

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 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591935

研究課題名（和文） 関節軟骨細胞に発現する破骨細胞分化制御因子の機能に関する研究

研究課題名（英文） Investigation of the molecular mechanisms through which osteoclast differentiation regulating factors modulates osteoarthritis progression.

研究代表者

古賀 大介 (KOGA DAISUKE)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60422482

研究成果の概要（和文）：

変形性関節症(OA)は加齢に伴って関節軟骨の破壊と骨棘形成を進行することを特徴とする関節の変性疾患であるが、発症メカニズムが解明されたとは言いがたい。我々は以前、関節軟骨に発現するosteoprotegerin (OPG)に着目し、OPGは軟骨細胞に直接作用し、軟骨変性に抑制的に機能することを明らかにしたが、OPGの関節内における標的は依然明らかではない。本研究では、当初、OPGと高い親和性にて結合するRANKLと、そのレセプターであるRANKの軟骨細胞内シグナルの、軟骨細胞代謝における機能を検討した。リアルタイムPCR法による検証では、若年マウス軟骨細胞、およびマウス軟骨細胞様細胞株ATDC5において、レセプターであるRANKの発現は認められなかった。一方、変形性膝関節症の患者から採取したヒト滑膜細胞ではRANK,RANKLともに明らかな発現が認められた。これらの知見から、少なくとも若い軟骨細胞では、RANK/RANKLのシグナルカスケードは活性化されないことがあきらかとなった。次に、RANKLと同様に破骨細胞分化を制御するTNFシグナルに着目し、TNFR1KOマウスの関節軟骨を解析した。生後1年では野生型と比較し、TNFR1KOでは膝関節の骨棘形成が亢進し、関節軟骨の菲薄化が認められた。以上より、TNFR1KOでは軟骨の骨化が促進していることが示唆された。野生型マウス、TNFR1KOマウスの膝関節に外科的変形性膝関節症モデルを適用すると、TNFR1KOでは骨棘形成がより促進されていた。新生マウスの骨端軟骨を採取しmRNA発現をreal-time RT-PCRにて比較すると、TNFR1KOではCol10a1の発現が野生型と比較して有意に亢進していた。このように、TNFR1シグナルは軟骨細胞の肥大化/骨化を制御することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Purpose

Proinflammatory cytokines, such as IL-1 and tumor necrosis factor α (TNF α), are suspected of causing damage to osteoarthritis (OA) cartilage. TNF α content is elevated in the synovial fluid of OA joints. There are 2 cell surface receptors for TNF α including p55 (TNFRI) and p75 (TNFRII). TNF α and TNFRs I and II are up-regulated in OA cartilage. For bone metabolism, mice null for TNFR1 have significantly increased peak bone mass, resulting from elevated bone formation. In vitro, TNF α inhibited mineralization of osteoblasts through regulation of NF-kB activity. Thus, whereas TNFR1 plays roles in osteoblast differentiation, its functions in chondrocyte metabolism is unknown. Endochondral ossification is an essential process for development of OA, which is characterized by cartilage degradation and osteophyte formation. The aim of this study is to investigate the role of TNFR1 in the maintenance of articular tissues.

Materials and methods

[Histological evaluation of aged TNFR1^{-/-} mice]

Knee joints of TNFR1^{-/-} and their wild-type (WT) littermates (52-60 weeks of age) were evaluated immunohistologically. Whole knee joints were removed by dissection, fixed in 4% paraformaldehyde, and decalcified in EDTA. After dehydration and paraffin embedding, serial 5- μ m sagittal sections were made from the whole medial compartment of the knee joint. Three sections were picked up at 100- μ m intervals from the weight-bearing region of each medial plateau of tibia, and were stained with

Safranin O-fast green and HE. Osteophyte area and articular cartilage thickness were quantified in each slide using Image-Pro Plus 4.1 software.

[Surgical induction of OA in TNFR1^{-/-} mice.]

TNFR1^{-/-} and their wild-type (WT) littermates were surgically induced to develop OA by medial collateral ligament transection and medial meniscectomy. Four weeks after surgery, the mice were euthanized.

Results

At 52-60 weeks of age, whereas osteophyte formation was detected at the medio-anterior edge of tibial plateau regardless of genotype, osteophyte area was significantly increased in TNFR1^{-/-} mice. Moreover, articular cartilage thickness was reduced at medial end region of tibia plateau in TNFR1^{-/-} mice, suggesting ossification of articular chondrocyte was advanced by TNFR1 deficiency. We next compared osteoarthritis development between adult littermates of wild-type and TNFR1^{-/-} mice by creating a surgical osteoarthritis model through induction of instability to the knee joints. Histological evaluation confirmed that the TNFR1 deficiency caused significant acceleration for osteophyte formation. Degree of cartilage destruction was almost comparable between TNFR1^{-/-} and WT. Real time PCR analysis for epiphyseal chondrocyte from new born mice revealed mRNA expression of type X collagen, a marker for chondrocyte hypertrophy, was significantly elevated in TNFR1^{-/-} mice compared to WT littermate. Currently, we are picking up a number of candidate genes for targets of TNFR1 in the course of chondrocyte hypertrophy using cDNA microarray analysis.

Conclusion

Endogenous TNFR1 had a protective effect against osteophyte formation through inhibition of type X collagen synthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1200000	360000	1560000
2010年度	1100000	330000	1430000
2011年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：整形外科

キーワード：OPG、RANK、RANKL、老化、関節軟骨

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は加齢に伴って関節軟骨の破壊と骨棘形成を進行することを特徴とする関節の変性疾患であり、罹患者数は本邦で約 1000 万人に上る非常にポピュラーな疾患であるものの、発症メカニズムが解明されたとは言いがたい。関節軟骨変性の分子メカニズムについては、近年ゲノミクスを中心として精力的な検索が繰り返され、これまで述べられてきた各種炎症性サイトカインに加え、asporin, ADAMTS-4/5、C I L Pなどの因子が関節変性の制御因子として新規に同定されており (Ikegawa ら)、この分野は活況を帯びつつある。興味深いことに、破骨細胞分化制御因子である、Receptor Activator

of Nf-kB (RANK)とそのリガンドである RANKL は、デコイレセプターの Osteoprotegerin (OPG)とともに関節軟骨に発現する (Komuro H ら Arthritis Rheum 2001)。更に、変性関節軟骨では、OPG mRNA の発現が正常軟骨と比較してより亢進しており、また OPG は RA や OA 関節の滑膜組織においても発現している (Haynes DR ら Rheumatology 2003)。Juvenile Paget 病は O P G 活性低下に伴って骨量の著しい減少をきたす先天性疾患であるが、早期に変形性関節症が認められる。これらの知見から、RANK/RANKL/OPG という破骨細胞分化制御因子群が軟骨代謝においても機能する可能性が予見されるものの、分子メカ

ニズムは明らかでなかった。我々は、関節軟骨に対するOPGの直接作用に着目し、OPGノックアウトマウスと野生型マウス(WT)の膝関節組織像を経時的に比較した。その結果、OPGノックアウトマウスは加齢に従い軟骨下骨が菲薄化すると共に軟骨変性が加速するが、まだ軟骨下骨代謝に影響が認められない若年 OPG+/+の膝関節においてでさえも、野生型と比較して関節軟骨が菲薄化し、軟骨変性が進行していることを見出した(Shimizu, Asou ら Arthritis Rheum 2007)。また、マウス外傷性変形性膝関節症モデルにおいて、OPG+/+マウスはより軟骨変性が重症化すること、OPGの関節内投与では軟骨細胞のアポトーシスが抑制され、軟骨変性進行が阻害されることなどを見出した(Shimizu, Asou ら Arthritis Rheum 2007)。これらの結果から、OPGは軟骨細胞に直接作用し、軟骨変性に抑制的に機能することが明らかとなったが、OPGの軟骨細胞における標的因子は明らかではない。OPGのリガンドのひとつである TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)は関節軟骨に発現し、軟骨細胞のアポトーシスを誘導すること(Lee SW ら Arthritis Rheum. 2004)から、我々はOPGがTRAILを介してアポトーシスを抑制していることを推察した(Shimizu, Asou ら Arthritis Rheum 2007)が、TRAILとOPGの結合能はRANKLとのそれよりもはるかに低いため、RANKLを介した分子機構が軟骨細胞に存在する可能性が推測される。また、NFAT、calmodulin CaMKなどの、破骨細胞においてRANK下流に存在するシグナル分子、あるいはその相同遺伝子は多く軟骨細胞にも発現している。しかしRANK/RANKLシグナルに着目して軟骨細胞内シグナル、軟骨細胞代謝を詳細に検討した研究はない。

2. 研究の目的

1. 軟骨細胞様細胞株ATDC5, マウス関節軟骨細胞を用いたシグナル因子変動の検索

骨細胞様細胞株ATDC5にRANKL、あるいはRANKsiRNAを作用させ、RANKシグナルを刺激、あるいは抑制して遺伝子の変動をPCR、cDNAアレイなどの手法にて検証する。特に破骨細胞において解析が進む細胞内シグナル分子の変動に着目して軟骨細胞との相同性を検証する。In vitroの環境にてRANKシグナルの変動に反応する遺伝子プロファイルを解析することによって、RANK下流に位置するシグナルカスケードを検証する。同様の検証をマウス関節軟骨細胞(Marjolaine G ら Nat. Protocols 2008の手技に順ずる)において行う。

2. LCM法を用いたin vivoでのRANKL/RANKシグナル経路の同定

マウス膝関節内にRANKL蛋白、あるいはRANKsiRNAを投与し、RANKシグナルを操作して軟骨代謝を組織学的、生化学的に解析することによって、RANKシグナルの生体内での重要性を検証する。また、LCM法を用いてin vivoの環境にてRANKシグナルの変動に反応する遺伝子プロファイルを解析することによって、RANK下流に位置するシグナルカスケードを検証する。以上のアプローチにて、軟骨細胞におけるRANK/RANKL/OPGの発現意義を明らかとする。

3. 研究の方法

生後1週のマウスから初代骨端軟骨細胞を採取し、リアルタイムPCR法にてRANK、RANKLの発現を検証した。同様に軟骨細胞様細胞株ATDC5細胞を軟骨分化誘導し、RANK、RANKLの発現を検証した。ヒト手術検体から滑膜を採取し、RANK、RANKLの発現を検証した。

生後1年のTNFR1KOマウス、および野生型マウスの膝関節を組織学的に解析した。生後3カ月のTNFR1KOマウス、および野生型マウスにおいて、内側半月板、内側側副靭帯を切除して変形性膝関節症を惹起し、術後1カ月にて組織学的に解析し比較した。生後1週野生型、およびTNFR1KOマウスから骨端軟骨を採取し、遺伝子プロファイルを実時間RT-PCR法、マイクロアレイ法にて比較した。

4. 研究成果

リアルタイムPCR法による検証では、若年マウス軟骨細胞、およびマウス軟骨細胞様細胞株ATDC5において、レセプターであるRANKの発現は認められなかった。一方、変形性膝関節症の患者から採取したヒト滑膜細胞ではRANK、RANKLともに明らかな発現が認められた。これらの知見から、少なくとも正常軟骨細胞では、RANK/RANKLのシグナルカスケードは活性化されず、滑膜がRANKLやOPGの主な標的である可能性が示唆された。

一方、我々は、破骨細胞分化、機能を制御する因子の一つであるTNFシグナルに着目し、TNFR1KOマウスの関節軟骨を解析した。生後1年において、野生型と比較し、TNFR1KOでは膝関節の骨棘形成がより促進され、関節軟骨の菲薄化が認められた。以上より、TNFR1KOでは軟骨の骨化が促進していることが示唆された。野生型マウス、TNFR1KOマウスの膝関節に外科的変形性膝関節症モデルを適用すると、TNFR1KOでは骨棘形成がより促進されていた。新生マウスの骨端軟骨を採取しmRNA発現を実時間RT-PCRにて比較すると、TNFR1KOではCol10a1の発現が野生型と比較して有意に亢

進んでいた。このように、TNFR1シグナルは軟骨細胞の肥大化/骨化を制御することが示唆された。この業績は 2011 年国際変形性関節症学会(OARSI world congress on osteoarthritis)にて発表され、高い評価を得た。今後、マイクロアレイ法の結果を参考に、軟骨細胞内シグナルを解明することを目標としている。

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 7 件)

① Hailati A., Yamauchi Y., Ochi H., Koga D., Okawa A., Ogishima S., Okazaki M., Asou Y. TNFR1 deficiency facilitates articular cartilage ossification and osteophyte formation. Osteoarthritis and Cartilage suppl. 2011

② Hailati Aini, Hiroki Ochi, Munetaka Iwata, Atsushi Okawa, Daisuke Koga, Mutsumi Okazaki, Atsushi Sano, Yoshinori Asou. Procyanidin B3 prevents articular cartilage degeneration and heterotopic cartilage formation in a mouse surgical osteoarthritis model. PLoS ONE 2012 in press.

③ Itoh H., Hara Y., Yagawa M., Kato T., Ochi H., Koga D., Okawa A., Shinomiya K., Asou Y. Runx2 expression correlates with the degree of disc aging: a comparison between Magnetic Resonance Imaging and Runx2 expression. J Vet Med Sci. 2012 in press.

④ Shimizu S, Okuda N, Kato N, Rittling SR, Okawa A, Shinomiya K, Muneta T, Denhardt DT, Noda M, Tsuji K, Asou Y. Osteopontin deficiency impairs wear debris-induced osteolysis via regulation of cytokine secretion from murine macrophages. Arthritis Rheum. 2010 May;62(5):1329-37.

⑤ Ochi, H ;Hara, Y ;Tagawa, M ;Shinomiya, K ;Asou, Y The roles of TNFR1 in lipopolysaccharide-induced bone loss: dual effects of TNFR1 on bone metabolism via osteoclastogenesis and osteoblast survival. J Orthop Res. 2010 May;28(5):657-63.

⑥ Ohba T, Haro H, Ando T, Wako M, Suenaga F, Asou Y, Koyama K, Hamada Y, Nakao A. TNF-alpha-induced NF-kappaB signaling reverses age-related declines in VEGF induction and angiogenic activity in intervertebral disc tissues. J Orthop Res. 2009 Feb;27(2):229-35.

⑦ Nakamura T, Iribe T, Asou Y, Miyairi H, Ikegami

K, Takakuda K. Effects of compressive loading on biomechanical properties of disc and peripheral tissue in a rat tail model. Eur Spine J. 2009 Jun 26.

[学会発表] (計 4 件)

① Hailati A., Yamauchi Y., Ochi H., Koga D., Okawa A., Ogishima S., Okazaki M., Asou Y. TNFR1 deficiency facilitates articular cartilage ossification and osteophyte formation. OARSI world congress on osteoarthritis. 2011

② 朴金瑛 辻邦和 古賀大介 森田定雄 大川淳 竹田秀 麻生義則 サーチュイン遺伝子 Sirt6 による軟骨代謝制御 東京骨関節フォーラム 2011

③ 岩田宗峻 越智広樹 原康 多川政弘 古賀大介 大川淳 麻生義則 短期高脂肪食負荷によるマウス変形性膝関節症モデルの樹立東京骨関節フォーラム 2011

④ Aini Hailati, 麻生 義則, 越智 弘樹, 古賀 大介, 加藤 剛, 大川 淳, 佐野 淳, 岡崎 睦 Chondroprotective effects of procyanidin in murine articular chondrocytes 日本分子生物学会 2010/12/10 神戸

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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◇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

6. 研究組織

(1)研究代表者

古賀 大介 (KOGA DAISUKE)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60422482

(2)研究分担者

麻生 義則 (ASO YOSHINORI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研
究科・寄付講座教員
研究者番号：50345279

(3)連携研究者

()

研究者番号：