

関節軟骨の生体恒常性の維持および破綻機構の統合的理解に
基づく革新的医療技術の開発

Development of innovative medical technology based on
integrated understanding of both protection and
destruction of articular cartilage homeostasis

課題番号：16H06393

西村 理行 (NISHIMURA, RIKO)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授



研究の概要（4行以内）

関節軟骨細胞の恒常性の維持と破綻に関わる分子の同定を行い、関節軟骨細胞の特性を細胞および分子レベルで明らかにする。また変形性関節症の発症に関わる分子の同定と機能解析を進め、その破壊を抑止する新規治療薬の探索と、変形性関節症の診断マーカーを明らかにし、早期変形性関節症に有効な治療法および診断法の開発基盤に貢献することを目指している。

研究分野：機能系基礎歯科学、生化学、分子生物学

キーワード：関節軟骨、変形性関節症、転写因子

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨細胞は、幹細胞性を有し、一生涯、硝子軟骨として機能することが運命づけられており、顎関節、膝関節および股関節等の関節運動の一躍を担っている。しかし関節軟骨細胞および関節軟骨基質が、加齢、炎症あるいは過度の機械的刺激によって破壊されると、変形性関節症などの関節疾患が発症する。近年の超高齢社会の到来により、変形性関節症の患者数は増加の一途を辿っており、2000万人にも膨れ上がり、大きな社会問題になっている。したがって、変形性関節症に対するより有効な新規治療法の開発と早期診断法の確立が渴望されている。その実現には、変形性関節症の発症メカニズムを細胞ならびに分子レベルで解明することが必要であると考えられる。

2. 研究の目的

関節軟骨細胞の特性を細胞ならびに遺伝子レベルで解き明かし、関節軟骨細胞の幹細胞性の維持機構を的確に理解するとともに、変形性関節症を引き起こすシグナルを究明し、その発症メカニズムを *in vitro* ならびに *in vivo* で解明することを目指す。究極的には、関節軟骨細胞の維持と破綻の機構を統合的に理解し、変形性関節症の新規治療法と早期診断法の開発に貢献することを最大の目的として本研究計画を立案した。

3. 研究の方法

- 1) 関節軟骨細胞に特異的な転写因子の同定
関節軟骨表層細胞（SFZ細胞）特異的マ-

カー遺伝子である *Prg4* あるいは *GDF5* の発現調節に関わる転写因子を遺伝子座特異的ゲノム機能解析技術である *enChIP* 法を用いて同定する。また *enChIP* 法によるクロニングと平行して、SFZ細胞と成長軟骨細胞に発現する遺伝子を *Microarray* 解析により比較検討し、SFZ細胞特異的に発現する遺伝子を同定する。

- 2) 変形性関節症の発症に関わる分子の同定とその機能解析

変形性関節症を惹起するシグナルを明らかにするために、変形性関節症ヒト患者の遺伝子データベースを基盤にして、変形性関節症の発症に関与して転写因子を選別し、それら転写因子の機能を *in vitro* および *in vivo* で解析する。特に変形性関節症の発症に対する同定した転写因子の関与を検討するために、遺伝子改変マウスを用いて解析を実施する。

- 3) 関節軟骨細胞の恒常性の維持に関与する分子の同定と機能的役割の解明

関節軟骨細胞の *Microarray* 解析結果を基に、関節軟骨細胞の恒常性の維持に関与している候補分子を選び出し、それぞれの遺伝子を過剰発現あるいはノックダウンを行い、関節軟骨細胞の形質と機能に対する効果を検討する。

4. これまでの成果

- 1) *Prg4* 遺伝子プロモーター領域を用いて *enChIP* 解析を行い、*Prg4* 遺伝子に結合する転写因子とリプレッサーを同定した。この転写因子の SFZ細胞における発現が非常に高

いことを Microarray 解析並びに RT-qPCR 解析にて確認した。両者が Prg4 遺伝子プロモーターに結合することをクロマチン免疫沈降(ChIP)法にて認めた。またこの転写因子の過剰発現は、Prg4 遺伝子プロモーター活性を促進し、Prg4 遺伝子の発現を誘導することを見出した。一方、リプレッサーは、この転写因子に結合し、Prg4 遺伝子の発現を低下させることを明らかにした。

2) ヒト変形性関節症患者のデータベースとマウス SFZ 細胞を用いた Microarray 解析結果を照らし合わせて、転写因子 Sox4 および Sox11 が変形性関節症の発症および進行に関与していることを見出した。Sox4 あるいは Sox11 は、Interleukin-1 やレチノイン酸の添加にて発現が増加し、Sox4 あるいは Sox11 の過剰発現がアグリカン分解酵素である Adamts4 および Adamts5 の発現を誘導した。マウス関節軟骨器官培養系に Sox4 あるいは Sox11 アデノウイルスを作用させると、関節組織の変性と分解、ならびに Adamts5 と MMP13 の発現増加を認めた。さらに、ヒト変形性関節症患者の病態の程度に並行して、Sox4 および Sox11 の発現が増加することを見出した。

また上記の解析を通じて、Sox4/11 以外に、変形性関節症のマーカー遺伝子の同定も行っている。

3) 変形性関節症に対する新規治療薬のハイスクリーンシステムを開発するために、Cas9 ゲノム編集法を用いて Prg4 遺伝子のストップコドンの直前に HiBiT タグを挿入したノックインマウスを作製した。この Prg4-HiBiT ノックインマウスより採取した SFZ 細胞は、非常に高いルシフェラーゼ活性を示した。この細胞を用いることにより、Prg4 の発現を増加させる低分子化合物の網羅的スクリーニングを行えるシステムが開発できた。

5. 今後の計画

1) GDF5 遺伝子を発現誘導する転写因子の同定を enChIP 解析にて行う。同定された転写因子の *in vitro* での検索は、ルシフェラーゼレポーターアッセイ、ChIP 解析、および RT-qPCR 法による発現解析にて実施する。

2) Prg4-HiBiT ノックインマウスの SFZ 細胞を用い、Prg4 遺伝子を特異的に増加させるリードコンパウンドのスクリーニングを行う。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Murakami T*, Ruengsinpinya L, Nakamura E, Takahata Y, Hata K, Okae H, Taniguchi S, Takahashi M, Nishimura R. G protein subunit beta 1 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation. (2019) **J Immunol** doi: 10.4049/jimmunol.1801388.

2. Takahata Y*, Nakamura E, Hata K,

Wakabayashi M, Murakami T, Waqkamori K, Yoshikawa H, Matsuda A, Fukui N, Nishimura R. Sox4 is involved in osteoarthritic cartilage deterioration through induction of ADAMTS4 and ADAMTS5. (2019) **FASEB Journal** 33: 619-630.

3. Tanaka J, Ogawa M, Hojo H, Kawashima Y, Mabuchi Y, Hata K, Nakamura S, Yasuhara R, Takamatsu K, Irié T, Fukada T, Sakai S, Inoue T, Nishimura R, Ohara O, Saito I, Ohba S, Tsuji T, Mishima K* (2018) Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells. **Nature Communications** 9: 4216 doi.org/10.1038/s41467-018-06469-7.

4. Kawane T, Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori H, Yoshida CA, dos Santos Matsuura-Kawata VK, Sakane C, Matsuo Y, Nagai K, Maeno T, Date Y, Nishimura R, Komori T*. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating *Fgfr2* and *Fgfr3*. (2018) **Sci Rep** 8 (1): doi:10.1038/s41598-018-31853-0.10.1038/s41598-018-31853-0.

5. Kida J, Hata K, Nakamura E, Yagi H, Takahata Y, Murakami T, Maeda Y, Nishimura R*. Interaction of LEF1 with TAZ is necessary for the osteoblastogenic activity of Wnt3a. (2018) **Sci Rep** 8: 10375. doi: 10.1038/s41598-018-28711-4.

6. Nishimura R*, Hata K, Nakamura E, Murakami T, Takahata Y. Transcriptional network systems in cartilage development and disease. (2018) **Histochem Cell Biol** 149(4): 353-363

7. Wakabayashi H, Wakisaka S, Hiraga T, Hata K, Nishimura R, Tominaga M, Yoneda T*. Decreased sensory nerve excitation and bone pain associated with mouse Lewis lung cancer in TRPV1-deficient mice. (2018) **J Bone Miner Metab.** 36: 274-285.

8. Nishimura R*, Hata K, Takahata Y, Murakami T, Nakamura E, Yagi H. Regulation of cartilage development and diseases by transcription factors. (2017) **J Bone Metab** 24(3): 147-153

9. Hata K*, Murakami T, Takahata Y, Nishimura R. Transcriptional network controlling enchondral ossification. (2017) **J Bone Metab** 24(2): 75-82.

7. ホームページ等

http://www.dent.osaka-u.ac.jp/admission/admission_000294.html