後 7 日齢以内に 6 回タモキシフェンを投与することで Prg4 を完全に DTA 処理するマウス群を作成した。これらのマウスは

関節形成成熟期の2か月齢と Aging 期6か月齢の2つのポイントで観察した。現在までの解析では2か月齢のマウスにおいて、Prg4EGFPCreErt2;DTA マウスでは関節形成はできているものの、軟骨細胞のない関節軟骨になり、関節層の厚みに異常が起きていることが観察されている。この現象は膝関節だけでなく、肩関節、肘関節、椎間関節、大腿骨頭、すべての関節で観察されることが明らかとなった。3D コンフォーカル定量解析でも、Prg4 発現細胞はコントロールに比べて、90%以下になっていることも示されるものの、軟骨層のボリュームも減っていることが絶対的定量で示すことができた。

さらに、Prg4 ノックイン LacZ 遺伝子マウスを用いた組織学的解析で Prg4 の発現は運動器、腱・靭帯、脊椎、滑膜組織にも強く発現していることが明らかに示された。

これらの結果より、Prg4 は全ての関節表層における Stemness の役割を担っていることが示唆された。

(2) Prg4 の初期 OA 発症に関わるメカニズム

Prg4CreErt2; mTmG flox/flox を使って、マウス膝 OA モデル (DMM モデル) を作成している。OA モデル作成直前にタモキシフェンを投与することで、OA 初期発症の現象をとらえるため、Prg4 発現細胞を GFP で標識し、組織学的解析と 3D コンフォーカルを用いた定量的解析技術で行っている。

(3) 関節維持・変性における Prg4 発現細胞の役割の解析

Prg4CreErt2; DTA マウスを用いて、Prg4 発現細胞の機能喪失の解析に用いる。骨格成長後の関節形成成熟期 (8 週齢) に TM を投与し、生後 2 年まで加齢による変化を解析するマウスを作出した。運動負荷モデルとして、トレッドミル強制走行負荷、外科的 OA モデル、抗コラーゲン抗体による関節炎モデルを解析する。これらに必要なマウスを作出し、解析の準備を行っている。

*これらの解析は引き続き、国際共同研究強化 (B) で行っている。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 13 件) *Corresponding Author **co-first authors

1. **Yano F***, Ohba S, Murahashi Y, Tanaka S, Saito T and Chung UI. Runx1 contributes to articular cartilage maintenance by enhancement of cartilage matrix production and suppression of hypertrophic differentiation. *Sci Rep*. 2019 Accepted
2. Chang SH, Mori D, Kobayashi H, Mori Y, Nakamoto H, Okada K, Taniguchi Y, Sugita S, **Yano F**, Chung UI, Kim-Kaneyama J, Yanagita M, Economides A, Canalis E, Chen D, Tanaka S, Saito T. Excessive mechanical loading promotes osteoarthritis through the gremlin-1–NF- κ B pathway. *Nat Commun*. 2019 Mar 29;10(1):1442. doi: 10.1038/s41467-019-09491-5.
3. Chijimatsu R, **Yano F**, Saito T, Kobayashi M, Hamamoto S, Kaito T, Kushioka J, Hart DA, Chung UI, Tanaka S, Yoshikawa H, Nakamura N. Effect of the small compound TD-198946 on glycosaminoglycan synthesis and transforming growth factor- β 3 associated chondrogenesis of human synovium-derived stem cells in vitro. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019 Jan 16. doi: 10.1002/term.2795.
4. Murahashi Y, **Yano F**, Nakamoto H, Maenohara Y, Iba K, Yamashita T, Tanaka S, Ishihara K, Okamura Y, Moro T, Saito T. Multi-layered PLLA-nanosheets loaded with FGF-2 induce robust bone regeneration with controlled release in critical-sized mouse femoral defects. *Acta Biomater*. 2019 Feb;85:172-179. doi: 10.1016/j.actbio.2018.12.031.

5. Murahashi Y, **Yano F**, Kobayashi H, Makii Y, Iba K, Yamashita T, Tanaka S, Saito T. Intra-articular administration of IκBα kinase inhibitor suppresses mouse knee osteoarthritis via downregulation of the NF-κB/HIF-2α axis. *Sci Rep*. 2018 Nov 7;8(1):16475. doi: 10.1038/s41598-018-34830-9.
6. Makii Y, Asaka M, Setogawa S, Fujiki S, Hosaka Y, **Yano F**, Oka H, Tanaka S, Fukui N, Yanagihara D, Saito T. Alteration of gait parameters in a mouse model of surgically induced knee osteoarthritis. *J Orthop Surg* (Hong Kong). 2018 May-Aug;26(2):2309499018768017. doi: 10.1177/2309499018768017.
7. Fujii Y, Kawase-Koga Y, Hojo H, **Yano F**, Sato M, Chung UI, Ohba S, Chikazu D. Bone regeneration by human dental pulp stem cells using a helioxanthin derivative and cell-sheet technology. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Feb 1;9(1):24. doi: 10.1186/s13287-018-0783-7.
8. Oichi T, Taniguchi Y, Soma K, Chang SH, **Yano F**, Tanaka S, Saito T. A Mouse Intervertebral Disc Degeneration Model by Surgically-Induced Instability. *Spine* (Phila Pa 1976). 2018 May 15;43(10):E557-E564. doi: 10.1097/BRS.0000000000002427.
9. Huang KC, **Yano F**,** Murahashi Y, Takano S, Kitaura Y, Chang SH, Soma K, Ueng SWN, Tanaka S, Ishihara K, Okamura Y, Moro T, Saito T. Sandwich-type PLLA-nanosheets loaded with BMP-2 induce bone regeneration in critical-sized mouse calvarial defects. *Acta Biomater*. 2017 Sep 1;59:12-20.
10. Kawata M, Taniguchi Y, Mori D, **Yano F**, Ohba S, Chung UI, Shimogori T, Mills AA, Tanaka S, Saito T. Different regulation of limb development by p63 transcript variants. *PLoS One*. 2017 Mar 23;12(3):e0174122. doi: 10.1371/journal.pone.0174122. eCollection 2017 Mar 23.
11. 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 T. Biphasic regulation of chondrocytes by Relα through induction of anti-apoptotic and catabolic target genes. *Nat Commun*. 2016 Nov 10;7:13336. doi: 10.1038/ncomms13336.
12. 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. p63 Regulates Chondrocyte Survival in Articular Cartilage. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Mar;69(3):598-609. doi: 10.1002/art.39976.
13. Chang SH, Yasui T, Taketomi S, Matsumoto T, Kim-Kaneyama JR, 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*. 2016 Apr;24(4):688-97. doi: 10.1016/j.joca.2015.11.008.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. **矢野文子**、斎藤琢：関節軟骨の維持・変性を制御するシグナル群 第 41 回日本分子生物学会年会 2018.11.29 横浜パシフィコ、神奈川 (シンポジウム口演)
2. **矢野文子**、斎藤琢、大庭伸介、鄭雄一：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 2016.10.13-14 福岡国際会議場、福岡 (シンポジウム口演)
3. **矢野文子**、斎藤琢、大庭伸介、鄭雄一：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 2016.7.20-23 大阪国際会議場、大阪 (シンポジウム口演)
4. **矢野文子**、斎藤琢、大庭伸介、田中栄、鄭雄一：Runx1 による軟骨分化制御機構 第 2 回骨免疫学会 2016.7.6-8 ホテルモントレ沖縄スパ&リゾート、沖縄 (査読あり、ポスター)

発表)

5. **矢野文子**、斎藤琢、宮本健史：変形性関節症の新規治療候補薬の作用解析 東大病院先端医療開発フォーラム 2016.2.2 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール、東京（査読なし、口頭・ポスター発表）
6. **Fumiko Yano**, Taku Saito, Shinsuke Ohba, Sakae Tanaka, Ung-il Chung: Runx1 contributes to articular cartilage maintenance through enhancement of cartilage matrix production and suppression of hypertrophic differentiation. Cold Spring Harbor Asia conference on Bone & Cartilage: From Development to Human Diseases, 2016.10.24-10.28 (The Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China)（査読有・ポスター発表）
7. **Fumiko Yano**, Taku Saito, Shinsuke Ohba, Ung-il Chung: Runx1 contributes to articular cartilage maintenance through enhancement of cartilage matrix production and suppression of hypertrophic differentiation. The second Herbert Fleisch Workshop, 2016.2.28-3.1 (Novotel Brugge Centrum Brugge, Belgium)（査読有・口頭発表・ポスター発表）

〔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

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：Matthew L. Warman, M.D.

ローマ字氏名：Matthew L. Warman, M.D.

所属研究機関名：Investigator, Howard Hughes Medical Institute

Director, Orthopaedic Research Laboratories, Boston Children's Hospital

Harriet M. Peabody Professor of Orthopaedic Surgery and Genetics, Harvard Medical School

部局名：Orthopaedic Research Laboratories

職名：Professor

〔その他の研究協力者〕なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。