

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790269

研究課題名 (和文) ヒト変形性関節症軟骨における RECK 分子の発現と機能解析

研究課題名 (英文) Expression and function of RECK in human osteoarthritic cartilage

研究代表者

木村 徳宏 (KIMURA TOKUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40445200

研究成果の概要： ヒト変形性関節症 (OA) 軟骨組織において高発現する RECK 分子の発現調節と機能の解明に取り組んだ。OA の病態上重要と考えられる各種サイトカインによる RECK の発現調節を検討したところ、IGF-1 が発現促進因子、IL-1 と TNF- α が発現抑制因子であることがわかった。RECK の機能について siRNA 実験を行い調べたところ、RECK は OA 軟骨細胞とマトリックスの相互作用を変化させ、細胞遊走を抑制し、細胞増殖を促進する作用を持つことが明らかになり、OA における軟骨の不完全再生に関与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	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	450,000	3,150,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・人体病理学

キーワード： 関節、軟骨、変形性関節症、細胞外マトリックス、細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (osteoarthritis, OA) は関節軟骨の変性に始まり関節の変形をきたす疾患で、関節疾患の中で最も頻度が高く、有病率は年齢とともに上昇し、65 歳以上の人口の半数以上に関節の OA 変化が認められると言われている。OA は膝・股関節などの荷重関

節に好発し、関節の痛みや運動制限を引き起こし、最終的に人工関節置換を余儀なくされる患者が多い。人口の高齢化が進んでいるわが国においては、人々の quality of life を阻害する点できわめて重要な疾患と言える。

OA は関節軟骨の加齢性変化と力学的ストレスを背景として発症してくるが、その病態

の中心となるのは、軟骨破壊と、それに対する軟骨の不完全再生反応、と考えられる。具体的には、の過程ではプロテオグリカンの分解・脱失やコラーゲン線維構築の断裂という、細胞外マトリックスの変性・破壊が起こり、関節軟骨に亀裂を生じる。また軟骨細胞のアポトーシスも起こる。の過程では軟骨細胞が増殖して細胞集団を形成し（cloningと呼ばれる）また軟骨細胞の性質も正常軟骨とは異なったものに変化する。しかし障害を受けた軟骨組織を十分に再生することはできず、軟骨破壊が進行してゆくこととなる。

これまでの研究では、のプロセスにおいてプロテアーゼによる細胞外マトリックス分解が中心的役割を果たすことが明らかにされている。プロテアーゼの中でもマトリックスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinase, MMP）が特に重要であり、OA軟骨組織では様々なMMP分子種の発現が知られている。の過程に関してはサイトカイン・増殖因子の役割が注目されているが、全体としての病態の解明は遅れている。軟骨組織は障害に反応して不完全ではあるが再生に向かう変化を起こすことから、分子メカニズムの解明により不完全再生を完全な再生に導くことができれば、OAの再生医学的治療につながる可能性を秘めている。

RECK（reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs）分子は、近年発見されたGPIアンカー型タンパク質で（Oh J et al. Cell 107: 789-800, 2001）、複数のMMP（MMP-2, MT1-MMP, MMP-9）を阻害することが知られており、細胞膜上でMMP活性を

制御している可能性が高いと考えられる。現在までに主に癌細胞生物学の分野で研究され、RECKの発現は癌細胞の浸潤性を低下させることが示されている（Takahashi C et al. Proc Natl Acad Sci USA 95: 13221-13226, 1998）。一方、RECKは胎生期において軟骨組織での発現が認められることから（Kondo S et al. J Cell Sci 120: 849-857, 2007）、OAをはじめとした病的関節軟骨での発現が予想される。しかし、成体および疾患の関節軟骨組織におけるRECK分子の発現や機能解析についてはこれまでに全く報告がない。

そこで、われわれはヒト関節軟骨組織23検体を用いて、RECK分子が正常軟骨に比べOA軟骨において高発現していることを定量RT-PCR法と免疫組織化学で見出した。免疫染色の結果では、特にcloningを起こした軟骨細胞にRECKが高率に発現していた。さらにわれわれはヒトOA関節軟骨から単離・培養した軟骨細胞（OA軟骨細胞）においてRECKの遺伝子発現を確認し、siRNAの導入によりRECK発現を低下させる手法を確立した。予備実験の結果、RECK発現の抑制によりOA軟骨細胞の形態変化、focal adhesionの変化、さらに細胞増殖能の低下を認めた。このことから、RECKがMMPの活性阻害により軟骨に対し防御的に働くというだけでなく、細胞-細胞外マトリックス相互作用を調節し、軟骨細胞の増殖促進により軟骨再生に関わる可能性が示唆された。すなわち、上述のOA病態のを抑制しつつに作用する興味深い分子である可能性が考えられ、OA軟骨におけるRECK分子の発現と機能の解析を行った。

2. 研究の目的

- (1) RECK 分子が OA の関節軟骨細胞で高発現するメカニズムについて、サイトカイン・増殖因子・細胞外マトリックスによる発現誘導の作用を検討する。
- (2) OA 軟骨細胞の細胞外マトリックスへの接着、伸展、focal adhesion の形成における RECK 分子の役割を、siRNA の手法を用いて検討する。
- (3) OA 軟骨細胞の増殖および細胞死における RECK 分子の作用を、siRNA の手法を用いて検討する。
- (4) OA 軟骨細胞が産生する MMP 活性を RECK 分子がどのように制御しているか調べる。
- (5) OA 軟骨細胞 - 細胞外マトリックス相互作用における細胞内シグナル伝達系に関して、RECK 分子がどの系を調節しているかを検討する。

3. 研究の方法

(1) サイトカイン・増殖因子・細胞外マトリックスによるRECK分子の発現誘導の検討

ヒトOA軟骨組織から単離・培養した軟骨細胞 (OA軟骨細胞) を実験に用いる。OAの病態上重要と考えられているサイトカイン・増殖因子 (IL-1, TNF- α , TGF- β , IGF-1等) を、OA軟骨細胞の培地に添加し、3~48時間作用させ、RNAおよびタンパク質を抽出する。RECK のmRNAについてはRT-PCR法、タンパクについてはWestern blot法により発現量の変化を調べる。また、培養皿を、II型コラーゲン、VI型コラーゲン、フィブロネクチン等、生体内

で軟骨細胞周囲に存在する細胞外マトリックスでコーティングし、その上でOA軟骨細胞を培養してRECKの発現量を同様に検討する。

(2) OA軟骨細胞の細胞外マトリックスへの接着、伸展、focal adhesionの形成、遊走におけるRECK分子の機能解析

RECKをターゲットとしたsiRNAを電気穿孔法によりOA軟骨細胞に導入し、RECK発現を抑制した細胞 (RECK-siRNA細胞) を用意する。対照として等量のnon-silencing siRNAをOA軟骨細胞に導入する (control細胞)。これらの細胞をノンコーティングまたは細胞外マトリックスをコーティングした培養皿に播種し、細胞の接着、伸展、focal adhesionの形成の程度を比較する。Focal adhesionの評価にはpaxillin, vinculinの蛍光免疫染色を行い観察する。細胞形態について蛍光標識ファロイジンによりF-アクチンを可視化し評価を行う。細胞遊走についてはmonolayer wounding assayにより比較する。

(3) OA軟骨細胞の増殖および細胞死におけるRECK分子の役割の検討

上記の RECK-siRNA 細胞と control 細胞の増殖能を BrdU とり込みアッセイを用いて比較する。また、これらの細胞に TNF- α +actinomycin D 等を作用させて細胞死を誘導し、細胞死の程度を比較する。

(4) OA軟骨細胞が産生するMMP活性のRECK分子による制御の検討

RECK-siRNA 細胞と control 細胞に IL-1 もしくは TNF- α を作用させ、種々の MMP 分子の産生を誘導する。培養上清および cell lysate の Western blotting や gelatin zymography を行い、MMP の活性が RECK の発現量によりど

のように変化するか調べる。

(5) OA 軟骨細胞 - 細胞外マトリックス相互作用における細胞内シグナルの RECK 分子による調節の検討

RECK siRNA 細胞と control 細胞を培養皿に播種し、cell lysate の Western blotting により FAK, ERK 等の細胞内シグナル伝達系分子のリン酸化の状態を比較する。

4. 研究成果

ヒト OA 軟骨細胞において、OA の病態上重要と考えられる各種サイトカインによる RECK の発現調節について調べた結果、IGF-1 が発現促進因子、IL-1 と TNF- α が発現抑制因子であることが mRNA レベルおよびタンパクレベルで明らかになった。OA の病態生理において、IGF-1 は軟骨再生を促す “anabolic cytokine”、IL-1 と TNF- α は軟骨破壊を進める “catabolic cytokines” として作用すると考えられていることから、RECK は軟骨再生の局面で高発現する分子である可能性が示唆される。

RECK siRNA 細胞と control 細胞の間で細胞接着能には有意差がなかったが、培養皿上での細胞伸展を定量化して比較すると、RECK siRNA 細胞では伸展が有意に抑制された。また、RECK siRNA 細胞では細胞形態が細長くなり、蛍光標識ファロイジン染色を行うとアクチンストレスファイバーが平行に走行する像が認められた。細胞の接着装置である focal adhesion を蛍光免疫染色で可視化すると RECK siRNA 細胞では focal adhesion が小型化していた。これらの形態変化が細胞

運動と関連していることが予想されたので、細胞の遊走能を評価するための monolayer wounding assay を行ったところ、RECK siRNA 細胞では control 細胞に比べ遊走能が亢進しており、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 阻害剤の BB94 によりその遊走は部分的に抑制された。BrdU とり込みアッセイによる細胞増殖の比較では、RECK siRNA 細胞は control 細胞より増殖能が低下しており、BB94 を加えてもその差は変化しなかった。

以上のデータから、RECK 分子はヒト OA 軟骨において IGF-1 の影響下で高発現し、軟骨細胞-マトリックス相互作用を変化させ、細胞遊走を抑制するとともに増殖を促進する機能を有することが示唆される。OA 軟骨の特徴的病変のひとつであり軟骨細胞の増殖性変化と考えられる「軟骨細胞の cloning」の部に RECK が高発現することを踏まえると、RECK 分子が cloning 病変の形成、あるいは軟骨の不完全再生に深く関与している可能性が考えられる。

これらの知見は、軟骨疾患における RECK 分子の発現調節・機能として初めて明らかにされたものである。OA 病変における軟骨細胞の cloning あるいは不完全再生のメカニズムについては未知の部分が多く、本研究の成果は OA の病態の解明に有意義と考えられる。

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)

〔学会発表〕(計2件)

木村徳宏、岡田保典、RECK分子はヒト変形性関節症軟骨に発現し軟骨細胞のcloningに関わる、第40回日本結合組織学会学術大会・第55回マトリックス研究会大会合同学術集会、2008年5月30日、こまばエミナーズ(東京都)

木村徳宏、岡田保典、変形性関節症関節軟骨におけるRECK分子の発現と機能解析、第97回日本病理学会総会、2008年5月15日、石川県立音楽堂

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 徳宏 (KIMURA TOKUHIRO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：40445200

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし