

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390395

研究課題名(和文) 運動器疾患感受性遺伝子の機能解明に立脚した軟骨変性治療

研究課題名(英文) Strategic approach for cartilage degeneration based on functional analysis of susceptibility gene

研究代表者

木村 友厚 (TOMOATSU KIMURA)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：80167379

研究成果の概要(和文)：脊椎椎間板および関節軟骨の変性に関連する遺伝子として明らかにされた疾患感受性遺伝子 CILP について、まずその *in vivo* での機能を明らかにするために、軟骨および髄核特異的に CILP 発現を示す conditional Tg マウスを作成した。異なるエンハンサー下に、髄核での CILP 過剰発現を示すマウスと、髄核での発現のないマウス系統を詳細に比較することにより、CILP 発現によって早期に髄核変性が惹起されることを組織学的に明らかにした。またそれは *in vivo* で CILP と TGF β が結合し、続いて SMAD を介する下流シグナルの抑制が生じ、その結果マトリックス産生が抑制される事によることを明らかにした。さらにアグリカナゼや MMP-13 をはじめとするマトリックス分解系の亢進と髄核細胞のアポトーシスも生じることも示し、疾患感受性遺伝子として分離した CILP が実際に *in vivo* で軟骨(椎間板)のマトリックス代謝を負に制御することを初めて示した。

これに基づいて CILP の関る軟骨代謝ステップを制御する治療の検討を開始し、その一つとして、catabolism 制御の目的で *in vivo* でのアグリカナゼ抑制を siRNA を用いて試み、その結果アグリカナゼをターゲットとして椎間板変性進行が阻止できることを明らかにした。さらに CILP の関るマトリックス代謝の上流因子である c-Fos/AP-1 もターゲットとし、変形性関節症モデル動物に対して新たに開発された c-FOS/AP-1 阻害薬を連日経口投与することにより、アグリカナゼや MMP-13 発現が抑えられ、関節軟骨変性の進行が完全に阻止できることが明らかとなり、今後の軟骨変性治療の実際的な分子標的候補を示した。

研究成果の概要(英文)：To clarify the *in vivo* function of CILP, which was identified as a susceptibility gene associated with cartilage degenerative disease, we firstly established conditional Tg mouse line expressing the gene specifically in cartilage or nucleus pulposus. X-ray, MRI and histochemical analysis of the mice lines indicated that the specific overexpression of the CILP in the nucleus pulposus was responsible for the accelerated intervertebral disc degeneration. This was apparently caused by *in vivo* binding of the TGF β with CILP, reduced receptor binding and TGF β signaling that leads to the inhibition of the cartilage matrix gene expression. In addition there was enhanced matrix proteinase expression and disc cell apoptosis that also generated matrix homeostasis imbalance. Based on these observations, we then tried to block the factors associated with the CILP signaling pathway. Inhibition of aggrecanase by injection of ADAMTS5 siRNA *in vivo* using intervertebral disc degeneration model resulted in the protection of the progression. We also started to block the upstream signal of c-fos/AP-1 using newly developed specific inhibitor. Administration of the c-fos/AP-1 inhibitor to mouse DMM model dramatically prevented the progression of articular cartilage degeneration, partly through inhibition of proteinase expression. Thus, these observations suggested possible strategic targets for cartilage degeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 7,100,000 | 2,130,000 | 9,230,000 |
| 2009年度 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |
| 2010年度 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究代者の研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目（計画調書に記入したもの）：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード（任意）：関節病学、軟骨、感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

様々な common disease の感受性遺伝子がゲノムワイドの解析や候補遺伝子アプローチで明らかにされつつあるが、最近になって運動器の common disease である椎間板変性（椎間板ヘルニア）や関節軟骨変性（変形性関節症）についても、いくつかの疾患感受性遺伝子が解明されてきた。われわれも椎間板変性患者について、軟骨関連遺伝子の候補遺伝子を中心にアプローチし、遺伝子多型研究センターで収集された遺伝子多型データと高速度大量タイピングシステムを用いての大規模な相関解析の結果、cartilage intermediate layer protein (CILP) をはじめとするマトリックス遺伝子の多型が、椎間板変性と相関することを明らかにした。さらに連鎖不平衡領域の決定、ハプロタイプに基づく解析も行い、CILP の遺伝子多型が、椎間板変性の疾患感受性多型であることを発見してきた。この CILP はその後の英国のグループの解析では変形性膝関節症とも相関することが示されている。その他にも COL9A2、Asporin、GDF5 などが相関することが報告されている。

しかしながら、これらの疾患感受性遺伝子の機能については不明な点が多い。in vitro の解析においては、いずれの遺伝子産物も何らかの形で軟骨 ECM 代謝に影響を与えることがわかっている。しかし各々の遺伝子発現や

多型が in vivo では一体どのような機能を示し、それが如何にして軟骨変性疾患に結びつくのかは解明されていない。その変性メカニズムを遺伝子レベル、蛋白レベルで解明することは、軟骨変性疾患に対する治療戦略への糸口とする上でも、その重要性は非常に高い。

一方、椎間板変性や変形性関節症の抑制を目的に様々な治療薬が検討されてきた。しかしながら現在に至るまで、これらの構造的破壊の進行を抑制できる有効な治療法の開発は全く成功していない。CILP をはじめとする疾患感受性遺伝子の機能解明から、新たにその pathway にかかわる種々の分子をターゲットとすることにより、真に有効な治療戦略が明らかとなる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトのゲノム解析にて見出しされた関節・脊椎疾患（関節軟骨変性・椎間板変性）の感受性遺伝子について、その機能を動物モデルの作成・解析を通じて解明し、さらにそれに立脚した疾患制御の方策を、in vivo で目指そうとするものである。

(1) 本研究機関内に、まず CILP を関節・脊椎椎間板の軟骨の特定部位に過剰発現した、部位特異的トランスジェニック (Tg) マウスを作成し、CILP の過剰発現と、発現の有無による軟骨変性誘導の相違を in vivo で明らかにする。また環境要因として力学要因を加え、多因子疾患とし

での軟骨変性の促進を解析する。さらに CILP の及ぼす影響を、関節軟骨および脊椎椎間板を中心に、各種遺伝子発現、さらに TGFβシグナルを免疫染色を中心に解析し、CILP の関る病態メカニズムを明らかにする。

(2) 得られた CILP 機能の知見をもとに、CILP の関る pathway や軟骨代謝における関連分子をターゲットとし、椎間板や関節軟骨変性を阻止する戦略を開発する。これには *in vivo* での siRNA 投与での発現抑制、あるいは特異的阻害薬を作製し、これを用いての標的分子制御による治療効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 本研究期間内に、まず軟骨の部位特異的に過剰発現した、mCILP-Tg マウスを作成する。これには軟骨、脊索、髄核、短骨での部位特異的発現に関する *cis*-element を有する Col11a2 プロモーター/エンハンサーを持って、脊椎椎間板髄核および髄核以外の椎間板軟骨部に CILP を過剰発現した複数系統の Tg マウスを樹立する。これらのマウス系統において、関節軟骨変性、椎間板変性の促進メカニズムを形態学的 (micro CT、MRI、組織、免疫組織) に解析する。同時に変性進行前の軟骨組織における CILP 発現、TGFβ および受容体発現、リン酸化 smad、各 MAPK、マトリックス遺伝子発現、さらに変性進行時の軟骨細胞肥大化関連遺伝子発現、apoptosis 等について検討する。

ついで Tg マウスおよび正常 littermate に対して力学的要因をそれぞれ加え、軟骨変性破壊のさらなる進行促進の有無を明らかにする。これには顕微手術で内側半月切離を行い変形性膝関節症を誘導する。まず 3-6 ヶ月間の経過で、膝関節に対して軟 X 線撮影、micro CT 検索を行うとともに、組織学的解析をする。組織学的解析には軟骨マトリックスの変化、軟骨細胞の病的肥大化 (最終分化) の有無と程度、軟骨下骨の変化、抗 II 型コラーゲン染色性の変化、抗 X 型コラーゲン染色性の出現、および CILP 等の免疫染色を含む。これらの変化を、CILP 発現部位の異なる

mCILP-Tg マウス間で比較する。一方、頸椎には棘突起および項靭帯切除により頸椎症を誘導し、膝と同様に CILP 発現の違いによる軟骨変性の誘導発症の違いを明らかにする。

(2) CILP を中心とする疾患感受性遺伝子の *in vivo* 機能解析で明らかになった CILP pathway 関連分子の中で、マトリックス catabolism に直接関る proteinase と、上流因子をターゲットとし、まず siRNA を作製して *in vivo* の軟骨変性モデル動物に投与し、変性進行阻止効果を検討する。さらに特異的阻害薬の作製を試み、これの投与による疾患進行抑制にも着手する。

4. 研究成果

(1) マウス *CILP* 遺伝子をクローニングし、異なる軟骨部位 (髄核、椎間板、関節軟骨) に発現させた Tg マウス系統 453*mCILPInt* と 742*mCILP* を作成した。また発現解析のための抗 mCILP 抗体を作成した。これらの複数のマウス系統を維持すると同時に、各マウス組織における transgene の発現を RT-PCR 並びに抽出蛋白の解析で明らかにした。さらに生後 8 ヶ月目までの骨格を、頸椎・腰椎、および膝関節を中心に形体学的 (軟 X 線、MRI、組織) に検討した。その結果、これらのマウスでは顕著な骨格異常はなく正常の成長を遂げることで、軟 X 線レベルでは早期の脊椎症や関節症の変化は出現しないこと、一方で椎間板髄核特異的に CILP を発現させた 453*mCILPInt* では、椎間板変性を示す MRI 上の輝度変化が有意に早期に認められることが明らかとなった (図 1)。また組織学的にも加齢によって CILP により椎間板変性が軽度 enhance されていることが *in vivo* で初めて明らかとなった (図 2)。

さらにこのマウス系統を使用し、疾患感受性遺伝子 CILP に加えての環境要因として、頸椎には棘突起・靭帯切除による力学的要因を追加し、これによって、椎間板変性がさらに促進し脊椎症変化が誘導されることを明らかにした。

一方、この椎間板変性誘導メカニズムが TGFβシグナルを介するかを知るために、髄核におけるリン酸化 smad の発現変化を中心に解析したところ、453*mCILPInt* ではリン酸化が有意

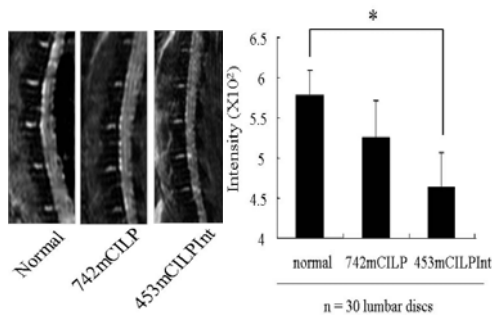


図1 マウス椎間板のMRI 輝度変化

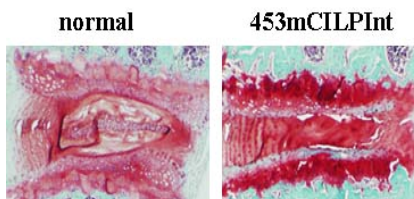
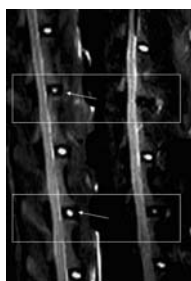


図2 CILPによるマウス椎間板の変性進行

に低下しており、さらにマトリックス遺伝子発現が低下していること、また髄核細胞のアポトーシスも亢進しており、CILPがTGFβシグナルを介して髄核のマトリックス代謝を負に制御したことが明らかとなった。

(2)これらに基づいてCILPの関する軟骨代謝のステップを制御する治療の検討を開始し、まずその一つとしてcatabolism制御の目的でsiRNAの*in vivo*投与によりアグリカナゼ抑制を試みた。椎間板変性をpunctureモデルで誘導後、髄核内にADAMTS5 siRNAを投与したところ、vehicle投与と比べて有意に変性進行が抑制できることを、MRI画像と組織学的に明らかにした(図3)。



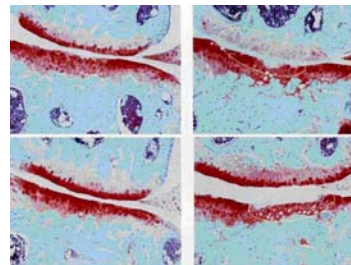
矢印部椎間板にsiRNA投与

siRNA control

図3 ADAMTS5制御による変性進行抑制

引き続き、CILPの上流でより広範にECMホメオスターシスに関する因子として

c-Fos/AP-1をターゲットとし、これに対する特異的阻害薬を得て投与を行った。マウスの内側半月板切離により緩序に進む変形性関節症モデルを作製し、本阻害薬を連日に経口投与したところ、関節軟骨変性の進行が顕著に阻止できることを示した(図4)。また関節軟骨では



c-Fos 阻害

control

図4 c-Fos阻害による軟骨変性抑制

アグリカナゼやMMP-13の発現が抑えられており、これが軟骨破壊阻止に働いたことが考えられた。これらの結果は、このCILPの上流や下流分子が、今後の軟骨変性治療戦略の実際的な分子標的となることを示している。

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)

[雑誌論文] (計13件)

- ①Hori T, Kondo T, Kanamori M, Tabuchi Y, Ogawa R, Zhao QL, Ahmed K, Yasuda T, Seki S, Suzuki K, Kimura T. Ionizing radiation enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through up-regulations of death receptor 4 (DR4) and death receptor 5 (DR5) in human osteosarcoma cells. *J Orthop Res* 査読有, 28,2010,739-745
- ②Yukata K, Matsui Y, Shukunami C, Takimoto A, Hirohashi N, Ohtani O, Kimura T, Hiraki Y, Yasui N. Differential expression of Tenomodulin and Chondromodulin-1 at the insertion site of the tendon reflects a phenotypic transition of the resident cells. *Tissue Cell* 査読有, 2010,42,116-120
- ③Hori T, Kondo T, Kanamori M, Tabuchi Y, Ogawa R, Zhao QL, Ahmed K, Yasuda T, Seki S, Suzuki K, Kimura T. Nutlin-3 enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced

- apoptosis through up-regulation of death receptor 5 (DR5) in human sarcoma HOS cells and human colon cancer HCT116 cells. *Cancer Lett* 査読有, 2010, 287,98-108
- ④ Suzuki K, Matsui Y, Endo K, Kubo T, Hasegawa T, Kimura T, Ohtani O, Yasui N. Myxoid liposarcoma with EWS-CHOP type I fusion gene. *Anticancer Res* 査読有, 2010, 304679-4683
- ⑤ Kubo T, Matsui Y, Naka N, Araki N, Myoui A, Endo K, Yasui N, Ohtani O, Suzuki K, Kimura T, Yoshikawa H, Ueda T. Specificity of fusion genes in adipocytic tumors. *Anticancer Res* 査読有, 2010,30,661-664
- ⑥ Seki E, Matsushita I, Sugiyama E, Taki H, Shinoda K, Honoki H, Motomura H, Kimura T. Radiographic progression in weight-bearing joints of patients with rheumatoid arthritis after TNF-blocking therapies. *Clin Rheumatol* 査読有, 2009, 28, 453-460
- ⑦ Yasuda T, Kanamori M, Nogami S, Hori T, Oya T, Suzuki K, Kimura T. Establishment of a new human osteosarcoma cell line, UTOS-1: cytogenetic characterization by array comparative genomic hybridization. *J Exp Clin Cancer Res* 査読有, 2009,28,26
- ⑧ Karasugi T, Semba K, Hirose Y, Kawaguchi Y, Kimura T, Ikageka S, et al. Association of the tag SNPs in the human SKT gene (KIAA1217) with lumbar disc herniation. *J Bone Miner Res* 査読有, 2009,24,1537-1543
- ⑨ Seki S, Asanuma-Abe Y, Masuda K, Kawaguchi Y, Asanuma K, Muehleman C, Iwai A, Kimura T. Effect of small interference RNA (siRNA) for ADAMTS5 on intervertebral disc degeneration in the rabbit annular needle-puncture model. *Arthritis Res Ther* 査読有, 2009,11,R166
- ⑩ Nakamura C, Matsushita I, Kosaka E, Kondo T, Kimura T. Anti-arthritic effects of combined treatment with histone deacetylase inhibitor and low-intensity ultrasound in the presence of microbubbles in human rheumatoid synovial cells. *Rheumatology* 査読有, 2008,47,418-424
- ⑪ Tokunaga A, Oya T, Ishii Y, Motomura H, Nakamura C, Ishizawa S, Fujimori T, Nabeshima Y, Umezawa A, Kanamori M, Kimura T, Sasahara M. PDGF receptor β is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. *J Bone Miner Res* 査読有,

2008, 23,1519-1528

- ⑫ Hirose Y, Chiba K, Karasugi T, Nakajima M, Kawaguchi Y, Mikami Y, Furuichi T, Mio F, Miyake A, Miyamoto T, Ozaki K, Takahashi A, Mizuta H, Kubo T, Kimura T, Tanaka T, Toyama Y, Ikegawa S. A functional polymorphism in THBS2 that affects alternative splicing and MMP binding is associated with lumbar-disc herniation. *Am J Hum Genet* 査読有 2008, 82,1122-1129
- ⑬ Hori T, Kondo T, Tabuchi Y, Takasaki I, Zhao Q, Kanamori M, Yasuda T, Kimura T. Molecular mechanism of apoptosis and gene expressions in human lymphoma U937 cells treated with anisomycin. *Chem Biol Int* 査読有, 2008,172,125-140

〔学会発表〕 (計 8 件)

- ① 元村拓、松井好人、関庄二、塩沢俊一、木村友厚. c-FOS/AP-1 阻害は変形性関節症モデルの軟骨破壊を抑制する。第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2011, 10. 20-21, 前橋
- ② Seki S, Tsumaki N, Kawaguchi Y, Abe Y, Suzuki K, Iwai A, Oya T, Ikegawa S, Kimura T. CILP, cartilage intermediate layer protein, promotes lumbar disc degeneration. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2010,3, 6-9, New Orleans
- ③ Seki S, Abe Y, Kawaguchi Y, Asanuma K, Masuda K, Kimura T. Small interference RNA (siRNA) of ADAMTS4 and ADAMTS5 in nucleus pulposus cells in vitro and effects of ADAMTS5 siRNA in the rabbit annular needle puncture model. 37th Annual Meeting International Society for the Study of the Lumbar Spine, 2010,4,13-17, Auckland
- ④ Chiba K, Mio F, Hirose Y, Kawaguchi Y, Mikami Y, Kimura T, Kubo T, Toyama Y, Ikegawa S. Polymorphisms in genes encoding extracellular matrix proteins are associated with susceptibility to lumbar disc herniation. ISSLS Annual Meeting, 2010, 4, 13-17, Newzeland
- ⑤ Matsui Y, Michigami T, Kawabata H, Kimura T, Ohtani O, Nishimura G. Czech dysplasia occurring in a Japanese Family. 第 83 回日本整形外科学会学術総会, 2010, 5, 27-30, 東京
- ⑥ Mio F, Chiba K, Kawaguchi Y, Mikami Y, Seki S, Mori M, Hirose Y, Kubo T, Kimura T, Toyama Y, Ikegawa S. A functional polymorphism in COL11A1 is associated with susceptibility to lumbar disc herniation. 5th Annual Meeting of

the Orthopaedic Research Society,
2009,2,22-25, Las Vegas

- ⑥ Seki S, Abe Y, Kawaguchi Y, Asanuma K,
Masuda K, Kimura T. Small interference
RNA (siRNA) of ADAMTS4 and ADAMTS5
in NP cells in vitro and effect of ADAMTS5
siRNA in the rabbit anular needle puncture
model. 36rd Annual Meeting of the
International Society for the Study of the
Lumber Spine, 2009, 5, 3-8, Miami
- ⑦ Kimura T. Osteoarthritis and cartilage
degeneration: Where are we? First Indonesia
Japan Rheumatology Forum, 2009, 12, 16-19,
Bali
- ⑧ 木村友厚. 骨関節と細胞外マトリックス.
第 114 回日本解剖学会総会全国学術集会
2009, 3, 28-30, 岡山.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 友厚 (KIMURA TOMOATSU)
富山大学大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号 : 80167379

(2) 研究分担者

川口 善治 (KAWAGUCHI YOSHIHARU)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
准教授
研究者番号 : 00262527
関 庄二 (SEKI SHOJI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・
助教
研究者番号 : 00432112

(3) 連携研究者