

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 年度～2008 年度
 課題番号：19591745
 研究課題名（和文） 変形性関節症発症初期にかかわる遺伝子の解明と治療への応用
 研究課題名（英文） Analysis of gene expression in osteoarthritis initiation and the applicability to the treatment.
 研究代表者：眞島 任史（MAJIMA TOKIFUMI）
 北海道大学・大学院医学研究科・特任教授
 研究者番号：30241334

研究成果の概要：家兔 ACL 切断変形性関節症(OA)モデルを用いて、OA 発症初期の関節滑膜で過剰発現する候補遺伝子を検出した。その候補遺伝子の siRNA をエレクトロポレーション法にて関節滑膜に導入したところ明らかに OA が進行した。OA 発症初期の段階では候補遺伝子が OA 進行を抑制している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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・遺伝子解析・siRNA

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症（以下、OA）は先進国においてもっとも多く発症する疾患である。靭帯損傷などの原因で生じた関節不安定性や荷重分布不均衡が OA 進行のリスクとなることがわかっている。それゆえ従来から主な OA 発症の原因は、関節不安定性や荷重分布不均衡などによる過剰な力学的ストレスが直接的に関節軟骨にかかり軟骨変性をきたしていると考えられていた。一方近年、関節内の力学的環境の変化に反応して増加する生物学的因子が OA 軟骨の変性進行に重要な役割を果たしているという報告が散見されるようになった。それらの生物学的因子にはサイトカイン、増殖因子、matrix metalloproteinase（以下、MMP）、軟骨アポトーシス関連因子

などがあげられる。さらに従来は OA 発症のメカニズムに関する研究のターゲットは関節軟骨が中心であったが、最近では遺伝子治療のターゲットとしやすい関節滑膜が注目されるようになってきた。滑膜は軟骨表面以外の関節内を覆う 1～数層で構成される組織である。関節リウマチ（以下、RA）においては滑膜線維芽細胞やマクロファージが MMP、炎症性サイトカインの産生および分泌を通して炎症のプロセスに重要な役割を担っている。また末期 OA 患者から採取した関節滑膜の病理組織像が早期 RA 患者から採取した滑膜とよく似ているという報告も散見される。これらの結果から、RA と同様に OA においても滑膜から放出される chemical mediator が軟骨変性に寄与してい

ると推測できる。実際、研究代表者（眞島任史）が確立した動物 OA モデルにおいて軟骨変性に先立ち明らか滑膜炎、関節液の貯留を認めていた(*ORS Transaction, 2004*)。そのため我々は関節不安定性などの力学的ストレスが滑膜組織へ加わることにより、滑膜組織内で遺伝子発現変化を生じ、その遺伝子変化が OA の発症および進行に影響を与えているという仮説を立て本研究を行った。

2. 研究の目的

(1) OA のごく初期の段階において滑膜組織で過剰発現している疾患の発症に関わる候補遺伝子を Suppression Subtractive Hybridization (以下、SSH) 法、real-time RT-PCR にて検出すること。

(2) 家兎 OA モデルの関節滑膜に検出された候補遺伝子の siRNA をエレクトロポレーション法で導入し、発現を抑制することにより OA の発症・進行への関与を証明すること。

3. 研究の方法

(1) 家兎 OA モデルの OA 初期（術後 1 週）の時点で両膝から滑膜組織を摘出し、mRNA を抽出後、SSH 法、real-time RT-PCR にて sham 側に比して ACL 切断側の滑膜で過剰発現している候補遺伝子を検出した。またその候補遺伝子の経時的変化を調べることで発現のピークの時期をみた。

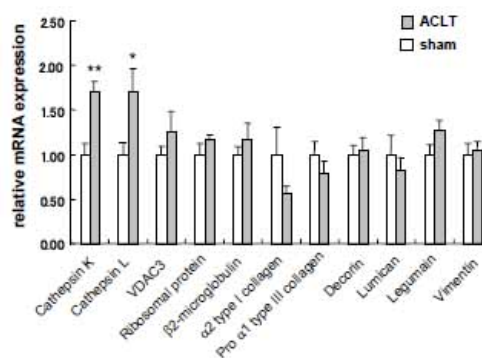
(2) 候補遺伝子の siRNA を作成しエレクトロポレーション法を用いて周術期に候補遺伝子の siRNA を導入し（計 4 回）、術後 4 週で軟骨変性の評価を行った。

(3) 最後に siRNA を導入した滑膜内における OA 関連遺伝子の経時的な発現変化を調べた。

4. 研究成果

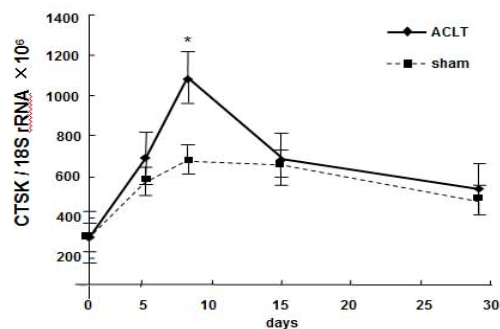
(1) 術後 1 週の時点で ACL 切断側と sham 側の滑膜を採取し、mRNA を抽出後に SSH 法にて過剰発現していた遺伝子を 11 個検出した。次に、各遺伝子の発現量を real-time RT-PCR にて調べたところ、cathepsin K が特に過剰発現していたことを確認した(図 1)。そのため、候補遺伝子を cathepsin K に決定した。

図 1 候補遺伝子の発現



(2) 次に cathepsin K の経時的な発現変化を real-time RT-PCR で確認したところ、術後 1 週で最も発現が高いことがわかった(図 2)。

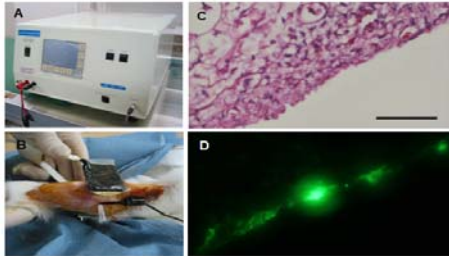
図 2 cathepsin K の経時的変化



(3) 次に cathepsin K の siRNA を 5 種類作成した。また、Rabbit cathepsin K 定常発現株も作製し、それに siRNA を導入し最も発現抑制効果の高い siRNA を選択した。その siRNA を in vivo の系で使用することとした。

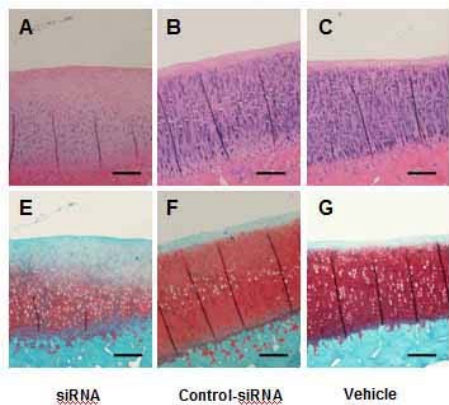
(4)次に家兔の関節滑膜にエレクトロポレーションで遺伝子導入できる条件設定を行った。導入の確認はGFPタンパクを用いた(図3)。

図3 エレクトロポレーションによる導入



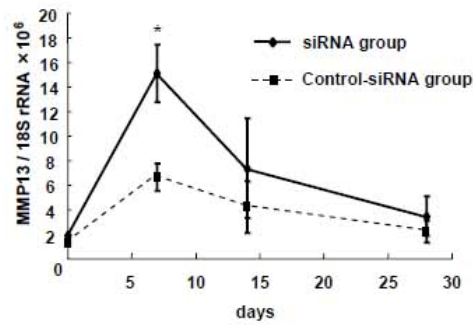
(5)in vitro の系で cathepsin K の機能解析を行った。ACL 切断の 3 日前と 1 日前の 2 回 siRNA を導入し、siRNA 投与群で control-siRNA 投与群よりも明らかな OA 進行を認めた(図4)。

図4 術後4週の病理組織像
(上段がHE染色、下段がサフラニンO染色)



(6)最後に siRNA 投与群と control-siRNA 投与群の滑膜で OA 関連遺伝子の経時的発現変化の推移を検討したところ、術後1週の時点でMMP-13のみが siRNA 投与群で発現上昇していた(図5)。

図5 MMP-13の経時的変化



(7)従来、cathepsin K は OA に対して進行を促進する因子としての報告が多かったが、本研究の結果からは OA 発症初期の段階では OA 発症もしくは進行を抑制する機能を持っている可能性が示唆された。本研究は今後の新たな OA 治療の戦略に貢献する結果であると考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Takahashi D., Iwasaki N., Kon S., Matsui Y., Majima T., Minami A., Uede T.: Down-regulation of cathepsin K in synovium leads to progression of osteoarthritis in rabbits., 査読有り, *Arthritis & Rheumatism*, 2009, in press

[学会発表] (計 4 件)

① 高橋大介, 岩崎倫政, 松井雄一郎, 眞島任史, 三浪明男, 上出利光: 関節滑膜で発現するカテプシンKは軟骨変性を抑制する, 平成20年10月26日, 第22回日本整形外科学会基礎学術集会, アクトシティ浜松(浜松市)

②高橋大介, 岩崎倫政, 松井雄一郎, 浅野毅, 眞島任史, 三浪明男, 今重之, 上出利光: 関節滑膜内のカテプシンKはMMP-13の発現を抑制する, 平成20年10月24日, 第23回日本整形外科学会基礎学術集会, 国立京都国際会館(京都市)

③高橋大介, 岩崎倫政, 松井雄一郎,

松橋智弥, 浅野毅, **眞島任史**, 三浪明男,
上出利光: 関節滑膜で発現するカテプシン K
は軟骨変性を抑制する, 平成 20 年 3 月 21 日,
第 21 回日本軟骨代謝学会, 京都テルサ
(京都市)

④Takahashi D., Iwasaki N., Matsui Y.,
Matsuhashi T., Asano T., **Majima T.**,
Minami A., Kimura C., Kon S., Uede T. :
Down- regulation of cathepsin K in
synovium accelerates cartilage degradation
in rabbits.,
*54th Annual Meeting of the Orthopaedic
Research Society*, 2008.03.02, Moscone
West Convention Center, (San Fransisco
CA, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞島 任史 (MAJIMA TOKIFUMI)
北海道大学・大学院医学研究科・特任教授
研究者番号: 30241334

(2) 研究分担者

沢口 直弘 (SAWAGUCHI NAOHIRO)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号: 80435982

(3) 連携研究者

なし