

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25年5月29日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2012

課題番号：21249078

研究課題名（和文） 変形性関節症における軟骨分化マスター因子 SOX9 の病態関与と新規治療への基盤研究

研究課題名（英文） Studies of pathological involvement of Sox9 in osteoarthritis and discovery of new treatment for osteoarthritis

研究代表者

秋山 治彦 (AKIYAMA HARUHIKO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60402830

研究成果の概要（和文）：

関節軟骨に Sox9 遺伝子を過剰発現させたマウスでは明らかな変形性関節症変化の遅延が認められた。また、関節軟骨および、Sox9-EGFP マウスおよび Sox9-EGFP null chimera の軟骨細胞を用いたマイクロアレイ解析から、変形性関節症関連遺伝子として1つ、Sox9 による発現誘導される遺伝子1つを絞り込んだ。さらに、Sox9-EGFP マウス由来軟骨細胞を用いて Sox9 発現誘導活性を有する化合物のスクリーニングを実施した。約 10000 種類以上の化合物スクリーニングにより 7 種類の候補が得られた。

研究成果の概要（英文）：

Overexpression of Sox9 in articular chondrocytes resulted in delay of osteoarthritis change. In addition, genome-wide screening using GeneChip with chondrocytes derived mouse articular cartilage, Sox9-EGFP mice, and Sox9-EGFP null chimera identified one gene involved in osteoarthritis and one gene induced by Sox9. Furthermore, screening of about 10000 chemical reagents using Sox9-EGFP chondrocytes revealed 7 chemical reagents which has Sox9-inducing activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2012年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
総計	36,700,000	11,010,000	47,710,000

研究分野：整形外科

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、Sox9、遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

我が国は高齢化社会を迎え、高齢者の日常生活動作(ADL)およびQOL(quality of life)の向上は社会的にも重要なテーマとして取り上げられている。変形性関節症による疼痛

や運動障害によるADLの低下を認める患者は増加の一途をたどっており、変形性関節症や運動器不安定症を基盤としたロコモティブシンドロームがクローズアップされている。現在の変形性関節症の治療は疼痛に対

する対症療法や運動療法などが中心であり、積極的治療としてはヒアルロン酸の関節内注射があるのみで、関節軟骨の変性からの保護および変性軟骨の再生は今だ研究の域を出ていない。

従来の軟骨研究は初代軟骨細胞や継代細胞を用いた培養細胞系でおこなわれていた。しかし初代軟骨細胞は成長軟骨板から採取されたものであり、また継代細胞も関節軟骨の形質を完全に保持しているものは存在しない。また、関節軟骨培養系はヒト関節軟骨細胞または家兎関節軟骨細胞によるもので、採取できる細胞数が限られていること、家兎の場合はデータベースが整備されておらず遺伝子やタンパク質の解析が困難であるという問題点がある。また、培養細胞系が生体内での生理的条件下の関節軟骨組織を忠実に再現することは不可能である。従来の遺伝子改変マウスを用いた軟骨研究は、そのほとんどが個体発生過程における軟骨細胞の増殖および分化の研究であり、生後の関節軟骨の解析を遺伝子改変マウスで施行している研究は散見される程度である。その理由としては、transgenic マウスにおいて軟骨細胞で遺伝子を発現させる場合、一般に用いられる II 型コラーゲンプロモーターは生後 2-3 週間でその発現活性が著しく低下し (秋山、未発表; Han Y. MCB, 2008)、生後の関節軟骨で十分な遺伝子発現量を維持できない点がある。また、生後の関節は軟骨下骨および二次骨化中心の存在のため組織学的解析において骨の脱灰の必要があり、免疫染色や *in situ hybridization* 法でのタンパク質や遺伝子の検出の際、シグナルの低下やシグナル/ノイズ比が小さく、発現量の少ないタンパク質や遺伝子では分子生物学的解析が困難となる。

Sox9 と関節軟骨に関する研究は、変形性関節症由来の軟骨細胞への遺伝子導入での基質タンパク質の産生増加などの研究報告があるのみで (Tew, Arthritis Res Ther, 2007)、病態との関連および生体における解析はその発現をみるのみにとどまっている (Haag, Pathbiology, 2008; Fukui, A&R, 2008)。よって生後の関節軟骨での Sox9 の機能が個体発生時と同様に関節軟骨細胞の増殖と分化にドミナントな作用を持っているのか、変形性関節症における関節軟骨細胞で Sox9 遺伝子の発現が病態の進行とともにどのように変化し、また病態進行過程で関節軟骨細胞での Sox9 の下流因子が個体発生時の成長軟骨板の軟骨細胞や正常関節軟骨細胞においてと同じなのかどうかなどは全くの未知である。

生後の関節軟骨研究の上記のような問題点を克服し、Sox9 の関節軟骨での発現および機能を明らかにするため、本研究では、

Sox9 遺伝子の 3'-untranslated region に蛍光タンパク質 enhanced green fluorescent protein (EGFP) をコードする遺伝子をノックインすることによって Sox9 発現細胞に EGFP を発現する遺伝子改変マウスを作製した (秋山、未発表)。このマウスでは、EGFP 遺伝子は外来性の transgene ではなく内在性の Sox9 プロモーターによって発現するため、生後の関節軟骨での Sox9 の発現を生きたマウスでも初代軟骨培養細胞でも簡単にモニターすることができる。さらに、生後の関節軟骨において Sox9 を過剰発現させ機能解析を行うにあたり、conditional targeting の手法を用いて、conditional targeting 前には Red fluorescent protein (RFP) が、conditional targeting 後には EGFP が発現することによって、生後でも個体のままで Sox9 の過剰発現をモニターできる遺伝子改変マウスも作製した (秋山、未発表)。また従来、生後のどの時期においても関節軟骨で効率よく conditional targeting をおこなう Cre リコンビナーゼ発現遺伝子改変マウスは存在していなかったが、当該研究者は Sox9 遺伝子の 3'-untranslated region に CreERT2 遺伝子をノックインした遺伝子改変マウスの作製に成功した。このマウスによって、Cre リコンビナーゼの発現をタモキシフェンの腹腔内投与によって任意の時期に誘導することができる。これらの遺伝子改変マウスを用いることによって、生後の関節軟骨での Sox9 の発現動態および機能解析が可能となる。

2. 研究の目的

遺伝子改変マウスを用いた解析を通して、個体発生過程において転写因子 Sox9 が軟骨細胞の増殖、分化および軟骨基質産生に必須のマスター遺伝子として機能していることを明らかとした。すなわち Sox9 が欠失した未分化間葉系細胞は軟骨に分化できない (Akiyama, G&D, 2002)。軟骨細胞も Sox9 が欠失すると軟骨細胞としての細胞形質を維持することができず、また、軟骨特異的基質タンパク質を産生できず軟骨組織を形成できない (Akiyama, G&D, 2002)。さらに、Sox9 を異所性に発現させたマウスではその部位に一致して異所性に軟骨が形成される (Akiyama, Mat Biol, 2007)。このように、現在まで、個体発生過程における軟骨での Sox9 の発現動態や機能は明らかとなり、その分子機序の解明も進められている。しかし、生後関節軟骨における生体内での Sox9 の発現および機能は未だ明らかではない。また、変形性関節症などの病態との関係も未解決のままである。

本研究では生後の関節軟骨での Sox9 の発現および機能を遺伝子改変マウスを用いて

明らかにする。また、Sox9 を変形性関節症の治療ターゲットとして位置づけ、変形性関節症モデルマウスでの Sox9 の発現動態、機能を明らかとし、変形性関節症の病態進行過程における Sox9 の機能をマイクロアレイを用いた関節軟骨での下流因子同定にて明らかとする。さらに Sox9 の発現を関節軟骨で誘導し軟骨基質産生を増加させることによって軟骨を保護し変性を抑制する合成化合物を、Sox9 遺伝子座に Enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子をノックインした遺伝子改変マウス由来初代軟骨細胞を用いてスクリーニングし同定する。さらに同定された化合物が変形性関節症の関節軟骨変性に対して治療効果があるかどうか、また、関節軟骨再生に効果があるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) Sox9-EGFPマウスを用いた生後関節軟骨でのSox9 発現と変形性関節症モデルでのSox9 発現動態の解析

Sox9-EGFP マウスの膝関節軟骨を Laser Capture microdissection(LCM) で採取し RNA を抽出後、Sox9 遺伝子の発現量をそれぞれリアルタイム PCR で定量的に測定する。また、生後 2 ヶ月齢の Sox9-EGFP マウスの片側膝関節の内側および外側側副靭帯、内側および外側半月板、前十字靭帯を実体顕微鏡下で切除し、膝関節の不安定性を惹起させ変形性関節症を誘発するマウスモデルを作製する。対側は sham 手術によるコントロールとする。術後 2、4、8、12 週目に膝関節を採取し、蛍光実体顕微鏡で EGFP の発現動態を観察し蛍光強度を定量化する。またマイクロ CT で骨棘形成などの形態変化を解析する。

(2) conditional Sox9 transgenic (cTg) マウスを用いた関節軟骨および変形性関節症病態進行過程でのSox9 の機能解析

cTg マウスを Sox9-CreERT2 マウスと交配させダブルヘテロマウスを作製する。生後 2 ヶ月齢のダブルヘテロマウスの腹腔内にタモキシフェン 4mg を 3 日間連続投与する。コントロールとしてタモキシフェン不含のコーンオイルのみを投与する。タモキシフェン投与後 4 週間で膝関節を採取し、蛍光実体顕微鏡でタモキシフェン投与群では RFP の発現が関節軟骨で消失し、EGFP の発現を認めることによって Cre/loxP システムにより関節軟骨細胞に Sox9 遺伝子の発現が誘導されていることを確認する。

EDTA 脱灰パラフィン標本を用いて、ISH 法により Col1a1, Col2a1, Col10a1, アグリカン遺伝子などの発現レベルおよび発現部位を解析する。

(3) 遺伝子発現プロファイリング解析による正常軟骨および変形性関節症におけるSox9 の機能解析

Sox9-EGFP マウスの正常膝関節および変形性関節症モデルの膝関節、cTg マウスの Sox9 過剰発現膝関節および変形性関節症モデル膝関節を術後 2 週目、8 週目で採取しパラホルムアルデヒド固定後パラフィン切片を作製し、それぞれの関節軟骨から RNA 抽出後 Affymetrix 社 GeneChip によるマイクロアレイ解析を行い、それぞれの遺伝子発現プロファイリングを比較検討する。この実験によりマウス正常関節軟骨の遺伝子発現プロファイリング、Sox9 過剰発現により遺伝子発現誘導された遺伝子群、変形性関節症の病態進行による遺伝子発現プロファイリングの差異、変形性関節症病態進行に対する Sox9 過剰発現による遺伝子プロファイリングの変化を明らかにする。

(4) Sox9-EGFPマウス由来初代軟骨細胞を用いたSox9 発現誘導活性を有する化合物のスクリーニング

生後 1-2 日目の Sox9-EGFP マウスの肋骨を採取し、トリプシンおよびコラゲナーゼ処理にて軟骨細胞初代培養系を作製する。96 穴プレートに 1 穴あたり 10000 個の細胞を播種し 2 日間培養後、Chemical library の化合物を添加する。24 時間後蛍光マイクロプレートリーダーにて EGFP の蛍光強度を測定し、コントロールの 3 倍以上の蛍光強度を誘導する化合物のリストを作成する。この方法にて約 10000 種類以上の化合物スクリーニングを実施する予定である。EGFP 発現誘導活性を認めた化合物は、Sox9-EGFP マウスの膝関節に 33G 針付き注射器を用いて実体顕微鏡下に関節内投与し、30 分、1 時間、2 時間後に EGFP 蛍光強度を蛍光実体顕微鏡で観察し、生体内でも EGFP 発現誘導活性を有しているかを確認する。2 次スクリーニングとして、EGFP 誘導活性を有する化合物をマウス初代軟骨培養細胞に添加後、48 時間での Col2a1 およびアグリカン遺伝子発現上昇をリアルタイム PCR で解析し、さらに GAG アッセイによるプロテオグリカン産生上昇、ELISA による II 型コラーゲン産生促進活性を有するものを選択する。また平成 22 年度に施行したマイクロアレイで明らかとなった変形性関節症モデルにおいて Sox9 で発現が誘導される遺伝子群の発現量の変化をリアルタイム PCR で検討する。

(5) 家兔変形性関節症モデルおよび家兔関節軟骨欠損モデルを用いたSox9 発現誘導活性を持つ化合物の変形性関節症への治療効果の解析

3.5kg 日本白色家兎部分半月板切除による変形性関節症モデルを作製する。スクリーニングされた化合物を埋め込み型オスモティックポンプを用いて4週間持続投与する。コントロールとして溶媒のみを投与する群を作製する。手術4週後および8週後に屠殺し膝関節を摘出し、それぞれ早期変形性関節症と進行期変形性関節症の病態を検討する。マイクロCTにて骨棘などの形成による形態変化を解析した後、膝関節をEDTA脱灰しパラフィン切片を作製する。サフラニン-O/ファーストグリーン染色で変形性関節症の病態を解析し、化合物の効果を判定する。

また3-3.5kg 日本白色家兎大腿骨頸部に直径3mmおよび5mmの円柱状の関節軟骨欠損モデルを作製する。スクリーニングされた化合物を埋め込み型オスモティックポンプを用いて2週間持続投与する。コントロールとして溶媒のみを投与する群を作製する。手術2週後に屠殺し膝関節を摘出。EDTA脱灰後パラフィン切片を作製し、サフラニン-O/ファーストグリーン染色で欠損関節軟骨部の修復状態を解析し、化合物の効果を判定する。

4. 研究成果

(1) Sox9-EGFP マウスを用いて関節軟骨におけるSox9遺伝子の発現を解析した。Sox9遺伝子は生後マウス関節軟骨において恒常性に発現していた。半月板および側副靭帯・前十字靭帯損傷による外傷性変形性膝関節症マウスモデルをSox9-EGFPマウスを用いて作成したところ、手術後1週間目でEGFPの発現強度が有意に増強し、その後低下することが確認された。実際、Sox9遺伝子の発現の推移をリアルタイムPCRで確認したところ、やはり手術後1週間目でSox9遺伝子の発現は亢進し、その後低下することが明らかとなった。組織学的解析では、手術後1週間では関節軟骨の明らかな変性所見は認められなかったが、術後2週間目より関節軟骨表層のフィブリレーションをきたし、術後4週で関節軟骨の変性および骨棘形成が認められた。以上の結果から、変形性関節症の病態の初期では、関節軟骨においてSox9遺伝子の発現が一過性に亢進することが明らかとなった。Sox9遺伝子は、軟骨細胞外基質蛋白質であるII型コラーゲン、IX型コラーゲン、アグリカンなどの遺伝子の発現を直接誘導することが知られている。よって、変形性関節症発症初期のSox9遺伝子の発現亢進は、軟骨細胞による細胞外基質蛋白質の発現誘導による病態の抑止がなされていると考えられる。よって、関節軟骨にSox9遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスをCre/loxPリコンビネーションシステムを用いて作成し(CAG/floxmRFP1/Sox9/IRESEGFP;

Sox9-Cre)、生後、膝関節の靭帯および半月板切除により変形性膝関節症を惹起させ、病態の進行をSham手術群と比較検討した。組織学的解析では、Sham群と比べ、Sox9過剰発現群では明らかな変形性関節症変化の遅延が認められた。以上のin vivo解析より、Sox9遺伝子の関節軟骨における発現誘導は、変形性関節症の病態を改善し、また、発症を抑止することが可能であることが明らかとなった。

(2) マウスの正常膝関節および変形性関節症モデルマウスの膝関節軟骨の凍結切片を作製し、Laser Capture Microdissection法で関節軟骨のみを切り出し、RNAをQIAGEN社RNeasy kitで抽出後、Affymetrix社のプロトコールに準じてそれぞれのRNAからラベルしたcRNAを作製後、Affymetrix社GeneChipによるマイクロアレイ解析を行い、それぞれの遺伝子発現プロファイリングを比較した。また、Sox9により発現誘導される遺伝子解析は、Sox9-EGFPマウスの軟骨およびSox9-EGFP null chimeraからEGFP陽性細胞をFACSで単離し、上述と同様にAffymetrix社GeneChipによるマイクロアレイ解析を施行した。それぞれのデータから2倍以上の遺伝子発現量の相違が見られる遺伝子をin situ hybridization法を用いて関節軟骨でのin vivoの発現を確認した。変形性関節症モデルマウスで発現亢進する遺伝子はMMP9, MMP13などがpositive controlとして確認され、その他に変形性関節症での役割が分かっていない遺伝子も同定された。また軟骨においてSox9で発現誘導される遺伝子は、Col2a1, Col11a2, Matrilin-1などがpositive controlして確認され、その他にもいくつかの遺伝子が同定されている。これら遺伝子の軟骨細胞での機能を確認するために、マウス軟骨細胞株ATDC5細胞およびマウス胎性間葉系細胞株C3H10T1/2細胞にそれぞれの発現ベクターをlipofectionで導入し、Alcian blue染色による軟骨結節形成能およびCol2a1、Aggrecan、Col10a1遺伝子発現に対する効果を検討した。その結果、現在、変形性関節症関連遺伝子として1つ、Sox9による発現誘導される遺伝子1つに絞り込み、in vitroおよびノックアウトマウスを用いたin vivoでの機能解析を実施している。

(3) Sox9-EGFPマウス由来初代軟骨細胞を用いてSox9発現誘導活性を有する化合物のスクリーニングを実施した。生後1-2日目のSox9-EGFPマウスの肋骨を採取し、トリプシンおよびコラゲナーゼ処理にて軟骨細胞初代培養系を作製した。96穴プレートに1穴あたり10000個の細胞を播種し2日間培養後、Prestwick社およびSigma-Aldrich社から購入したChemical libraryの化合物を添加した。

24時間後蛍光マイクロプレートリーダーにてEGFPの蛍光強度を測定し、コントロールの3倍以上の蛍光強度を誘導する化合物のリストを作成した。この方法にて約10000種類以上の化合物スクリーニングを実施し終了した。この結果、17種類の低分子化合物が得られた。2次スクリーニングとして、EGFP誘導活性を有する化合物をマウス初代軟骨培養細胞に添加後、48時間でのCol2a1およびアグリカン遺伝子発現上昇をリアルタイムPCRで解析し、最終的に3種類の化合物が獲得された。これら7種類の化合物は、Sox9-EGFPマウスの膝関節を摘出し実体顕微鏡下に関節内投与しEGFP蛍光強度を蛍光実体顕微鏡で観察したところ、組織においてもEGFP発現誘導活性を有していることを確認した。よってこの7種類の低分子合成化合物は、関節軟骨においてSox9遺伝子発現を誘導し、関節症治療薬のシード化合物で有ると期待できる。次に3.5kg日本白色家兎部分半月板切除による変形性関節症モデルを作成し、上述の低分子化合物を連日関節内に4週間注射投与した。現在、関節軟骨修復効果をマイクロCTおよび組織学的解析にて検討を行い、至適投与濃度および投与量を検討中である。

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1件)

(1) Yukio Nakamura, Koji Yamamoto, Xinjun He, Bungo Otsuki, Youngwoo Kim, Hiroki Murao, Tsunemitsu Soeda, Noriyuki Tsumaki, Jian Min Deng, Zhaoping Zhang, Richard R. Behringer, Benoit de Crombrughe, John H. Postlethwait, Matthew L. Warman, Takashi Nakamura, and Haruhiko Akiyama*. Wwp2 is essential for palatogenesis mediated by the interaction between Sox9 and mediator subunit 25. *Nature Communications* **2**, Article number: 251. 2011. 査読有、doi: 10.1038/ncomms1242.

[学会発表] (計1件)

(1) 山本 浩司, 金 永優, 武井 大輔, 村尾 浩樹, 末吉 達也, 塚中 真佐子, 水野 敦子, 鈴木 誠, 松田 秀一, 秋山 治彦: TRPV4 は Sox9 の発現を介して変形性関節症の発症を抑制する. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2012 年 10 月 27 日. 名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 治彦 (AKIYAMA HARUHIKO)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 60402830

(2) 研究分担者

八十田 明宏 (YASODA AKIHIRO)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 50378642
伊藤 宣 (ITO HIROMU)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 70397537

(3) 連携研究者

なし