

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4月17日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791799

研究課題名（和文） ウィントシグナルによる関節表層細胞の機能制御機構の解明

研究課題名（英文） The role of Wnt signaling in the articular surface cells functions.

研究代表者

安原 理佳 (YASUHARA RIKA)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20453649

研究成果の概要（和文）：

関節軟骨の表層は「表層細胞」と呼ばれる特殊な細胞で覆われており、状況に応じて表層細胞を活性化させることが関節を正常に機能させるための重要な要因である。本研究課題では、関節軟骨の損傷および修復のメカニズムの解明を目的とし、表層細胞の性質を分子レベルで解析した。種々の遺伝子改変マウスの解析から、表層細胞は未分化な関節軟骨前駆細胞様の性質を有し、その性質の保持には Wnt/ β -catenin シグナルによる制御機構が存在することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The surface of articular cartilage is covered with unique cells called superficial cells. To keep maintaining articular function under the loaded circumstances, it is important to activate superficial cells. The aim of this study is to investigate the characteristics of superficial cells, and the pathological and recovery mechanisms in articular cartilage injuries. This study found that the superficial cells had undifferentiated chondro progenitor cell-like properties, that was controlled by Wnt/ β -catenin signaling using gain- and loss of function of β -catenin model mice.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：関節軟骨、再生医学、細胞・組織、遺伝子、軟骨、Wnt/ β -catenin

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は数層の層状構造を成し、表層部分は直接力学的負荷を受けるため、表層と深層とは構造や性質が大きく異なっている。しかし、表層組織を構成する「表層細胞」がどのような細胞なのか、また、それらの増殖や

分化がどのように制御されているのかは不明である。これまでの表層細胞の知見としては、以下のことが挙げられる。

(1) 表層細胞は円滑な関節運動を支持するために Lubricin タンパク質を発現し、Lubricin 欠損マウスでは関節表層細胞の欠

如と変形性関節症の発症が報告されている。
 (2) 関節軟骨は、細胞増殖能が低く、自己修復しにくい組織であるが、ウシ関節表層より長期増殖能維持する未分化幹細胞が存在すると報告された。

(3) 申請者は予備実験より、軟骨細胞で Wnt シグナルを活性化および、欠損させた遺伝子改変マウスを作成、解析した結果、 β -catenin シグナルによって表層細胞の細胞数や厚みを調節する重要な因子であることを見出した。

以上から、本研究課題では関節表層細胞の機能発現における Wnt/ β -catenin シグナルの役割について明らかにしようと至った。

2. 研究の目的

- (1) 関節表層細胞に対する Wnt/ β -catenin シグナルの作用の解析
- (2) 関節軟骨における間葉系幹細胞の局在、性質の解析

3. 研究の方法

- (1) 遺伝子改変動物の組織学的解析

軟骨特異的 Type XI Collagen プロモーター制御下に活性化型の β -catenin を発現させたマウス (CA- β -CatER) と、CreER-loxP システムを用いた軟骨特異的 β -catenin 欠損マウス (ColII Cre- β -catenin conditional KO) を用い、関節表層の構造の変化を組織学的に解析した。

① 関節軟骨の構造、組成: HE 染色、アルシアンブルー染色により解析した。

② BrdU 標識: BrdU 長期保持細胞を Slow Dividing Cell として検出した。

③ 遺伝子発現: in situ hybridization 法を用いて Lubricin の発現を検討した。

(2) マウス関節表層細胞の初代培養を用いた細胞機能解析

① 細胞増殖、細胞周期: MTS 法および FACSscan による細胞周期の解析を行った。

② 関節軟骨の性質: DNA マイクロアレイを用いて軟骨細胞と表層細胞の遺伝子発現の違いを検討した。また、RT-qPCR 法を用いて Lubricin 等の遺伝子解析を行った。

③ 軟骨分化能: (1) の遺伝子改変マウスから採取した表層細胞を Nude マウスの皮下に移植し、軟骨分化能を評価した。

4. 研究成果

関節表層を覆う数層の細胞に着目し、申請者はマウス関節軟骨より「表層細胞」の単離培養法を確立した。この培養系を用い、平成 22 年度は、表層細胞が未分化な関節軟骨前駆細胞様の性質を有する事、また、その性質の保持には Wnt/ β -catenin シグナルによる制御機構が存在することを明らかにした。さらに、 β -catenin の遺伝子改変マウスの組織学的解析により、 β -catenin を活性化させた関節軟骨

は増幅し、特に表層細胞の増加を認めた (図 1.1-2)。 β -catenin を欠如させた関節軟骨は不規則な構造を呈し、表層は細胞の欠如、線維組織による被覆を認め (図 1.3-4)、in vivo においても関節軟骨の維持に β -catenin シグナルが重要な役割を持つことを明らかに

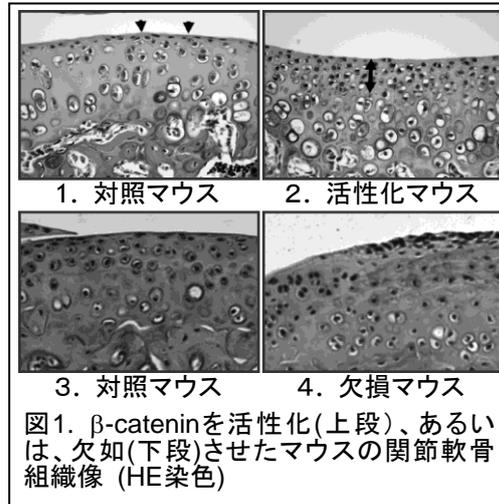


図1. β -catenin を活性化(上段)、あるいは、欠如(下段)させたマウスの関節軟骨組織像 (HE 染色)

した。

平成 23 年度はさらに in vivo における関節軟骨の細胞機能の解析を行い、マウス表層細胞を Nude マウスの腹部皮下に移植すると硝子軟骨様のペレットを形成し、表層細胞が軟骨に特化した細胞である事を見出した (図 2)。さらに、表層細胞に Wnt を前処理しておくことで、これらの軟骨分化は遅れ、表層細胞の性質を維持したペレットを形成した。一方で β -catenin 欠損マウスから採取した表層細胞は軟骨分化が促進した。

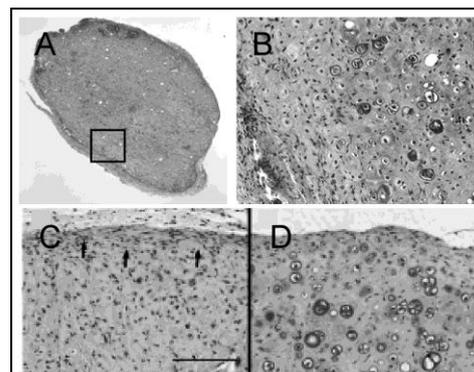


図2. 表層細胞から誘導した軟骨組織

表層細胞を Nude マウス皮下移植し軟骨組織へ誘導した。A: 弱拡大. 形成された軟骨組織. B: 強拡大. C: 野生型 D: β -catenin 欠損マウスから採取した表層細胞.

(A-C) 類円形の軟骨細胞の形成と、その表層に線維組織の被覆を伴った(矢印).

(D) 肥大化した大型軟骨細胞の形成を認めたが、線維組織の被覆は形成されなかった。

これらの結果は表層細胞が軟骨に特化した細胞であり、Wnt/ β -catenin シグナルによる制御を組み合わせる事により、生体により近

い関節軟骨の再生が可能であると示唆された。また、Wnt/ β -catenin シグナルは BMP/TGF β 、細胞接着因子である Integrin や Rac シグナルとも相互作用する事が in vitro の実験で示唆され、軟骨特異的 Rac1 欠損マウスの関節軟骨を形態解析した結果、関節表層が β -catenin 欠損マウスと類似して菲薄化する事が明らかとなった。

以上の本研究課題の遂行により得られた実験結果は表層細胞を応用した新たな関節軟骨再生に向けた有益な知見である。

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 5 件)

1. Yasuhara R, Ohta Y, Yuasa T, Kondo N, Hoang T, Addya S, Fortina P, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M., Roles of β -catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells, Lab Invest., 査読有, 2011, 91(12):1739-52.
2. Yasuhara R, Miyamoto M., Roles of Gingipains in Periodontal Bone loss, Journal of Oral Biosciences, 査読有, 2011, 53(3):197-205.
3. Yoshimura K, Miyamoto Y, Yasuhara R, Maruyama T, Akiyama T, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Tsunawaki S, Tachikawa T, Baba K, Kamiyo R., Monocarboxylate transporter-1 is required for cell death in mouse chondrocytic ATDC5 cells exposed to interleukin-1 β via late phase activation of nuclear factor κ B and expression of phagocyte-type NADPH oxidase, J Biol Chem., 査読有, 2011, 286(17):14744-52.
4. Kondo N, Yuasa T, Shimono K, Tung W, Okabe T, Yasuhara R, Pacifici M, Zhang Y, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M., Intervertebral disc development is regulated by Wnt/ β -catenin signaling, Spine, 査読有, 2011, 15:36(8):E513-8.
5. Yasuhara R, Yuasa T, Williams JA, Byers SW, Shah S, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M., Wnt/ β -catenin and retinoic acid receptor signaling pathways interact to regulate chondrocyte function and matrix turnover, J Biol Chem., 査読有, 2010, 1;285(1):317-27.

[学会発表] (計 4 件)

1. Yasuhara R, 他 6 名: The cross talks

between Wnt/ β -catenin and Rac-1 Signaling in Regulation of Maintenance and Function of Superficial Cell Layer in Articular Cartilage. The International Osteoporosis Federation 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting, 2011年9月4-8日, Gold coast, Australia

2. 安原 理佳, 他 4 名: 関節表層細胞の維持と機能調節における Wnt/ β -catenin と Rac1 シグナルのクロストーク, 第 29 回日本骨代謝学会, 2011 年 7 月 28-30 日, 大阪
3. Yasuhara R, 他 7 名: Essential Roles of Wnt/ β -catenin Signaling in Regulation of Structure and Function of Articular Surface Layer. 50th annual meeting of The American Society For Cell Biology, 2010 年 12 月, Philadelphia, PA, USA
4. 安原 理佳: (受賞講演) リシン特異的ジンジパインは破骨細胞の分化誘導に対して、OPG を分解する事で、LPS や活性型ビタミン D₃ の作用を増強する。歯科基礎医学会 受賞講演, 第 52 回歯科基礎医学会, 2010 年 9 月, 東京

[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

安原 理佳 (Rika Yasuhara)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20453649

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：