

## 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：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791376

研究課題名（和文） 変形性関節症におけるメカノチャネル TRPV4 の病態関与と新規治療を目指した研究

研究課題名（英文） TRPV4; pathogenesis and a new therapeutic target of osteoarthritis

研究代表者

山本 浩司 (YAMAMOTO KOJI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70536565

研究成果の概要（和文）：

軟骨細胞のメカノチャネル TRPV4 に着目し、変形性関節症(OA)への病態関与を遺伝子改変マウスで検証した結果、OA 初期では TRPV4 を介して関節荷重面の Sox9 発現が一時的に上昇し、TRPV4 ノックアウトマウスは野生型に比して OA の病態が進行するという知見を得た。また、TRPV4 の選択的アゴニスト GSK1016790A は軟骨細胞の Sox9 発現を誘導し、変形性関節症の病態進行を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In vivo observation of the Sox9 expression using Sox9-EGFP mice revealed that the Sox9 on the articular surface was increased temporally through TRPV4, which is one of the mechano-gated channels in chondrocytes, at the initial stage of osteoarthritis (OA). In addition, TRPV4 knock-out mice exhibited severer degradation of cartilage in the experimental OA model than wild-type mice. Furthermore, a selective agonist for TRPV4, GSK1016790A, induced the temporal expression of Sox9 in chondrocytes and was found to have a potential to inhibit the progression of OA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：軟骨代謝

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、メカニカルストレス、遺伝子改変マウス、TRPV4、Sox9

## 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は日常動作や Quality of life の著明な低下を引き起こす疾患であり、高齢化社会を迎えた我が国では患者数が増加の一途を辿っている。変形性関節症の発症や進

行には、半月板変性などに起因する異常なメカニカルストレスの亢進が関係しているが、メカニカルストレスにより誘発された分子の発現動態および変形性関節症との病態関与は殆ど解明できていない。従って、関節軟骨に対するメカニカルストレスによる分子

発現を組織レベルでリアルタイムにモニターし、軟骨代謝や組織恒常性の変化に対する知見を得ることは、変形性関節症の病態解析や、新規創薬・治療法の開発において極めて重要となる。

近年、Ca<sup>2+</sup>を通す非選択的カチオンチャネルで、低浸透圧、圧力、流れによるせん断力などの機械的刺激に応答する分子 Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)が生後の関節軟骨に発現していることが報告された(Phan et al., A&R, 2009)。また、TRPV4に活性型変異が生じると、短肢症や側弯症などの骨系統疾患が誘発される(Rock et al., Nature Genetics, 2008; Krabow et al., AJHG, 2009)。更に、軟骨分化過程では、TRPV4の薬理活性剤 4 $\alpha$ -phorbol 12,13-didecanoate (4 $\alpha$ -PDD)によってTRPV4の生理活性が上昇し、Sox9の転写活性が亢進することが報告されている(Muramatsu et al., JBC, 2007)。即ち、メカニカルストレスによるTRPV4の生理活性変化が関節軟骨の代謝活性に影響を及ぼしている可能性がある。そこで本研究では、メカニカルストレスに対して、TRPV4を介したSox9の発現が関節軟骨の代謝や恒常性に関与していると考え、メカニカルストレス-TRPV4-Sox9の分子機序を組織レベルで解明し、変形性関節症の早期治療法の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

転写因子 Sox9 は軟骨発生過程におけるマスター因子として機能しており、胎生期の分子機能に関する知見は数多く報告されている。しかし、生後の関節軟骨における機能や変形性関節症などの病態関与に関する知見は殆ど得られていない。そこで、発生期には Sox9 の上流に位置し、生後の関節軟骨においてはメカニカルストレスに応答する膜分子 TRPV4 に着目し、TRPV4 および Sox9 の遺伝子改変マウスを用いて、メカニカルストレスに対する Sox9 の発現動態を明らかにすることを目的とする。また、メカニカルストレスに対して TRPV4 を介した Sox9 の発現が関節軟骨の保護機構や恒常性に関与しているのかを検証することで、新規創薬・治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

Sox9 の遺伝子座に Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)をノックインした Sox9-EGFP マウス(Yamamoto et al., Nature Commu., 2011)と野生型マウス(Wt)あるいは TRPV4 ノックアウトマウス(TRPV4KO)を交配することによって、

Wt;Sox9-EGFP 及び TRPV4KO;Sox9-EGFP マウスを作製した。それぞれの生後 8 週齢のマウスに対して、膝関節軟骨の内側側副靭帯切断及び内側半月板切除を施した変形性関節症(OA)モデルを片足に作製し、対足には sham 手術を施した。これらの動物モデルを用いて、以下に示す解析及び評価を行った。

- (1) OA モデル作製後、1、2、4 週後に両足の膝関節を摘出し、大腿骨と脛骨を離断後にマクロ共焦点レーザー顕微鏡を用いて、関節荷重面の EGFP 蛍光観察を行った。また、EGFP の蛍光強度を定量的に測定することにより、OA 進行過程における Sox9 の空間的、経時的発現の動態解析を行った。
- (2) OA モデル作製後、4、8、12 週後に膝関節組織を摘出後、4%PFA で固定し、EDTA 脱灰後にパラフィン組織切片を作製した。ヘマトキシリン-エオジン染色、サフラン-オ染色、免疫染色を施し、組織学的解析を行った。
- (3) TRPV4 の選択的アゴニストの一つ GSK1016790A を軟骨細胞の培養液に添加し、in vitro において軟骨細胞の Sox9 発現に与える影響を検証した。
- (4) GSK1016790A をラット OA モデルおよびマウス OA モデルの膝関節内に注射し、OA の病態進行に対する抑制効果を検証した。

## 4. 研究成果

### (1) OA 進行過程における Sox9 の動態解析

まず、生後 1 ヶ月の Sox9-EGFP マウス大腿骨をマクロ共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、図 1 に示すように Sox9 発現部位特異的に EGFP が発現していることを確認した。また、図 2 は大腿骨頭部を強拡大した 3 次元共焦点画像であり、単一細胞レベルで EGFP の発現を認めた。

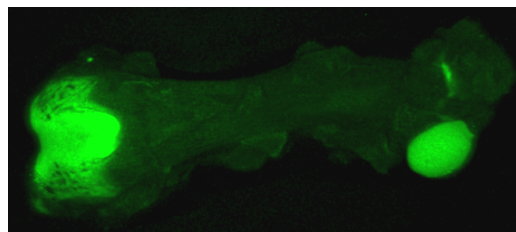


図 1 Sox9-EGFP マウスの大腿骨

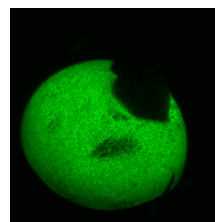


図 2 大腿骨頭の 3 次元蛍光画像

本システムを用いて、Wt;Sox9-EGFP 及び TRPV4KO;Sox9-EGFP マウスの OA モデルを作製し、大腿骨および脛骨の関節荷重面に対して、蛍光定量解析を行った。図 3 は OA モデル作製後 1 週における、Wt;Sox9-EGFP マウスの脛骨上関節面の 3 次元蛍光画像であり、図 4 は対足 sham 手術を行った脛骨上関節面画像である。

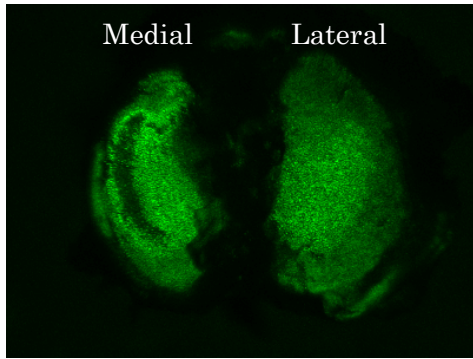


図 3 OA モデル脛骨上関節面画像

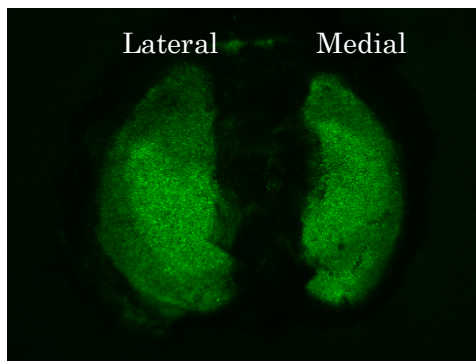


図 4 sham 脛骨上関節面画像

半月板切除によって、内側辺縁における蛍光値の減少が著しく、Sox9 の発現が部分的に減少していることを空間的に明らかにした。また逆に脛骨内側の中心位置に近い部位では術後 1 週において蛍光値が上昇(sham に対して)しており、OA 早期において部分的に Sox9 の発現上昇を認めた。これらの蛍光値の上昇は TRPV4KO;Sox9-EGFP マウスでは見られず、メカニカルストレスが TRPV4 を介して Sox9 の発現に影響を与えることを示唆する結果であった。

#### (2) TRPV4 ノックアウトによる OA への影響

TRPV4 のノックアウトマウス(♂)は自然発症的に OA が進行することが報告されている(Clark et al., A&R, 2010)。そこで、メカニカルストレスとの関係を調べるべく、内側側副靭帯切断及び内側半月板切除によって関節の不安定性を惹起し、OA を誘発させた。その結果、TRPV4 分子をノックアウトする

ことによって、組織学的に変形性関節症の病態進行が認められた。即ち、TRPV4 分子の欠失によってメカニカルストレスの異常な伝達が生じ、早期に Sox9 が上昇することなく catabolic な作用が増大したと考えられる結果であった。

#### (3) GSK1016790A の Sox9 発現に及ぼす影響

TRPV4 の選択的アゴニストの一つである GSK1016790A を軟骨細胞の培養液に添加すると、添加後数時間で Sox9 の mRNA 発現が上昇した。一方 TRPV4KO マウスから採取した軟骨細胞では Sox9 の発現上昇は見られなかった。

#### (4) GSK1016790A の OA 抑制効果の検証

ラットおよびマウスの膝関節に対して、OA モデルを作製し、OA 作製 1 週間後に GSK1016790A を膝関節内に投与した。その後 1~2 週間、1 日おき、もしくは毎日投与を続け、PBS 投与群との組織学的比較を行った。その結果、ラット、マウス両実験とも、GSK1016790A 投与群では、変形性関節症の病態進行が抑制されるという結果を得た。図 5 はラットを用いて左から sham 群、PBS 投与群、および GSK1016790A 投与群における OA 進行過程をトルイジンブルー染色によって評価した組織画像である。GSK1016790A の投与によって、軟骨変性が抑制されていることが示された。

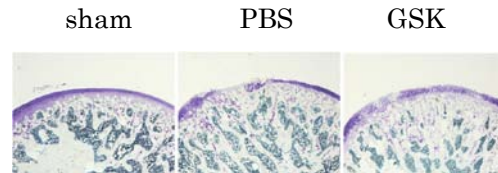


図 5 ラット大腿骨関節面 (トルイジンブルー染色)

現在、TRPV4 に関する種々の恒常的活性変異体を作成し、Sox9-CreERT2 によって生後の関節軟骨特異的に TRPV4 の活性を亢進させる transgene が出来ており、今後これらの遺伝子改変マウスを用いて軟骨変性が抑制されるのかを検証する。また、Wt および TRPV4KO の軟骨細胞にバイオリクターを用いてダイレクトにメカニカルストレスを負荷し、Sox9 の発現変化を解析している。

本研究のこれまでの学術的成果は in vivo においてメカニカルストレス—TRPV4—Sox9 の発現動態を解析し、その空間的、経時的情報を新規に得たところにある。また TRPV4 を介した Sox9 の発現が OA の病態に関与している可能性を示し、TRPV4 の選択

的アゴニストの一つがOAの進行を抑制することを示した。今後はそれらの分子機序を明らかにすることで、新規創薬開発などが期待できる。

なし

#### 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)

[学会発表] (計6件)

- ① 山本浩司, 中村幸男, 村尾浩樹, 添田恒光, 中村孝志, 秋山治彦, Wwp2 は palatogenesis に必須であり, Sox9 および Med25 との機能的相互作用を介して Sox9 転写活性を制御する, 第25回日本骨代謝学会学術集会抄録集, 86, 2012.03.10, 愛知(受賞口演)
- ② 山本浩司, 金永優, 武井大輔, 村尾浩樹, 末吉達也, 塚中真佐子, 水野敦子, 鈴木誠, 中村孝志, 秋山治彦, TRPV4 は Sox9 の発現を介して変形性関節症の発症を抑制する, 第25回日本骨代謝学会学術集会抄録集, 64, 2012.03.09, 愛知(シンポジウム)
- ③ 村尾浩樹, 山本浩司, 塚中真佐子, 武井大輔, 中村孝志, 秋山治彦, 肥大軟骨細胞における  $\beta$ -catenin の機能解析, 第25回日本骨代謝学会学術集会抄録集, 91, 2012.03.09, 愛知
- ④ 山本浩司, 秋山治彦, 軟骨細胞分化の転写制御, 第29回日本骨代謝学会学術集会抄録集, 118, 2011.07.30, 大阪(シンポジウム)
- ⑤ 末吉達也, 村尾浩樹, 山本浩司, 秋山治彦, 中村孝志, 肥大軟骨層特異的に TGF $\beta$  シグナルをノックアウトしたマウスの解析, 第24回日本軟骨代謝学会抄録集, 136, 2011.03.05, 福岡
- ⑥ 山本浩司, 中村幸男, 秋山治彦, 添田恒光, 村尾浩樹, 中村孝志, Wwp2 は palatogenesis に必須であり, Sox9 および Mediator protein との機能的相互作用を介して Sox9 転写活性を制御する, 第24回日本軟骨代謝学会抄録集, 87, 2011.03.04, 福岡

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 浩司 (YAMAMOTO KOJI)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 70536565

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者