

## 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 1 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591955

研究課題名（和文） 指節間関節形成を支配する Gdf5 による軟骨原基の成長分化機構

研究課題名（英文） Studies about the regulation of cartilage growth and differentiation by Gdf5, main regulator of joint formation in digits.

研究代表者

伊藤 俊治 (ITO SHUNJI)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50275351

研究成果の概要（和文）： 昨年度の研究によって、指節間関節の形成においては Gdf5 の下流でいくつかのマーカー蛋白質が Trps1 を介して発現調節されていることが明らかとなった。現在その中から、Prg4/Lubricin に注目して解析を行っている。Prg4/Lubricin は滑膜液の主要成分の一つであることが知られていたが、四肢の発生過程では軟骨原基の末端部分を覆う superficial layer で発現していることが最近明らかになった。そこで Trps1 KO マウスの四肢での Prg4/Lubricin の発現を検索したところ、発現領域の乱れや発現量の減少が確認された。Prg4/Lubricin の発現が Gdf5/Trps1 によって調節されていることは、培養軟骨細胞を用いた実験によっても確かめられた。また指節間関節が形成されない Dominant Negative Gdf5 発現マウスでは、指節間関節ができるべき領域で Trps1 の発現が顕著に低下しており、加えて Prg4/Lubricin の発現は全く認められなかった。これらの地検より、現在「軟骨原基中の予定関節領域に Gdf5/Trps1 の作用により Prg4/Lubricin が誘導され、それによって superficial layer が形成されることにより、関節空隙が生じる」という作業仮説を立てて現在組織学的な解析を行っている。また Prg4/Lubricin についてさらに検討したところ、myxoid liposarcoma において発現が亢進しており、Transform 活性があることを確認している。これより予想される類軟骨細胞の増殖への影響についても、脂肪組織と同時に検討した。また、研究計画にある組織培養についても予備的検討を行った。

研究成果の概要（英文）： Tricho-rhino-phalangeal syndrome (TRPS) is an autosomal dominant skeletal disorder caused by mutations of the TRPS1 gene. Although TRPS is characterized by deformed epiphysis of the digits, the pathological mechanism remain unknown. Our previous study showed that the Trps1 protein synthesis was regulated by Gdf5, an early marker of joint formation. In this study, we hypothesized that Trps1 has some roles in the Gdf5 signaling pathway that formed joints of the digits and examined the joint formation of the digits in the Trps1-deficient (KO) mice. We found that the joint formation was incomplete due to lack of the superficial layer of the articular cartilage in KO mice. To address which proteins are involved in the incompletely formed joints downstream of Gdf5/Trps1, we examined the expression of several proteins related to joint formation by RT-PCR. We found that Prg4, a major component of the synovial fluid, was reduced in KO mice. Prg4 was expressed in the superficial layer of the developing digits of wild type mice, whereas it was discontinuously expressed in KO mice. Using ATDC5 cells, a chondrogenic cell line, we revealed that Gdf5 induced Prg4 expression in ATDC5 cells and that Trps1 promoted the Prg4 induction by Gdf5. These data suggest that the Gdf5/Trps1 pathway may be involved in joint formation of the digits by inducing Prg4 expression in the superficial layer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2860000	660000	3520000
2010年度	700000	210000	910000
2011年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
総計	4060000	1020000	5080000

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：関節病学・アポトーシス

1. 研究開始当初の背景：四肢の滑膜関節の多くは軟骨原基と軟骨原基の間に形成されるので、関節形成と軟骨原基形成の間には密接な関係があると思われ、実際に多くの分子が両方で働いている。例えば関節形成には軟骨と同様に TGF- $\beta$  スーパーファミリーの役割が重要で、この分子群に属する GDF5 が指節間関節形成領域に発現することが知られているし、GDF5 を含む BMP のアンタゴニストである Noggin の欠損マウスでは指節骨の関節が形成されない (Science, 280, 1455-1457, 1998)。最近、II 型 TGF- $\beta$  受容体を軟骨特異的に欠損させると指節間関節形成が大きく阻害されること (J.Cell.Biol., 177,1105-1117,2007)、Gdf5 mutant mouse では指節骨同士が融合し、また若年性に変形性関節症を発症すること (Hum.Mol.Genet., 16, 2366-2375, 2007)などもわかってきた。しかしながら、これらの分子がどのように作用によって関節を形成するか、どの分子の働きが最も重要なのかについては判っていない。

申請者は軟骨分化の分子メカニズム、特に軟骨形成異常の原因となる遺伝子の機能に興味を持ち培養細胞を用いて研究を行ってきた。これまでにヒトの毛髪・鼻・指節異形成症の原因遺伝子である Trps1 について研究を行い、Trps1 がマウスでも軟骨の形成に関わること、Trps1 が軟骨細胞の分化・アポトーシスを促進すること、その過程には Pthrp が関与することなどを明らかにしてきた。我々の研究の過程で、Trps1 を調節する因子として Gdf5 が同定され、両者が指節間関節形成領域で共存していることが明らかとなった。前述のように GDF5 には指節間関節形成で重要な役割があり、また軟骨原基の成熟と関節の形成の間には密接な関係があると考えられていることから、TRPS1 を糸口に GDF5 の作用機序、さらには関節形成のメカニズムを解明できるのではないかと考え、現

在研究を行っている。

2008 年より理化学研究所が近年作成した Gdf5 mutant mouse を導入し、指節間関節形成を中心に解析を行っている。その結果、Gdf5 mutant mouse では関節が形成されず、指節骨同士が融合するという興味深い表現型が得られた。

2. 研究の目的：滑膜関節の形成については、間充細胞の凝集、周軟骨細胞の関与、関節形成領域でのアポトーシス、間質成分の増生など様々な現象が注目されているが、我々は今回軟骨細胞のアポトーシスに着目した。我々の研究により Gdf5 の下流で働くことが判った Trps1 は培養軟骨細胞ではアポトーシスを促進することが明らかとなっている。そこで、「指節間関節形成でも軟骨原基のアポトーシスが重要な役割を果たしており、GDF5 はその調節を介して、関節の形成を制御している」との作業仮説を立てた。

具体的には遺伝子改変マウスや指節骨器官培養などを用いて、Gdf5 シグナルの変化によって

- (i) 関節形成領域のアポトーシスがどのように変化するか
  - (ii) 関節形成領域で Trps1 などアポトーシス関連分子群がどのように変化するか
  - (iii) アポトーシス以外にどのような変化があるか
- 等の点について、組織学的・分子生物学的に検討した。

3. 研究の方法：1.Prg4/Lubricin の発現調節の解析 Prg4/Lubricin は指節骨の骨端部に発現していることが知られるが、この発現は Gdf5 の刺激により Trps1 によって調節されていること、また従来知られていた Gdf5

の下流因子 **Barx2** とは独立に調節されていることが明らかとなった。一方でこれらとは別の関節マーカーである **CD44** や **Noggin** などは **Trps1** の調節を受けておらず、関節形成関連分子の調節は複数のシグナリング経路が関与していることが示された。これらの変化は軟骨様細胞株 **ATDC5** を用いた実験でも確かめられ、**ATDC5** 細胞は関節・骨端部形成のモデルとしても用いることができることが明らかとなった。また、**Prg4/Lubricin** には少なくとも4つの **variant** が存在し、関節周辺でもそのうち3つが発現していることが判ったが、現在それらの **variant** 間の機能の差異・役割分担について、恒常的発現系の構築によって検討している。

2. **Trps1** の関節における機能の検討 **Prg4/Lubricin** 発現調節以外の **Trps1** の機能についても、標的遺伝子の検索を引き続き行った。また **Trps1 KO** マウスを用いた大阪大学・歯学部の阿部真土氏らとの共同研究により顎関節の発生においても **Trps1** が重要な機能を果たしていることが明らかとなった。

3. その他 マウス指節骨関節の組織培養実験を予備的に行い、最適な培養条件を決定すべく現在検討中である。

4. 研究成果： 昨年度の研究によって、指節間関節の形成においては **Gdf5** の下流でいくつかのマーカー蛋白質が **Trps1** を介して発現調節されていることが明らかとなった。現在その中から、**Prg4/Lubricin** に注目して解析を行っている。**Prg4/Lubricin** は滑膜液の主要成分の一つであることが知られていたが、四肢の発生過程では軟骨原基の末端部分を覆う **superficial layer** で発現していることが最近明らかになった。そこで **Trps1 KO** マウスの四肢での **Prg4/Lubricin** の発現を検索したところ、発現領域の乱れや発現量の減少が確認された。**Prg4/Lubricin** の発現が **Gdf5/Trps1** によって調節されていることは、培養軟骨細胞を用いた実験によっても確かめられた。また指節間関節が形成されない **Dominant Negative Gdf5** 発現マウスでは、指節間関節ができるべき領域で **Trps1** の発現が顕著に低下しており、加えて **Prg4/Lubricin** の発現は全く認められなかった。これらの地検より、現在「軟骨原基中の予定関節領域に **Gdf5/Trps1** の作用により **Prg4/Lubricin** が誘導され、それによって **superficial layer** が形成されることにより、関節空隙が生じる」という作業仮説を立てて現在組織学的な解析を行っている。また **Prg4/Lubricin** についてさらに検討したところ、**myxoid liposarcoma** において発現が亢進しており、**Transform** 活性があることを確認している。これより予想される類軟骨細胞の増殖への影響についても、脂肪組織と同時に検討中である。

また、研究計画にある組織培養についても予備的検討を行った。

## 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9件)

- ① Oikawa K, Tanaka M, Itoh S, Takanashi M, Ozaki T, Muragaki Y, Kuroda M., A novel oncogenic pathway by TLS-CHOP involving repression of MDA-7/IL-24 expression. *Br J Cancer*, 査読有, 106(12), 1976-9, 2012
- ② T Gui, G Zhou, Y Sun, A Shimokado, S Itoh, K Oikawa, and Y Muragaki, MicroRNAs that target Ca<sup>2+</sup> transporters are involved in vascular smooth muscle cell calcification. *Lab Invest*, 査読有, 92(9), 1250-1259, 2012
- ③ Y Hirai, Y Muragaki, S Itoh, K Oikawa, M Juri, T Kondo, and Y Okamura, Fibulin-5 Protein Is Reduced in the Lung of Patients with Spontaneous Pneumothorax Who Are Under 25 Years Old. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 査読有, 18(3), 200-205, 2012
- ④ I Michikami, T Fukushi, S Honma, S Yoshioka, S Itoh, Y Muragaki, K Kurisu, T Ooshima, S Wakisaka, and M Abe, **Trps1** is necessary for normal temporomandibular joint development. *Cell Tissue Res*, 査読有, 348, 131-40, 2012
- ⑤ Kanno S, Gui T, Itoh S, Gai Z, Sun Y, Oikawa K, Yoshida M and Muragaki Y, Aberrant expression of the P2 promotor-specific transcript **Runx1** in epiphyseal cartilage of **Trps1**-null mice. *Exp Mol Pathol* 査読有, 90, 143-148, 2011
- ⑥ Kawakatsu M, Kanno S, Gui T, Gai Z, Itoh S, Tanishima H, Oikawa K, and Muragaki Y, Loss of **Smad3** gives rise to poor soft callus formation and accelerates early fracture healing. *Exp Mol Pathol*, 査読有, 90, 107-115, 2011
- ⑦ Nishioka R, Itoh S, Gui T, Gai Z, Oikawa K, Kawai M, Tani M, Yamaue H and Muragaki Y, **SNAIL** induces epithelial-to-mesenchymal transition in a human pancreatic cancer cell line (BxPC3) and promotes distant metastasis and invasiveness in vivo. *Exp Mol Pathol* 査読有, 89, 149-157, 2010
- ⑧ Gai Z, Zhou G, Gui T, Itoh S, Oikawa K, Uetani K and Muragaki Y, **Trps1**

Haploinsufficiency Promotes Renal Fibrosis by Increasing Arkadia Expression. J Am Soc Nephrol. 査読有, 21, 1468-1476, 2010

- ⑨ Gai Z, Zhou G, Itoh S, Morimoto Y, Tanishima H, Hatamura I, Uetani K, Ito M and Muragaki Y, Trps1 functions downstream of Bmp7 in Kidney development. J Am Soc Nephrol. 査読有, 20, 2403-2411, 2009

[学会発表] (計 9 件)

- ① 伊藤俊治、孫玉静、桂婷、下角あい子、川勝基久、尾崎敬、及川恒輔、村垣泰光、Gdf5/Trps1 は Prg4 発現を制御し指節骨骨端部形成を調節する。第 25 回軟骨代謝学会, 2012
- ② 伊藤俊治、孫玉静、桂婷、下角あい子、川勝基久、及川恒輔、尾崎敬、村垣泰光、Gdf5/Trps1 signaling regulates Prg4 expression in the superficial cells of the articular cartilage. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011
- ③ 伊藤俊治、谷島裕之、川勝基久、孫玉静、桂婷、下角あい子、平井慶充、及川恒輔、村垣泰光、指節間関節形成における軟骨原基表層細胞の役割。第 79 回和歌山医学会総会, 2011
- ④ Abe M, Itoh S, Muragaki Y, Michikami I, Trps1 contributes to normal temporomandibular joint formation. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 2010
- ⑤ 伊藤俊治、谷島裕之、蓋志博、桂婷、神埜聖治、川勝基久、及川恒輔、村垣泰光、Gdf5/Trps1 は関節形成軟骨細胞の分化を調節する。第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 2010
- ⑥ 伊藤俊治、蓋志博、桂婷、及川恒輔、村垣泰光、Prg4 は Gdf5/Trps1 の支配下に指節間関節形成に関与する。第 78 回和歌山医学会総会, 2010
- ⑦ 蓋志博、桂婷、伊藤俊治、及川恒輔、村垣泰光、腎発生期における尿管芽の枝分かかれと集合管形成の調節分子機構。第 78 回和歌山医学会総会, 2010
- ⑧ 蓋志博、伊藤俊治、谷島裕之、伊藤正孝、上谷光作、村垣泰光、Trps1 is required for the mesenchymal-epithelial transition and ureteral bud branching. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009
- ⑨ 伊藤俊治、毛利泰輔、山下友佑、蓋志博、神埜聖治、及川恒輔、上谷光作、村垣泰光、Functions of Gdf5 and Trps1 in phalangeal joint formation. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 俊治 (ITOH SHUNJI)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50275351

### (2) 研究分担者

村垣 泰光 (MURAGAKI YASUTERU)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40190904

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

