

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 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591930

研究課題名（和文） 転写因子 C/EBP ファミリーによる軟骨代謝調節メカニズムの解析

研究課題名（英文） Regulation of chondrocyte metabolism by transcription factor C/EBP families

研究代表者

三浦 俊樹 (MIURA TOSHIKI)

東京大学医学部附属病院・講師

研究者番号：20376479

研究成果の概要（和文）：

軟骨内骨化は骨格成長や変形性関節症（OA）発症に関与する。今回、転写因子 CCAAT/enhancer-binding protein（C/EBP）ファミリーの生理的および病的な軟骨内骨化における役割とについて検討した。

C/EBP δ ホモ欠損マウスおよび C/EBP ϵ 欠損マウスにおいては明らかな骨格形成異常は認められなかったが、C/EBP β ホモ欠損（-/-）マウスは同胞野生型（+/+）マウスに比べて胎生期より成長障害が見られ、肢芽での COL10、MMP13 の発現が低下していた。また C/EBP β ヘテロ欠損（+/-）マウス（8 週齢）の膝関節に実験的 OA モデルを作成した場合でも、+/+マウスに比べて関節軟骨での COL10、MMP13 の発現の低下と共に軟骨変性が抑制された。C/EBP β は Runx2 の co-factor として知られているため、C/EBP β と Runx2 の複合遺伝子欠損マウス（C/EBP β -/- ; Runx2 +/-）を作成したところ、同胞 C/EBP β -/- マウスよりも強い成長障害を認めた。組織学的検討には、軟骨内骨化の遅延および一次海綿骨量の低下を認め（alcian blue / von Kossa 二重染色）、COL10 の発現は C/EBP β -/- と同程度であったが MMP13 の発現が著明に低下していた。このメカニズム解明のため、ヒト軟骨系細胞株 SW1353 に C/EBP β と Runx2 を共導入すると、増殖能（CCK-8 assay）は単独導入と同程度であったが、各種軟骨分化マーカーの中で MMP13 の発現（real-time RT-PCR）が相乗的に上昇した。一方、C/EBP β と Runx2 の発現は相互の強制発現によって変化はなく、独立した制御が示された。MMP13 promoter-luciferase gene construct 導入 SW1353 に C/EBP β と Runx2 を過剰発現させたところ、協調して転写活性を促進することが示され、更に段階的 deletion、mutagenesis、tandem-repeat construct を用いた検討によって、MMP13 遺伝子の転写開始点上流 -144～-89 bp の部位に OSE2 に加え C/EBP モチーフを含む応答領域を同定した。C/EBP β は Runx2 と協調して MMP13 を転写誘導し、骨格成長や OA の軟骨変性を制御していることが示された。C/EBP β 、Runx2 の相互作用は成長障害および OA などの軟骨変性疾患などの治療ターゲットとなりうることを示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The endochondral ossification is a crucial process in normal skeletal growth and osteoarthritis (OA) development. Aiming at elucidation of the molecular mechanism underlying this process and identification of therapeutic targets for OA, we examined the signal network around CCAAT/enhancer-binding protein- β (C/EBP- β), a regulator of chondrocyte functions. Computational predictions and a C/EBP motif-reporter assay identified RUNX2 as the most potent transcriptional partner of C/EBP- β in chondrocytes. Both C/EBP- β and RUNX2 were co-expressed in the terminal differentiation stage of chondrocytes in several cell culture systems, in the mouse limb cartilage, and in the OA joint

cartilage of mice and humans. To determine the involvement of C/EBP- β and RUNX2 in the endochondral ossification process, we generated their compound knockout mice: *Cebpb^{-/-};Runx2^{+/-}* and *Cebpb^{+/-};Runx2^{+/-}*, because *Runx2^{-/-}* mice died just after birth. The *Cebpb^{-/-};Runx2^{+/-}* mice showed more severe dwarfism than the *Cebpb^{-/-}* and *Runx2^{+/-}* littermates with impaired cartilage degradation but unaffected chondrocyte differentiation. Although *Cebpb^{+/-};Runx2^{+/-}* mice showed normal skeletal growth, they exhibited greater suppression of knee OA development in surgical and age-related OA models than their *Cebpb^{+/-}* and *Runx2^{+/-}* littermates. Histological analyses in the limb cartilage and the OA joint cartilage showed that the compound knockout caused a considerable decrease of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) among various factors related to endochondral ossification. In cultured chondrocytes, C/EBP- β and RUNX2 cooperatively enhanced endogenous expression and promoter activity of *MMP13* shown by real-time RT-PCR and luciferase assay. The specific and direct binding of C/EBP- β and RUNX2 as a protein complex to a C/EBP-binding motif and an OSE2 motif in the *MMP13* promoter was shown by EMSA and ChIP-reIP assay. Lastly, to identify the upstream mechanism, we performed a screening of transcription factors using a human *CEBPB* promoter fragment among putative factors regulating chondrocyte differentiation, and identified hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) as the most potent and functional inducer of C/EBP- β expression in chondrocytes through specific binding to a hypoxia-responsive element. In conclusion, C/EBP- β and RUNX2, with MMP-13 as the target and HIF-2 α as the inducer, cooperatively control cartilage degradation. This molecular network in chondrocytes may represent a therapeutic target for OA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

近年高血圧、高脂血症、糖尿病などの生活習慣病予備軍としてメタボリックシンドロームという概念が普及しその予防に対する社会的意義・要求が高まって来ている。その予防策として肥満の抑制、運動機能強化・運動

器疾患予防が重要な位置にあることは自明の事実であり、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞などの間葉系細胞における増殖・分化メカニズムを知りその制御機構を理解することは、肥満予防、運動器疾患対策さらにはメタボリックシンドローム予防につながる大変

意義深いものである。転写因子 C/EBP ファミリーはこうした間葉系細胞の増殖・分化に関与する重要な分子であることが知られており、中でも脂肪細胞においては C/EBP α , β , δ が互いに協調しながら分化・増殖を制御し、その遺伝子欠損マウスで脂肪組織量が減少することが報告されている。

C/EBP ファミリーは、様々な組織でファミリー内の分子が互いに協調しながら細胞増殖、分化、機能に関与することが知られている。このためファミリー分子間の機能重複、協調性について検討することが、分子メカニズム解明の上で不可欠である。また二量体を形成する他の分子として骨芽細胞分化においてはそのマスター転写因子である Runx2 と C/EBP β , δ との協調性が知られており、骨形成においても C/EBP ファミリーが重要な役割を担うことが示唆されている。Runx2 は軟骨細胞においてもその分化に重要な役割を果たし、過去の我々の成果として Runx2 の遺伝子欠損マウスにおいて変形性関節症の進行が抑制されるという事実を得ていることから、軟骨細胞においても C/EBP ファミリーが Runx2 と協調してその分化に作用し、変形性関節症においても同様に関与していることが十分に考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は転写因子 CCAAT-enhancer binding protein (C/EBP)ファミリーの軟骨代謝における役割とその分子メカニズムを解明し、種々の軟骨病態への関与を検討するとともに、関節再生の創薬・技術開発に応用するための基礎検討を行うことである。

3. 研究の方法

C/EBP ファミリーにおいて転写活性化領域を持つものは、C/EBP α , β , δ , ϵ であり、この内、in vivo においては特に C/EBP β , δ , ϵ に注目し、その遺伝子欠損マウスの軟骨組織を生理的条件下および病的条件下(変形性膝関節症モデル)に解析を行った。

4. 研究成果

C/EBP β , δ , ϵ 単独遺伝子欠損マウスについて骨格系における表現型の解析を行った。C/EBP β 遺伝子欠損マウスでは、胎生期より軟骨内骨化の遅延を伴う成長障害を認めるものの生後その障害は徐々に解消された。このマウスにおいては各種免疫化学染色や in situ hybridization では X 型コラーゲンや MMP13 の発現の低下を確認することが出来た。C/EBP δ , ϵ それぞれの遺伝子欠損マウスは胎生期、生後を通じて明らかな骨格系の異常は確認できなかった。さらに C/EBP β , δ , ϵ 遺伝子欠損マウスと WT の新生仔肋軟骨から軟骨細胞を採取して以下の検討を行った。軟

骨細胞の増殖を評価した結果、特に C/EBP β 遺伝子欠損により軟骨細胞の増殖能が更新していること、およびその下流で細胞周期関連因子として CDK インヒビターの一つである p57 の発現が関与していることが明らかとなった。また、軟骨細胞分化については C/EBP β , δ , ϵ いずれにおいても遺伝子欠損により肥大分化以降にかかわる各種マーカーの発現の低下を確認することができた。

変形性関節症モデルにつき検討を行った結果、C/EBP β 遺伝子欠損マウスでは軟骨変性の進行が抑制され、同マウスにおける変性軟骨部での X 型コラーゲン、MMP13 の発現量は低下していた。C/EBP δ , ϵ それぞれの単独遺伝子欠損マウスではこのような明らかな差は認められなかった。さらに自然経過例における OA の進行についての検討を行い、C/EBP β 遺伝子欠損マウスでの OA の進行が抑制される傾向を確認した。

C/EBP β の上流シグナルについてそのプロモーターを用いた検討を行った。軟骨分化にかかわる各種転写因子を作用させ、このプロモーター領域を組み込んだレポーターベクターと共導入したところ、HIF2 α が最も強い転写活性を有していることが判明した。さらに、プロモーター領域の段階的欠失、変異コンストラクトにより、その応答領域として C/EBP β プロモーター上に hypoxia responsive element (HRE) motif を同定し、同部への HIF2 α の結合性も確認することができた。

C/EBP β ;C/EBP ϵ 遺伝子欠損マウスならびに C/EBP δ ;C/EBP ϵ 遺伝子欠損マウスを作製した。C/EBP δ ;C/EBP ϵ 遺伝子欠損マウスにおいては生理的な骨格成長を経時的におって解析したものの明らかな骨格形成の異常は確認できなかった。C/EBP β ;C/EBP ϵ 遺伝子欠損マウスにおいては C/EBP β 単独のものとは比べ胎生期において更なる成長障害が生じていることが明らかとなった。しかし、胎生後期以降においてはその複合ホモ遺伝子欠損マウスを得ることはできず、胎生致死と考えられた。

C/EBP β ;Runx2 遺伝子欠損マウスの解析を行った。結果として、C/EBP β ホモ;Runx2 ヘテロ遺伝子欠損マウスは生後まで成長障害が継続し、C/EBP β ホモ遺伝子欠損マウスより著名な表現型を呈することが確認できた。組織学的解析の結果、MMP13 の発現の著しい低下が確認され、更なる解析の結果、そのメカニズムのひとつとして C/EBP β と Runx2 が協調して MMP13 を転写誘導し、軟骨の基質分解を促していることが明らかとなった。さらに変形性関節症モデルにおいてもこの複合遺伝子欠損マウスにおいて、単独のもの比べてその進行が抑制されていることが明らかとなった。

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 10 件) すべて査読あり

1. 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.
2. 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 β and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 α as the inducer in chondrocytes. *Hum Mol Genet* 21: 1111-1123, 2012.
3. Ogata N, Shinoda Y, Wettschureck N, Offerman S, Takeda S, Nakamura K, Segre GV, Chung UI, and Kawaguchi H: The G α_q signal in osteoblasts is inhibitory to the osteoanabolic action of PTH. *J Biol Chem* 286: 13733-13740, 2011.
4. 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.
5. Shinoda Y, Kawaguchi H, Higashikawa A, Hirata M, Miura T, Saito T, Nakamura K, Chung UI, and Ogata N: Mechanisms underlying catabolic and anabolic functions of parathyroid hormone on bone by combination of culture systems of mouse cells. *J Cell Biochem* 109: 755-763, 2010.
6. 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 α during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med* 16: 678-686, 2010.
7. 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.
8. 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 β promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57^{Kip2}. *PLoS ONE* 4: e4543, 2009.
9. Ushita M, Saito T, Ikeda T, Yano F, Higashikawa A, Ogata N, Chung UI, Nakamura K, and Kawaguchi H: Transcriptional induction of SOX9 by NF- κ B family member RelA in chondrogenic cells. *Osteoarthritis Cartilage* 17: 1065-1075, 2009.
10. Kan A, Ikeda T, Saito T, Yano F, Fukai A, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Screening of chondrogenic factors by a real-time fluorescence monitoring cell line ATDC5-C2ER: Identification of sorting nexin 19 as a novel factor. *Arthritis Rheum* 60: 3314-3323, 2009.

[学会発表] (計 20 件)

1. Kawaguchi H: Endochondral ossification signals as potential therapeutic targets for osteoarthritis (Invited Lecture). 2011 Gordon Research Conference: Cartilage Biology & Pathology. 2011. 3. 6-11 (Ventura, CA, USA).
2. Kobayashi H, Hirata M, Itoh S, Saito T, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi 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. 6-11 (Ventura, CA, USA).
3. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Mabuchi A, Sapkota BR, Akune T, Yano F, Ikeda T, Nishida N, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, and Kawaguchi H:

- C/EBP- β and RUNX2 in chondrocytes control cartilage degradation. 2011 Gordon Research Conference: Cartilage Biology & Pathology. 2011. 3. 6-11 (Ventura, CA, USA).
4. Kawaguchi H: Overview of molecular backgrounds of osteoarthritis. The 3rd International Cartilage and Osteoarthritis Symposium (ICOA 2011) (Keynote Lecture). 2011. 7. 5 (Suwon, Korea).
 5. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Mabuchi A, Sapkota BJ, Akune T, Yano F, Ikeda T, Nishida N, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, Kawaguchi H: C/EBP- β and RUNX2 cooperatively control cartilage degradation with MMP-13 as the target and HIF- α as the inducer in chondrocytes. 33th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR). 2011. 9.16-20 (San Diego, California, USA).
 6. Kawaguchi H: Therapeutic target molecules for cartilage degradation in osteoarthritis progression (Invited Lecture). System Biology and Drug Discovery. 2010. 2. 9 (Seoul, Korea).
 7. Kawaguchi H: Molecular backgrounds of cartilage degradation during osteoarthritis progression (Invited Lecture). 2010 Anti-aging and Well-being International Symposium. 2010. 2. 19 (Daegu, Korea).
 8. Kawaguchi H, Matsushita T, Oka H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Sato K, Nakamura K: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of local application of recombinant human fibroblast growth factor-2 for tibial shaft fractures. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). 2010. 3.6-9 (New Orleans, Louisiana, USA).
 9. Fukai A, Kawamura N, Saito T, Oshima Y, Ikeda T, Yano F, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H: Akt1 in chondrocytes controls cartilage calcification during skeletal growth and osteophyte formation in osteoarthritis. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). 2010. 3.6-9 (New Orleans, Louisiana, USA).
 10. Kawaguchi H: Endochondral ossification signal: A potential therapeutic target for osteoarthritis (invited lecture). 2010 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2010. 9.23-26 (Brussels, Belgium).
 11. Fukai A, Saito T, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, Kawaguchi H: HIF2A / NF-kappa B signal in chondrocytes controls extensive steps of osteoarthritis development in mice and humans (Young Investigator Award). 2010 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2010. 9.23-26 (Brussels, Belgium).
 12. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Yano F, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H: Molecular network on the C/EBP-beta axis including Runx2, MMP13, and HIF2A controls osteoarthritis development (Young Investigator Award). 2010 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2010. 9.23-26 (Brussels, Belgium).
 13. Kawaguchi H, Oka H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Sato K, Matsushita T, and Nakamura K: A local application of recombinant human fibroblast growth factor-2 for tibial shaft fractures: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 32th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR). 2010. 10.15-19 (Toronto, Canada).
 14. Taniguchi Y, Saito T, Ikeda T, Chung UI, Nakamura H, Kawaguchi H: A Transcription factor p63 controls extensive steps of endochondral ossification through distinct functions of the isoforms (Young Investigator Award). 32th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR). 2010. 10.15-19 (Toronto, Canada).
 15. Kawaguchi H, Chikuda H, Kawasaki Y, Hofmann F: Cyclic GMP-dependent protein kinase II promotes chondrocyte hypertrophy and skeletal growth. 4th International Conference on cGMP. 2009. 6.19-21 (Rosensburg, Germany).
 16. Saito T, Fukai A, Ikeda T, Yano F, Hirata M, Kan A, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Comprehensive control of

- endochondral ossification by HIF-2 α during skeletal growth and osteoarthritis progression. 31th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR). 2009. 9.11-15 (Denver, Colorado, USA).
17. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Kan A, Higashikawa A, Yano F, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Distinct transcriptional control of chondrocyte hypertrophy and cartilage degeneration by C/EBP-beta and Runx2 during endochondral ossification. 2009 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2009. 9.10-13 (Montreal, Quebec, Canada).
18. Fukai A, Kawamura N, Saito T, Ikeda T, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Akt1 in chondrocytes controls cartilage calcification during osteophyte formation in osteoarthritis. 2009 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2009. 9.10-13 (Montreal, Quebec, Canada).
19. Kawaguchi H: Transcriptional regulation of cartilage degeneration during osteoarthritis progression. The 2nd International Cartilage and Osteoarthritis Symposium (Plenary Lecture). 2009. 10. 10 (Seoul, Korea).
20. Kawaguchi H: Molecular backgrounds of cartilage degeneration during osteoarthritis progression (Special Lecture: OARSI-KORS Co-sponsored Symposium). The 35th Annual Meeting of the Korean Orthopaedic Research Society. 2009. 10. 14 (Seoul, Korea).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[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

三浦 俊樹 (MIURA TOSHIKI)
東京大学医学部附属病院・講師
研究者番号：20376479

(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
筑田 博隆 (CHIKUDA HIROTAKA)
東京大学医学部附属病院・助教
研究者番号：30345219
伊藤 英也 (ITO HIDEYA)
東京大学医学部附属病院・助教
研究者番号：30436464

(3) 連携研究者

緒方 直史 (OGATA NAOSHI)
東京大学医学部附属病院・講師
研究者番号：10361495