

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28日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591942

研究課題名（和文） SDF-1/CXCR4 シグナルの関節軟骨変性における役割の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the roles of SDF-1/CXCR4 signaling on degenerative changes of articular cartilage

研究代表者

伊藤 宣 (ITO HIROMU)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70397537

研究成果の概要（和文）：

関節軟骨の変性に SDF-1/CXCR4 シグナルが関わっていることを調べるために、マウスの軟骨細胞に SDF-1 を加えたところ、SDF-1 は II 型・X 型コラーゲンの発現を上昇させたが、X 型コラーゲンの遺伝子発現を直接には制御しないことが判明した。また変形性関節症変化を誘導したマウスの膝関節軟骨では、SDF-1・CXCR4 の遺伝子発現は増加することが判明したが、SDF-1 のヘテロノックアウトマウスで調べたところ、ワイルドタイプと比較して変形性関節症変化に有意な差は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：

We examined the roles of SDF-1/CXCR4 signaling on degenerative changes of articular cartilages. SDF-1 upregulated type II and type X collagen expression in mouse chondrocytes, but did not directly regulate mRNA expression of type X collagen. In mouse knee joint with osteoarthritic changes, SDF-1 and CXCR4 expression were upregulated. However, there were no significant osteoarthritis changes between wild-type and SDF-1+/- mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：リウマチ学

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：変形性関節症、関節軟骨、ケモカイン、SDF-1、CXCR4

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は、高齢化社会の中でいまや国民の関心を最も集める疾患の一つである。患者数も1000万人と言われるが、すべての関節を含めればその数はこれを大きく上回ると予想される。また要介護の原因疾患に骨

関節疾患が25%を数える現状の中、健康寿命の延長に最も大きな影響を与える疾患の一つである変形性関節症に対する対策は、今後我が国が最も力を注ぐべきもののひとつであることは異論を俟たない。変形性関節症は関節軟骨の変性に基づく疾患であり、近年の

再生医療の発展で関節軟骨損傷治療への再生医療の治療応用が期待されているものの、現時点では一度損傷した関節軟骨は少なくとも充分には治癒しえない現実がある。したがって関節軟骨の変性のメカニズムを解明し、それを予防、治療へと結びつけることに対する期待は大きい。

これまで関節軟骨の変性に対しては多くの研究がなされてきた。近年分子生物学的手法が盛んになるにつれて、アスボリン、GDF5、DVWA に代表される変形性関節症の遺伝学的危険因子の同定や (Kizawa et al, Nature Genet 2005 など)、関節軟骨の基質分解に対する MMP、ADAMTS-5 などのプロテアーゼの関与 (Glasson et al, Nature 2005 など) など顕著な研究結果がえられてきている。一方関節軟骨の変性には、基質分解だけでなく軟骨細胞自身の分化も深く関わっていることが明らかになってきた。マウスの変形性関節症モデルにおいて、変性した軟骨細胞は軟骨肥大化細胞のマーカーである X 型コラーゲンと MMP-13 を強く発現しており (Kamekura et al, Osteoarthritis Cartilage 2005)、転写因子である RUNX-2 がこの誘導に深く関与していることが示された (Kamekura et al, Arthritis Rheum 2007)。しかし関節軟骨細胞が肥大化する、ないしそのマーカー遺伝子を発現するとして、これがどのように関節軟骨の変性に結びつくのか、その機序は明らかではない。またさまざまなサイトカインが軟骨変性に関わることが知られているが、向炎症性サイトカインが MMP-1, 3, 13 などのプロテアーゼを誘導することはわかっているものの、関節軟骨細胞の肥大化との関わりはほとんどわかっていない。

我々はこれまで関節炎と関節軟骨の biology について研究してきた (Tsumumi et al, Rheumatol Int 2008, Hirota et al, J Exp Med 2007, Kakinuma et al, Arthritis Rheum 2004)。一方、平成 17~18 年度に科研費を得て、ケモカインのひとつである SDF-1/CXCR4 シグナルの骨軟骨における役割について研究した (Kitaori et al, Arthritis Rheum 2009)。そしてまた平成 19~20 年度の科研費にて、このシグナルが軟骨細胞の肥大化に影響を与える因子であることを明らかにしつつある (Murata et al, PLoS ONE 2012)。またラットを用いた変形性関節症モデルで、CXCR4 が誘導され (Appleton et al, Arthritis Rheum 2007)、また変形性関節症および関節リウマチ (RA) において滑膜切除を行うと、SDF-1 の血中濃度が減少し、MMP-13 などの濃度も減少することが示されている (Kanbe, et al, J Bone Joint Surg-B 2004)。したがって SDF-1/CXCR4 が関節軟骨細胞の肥大化も制御し、且つまた MMP な

どのプロテアーゼ産生も制御する関節軟骨変性の key signal の一つである可能性が考えられる。SDF-1/CXCR4 シグナルが軟骨細胞の細胞内骨格に影響を与える因子であることをも考え合わせると (Murata et al, PLoS ONE 2012)、このシグナルの関節軟骨変性における役割の探求は、研究課題として非常に興味深いと考えられる。

2. 研究の目的

今回我々は、特に SDF-1/CXCR4 シグナルをその候補分子として、関節軟骨が変性するときに軟骨細胞の肥大化がどのように関わっているのか明らかにすることを目指した。また関節軟骨細胞が肥大化するときに、どのようなプロテアーゼを誘導し、これに SDF-1/CXCR4 がどのように関わっているのか、他のサイトカイン、ケモカインとの関わりを含めて明らかにすることを目指し研究にとりかかった。ただし臨床的な問題の解決への手がかりとなることを目指し、関節軟骨変性を阻害することを目指して研究を進めることを目標とした。

関節軟骨の変性については、これまで多くの研究が行われて目覚ましい結果が得られている。しかし分子生物学的にそのメカニズムが充分わかっているとは言いがたい。一方 SDF-1/CXCR4 は、ケモカインの一種であり、hematopoietic cell のホーミング、B 細胞の分化などに働く重要な因子であることはわかっているが (Nagasawa et al, Nature Rev Immunol 2006)、骨関節における働きはほとんどわかっていなかった。しかし最近この因子が破骨細胞の遊走に働いていること (Yu et al, J Bone Miner Res, 2003) が明らかになり、また間葉系幹細胞の骨治癒部位への誘導に重要であることを我々などが明らかにした (Kitaori et al, Arthritis Rheum, in press, Otsuru et al, Stem Cells, 2007)。また最近明らかになってきた関節軟骨細胞の肥大化という現象に注目してみると、我々独自の研究結果から SDF-1/CXCR4 が軟骨細胞分化において重要な働きを果たしていることがわかってきており、このシグナルが関節軟骨変性にも大きな影響を与えている可能性が高いと考えられる。しかしこの点に注目してされた研究は存在しない。またこのシグナルが細胞骨格を直接制御する因子であり、また SDF-1 は軟骨細胞においてプロテアーゼを誘導する作用があることが報告されていることから (Chiu et al, Mol Pharmacol, 2007)、関節軟骨変性におけるさまざまな現象、生物学的変化を統一して説明できる因子である可能性がある。そしてその重要性和メカニズムを解明することで新しい治療の可能性がひろがり、この因子をブロックすることで関節軟骨変性をコントロールできる可能性が

拓ける。すなわち多くの患者が苦しんでいる変形性関節症の進行を予防ないし遅延できる、新しい生物学的治療に結びつけられる可能性がある」と期待される。

3. 研究の方法

(1) 8週齢の C57BL/6 マウスの左膝の内側副靭帯、内側半月板を顕微鏡下で切除した。右膝は皮膚のみ切開を行う sham operation control とした。これを術後 2、4、8、12 週後に屠殺し、X線撮影を行って関節裂隙の狭小化、骨棘形成などの変形性関節症所見を確認した。また組織をパラフィン包埋し、HE染色および Safranin O 染色を用いた組織学的評価を行って、関節軟骨変性を確認した。また得られた組織を用いて X 型コラーゲン、MMP-13、SDF-1、CXCR4 などの抗体を用いた蛋白発現の免疫組織学的評価を行った。さらに関節軟骨を切除して組織片を液体窒素で凍結し、homogenizer で粉々にして RNA を抽出した。この RNA を用いて RT-PCR を行い、X 型コラーゲン、MMP-13、SDF-1、CXCR4 などの遺伝子発現評価を行った。

(2) 出生直後の C57BL/6 マウスの肋軟骨から、enzyme digestion ののちに軟骨細胞を採取し、単層培養し、60~80%コンフルエントの細胞を一度だけ継代し、ふたたび培養皿にまいた。これに SDF-1 のリコンビナントタンパクないし TF14016 を加え、その遺伝子発現の変化を調べた。

(3) mouse chondroprogenitor cell line である ATDC5 細胞を培養して分化を誘導し、これに SDF-1 のリコンビナントタンパクないし TF14016 を加え、その遺伝子発現の変化ないし分化に対する影響を alcian blue 染色で調べた。

(4) 妊娠 15.5 日目の ICR マウスから胎仔を採取し、この胎仔の中足骨を採取し、これから酵素処理で軟骨細胞を単離した。この軟骨細胞に、マウス由来の X 型コラーゲンの reporter construct を導入した。導入したことは、BMP-2 添加によるコントロール実験で確認したこれに、recombinant SDF-1 蛋白を加えて、X 型コラーゲンの遺伝子発現に、SDF-1 シグナルがどのような影響を及ぼすかを調査した。マウス由来 X 型コラーゲンの reporter construct は、鹿児島大学より提供を受けた。

(5) 連携研究者の長澤から供与された SDF-1 および CXCR4 の heterogenous gene deletion マウスにおいて、同様に変形性関節症を作成し、X線、組織学的に変形性関節症の進行が抑制されるかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) 8週齢の C57BL/6 マウスの左膝の内側副靭帯、内側半月板を顕微鏡下で切除した。右膝は皮膚のみ切開を行う sham operation control とした。これを手術 2、4、8、12 週後に屠殺し、X線撮影を行ったところ、臨床上見られる変形性関節症と同様の骨棘形成、関節裂隙狭小化、軟骨下骨硬化などを認めた。

(2) 手術 2、4、8、12 週後の膝関節を採取し、これをパラフィン包埋し、HE染色および Safranin O 染色を用いた組織学的評価を行ったところ、HE染色で経時的な軟骨の菲薄化、消失、軟骨下骨の硬化と破壊、滑膜の増殖など関節の変形性関節症変化を認めた。また Safranin O 染色では、染色性の低下を経時的に認め、このモデルで変形性関節症を経時的に再現できていると考えられた。

(3) この関節から軟骨のみを採取し、液体窒素で凍結して homogenizer で粉々にした組織から mRNA を抽出して PCR を行ったところ、II型コラーゲン、X型コラーゲン、SDF-1、CXCR4 の遺伝子発現を経時的に認めた。II型コラーゲンが全体的にやや減少傾向を見せたのに対し、X型コラーゲンは術後12週で増加していた。SDF-1は、手術時より徐々に発現の減少傾向を認めるが12週で増加していた。それに対しCXCR4は、手術時より2週で遺伝子発現の上昇を認め、経時的にやや減少する傾向を認めたが、いずれの時期においても sham operation に比べて増加していた。以上のことから、① 内側副靭帯および内側半月板を切除することで、臨床上みられる変形性関節症を模した変形性関節症モデルをマウスで作成できた。② 変形性関節症モデルでは、II型コラーゲンの経時的な遺伝子発現の減少と、X型コラーゲンの上昇を認めた。③ SDF-1 の遺伝子発現は、後期で増加するのに対し、CXCR4は初期で上昇し、徐々に低下する傾向があることがわかった。

(4) 出生直後の C57BL/6 マウスの肋軟骨から、enzyme digestion ののちに軟骨細胞を採取し、単層培養し、60~80%コンフルエントの細胞を一度だけ継代し、再び培養皿にまいた。これに SDF-1 のリコンビナントタンパクないし TF14016 を加え、その遺伝子発現の変化を調べたところ、SDF-1 は type II および type X collagen の発現を上昇させ、また TF14016 はそれらを抑制することがわかった。しかし SOX9 の発現に変化は認められなかった。

(5) mouse chondroprogenitor cell line である ATDC5 細胞を培養して分化を誘導し、これ

にSDF-1のリコンビナントタンパクないしTF14016を加え、その遺伝子発現の変化ないし分化に対する影響をalcian blue染色で調べた。14日間の培養において、controlの細胞はtype IIおよびtype X collagenの発現上昇を認めた。SDF-1を継続して加えた群においても、同様の発現上昇を認め、controlとの間に差異は認められなかった。以上のことから、軟骨細胞において、SDF-1はtype X collagenの発現を上昇させ、軟骨細胞の肥大化に寄与していることが推察された。関節軟骨においては、これは関節軟骨を変性させるシグナルとして働いていることが示唆される。

(6) 妊娠 15.5 日めの ICR マウスから胎仔を採取し、この胎仔の中足骨を採取し、これから酵素処理で軟骨細胞を単離した。この軟骨細胞に、マウス由来の X 型コラーゲンの reporter construct を導入した。これに、recombinant SDF-1 蛋白を加えて、X 型コラーゲンの遺伝子発現に、SDF-1 シグナルがどのような影響を及ぼすかを調査した。マウス由来 X 型コラーゲンの reporter construct は、鹿児島大学より提供を受けた。その結果、SDF-1 は X 型コラーゲンの発現には影響を及ぼさないことが判明した。しかし、wild type と SDF-1 ノックアウトマウスから得られた中足骨では、X 型コラーゲンの発現が wild type のほうが強いことから、SDF-1 は、X 型コラーゲンの発現を直接制御するのではなく、軟骨細胞分化を調整することで X 型コラーゲンの発現に影響している可能性が考えられた。

(7) in vivo における関節軟骨での SDF-1 の働きをみるため、8 週齢の C57BL/6 マウスの一方の膝の内側側副靭帯、内側半月板を顕微鏡下で切除して変形性関節症変化を誘導した。これを wild type と SDF-1 および CXCR4 のヘテロノックアウトマウスで調べたところ、X 線における変形性関節症変化、組織所見における関節軟骨変性に有意な差は見られなかった。以上のことから、SDF-1 は軟骨細胞の分化を制御するが、関節軟骨の変性には直接には関わっていない可能性が示唆された。

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 1 件)

- (1) Koichi Murata, Toshiyuki Kitaori, Shinya Oishi, Naoki Watanabe, Hiroyuki Yoshitomi, Shimei Tanida, Masahiro Ishikawa, Takashi Kasahara, Hideyuki Shibuya, Nobutaka Fujii,

Takashi Nagasawa, Takashi Nakamura, Hiromu Ito: Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. PLoS ONE 2012;7(5):e37163. 査読有
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0037163>

[学会発表] (計 1 件)

- (1) 村田浩一、伊藤宣、中村孝志 他. SDF-1 はアクチン重合を制御して軟骨の肥大化を促進する. 第 24 回日本軟骨代謝学会学術集会 2011 年 3 月 5 日 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 宣 (ITO HIROMU)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70397537

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

田代 啓 (TASHIRO KEI)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：10263097
長澤 丘司 (NAGASAWA TAKASHI)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：80281690
中村 孝志 (NAKAMURA TAKASHI)
独立行政法人国立病院機構(京都医療センター臨床研究センター)・臨床研究企画運営部・研究員
研究者番号：10201675