

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16686

研究課題名(和文)変形性股関節症におけるCCN3を介した新たな軟骨細胞老化制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a new chondrocyte aging control mechanism mediated by CCN3 in osteoarthritis of the hip

研究代表者

山田 和希 (Yamada, Kazuki)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：50756088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々はCCN3の発現上昇が変形性股関節症(OA)を誘発するという仮説のもと、発症要因としてあげられる加齢、荷重およびCCN3の発現と軟骨組織の変性との関連を、大腿骨頭軟骨組織を用いて解析することを目的とした。ヒト股関節軟骨組織では荷重、非荷重に関わらずOA群でOA関連因子やCCN3 mRNAの有意な上昇を認め、組織染色でも同様であった。また、CCN3 mRNAと近傍組織のMankin scoreに正の相関が観察された。CCN3 Tgの大腿骨頭では早期より関節変性を認め、大腿骨頭初代培養軟骨細胞で、CCN3とOA関連マーカーの有意な発現上昇が遺伝子発現および免疫染色で認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、変形性股関節症の有無、さらには重症度とCCN3の発現には相関があるが、年齢やメカニカルストレスとにはないことが示唆され、股関節の軟骨細胞におけるCCN3を介した関節変性に関する分子メカニズムの一部が解明された。本研究結果により、変形性股関節症の発生と進行防止に対する新しい治療法の確立につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Based on the hypothesis that increased expression of CCN3 induces osteoarthritis of the hip (OA), we aimed to analyze the relationship between aging, weight bearing, and CCN3 expression, which are considered to be factors in the pathogenesis of OA, and cartilage degeneration using femoral head cartilage tissue. In human hip joint cartilage tissue, regardless of whether weight bearing was performed or not, a significant increase in OA-related factors and CCN3 mRNA was observed in the OA group. The same result was observed in histological stain. A positive correlation was also observed between CCN3 mRNA and the Mankin score of the adjacent tissue. Joint degeneration was observed early in the femoral head of CCN3 Tg mice, and gene expression and immunohistochemistry revealed significant increases in the expression of CCN3 and OA-related markers in primary cultured chondrocytes of the femoral head.

研究分野：股関節外科

キーワード：hip osteoarthritis cartilage TNF IL-6 p16 ADAMTA4/5 CCN3 CCN ファミリー遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性股関節症 (osteoarthritis of the hip; OA of the hip)の患者では痛みや歩行障害により日常生活動作が著しく低下する。変形性股関節症の発生には股関節の形状など様々な因子が関与しているが、老化による影響については十分に解明されていない。我々は OA 関連遺伝子の探索を行い、軟骨組織の発生・分化・再生過程において多様な生理機能を持つ Cellular Communication Network Factor (CCN)ファミリー遺伝子のうち、CCN3 がヒトから得られた関節軟骨細胞で加齢とともに有意に増加していることを認めた。また、酸化ストレス刺激により老化を誘導した軟骨細胞で CCN3 発現の上昇を認めた。さらに、CCN3 過剰発現マウスを作成したところ、生後早い時期より関節軟骨の破壊や軟骨変性などの OA 様所見を認めた。そこで、これらの結果をもとに股関節において CCN3 が軟骨細胞の老化による OA を促進するか検討することとした。また、股関節の軟骨細胞において、CCN3 を介した加齢性変性に対する分子メカニズムを解明することとした。CCN3 を阻害し細胞老化を抑制することで正常な軟骨代謝機構が維持できることを証明することは、変形性股関節症の発生と進行防止に対する新しい治療法の確立につながる非常に重要な研究と考えている。

2. 研究の目的

変形性股関節症における軟骨組織の加齢における CCN3 の役割を解明すること

3. 研究の方法

In vitro での検証

股関節軟骨細胞老化における CCN3 の関与の検証

高齢ヒトの変形性股関節症の軟骨細胞と、大腿骨頸部骨折の軟骨細胞を荷重部と非荷重部に分け、それぞれより CCN3 遺伝子・タンパク質発現が上がるか確認する。

老化および CCN3 発現が直接影響を及ぼす分子あるいは経路の特定

の細胞から抽出した RNA を用いて RNA-Seq 法を行い、発現変動のあった遺伝子の網羅的解析を行う。

In vivo での検証

軟骨細胞特異的 CCN3 過剰発現マウスの股関節軟骨変性についての組織学的解析

CCN3 過剰発現による軟骨組織変性の評価をするため、老化指標や基質産生・分解項目について免疫組織染色で解析を行う。

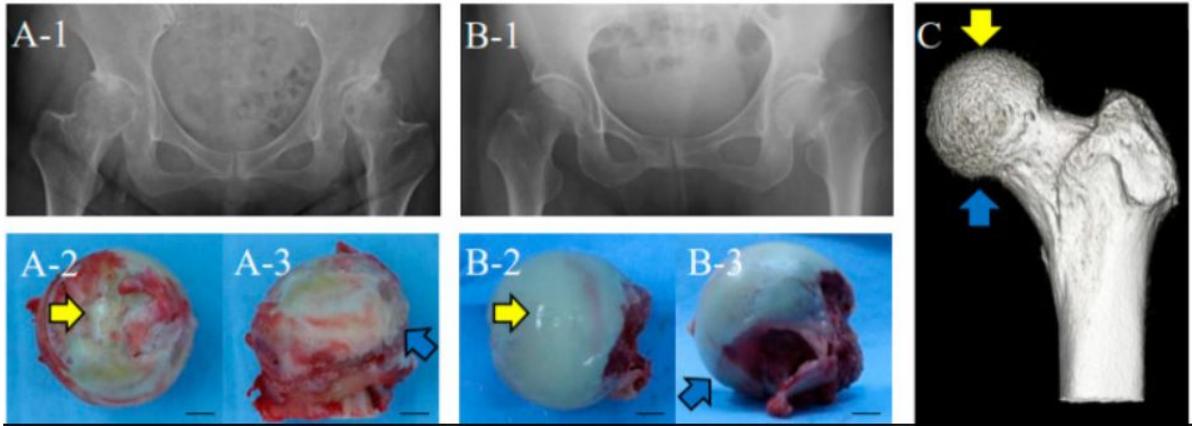
CCN3 過剰発現マウスの股関節軟骨細胞を単離、培養し、細胞老化制御が行われているか分子レベルで確認する。

以上の結果を踏まえ、変形性股関節症の軟骨組織の加齢時に起こる生物学的変化の中で、CCN3 がどのような役割を果たしているかを明確にする。

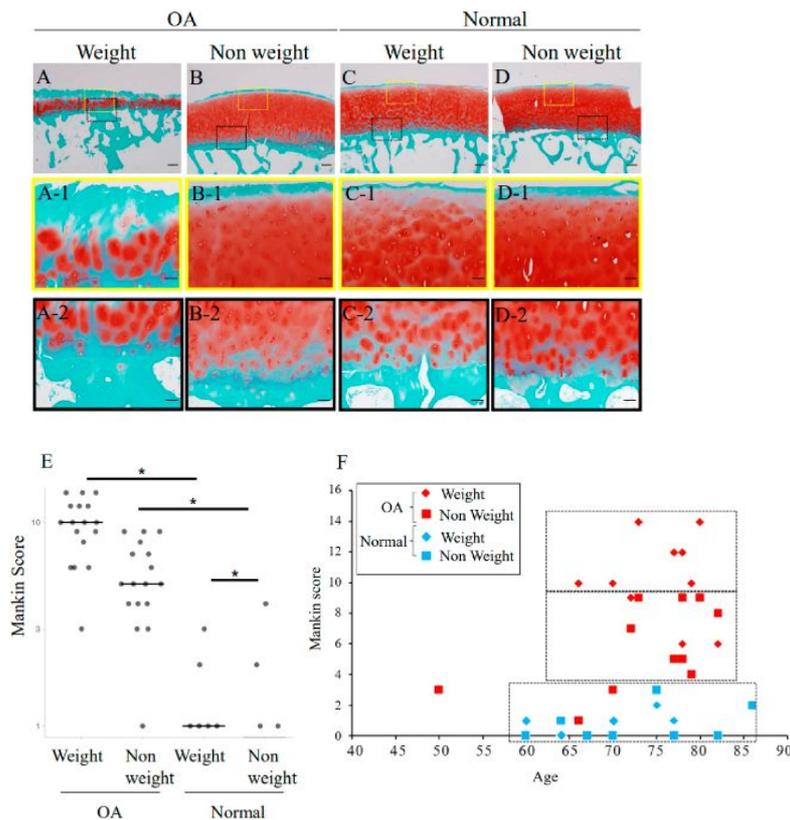
4. 研究成果

これまで我々は、膝関節軟骨における cellular communication network factor 3 (CCN3) の加齢に伴った発現上昇、CCN3 の過剰発現が senescence-associated secretory phenotype (SASP) を誘導することを示した。今回我々は CCN3 の発現上昇が変形性股関節症(OA)を誘発するという仮説のもと、発症要因としてあげられる加齢、荷重および CCN3 の発現と軟骨組織の変性との関連を、大腿骨頭軟骨組織を用いて解析することを目的とした。OA 群と正常群の大腿骨頭から荷重部と非荷重部を分取し、遺伝子発現を組織より直接、また初代培養軟骨細胞より調べた。軟骨

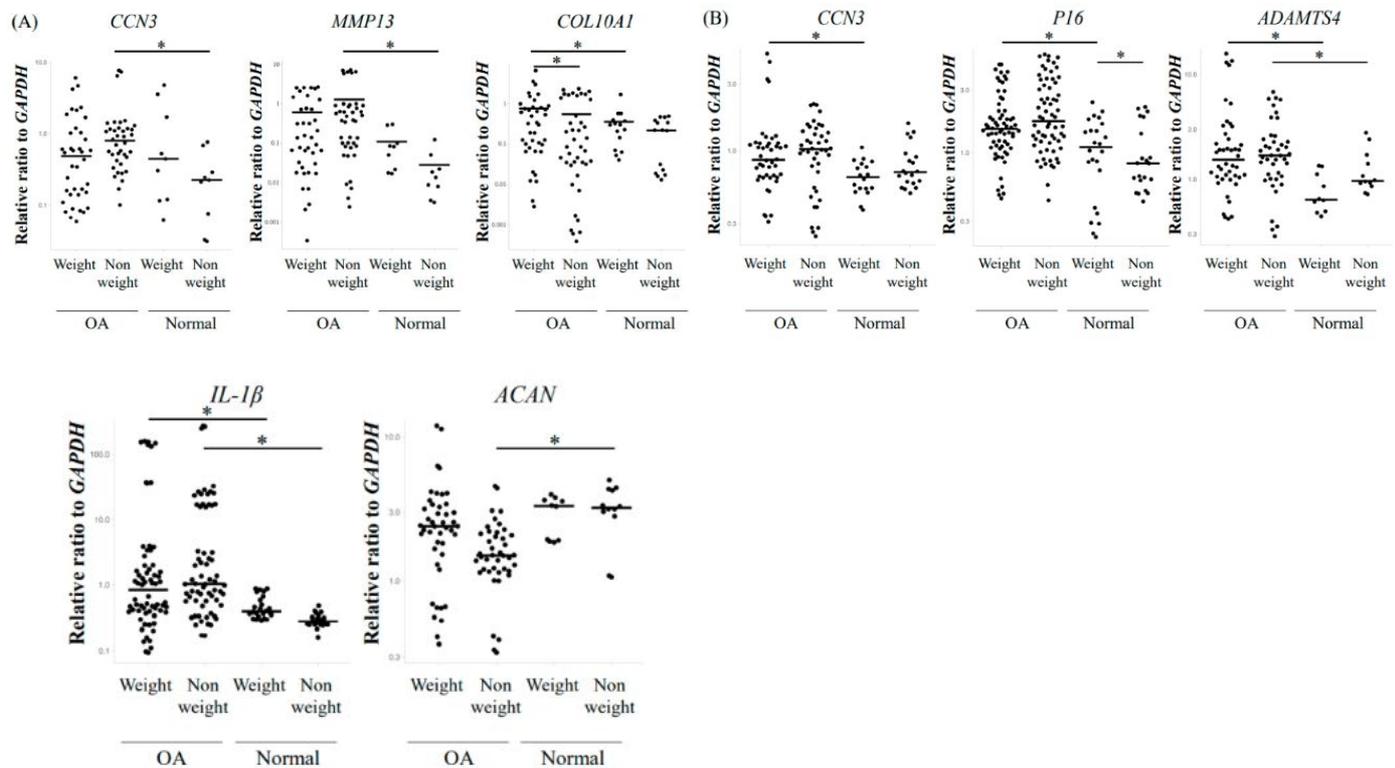
組織の変性は Safranin O -Mankin score で評価、年齢と Mankin score の相関がないことを確認した。さらに CCN3 と OA マーカーの免疫染色を行なった。軟骨組織に CCN3 を過剰発現させたトランスジェニックマウス(Tg)を作製し、画像解析、培養軟骨細胞の RNA 解析、組織の免疫染色を行なった。その結果、ヒト股関節軟骨組織では荷重、非荷重に関わらず OA 群で OA 関連因子や CCN3 mRNA の有意な上昇を認め、組織染色でも同様であった。また、CCN3 mRNA と近傍組織の Mankin score に正の相関が観察された。CCN3 Tg の大腿骨頭および肩関節では早期より関節変性を認め、大腿骨頭初代培養軟骨細胞で、Ccn3 と OA 関連マーカーの有意な発現上昇を遺伝子発現および免疫染色で観察した。本研究より、変形性股関節症の有無、さらには重症度と CCN3 の発現には相関があるが、年齢やメカニカルストレスとにはないことが示唆される。



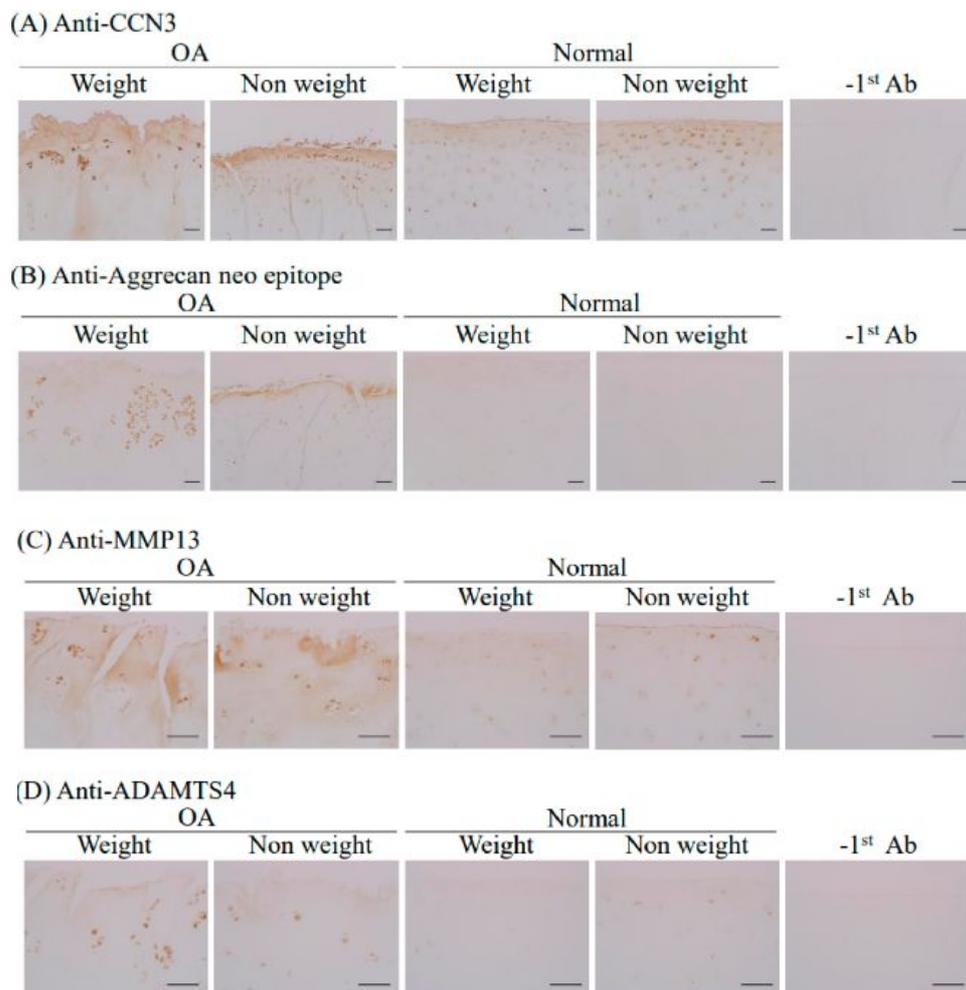
A-1, 2, 3:変形性股関節症(OA 軟骨)
 B-1, 2, 3:大腿骨頭部骨折(正常軟骨)
 C:軟骨採取部 黄色矢印:荷重部 青色矢印:非荷重部



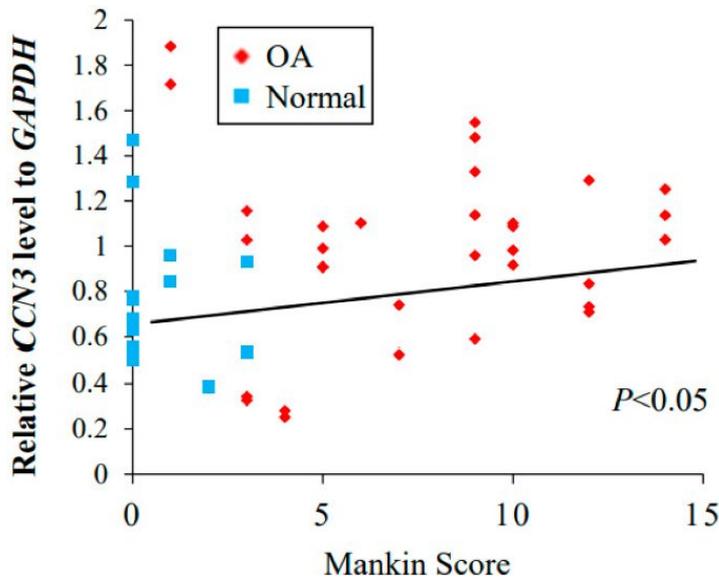
A ~ D:OA 軟骨と正常軟骨の荷重部と非荷重部の Safranin O 染色
 E: OA 軟骨と正常軟骨の荷重部と非荷重部を Mankin score で比較検討
 F:Mankin score と年齢を比較



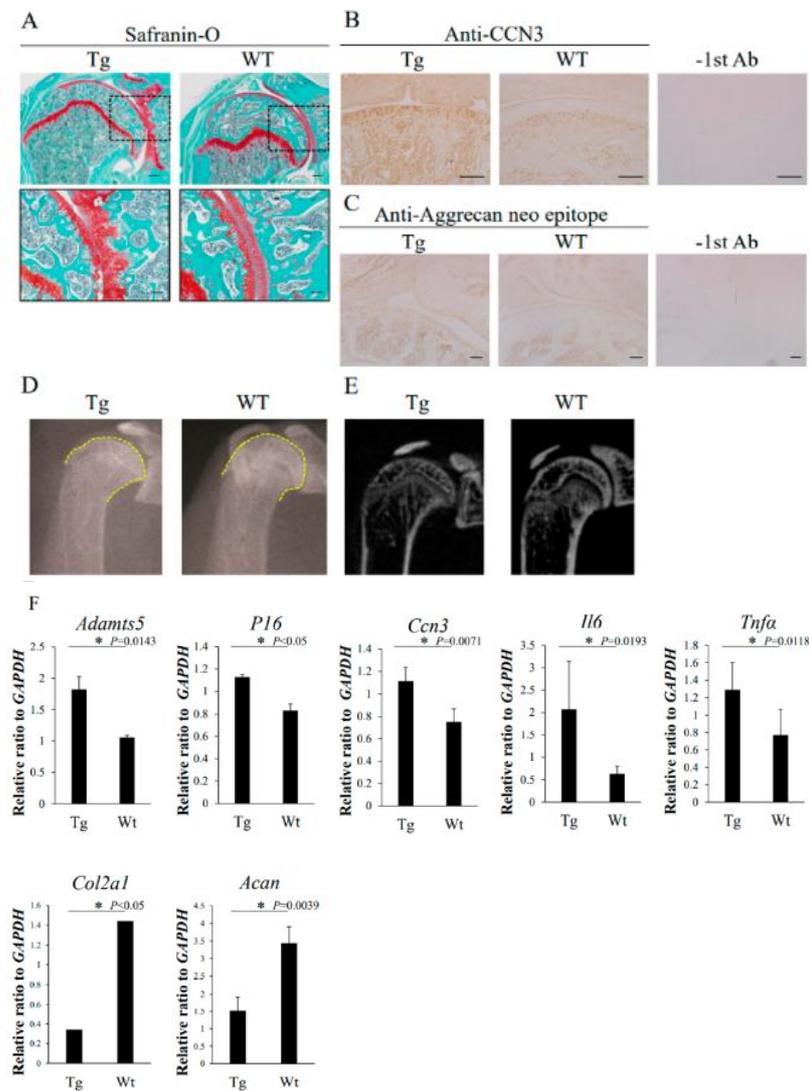
OA 軟骨と正常軟骨の荷重部と非荷重部の細胞を単離培養し抽出した RNA より発現マーカーを比較検討した



OA 軟骨と正常軟骨の荷重部と非荷重部の細胞を免疫染色し蛋白レベルでの発現を比較検討した



OA 軟骨と正常軟骨の CCN3 発現レベルと Mankin score の相関を調べた



CCN3 過剰発現させたトランスジェニックマウスとワイルドタイプマウスを比較検討している

A: Safranin O 染色

B, C: 採取した組織の蛋白レベルでの発現を比較

D, E: マウスの関節を画像検査で評価

F: マウスの軟骨より採取した組織を単離培養し抽出した RNA を各種マーカーで比較検討した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirose Kazuki, Kuwahara Miho, Nakata Eiji, Tetsunaga Tomonori, Yamada Kazuki, Saiga Kenta, Takigawa Masaharu, Ozaki Toshifumi, Kubota Satoshi, Hattori Takako	4. 巻 23
2. 論文標題 Elevated Expression of CCN3 in Articular Cartilage Induces Osteoarthritis in Hip Joints Irrespective of Age and Weight Bearing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15311 ~ 15311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms232315311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣瀬 一樹, 服部 高子, 桑原 実穂, 滝川 正春, 中田 英二, 鉄永 智紀, 山田 和希, 佐藤 嘉洋, 小浦 卓, 尾崎 敏文, 久保田 聡
2. 発表標題 変形性股関節症とCCN3発現の相関
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬 一樹, 服部 高子, 桑原 実穂, 滝川 正春, 中田 英二, 鉄永 智紀, 山田 和希, 佐藤 嘉洋, 小浦 卓, 尾崎 敏文, 久保田 聡
2. 発表標題 変形性股関節症とCCN3発現の相関
3. 学会等名 日本骨形態計測学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬 一樹, 服部 高子, 桑原 実穂, 滝川 正春, 中田 英二, 鉄永 智紀, 山田 和希, 佐藤 嘉洋, 小浦 卓, 尾崎 敏文, 久保田 聡
2. 発表標題 変形性股関節症とCCN3発現の相関
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬 一樹, 服部 高子, 中田 英二, 鉄永 智紀, 山田 和希, 佐藤 嘉洋, 桑原 実穂, 尾崎 敏文, 滝川 正春, 久保田 聡
2. 発表標題 変形性肩関節症モデルとしてのCCN3過剰発現マウス
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣瀬 一樹, 中田 英二, 服部 高子, 鉄永 智紀, 山田 和希, 佐藤 嘉洋, 桑原 実穂, 滝川 正春, 久保田 聡, 尾崎 敏文
2. 発表標題 変形性肩関節症とCCN3発現上昇との相関について
3. 学会等名 第36回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	廣瀬 一樹 (Hirose Kazuki)		
研究協力者	服部 高子 (Hattori Takako)		
研究協力者	中田 英二 (Nakada Eiji)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鉄永 智紀 (Tetsunaga Tomonori)		
研究協力者	桑原 実穂 (Kawahara Miho)		
研究協力者	滝川 正春 (Takigawa Masaharu)		
研究協力者	久保田 聡 (Kubota Satoshi)		
研究協力者	尾崎 敏文 (Ozaki Toshifumi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関