

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2007 ～ 2011

課題番号：19109007

研究課題名（和文）変形性関節症の病因解明・治療標的分子同定のための統合研究：ROAD プロジェクト

研究課題名（英文）The integrated study for molecular backgrounds and therapeutic targets of osteoarthritis :The ROAD project.

研究代表者

中村 耕三（NAKAMURA KOZO）

国立障害者リハビリテーションセンター（研究所）

自立支援局 自立支援局長（研究所併任）

研究者番号：60126133

研究成果の概要（和文）：変形性関節症（OA）の予防・治療法の確立に対する社会的ニーズの高まりは疑いの余地がない。我々は最近、OAの分子メカニズム解明から画期的な予防・治療法の開発を目指した戦略的OA統合研究計画としてROADプロジェクトを樹立した。本研究課題では、1) 軟骨変性制御分子のクローニングと分子ネットワークの解明、2) 重症度評価システムの開発、3) 遺伝・環境因子の網羅的・系統的探索、の3テーマについての研究を行なった。

研究成果の概要（英文）：Social needs for prevention and treatment of osteoarthritis (OA) is increasing. We have established the ROAD project as a comprehensive study of OA for elucidation of the etiology and identification of the molecular target of treatment. Here we performed 1) cloning of regulatory molecules of cartilage degradation and elucidation of the underlying mechanism, 2) Development of measurement of the OA severity, 3) Comprehensive and systemic search for the genetic and environmental factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	30,900,000	9,270,000	40,170,000
2008年度	21,000,000	6,300,000	27,300,000
2009年度	12,400,000	3,720,000	16,120,000
2010年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2011年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
総計	85,300,000	25,590,000	110,890,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：変形性関節症、軟骨代謝、遺伝子、画像解析、疫学

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症（osteoarthritis; OA）の予防・治療法の確立に対する社会的ニーズの高まりは疑いの余地がない。厚生労働省国民生活基礎調査によると、高齢者が要支援の対象となる原因疾患の第1位は関節症である。それにも拘わらず、OA研究は国内・国外を通じて、他の生活習慣病はもとより、骨粗鬆症や

関節リウマチなどの他の運動器疾患に比べても明らかに遅れている。その病因については、危険因子として力学的負荷の蓄積が指摘されている程度で、細胞・分子レベルのメカニズムに関しては殆ど解明されていない。したがって、その治療法が対症療法の域を出ていないのは当然の帰結である。また、OAの有病率・発症率などの基本的な疫学指標も国内外を通

じて確立されておらず、客観的かつ定量的な重症度の指標が存在しないため診断基準も曖昧なままである。すなわち、予防・治療法が開発されたとしても、それをエビデンスとして正確に評価する基本データも方法も存在していないのが現状である。OAに関する包括的・系統的な研究体制の確立は、いまや世界的に焦眉の課題と言える。

我々は2005年にOAの分子メカニズム解明から画期的な予防・治療法の開発を目指した戦略的OA統合研究計画として、ROAD

(Research on Osteoarthritis Against Disability)プロジェクトを樹立した。本研究では、東大整形外科講座、骨軟骨再生講座、臨床運動器医学講座、および人類遺伝学講座の連携によって、下記の3つのサブテーマ研究を行なった。

2. 研究の目的

(1) 軟骨変性制御分子のクローニングと分子ネットワークの解明(分子生物学研究)

我々はマイクロサージェリー手術によってマウスの膝関節に力学的負荷を与えることによる4種類のOAモデルの確立に成功した。このモデルを用いた検討から、OA発症の初期には軟骨細胞の肥大分化が重要な役割を果たすことを明らかにした。また、肥大分化のメカニズム解明のためにX型コラーゲン(COL10)発現クローニングシステム、in vitroの各段階における培養系モデルの開発に着手してきた。本研究では、世界に先駆けて確立したこれらin vivoおよびin vitroの系統的な実験系を駆使して、軟骨変性制御分子のクローニングと分子ネットワークの解明を行ない、治療標的分子の同定に繋げることを目的とした。

(2) 重症度評価システムの開発(医用工学研究)

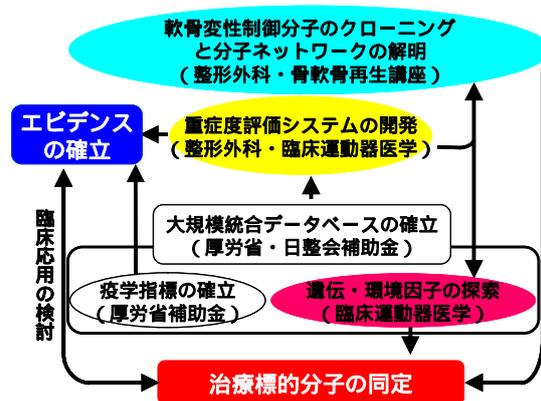
従来のOAの重症度の評価にはKellgren-Lawrence(K-L)分類によるカテゴリカル分類が最も多く使用されていたが、境界域での判定が主観的かつ曖昧になり、正確な診断基準・治療評価基準とはなり得なかった。本サブテーマでは、医用工学的手法を用いて単純X線画像の実測値を連続量として自動的に出力できるシステムを確立することで、客観的な診断基準を設けることを目指した。

(3) 遺伝・環境因子の網羅的・系統的探索(ヒトゲノム疫学研究)

ROADプロジェクトでは詳細な臨床情報とゲノム情報を網羅した大規模統合臨床データベースの構築を目指しており、これによって初めて大きな検出力を要求される正確なゲノムワイド関連解析が可能となった。この解析は、

候補遺伝子に限定して疾患の有無だけによる2群間比較のみを行ってきた従来のゲノム解析とは明らかに一線を画するものである。また、統合データベースを用いることで、臨床情報によって詳細に層別化した各群における感受性遺伝子の探索、また逆にゲノム情報によって層別化した各群における環境因子の探索が可能となった。更に、大量かつ高速に一塩基置換(SNP)のタイピングが可能マイクロアレイを用いて国際HapMapプロジェクト情報に基づいたハプロタイプ解析を行い、系統的・網羅的なOA感受性遺伝子の同定を効率的に実施した。この結果は常に上記の実験系での分子ネットワークデータと照会しながら治療標的分子の同定を目指した。

上記の3つのサブテーマ、および外部研究費によるテーマを包括・融合して、OAの分子レベルでの病因を解明し、画期的な予防・治療法を開発することが、ROADプロジェクトの目標である(下図)。



3. 研究の方法

(1) 軟骨変性制御分子のクローニングと分子ネットワークの解明

東大整形外科の中村、川口、田中と、骨軟骨再生講座の斉藤が連携して遂行し、発現クローニングシステムによる網羅的スクリーニング、候補遺伝子改変マウスへのOAモデル作成によるin vivoの検討を行なった。肥大分化のメカニズムのためのCOL10発現クローニングシステムとこれを用いた網羅的スクリーニングは主として骨軟骨再生講座が担当し、マウスOAモデルと培養系での確認を両講座が分担して行った。また、これらのin vivoおよびin vitroで同定された候補分子の発現を、東大整形外科でヒトの手術摘出標本を用いて確認した。さらにROADプロジェクトで構築した大規模統合臨床データベースを用いて候補遺伝子のSNPがOAに有意に関連するかを臨床運動器医学講座で検討した。これらの、

in vivo および in vitro の実験系、ヒトの手術摘出標本、ヒトゲノム解析のすべてで OA への関与が確認された分子を治療標的分子とみなして臨床応用への検討を行った。

(2) 重症度評価システムの開発

膝 OA に関しては既に KOACAD システムを構築した。これと、観察疫学によって確立した疫学指標（厚生省補助金）とを組み合わせることによって、OA のエビデンスを確立し、大規模統合臨床データベースを用いて前サブテーマで同定された治療分子の臨床応用を検討した。

(3) 遺伝・環境因子の網羅的・系統的探索

詳細な臨床情報とゲノム情報を網羅した大規模統合臨床データベースを用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) が主たる目的であるが、サブテーマ「軟骨変性制御分子のクローニングと分子ネットワークの解明」で強力な候補分子が見つければ、臨機応変にこの候補遺伝子の SNP による関連解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 軟骨変性制御分子のクローニングと分子ネットワークの解明

我々が確立したマウスの膝関節 OA モデルの関節軟骨の経時的な観察から、軟骨破壊の初期に X 型コラーゲン (COL10) 発現で示される軟骨細胞の肥大化が見られ、この肥大軟骨細胞から分泌される MMP-13 や ADAMTS5 などの蛋白分解酵素によって軟骨基質の変性が起こることが OA の引き金となるという知見を得た。そこで軟骨肥大化に関与している分子を網羅的にスクリーニングするために、COL10 発現クローニングシステムを作成した [7;「5. 主な発表論文」に記載した論文番号、以下も同様]。これを用いて、軟骨由来ライブラリーの網羅的スクリーニングを行ったところ、hypoxia-inducible factor-2 (HIF2A、EPAS1) [3]、CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) [2,8]、cGMP-dependent protein kinase II (cGKII) [13] が強力に COL10 の転写活性と軟骨細胞の肥大化を促進することを見出した。中でも HIF2A の OA への関与は、マウス実験モデルおよびヒトの手術摘出標本およびゲノム解析によって証明された。

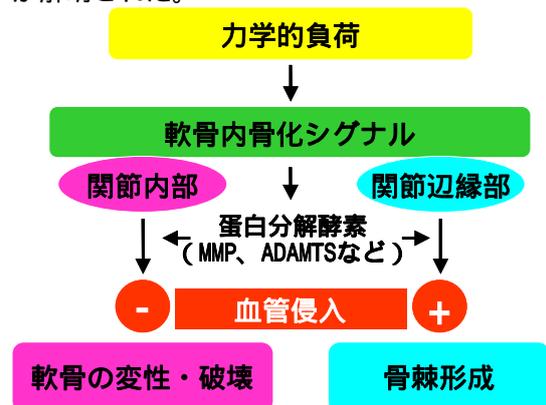
軟骨細胞の肥大化に加えて、アポトーシスの OA への関与も指摘されている。我々の検討においても、オステオプロテジェリン (OPG) +/- マウスに OA モデルを作製すると、関節軟骨の変性・破壊が促進された [15]。更に、我々が同定した軟骨の石灰化促進遺伝子である carminerin および Akt1 のノックアウトマウスに OA モデルを作製したところ、軟骨変性は

正常に進行したが、骨棘形成が低下していた [5]。一方、プロスタグランジン合成酵素である COX-1、COX-2、mPGES-1 のノックアウトマウスに OA モデルを作成しても OA の発症・進行は WT と同様に見られた [1,12]。以上より、OA の進行において結果として炎症反応が見られたとしても、それらのシグナルは少なくとも原因として OA の発症には関与していない可能性が高いと考えられた。

また、治療標的分子の同定のために細胞外分子の検索を行ったところ、Notch シグナルが生理的および病的な軟骨内骨化を制御することを、時期特異的および組織特異的のノックアウトマウスの作成によって明らかにした。軟骨細胞における Notch/Rbpj シグナルは Hes1 を介して MMP13 を転写誘導することによって軟骨内骨化を制御していた。中でも Hes1 の関与は生理的軟骨内骨化よりも OA における病的軟骨内骨化に対して強いことから、副作用の少ない有望な治療標的分子であると考えられた [論文投稿中]。

軟骨細胞の肥大分化、アポトーシス、石灰化は、成長板軟骨の軟骨内骨化の過程で見られる現象である。永久軟骨であるはずの関節軟骨においても、過度のメカニカルストレスの蓄積に抗しきなくなって軟骨内骨化が誘導されるものと推察された。滑膜や靭帯に接して血管の侵入が可能な関節辺縁では軟骨内骨化が起こって力学的要請に応じた骨棘が出来るが、関節の内部では血管侵入が出来ないために骨化することなく軟骨の破壊だけで終わってしまうと考えられる [6,11] (下図)。

以上より、HIF2A/NF- κ B シグナルや Notch/Rbpj/Hes1 シグナルに代表される軟骨内骨化関連分子が OA の治療標的となることが解明された。



(2) 重症度評価システムの開発

立位膝関節単純X線画像のデジタルフィルタリングによるノイズ除去、輪郭線の抽出、情報の統計処理による基準点標

準化を経て、OAの6項目の重症度指標（内・外側の関節裂隙の最小距離および面積、骨棘面積、大腿脛骨角）を全自動で計測し、定量値を出力するPCソフトウェアKOACADの開発を行い、特許を取得（第4934786号）、また既に発売を開始して先進医療を申請中である。また、股関節・腰椎X線自動定量評価システムのX線自動測定システムの開発も進めている。

KOACADの臨床利用を目的に、国内外の大規模観察研究において撮影した膝X線画像のOA重症度指標の定量値を求め、運動機能低下を来たす膝関節痛との関連を求める解析を行なったところ、ROADプロジェクトで構築した大規模統合臨床データベースに登録された一般住民データ約2,000例にて、現在の膝関節痛の有病と最も強い相関を示したのは男女ともに内側関節裂隙最小距離の減少であり、内側関節裂隙最小距離が1mm減少することにより男女ともに約40%膝関節痛のリスクが高まること明らかになった[11]。更に、米国NIH主導の大規模OA疫学プロジェクトOAIデータベースの膝OA患者約700例をKOACADで解析したところ、外側関節裂隙最小距離が縦断評価での膝関節痛増悪と相関を示した[投稿準備中]。以上により、人種、現在の膝OAの有病などの背景により、膝関節痛の危険因子となるX線上の重症度指標は異なっていることが判明し、これは従来のK-L分類によるカテゴリカルな評価では解明され得なかった知見である。

(3) 遺伝・環境因子の網羅的・系統的探索(ヒトゲノム疫学研究)

日本の4地域のコホート参加者3,500名から得た末梢血よりDNAを抽出し、臨床情報をデータベース登録し、X線画像情報は従来法(K-L法)による重症度評価データとKOACADによる各種計測値(関節裂隙、アライメント、骨硬化、骨棘)を登録済で、これによりOAの解析に際しては、年齢、性、肥満度等、既知のOA危険因子による層別化はもちろんのこと、必要に応じて他の因子も加味した分析を可能とするデータベースシステムを構築した[4,9,10]。

膝OAの新規疾患感受性遺伝子解明のため、まずGWASによる1次スクリーニングを実施した。東京地域のコホートより、膝OA患者200名と正常対照者200名を抽出し、Affymetrix社製500k Arrayによる50万SNPタイピングを実施した。その結果得られた $P < 0.001$ の379 SNPについて、再現性確認のためのreplication studyを実施したところ、全てで再現性が確認できたSNPは存在しなかった。

関連解析で $P < 0.01$ であったSNPは3,328 SNPあり、この中に真の膝OA感受性SNPが存在する可能性があるため、更なる検索を予定している。

一方、OAゲノム研究の国際コンソーシアムであるTREAT-OAに我々も共同研究者として参加しているが、2009年、TREAT-OAに参加している欧米4地域コホートのGWASデータのメタアナリシスにより、20個の膝OA感受性候補SNPが抽出された。それをもとに、他の欧米地域とアジア地域でreplication studyが行われ、我々のグループも参加した。その結果、全世界の膝OA患者7,892名と正常対照者45,684名における検討により、第7染色体上の7q22の領域に存在するrs4730250が膝OA感受性SNPであることが同定された[論文投稿中]。現在その機能解析が進行中である。

更に、変形性腰椎症の疾患感受性遺伝子の解明を、Affymetrix社製900k ArrayによるGWASを用いて行ない、数種類の候補遺伝子を同定した。引き続き韓国、ヨーロッパのゲノム研究グループと共同研究によって、これらの候補遺伝子SNPのreplication解析を行っている。また、特に可能性の高い遺伝子についてはマウスゲノムクスを用いてその機能解析を行っている。

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) すべて査読あり

[雑誌論文](計82件)

Fukai A, Kamekura S, Chikazu D, Nakagawa T, Hirata M, Saito T, Hosaka Y, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Lack of a chondroprotective effect of cyclooxygenase 2 inhibition in a surgically induced model of osteoarthritis in mice. *Arthritis Rheum-US* 64: 198-203, 2012.

Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Yano F, Ikeda T, Mabuchi A, Sapkota BR, Akune T, Nishida N, Yoshimura N, Nakagawa T, Tokunaga K, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: C/EBP- and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 as the inducer in chondrocytes. *Hum Mol Genet* 21: 1111-1123, 2012.

Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, and Kawaguchi H:

Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med* 16: 678-686, 2010.

Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, and Akune T: Cohort profile: Research on Osteoarthritis/Osteoporosis Against Disability study. *Int J Epidemiol* 39: 988-995, 2010.

Fukai A, Kawamura N, Saito T, Oshima Y, Ikeda T, Kugimiya F, Higashikawa H, Yano F, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Akt1 in murine chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiologic and pathologic conditions. *Arthritis Rheum* 62: 826-836, 2010.

Kawaguchi H: Regulation of osteoarthritis development by Wnt- β -catenin signaling through the endochondral ossification process. *J Bone Miner Res* 24: 8-11, 2009.

Higashikawa A, Saito T, Ikeda T, Kamekura S, Kawamura N, Kan A, Oshima Y, Ohba S, Ogata N, Takeshita K, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type x collagen gene. *Arthritis Rheum* 60: 166-178, 2009.

Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, Kawasaki Y, Saito T, Yano F, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: C/EBP promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57^{Kip2}. *PLoS ONE* 4: e4543, 2009.

Muraki S, Akune T, Oka H, Mabuchi A, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Nakamura K, Kawaguchi H, and Yoshimura N: Association of occupational activity with radiographic knee osteoarthritis and lumbar spondylosis in elderly patients of population-based cohorts: A large-scale population-based study. *Arthritis Rheum* 61: 779-786, 2009.

Muraki S, Oka H, Mabuchi A, Akune T, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Suzuki T,

Yoshida H, Ishibashi H, Yamamoto S, Nakamura K, Kawaguchi H, and Yoshimura N: Prevalence of radiographic lumbar spondylosis and its association with low back pain in the elderly of population-based cohorts: the ROAD study. *Ann Rheum Dis* 68: 1401-1406, 2009.

Kawaguchi H: Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells* 25: 1-6, 2008.

[学会発表](計 254 件)

Kawaguchi H: Overview of molecular backgrounds of osteoarthritis. The 3rd International Cartilage and Osteoarthritis Symposium (ICOA 2011). 2011.7.5 (Suwon, Korea)

Kawaguchi H: Endochondral ossification signals as potential therapeutic targets for osteoarthritis (Invited Lecture). 2011 Gordon Research Conference: Cartilage Biology & Pathology. 2011. 3. 8 (Ventura, CA, USA).

Kobayashi H: Transcriptional induction of ADAMTS5 by NF- κ B family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. 2011 Gordon Research Conference: Cartilage Biology & Pathology. 2011. 3. 8 (Ventura, CA, USA).

Hirata M: C/EBP- β and RUNX2 in chondrocytes control cartilage degradation. 2011 Gordon Research Conference: Cartilage Biology & Pathology. 2011. 3. 7 (Ventura, CA, USA).

Sugita S: Notch/Rbpj/Hes1 signaling in chondrocytes controls terminal stage of endochondral ossification in skeletal growth and osteoarthritis development. 2011 Gordon Research Conference: Cartilage Biology & Pathology. 2011. 3. 6 (Ventura, CA, USA).

[図書](計 48 件)

川口 浩: 変形性関節症の分子メカニズム - 治療標的分子の同定を目指して -. 医学の歩み 236 (5) : 531-534, 2011.

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：脊椎疾患診断支援装置、及び脊椎疾患診断支援プログラム

発明者：岡敬之、吉村典子、阿久根徹、川口浩、中村耕三

権利者：同上

種類：特許

番号：特許 2010-096330

出願年月日：2010年4月19日

国内外の別：国内

取得状況（計1件）

名称：膝関節診断支援方法及び装置並びにプログラム

発明者：岡敬之、吉村典子、川口浩、中村耕三

権利者：同上

種類：特許

番号：特許第4934786号

取得年月日：2012/03/02 登録

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 耕三 (Nakamura Kozo)

国立障害者リハビリテーションセンター

(研究所)・自立支援局・自立支援局長 (研究所併任)

研究者番号：60126133

(2)研究分担者

川口 浩 (Kawaguchi Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40282660

田中 栄 (Tanaka Sakae)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：50282661

阿久根 徹 (Akune Toru)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：60282662

(2010-2011)

岡 敬之 (Oka Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：60401061

(2010-2011)

齋藤 琢 (Saito Taku)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：30456107

(2010-2011)

廣田 仁聡 (Hirota Jinso)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30570733

(2009.7-2010)

池田 敏之 (Ikeda Toshiyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80322759

(2007-2009.6)

大西 五三男 (Onishi Isao)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70311628

(2007)

鄭 雄一 (Tei Yuichi)

東京大学・工学系研究科・教授

研究者番号：30345053

(2007)

馬淵 昭彦 (Mabuchi Akihiko)

東京大学・医学部附属病院・客員准教授

研究者番号：80312312

(2007-2008.9)

(3)連携研究者

大西 五三男 (Onishi Isao)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70311628

(2008)

鄭 雄一 (Tei Yuichi)

東京大学・工学系研究科・教授

研究者番号：30345053

(2008)

馬淵 昭彦 (Mabuchi Akihiko)

東京大学・医学部附属病院・客員准教授

研究者番号：80312312

(2008.10-2009.3)