

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 6 月 3 日現在

機関番号：37116
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591695
 研究課題名（和文） 変形性関節症の関節変性と骨棘形成機構の解明-時間・組織特異的 K0 マウスによる解析
 研究課題名（英文） Investigation of articular cartilage degeneration and osteophyte formation in osteoarthritis using smoothed conditional knockout mice
 研究代表者
 中村 英一郎（NAKAMURA EIICHIRO）
 産業医科大学・医学部・講師
 研究者番号：10412644

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、変形性関節症にみられる関節変性と骨棘形成のメカニズムを解析することである。内軟骨性骨化に関連する indian hedgehog (Ihh) と Ihh のシグナルを伝達する膜蛋白の smoothed (Smo) の時間特異的、組織特異的なノックアウトマウスを用いて変形性膝関節症モデルを作成し Smo をノックアウトしたところ Wt と比較し骨棘形成の減少がみられた。骨棘形成には hedgehog シグナルが関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Osteophyte formation is a common phenomenon in osteoarthritis. Endochondral ossification is considered an important pathophysiological process for osteophyte formation. We investigated whether the deletion of smoothed (Smo), a key component of the hedgehog pathway in the process of enchondral ossification, inhibits osteophyte formation in mouse osteoarthritis. The attenuation of osteophyte was shown in the mice deleted Smo, indicating that hedgehog signaling has a critical role in the osteoarthritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、変形性関節症、骨棘、ヘッジホッグ、Cre-ER(T)

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症や変形性脊椎症は、多くの高齢者に起こり日常生活動作（ADL）や生活の質（QOL）を低下させる原因の一つと考えられ

ている。関節裂隙の狭小化と骨棘形成は高齢者の退行変性所見として関節の X 線像にてよくみるものである。しかし、その形成メカニズムは基礎的には未だ十分に解明されて

おらず、根本的な治療法は確立されていない。

今まで実験的には、マウスの膝関節の meniscotibial 靭帯を切離して関節不安定性を惹起した DMM モデルや前十字靭帯切離する ACLT モデル、内側半月板と内側側副靭帯を切離する OA medial モデルなど膝関節メカニカルストレス負荷モデルが確立されており、組織学的に関節軟骨の変性と骨棘形成を観察している。2005 年に Glasson らや Stanton らは ADAMTS5 のノックアウトマウスを作成し DMM モデルにおいて軟骨破壊が起こらなかったことを報告しアグリカン分解酵素が軟骨変性に重要であることを示した (Glasson SS et al Nature, 2005, Stanton H, Nature, 2005)。Boos らは変形性関節症の免疫組織学的検討により関節軟骨変性に軟骨細胞の肥大化ならびにタイプ X コラーゲンの発現を示した (Boos N et al, J Orthop Res, 1999)。また、関節軟骨変性に伴う骨棘形成は内軟骨性骨化の様式をたどり形成されることが示された (Ono et al, Yonago Acta Medicine, 2000, Kamekura S et al, Osteoarthritis Cartilage 2005)。

以上より内軟骨性骨化過程において前肥大軟骨細胞層に発現する Indian Hedgehog (Ihh) や Ihh のシグナルを伝達する膜蛋白の *smoothed (Smo)* が、関節軟骨変性や骨棘形成にかかわっていることは十分予測される。しかしながら組織学的な検討ではその遺伝子の発現はわかるものの、機能については理解できない。そこでそれら遺伝子を欠失させることで機能を解析する手法が有効であるが Ihh や Smo の通常のノックアウトマウスは胎生致死もしくは生直後に死亡するため、生後におけるその遺伝子の機能や病的状態での機能について解析することは今までできなかった。しかし、近年、時間特異的、組織特異的に遺伝子欠損を起こすノックアウトマウス (コンディショナルノックアウトマウス: CKO) の技術が開発された。

そこで、この技術を用いて Smo を時間特異的、組織特異的にノックアウトすることで生後の関節変性ならびに骨棘形成のメカニズムを解析することを考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨棘形成時にも発現がみられる Ihh のシグナルを伝達する膜蛋白の *smoothed (Smo)* の時間特異的、組織特異的なノックアウトマウスを作成し、膝関節メカニカルストレス負荷モデルを用いて関節変性や骨棘形成メカニズムを解析し、ならびに Hedgehog と Smo の機能を解析することである。

3. 研究の方法

(1) コンディショナルノックアウトマウス (CKO) の作成

本研究は CreER(T)-loxP システムを用いている。Cre がタモキシフェン投与下に全細胞に作動する RosaCreER(T) マウスと、同投与下に軟骨特異的に発現する *Col2 α 1* プロモーターを用いた Col2CreER(T) マウスを使用し、それぞれ Smo flox/flox (Smo f1/f1) マウスと交配させることにより、RosaCreER(T)-Smo f1/f1 及び Col2CreER(T)-Smo f1/f1 マウスの作成を行った。

また、Cre ER(T)-loxP システムが正常に作動することと RosaCreER(T) および Col2CreER(T) マウスの組織等異性の確認のため、Cre による活性化部位に LacZ が発現する、RosaLacZ マウスを使用して検討した。

最初に胎児での発現を確認するため RosaCreER(T) および Col2CreER(T) マウスに RosaLacZ マウスを交配し、E12.5 でタモキシフェン投与後、48 時間後に胎児を採取し、LacZ 染色を行った。次いで生後での作動確認のためタモキシフェンを生後 3 週目、5 週目、屠殺 3 日前、屠殺前日に腹腔内注射し、屠殺後膝関節部を採取し LacZ 染色を行った。

(2) 変形性膝関節症モデル (OA モデル) の作成

本研究では様々な変形性膝関節症メカニカルストレスモデルのうち前十字靭帯切離モデル (ACLT モデル) と ACLT に加え内側半月板を切除した ACLT+MM 切除モデルを作り、さらに両方のモデル動物を餌と水を高所に置けるタワーケージ内で飼育しストレス無く運動負荷をかける運動負荷モデル (ACLT+負荷モデルと ACLT+MM 切除+負荷モデル) も加え 4 種類のストレスモデルを使用し関節の変性、骨棘の程度を評価した。

手術は生後 8 週目に施行し、吸入麻酔下でマウス膝前十字靭帯や内側半月板を顕微鏡下に切除した。タモキシフェンは図 1 のように生後 3 週目、5 週目、屠殺 3 日前、屠殺前日に腹腔内注射した。そして術後 10 週目に屠殺して組織学的な検討を行った。

↓ : Tamoxifen 投与

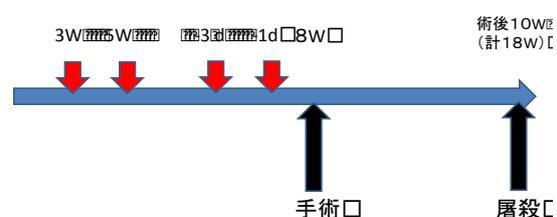


図 1 実験の流れ

(3) X線学的、組織学的評価

マウス屠殺後、膝関節レントゲンを Softex にて撮像した。その後 4% パラホルムアルデヒド(PFA)にて固定し、EDTA にて 3 週間脱灰を行い段階的に脱水後、パラフィン包埋を行った。包埋後、全関節面を矢状面で 70 μ m 間隔、7 μ m の厚さに薄切した。組織学的には HE 染色と Alcian blue-Alizarin red 染色、サフラニン O 染色を行った。

(4) Skeletal 染色

E17.5 の胎仔を採取し、100% エタノールで 3 日間固定後、アセトンにて 3 日間脱脂、Alcian blue-Alizarin red にて 3 日間染色を行った。その後 KOH 溶液 (1% KOH + 20% グリセロール) にて透明化し、グリセロールにて封入した。

4. 研究成果

(1) Cre-loxP システムの作動確認と CKO マウスにおけるタモキシフェンの至適投与時期の確認ならびに表現型。

RosaCreER(T)-RosaLacZ マウスでは胎児の全細胞に、また Col2CreER(T)-RosaLacZ マウスでは軟骨特異的に、タモキシフェン投与にて組織特異的な B-Gal の染色性を確認し、非投与時には染色がないことを確認した。

続いて、手術時 (8 週齢) 時点で効率的なリコンビネーションが起きるようにタモキシフェン投与時期を調節するために、タモキシフェン投与時期を組み合わせて検討した。この結果、RosaCreER(T) は生後 3 週、5 週、術前 3 日前、1 日前のタモキシフェン投与、Col2CreER(T) は生後 2 週、4 週、術前 3 日前、1 日前のタモキシフェン投与により、効率的なリコンビネーションが起こることを LacZ 染色にて確認した。

次いで RosaCreER(T)-Smo fl/fl において、E11.5 でタモキシフェンを投与し、E17.5 で胎児を採取、skeletal 染色をすると、ワイルドタイプと比較して、CKO のもので明らかな四肢、体幹の骨格の短縮を認めた。一方、タモキシフェン投与を生後 3 週以降で行った場合には、ワイルドタイプと CKO には身長、体重、四肢の長さなど成長障害ならびに形態異常の違いは認めなかった。

(2) 変形性膝関節症モデル別の関節軟骨変性と骨棘形成

それぞれの変形性膝関節症モデルにおける関節面の変性と骨棘形成の程度を確認するため、コントロールとして CreER(T) を持た

ない Smo fl/fl (Cre-) マウスを用いて上記プロトコールでタモキシフェン投与を行い、生後 8 週時点で OA モデル手術 (ACLT、ACLT+MM 切除、ACLT+負荷、ACLT+MM+負荷) を行い、術後 10 週目で屠殺し、Alcian blue-Alizarin red 染色ならびにサフラニン O 染色を行った。

ACLT モデルでは、図 2 のように大腿骨、脛骨双方の関節面の不整、軟骨層の毛羽立ちがみられ、また、脛骨後方に骨棘形成が認められた。ACLT + MM 切除モデルでは、さらに関節面の不整が著明となり関節軟骨の欠損、脛骨軟骨下骨の欠損がみられ、加えて脛骨後方に明らかな骨棘形成が認められた (図 3)。

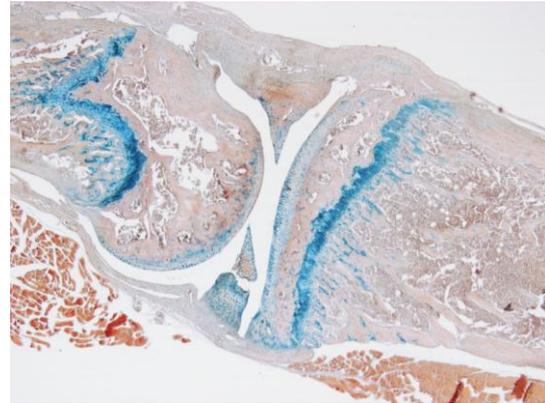


図 2 コントロールマウスの ACLT 術後 10 週目の関節変性と骨棘形成

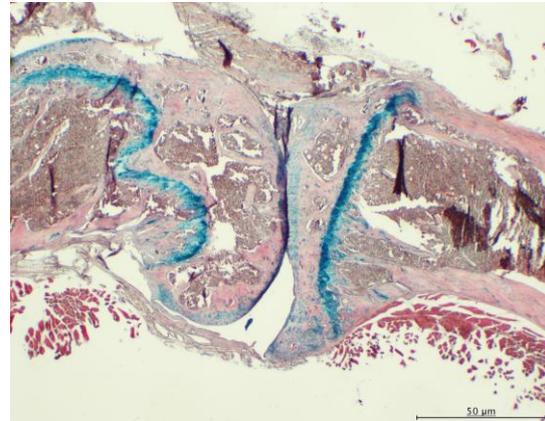


図 3 コントロールマウスの ACLT + MM 切除術後 10 週目の関節変性と骨棘形成

さらに ACLT+負荷モデルでは、関節面の破壊が著明となり、巨大な骨棘が形成されていた (図 4)。このことは関節の不安定性が増すほど、かつ関節への負荷がより大きくなるほどに関節変性は進行し同時に骨棘形成も著明となることが示唆された。

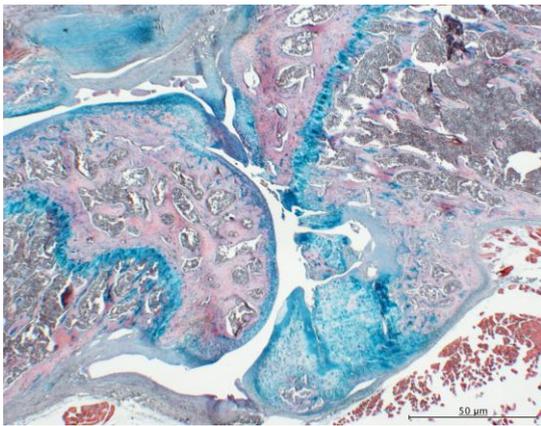


図4 コントロールマウスの ACLT+負荷、術後10週目の関節変性と骨棘形成

(3) Smo CKO における関節軟骨面の変性と骨棘形成

次いで、RosaCreER(T)-Smo f1/f1 マウスでも同様の OA モデルを作成するために、RosaCreER(T)-Smo f1/f1 に対してコントロールとして CreER(T)を持たない同腹の Smo f1/f1 (Cre-) マウスを用いてどちらにも上記プロトコルでタモキシフェン投与を行いながら一緒に飼育し、生後8週時点でOAモデル手術(ACLT、ACLT+MM 切除、ACLT+負荷、ACLT+MM+負荷)を行い、術後10週目で屠殺し、Alcian blue-Alizarin red 染色ならびにサフラニンO染色を行った。

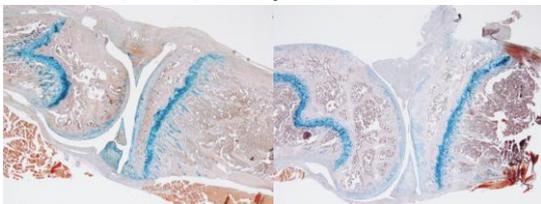


図5 ACLT 術後10週のコントロールマウス (Cre- : 左)とノックアウトマウス (Cre+ : 右)の関節変性と骨棘形成

先述のように Smo f1/f1 (Cre-) マウスでは膝関節脛骨後方に骨棘形成がみられるのに対し、RosaCreER(T)-Smo f1/f1 マウスでは骨棘形成がみられなかった (図5)。

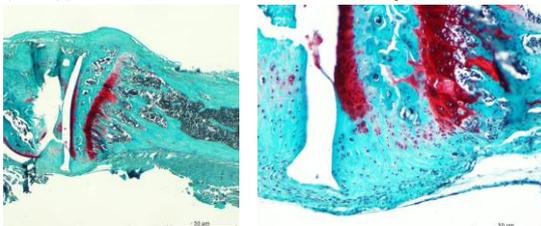


図6 コントロールのマウスにおける関節の変性と骨棘形成

サフラニンO染色では脛骨関節軟骨の変性

と骨棘形成が認められ、強拡大でみると脛骨後方の骨棘部近位に肥大軟骨細胞層が存在していた (図6)。

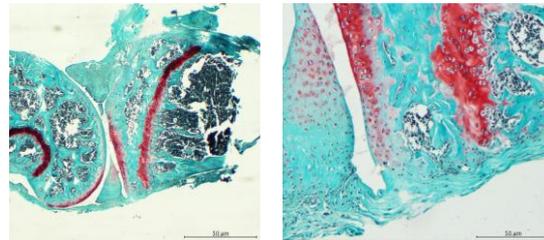


図7 Smo のノックアウトマウスにおける関節変性と骨棘形成

一方、RosaCreER(T)-Smo f1/f1 マウスでは、脛骨後方には骨棘形成は認められず、コントロールに見られた脛骨後方隅角に肥大軟骨細胞層は見られなかった (図7)。

内軟骨性骨化の過程では前肥大軟骨細胞層に Indian Hedgehog (Ihh) や Ihh のシグナルを伝達する膜蛋白の smoothened (Smo) が発現し肥大軟骨細胞への分化→血管侵入→骨化へと進むプロセスが見られる。今回、変形性関節症モデルにおいてコントロールマウスには関節の辺縁に骨棘がみられ、骨棘の近位には肥大軟骨細胞が存在していたが、Smo をCKOした結果、同部位に肥大軟骨細胞が存在せず骨棘形成がみられなかった。これは hedgehog シグナルの遮断が、関節辺縁における肥大軟骨細胞への分化→血管侵入→骨化へと進むプロセスを誘導しなかったと考えられた。このことから変形性関節症などに見られる骨棘形成には hedgehog シグナルが重要な役割を担っていることが明らかとなった。

(4) 得られた成果の位置づけと今後の展望

本研究では、関節軟骨変性に伴う骨棘形成には Hedgehog シグナルが関与していることを Hedgehog の伝達蛋白である Smoothened (Smo) の遺伝子欠損マウスを用いて明らかにした。また、関節の不安定性が増強されるとそれに応じて関節面の変性の程度が増悪し、同時に骨棘形成が増大することが示された。関節の不安定性により関節面の軟骨は破壊され、一方、関節辺縁では軟骨細胞の肥大化が誘導され、血管進入→骨化誘導→骨棘形成となると考えられた。軟骨細胞の肥大化に関与する hedgehog シグナルを遮断したところ骨棘形成の抑制がみられたことから骨棘形成には hedgehog シグナルが重要な役割を担っていることがわかった。

しかしながら関節の不安定性がどのよう

に軟骨細胞に影響し、hedgehog を発現させるのか未だ不明である。また、骨棘形成は関節変性の結果であるが、同時に関節不安定性の抑制、すなわち関節の再安定化を促す一過程とも考えられ、骨棘形成の抑制が長期的な結果として関節破壊を助長する可能性がないか今後検討していく必要がある。

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2件)

- ① Nakamura E, Zhu J, Nguyen MT, Yang J, Mackem S, Cre-mediated recombination can induce apoptosis in vivo by activating the p53 DNA damage-induced pathway. Genesis(査読有) 50(2), 102-111, 2012
- ② Wang Y, Cheng Z, ElAlieh HZ, Nakamura E, Nguyen MT, Mackem S, Clemens TL, Bikle DD, Chang W, IGF-1R Signaling in chondrocytes modulates growth plate development by interacting with the PTHrP/Ihh pathway. J Bone Miner Res (査読有) 26(7):1437-46, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 英一郎 (NAKAMURA EIICHIRO)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号：10412644

(3) 連携研究者

中村 利孝 (NAKAMURA TOSHITAKA)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：50082235

大友 一 (OTOMO HAJIME)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：40550372