

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10888

研究課題名(和文) 足・膝の比較による関節軟骨のホメオスタシスと変性の分子機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of cartilage homeostasis and molecular biology by comparison of ankle and knee joint

研究代表者

松本 卓巳 (Matsumoto, Takumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70436468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：足関節は膝関節と比較して変形性関節症を来しにくい事が知られているが、そのメカニズムは解明されていない。本研究は足・膝関節軟骨の分子生物学的特性を比較することによって関節軟骨の変性メカニズムを解明し新しい治療に役立てようとするものである。マウスとヒトの足・膝関節軟骨の遺伝子プロファイルを解析し足関節にのみ多く発現する候補遺伝子を絞り込んだ。候補遺伝子を軟骨特異的に欠失させるマウスを作成し独自に開発したマウス変形性関節症モデルを作成したところ候補遺伝子が軟骨の変性に深く関わっていることが判明した。次に関節軟骨最表層に注目し候補遺伝子の動態を解析したところ足と膝では全く異なる動態を示していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は従来の膝関節にのみ注目していた研究とは異なり、同生体の異なる関節の特異性を比較することにより得られる知見から変形性関節症の治療に繋げようとする画期的な研究である。同研究は同一個体の異なる細胞の情報をもとに行う治療であることから、昨今の医学の流れを大きく変えたiPS細胞を用いた再生医療に繋がる研究であり、まさにこの分野で世界をリードする日本であるからこそいち早く研究基盤を確立する必要があると考えている。本研究の一部の成果は第5回日本足の外科学会学術奨励賞を受賞、2018年日本足の外科学会学術集会で発表され高い評価を受けている。

研究成果の概要(英文)：The ankle is resistant to cartilage degeneration compared to the knee joint. However, the mechanism of the difference remains to be elucidated. The present study is aimed for investigating the mechanism of cartilage degeneration by comparison of the ankle and the knee cartilage molecular characteristic. We analyzed gene expression profiles of the ankle and the knee, and narrowed down the some candidate genes which exist abundant only in ankle cartilage. We created mouse osteoarthritis model using the candidate gene conditional knock out mice. It revealed the candidate genes have pivotal role for cartilage degeneration. We also focused on a behavior of the candidate genes on cartilage superficial layer, and found the candidate gene played a totally different role on the ankle and the knee.

研究分野：軟骨代謝、変形性関節症、整形外科

キーワード：足関節 膝関節 変形性関節症 軟骨代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今日の加速する高齢化社会において、高齢者の ADL、QOL を低下せしめる最も大きな原因である変形性関節症を克服することは本邦の緊喫の課題である。現在までの研究のほとんどは膝関節について行われてきたが、同じ荷重関節である足関節は膝関節より変性しにくいことが知られている。我々はこの足関節の特性に注目し、マウス足関節軟骨細胞の単離培養法の開発、マウス変形性足関節症モデルの開発などの基盤技術を確立してきた。

2. 研究の目的

本研究では最新の解析手法を用いて足・膝関節軟骨細胞の特性の違いを分子生物学的に解明し、さらに両関節の代謝機構を解明することを目的とする。この研究によって、足関節軟骨の生理学的・病理学的知見が得られるだけでなく、軟骨全般の維持・変性の本質的理解に繋がり、さらに変形性関節症を克服する画期的な知見に繋がるのが期待される。

3. 研究の方法

まずヒト足関節軟骨細胞の最適な単離培養法を検討・確立する。次にマウス・ヒトの足・膝関節軟骨細胞に変性ストレスを負荷し、その前後の網羅的遺伝子検索で両関節軟骨の変性ストレスへの応答の違いを比較検討し、両者の特性を決定する責任遺伝子群を絞り込む。そこで得られた有力な候補遺伝子について *in vitro* での機能解析を実施し、強い作用を示す遺伝子については遺伝子改変マウスを作出し、申請者らが開発した変形性足・膝関節症モデルや加齢モデルを用いて *in vivo* での検証を行う。さらにマーカー遺伝子のレポーターマウスを用いてセルトラッキングを行い、足・膝の関節軟骨細胞が変性過程の各段階でどのような代謝機構を示すかを詳細に解析する。

(1) マウス、ヒト足・膝関節初代軟骨細胞の発現解析による特性決定候補遺伝子の絞り込み

現在の関節軟骨研究においては、主に膝関節由来の初代軟骨細胞が用いられており、足関節については軟骨細胞の単離培養法が確立していなかったが、申請者らは活性の異なるコラーゲン分解酵素を活用した近年の膝関節軟骨細胞の層別の分離法を用いてマウス足関節軟骨の単離培養法の確立に成功した。本研究ではマウスでの手法を参考に、ヒト足関節軟骨細胞の単離培養法について、附属病院の人工関節置換術で得られる軟骨片を用いて検討・開発を行う。そして、これまでマウスで行ってきた解析と同様、ヒトの足・膝関節軟骨細胞の発現遺伝子の違いをマイクロアレイなどによって網羅的に解析し、マウスでの結果と照合しつつ、足関節、膝関節の特性決定候補遺伝子の絞り込みを行う。

(2) 足・膝関節の特性決定候補遺伝子の *in vitro* における機能解析

網羅的遺伝子検索ツールで得られたデータから足・膝関節の特性決定遺伝子の候補を絞り込み、その遺伝子に対して発現ベクターや siRNA を準備し、軟骨系 cell line や初代軟骨細胞を用いて表現型の変化を解析する。また我々が独自に開発した三次元周期的静水圧負荷装置や細胞伸展負荷装置を用いて変性を惹起する物理的ストレス (20MPa, 10Hz もしくは 10% 伸展率, 0.5Hz) を負荷したり、炎症性サイトカイン (IL-1 や TNF) を添加し、両者の応答反応の違いをマイクロアレイ、プロテインアレイにて解析し、その抵抗性の違いを決定する候補遺伝子の機能解析を行う。変性ストレスへの抵抗性を規定しうるものとして、タンパク分解酵素群及び NF- κ B, HIF-2 などの関連遺伝子、さらに物理的ストレスや炎症、アポトーシスに関係する遺伝子などにも注目し検証を行う。

(3) 足・膝関節の特性決定候補遺伝子の *in vivo* における機能解析

(2) の解析で強い作用が期待された遺伝子について、flox-mice, コンディショナルトランスジェニックマウスなどを作成し、その遺伝子が生体でどのような役割を果たしているのかを発生、成長、老化の過程で検索するとともに、Col2a1-Cre^{ERT2} マウスや Acan-Cre^{ERT2} マウスなど軟骨特異的 Cre マウスを用いてノックアウトや過剰発現を行い、各関節の維持・変性に対する作用を時系列で解析してゆく。

(4) 足、膝の関節軟骨変性過程における発現遺伝子群の比較

(1) では健全な足、膝関節軟骨細胞に関して解析を行うが、次年度以降はマウス変形性足関節症モデルや変形性膝関節症モデル、さらに加齢に伴う関節軟骨変性過程において、発現遺伝子の時間的、空間的な変化を解析する。これまでに得られた遺伝子群については免疫組織染色法で解析するほか、当科で多用しており関節軟骨を層別に切り出せる Laser-microdissection 法を用いた詳細な解析も行う。

(5) セルトラッキングによる足・膝関節軟骨細胞の代謝機構の解明

近年関節軟骨の最表層に軟骨の progenitor が含まれることがわかってきており、この最表層特異的 Prg4-GFP-Cre^{ERT2} マウスを用いた解析によって、膝関節軟骨の多くがこの最表層細胞に由来することが明らかとなった (*Arthritis Rheumatol.* 67:1261,2015)。しかしながら成長後の膝関節の維持や変性における細胞のターンオーバーについては現在も解明されておらず、当然ながら足関節

については何も解析されていない。我々は Prg4-GFP-Cre^{ERT2} マウスと Rosa26-tdTomato マウスを現有しており、最表層細胞のトラッキングによって膝、足の関節軟骨細胞がどのように保たれているかを比較解析し、軟骨細胞の代謝機構の解明を目指す。また(1)(4)の解析でさらに有望なマーカー遺伝子が得られた場合は、レポーターマウスを作成し、将来のさらなる解析に備える。

4. 研究成果

マウスとヒトの膝・足関節の網羅的遺伝子解析で得られた両関節軟骨の発現プロファイルの違いから足・膝関節の特異的遺伝子の候補を絞り込んだ。複数の有力な遺伝子では過剰な力学的負荷や炎症性サイトカインに抵抗性を占める結果が得られている。有力な遺伝子について flox マウスを作成した。独自に開発したマウス変形性足関節症モデル(Chang et al. Osteoarthritis Cartilage. 2016 Apr; 24(4):688-97) を用いて wild type mouse と軟骨特異的ノックアウトマウスを比較すると両者に大きな違いが見られた。

また、近年関節軟骨の機能維持に関節軟骨最表層が深く関わっていると言われていたが、最表層特異的な Prg4-GFP-Cre マウスと Rosa26-tdTomato を用いて最表層細胞のトラッキングを実施したところ足、膝関節軟骨では候補遺伝子が全く異なる動態を示すことが判明した。今後さらなる実験を重ね足関節特異的遺伝子の軟骨の代謝維持機構における役割を解明してゆく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Comparison of mouse and human ankles and establishment of mouse ankle osteoarthritis models by surgically-induced instability.

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 U, Tanaka S, Saito T.

Osteoarthritis Cartilage. 2016

〔学会発表〕(計 2 件)

Comparison of Mouse and Human Ankles and Establishment of Surgical Destabilization model of Mouse Ankle Osteoarthritis, Chang SH, Yasui T, Matsumoto T, Kasai T, Maenohara Y, Takeda R, Ando Y, Tanaka S, Saito T. 2016 Asian Federation of Foot and Ankle Surgeons.

Basic science of ankle cartilage, Chang SH, Yasui T, Matsumoto T, Saito T, Tanaka S. 2018 年日本足の外科学会学術集会

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：松本 卓巳

ローマ字氏名：Matsumoto Takumi

所属研究機関名：東京大学医学部附属病院

部局名：整形外科

職名：助教

研究者番号（8桁）：70436468

研究分担者氏名：齋藤 琢

ローマ字氏名：Saito Taku,

所属研究機関名：東京大学医学部附属病院

部局名：整形外科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30456107

研究分担者氏名：岡田 慶太

ローマ字氏名：Okada Keita

所属研究機関名：東京大学医学部附属病院

部局名：整形外科

職名：助教

研究者番号（8桁）：50759173

(2) 研究協力者

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。