

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19586

研究課題名（和文）関節軟骨維持・再生に関わる骨格幹細胞の同定

研究課題名（英文）Identification of Skeletal Stem Cells Involved in the Homeostasis and Regeneration of Articular Cartilage

研究代表者

安達 伸生（Adachi, Nobuo）

広島大学・医系科学研究科（医）・教授

研究者番号：30294383

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：変形性関節症（OA）は、本邦だけでも約2千万人の患者がいる運動器疾患であるが、その発症機構は未だ明らかでないため、根本的な治療法や予防法は確立されていない。新たな治療法の開発のためにも、軟骨を含む関節組織の恒常性維持や修復機構について理解することが重要である。本研究は、関節の維持や修復に関与する骨格幹細胞/軟骨前駆細胞を同定するために、細胞系統解析が可能かつその細胞を除去することでその役割を明確にできる遺伝子改変マウスを作製した。そして、関節組織中における候補骨格幹細胞/軟骨前駆細胞を示したことから、今後これらマウスを用いた研究から新たなOA・軟骨再生治療法の開発に向けた研究成果が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨を含む関節組織の恒常性維持や修復機構について骨格幹細胞/軟骨前駆細胞の役割を明確に示すことができる遺伝子改変マウスを作製し、候補細胞を示したことに意義がある。

研究成果の概要（英文）：Osteoarthritis (OA) is a common musculoskeletal disease that affects approximately 20 million patients in Japan. Despite its prevalence, the pathogenesis of OA remains unclear, and no fundamental treatments or preventive measures have been established. Understanding homeostasis maintenance and repair mechanisms of joint tissues, including cartilage, is important for developing new treatments. This study aimed to identify skeletal stem cells and cartilage progenitor cells involved in joint maintenance and repair. To achieve this, mice capable of undergoing cell lineage analysis were created, allowing for the clarification of the roles of these cells by selectively removing them. The findings suggest the presence of candidate skeletal stem cells and cartilage progenitor cells in joint tissues. These results will pave the way for further studies focused on developing new OA treatments and cartilage regeneration strategies using these mice.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性関節症 関節軟骨 骨格幹細胞 軟骨前駆細胞 遺伝子改変マウス 細胞系統解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎え、変形性関節症 (OA) は生活の質を著しく低下させ、要支援・要介護の原因第一位である運動器疾患の中で最も代表的な加齢性疾患であり、現在本邦だけでも約 2 千万人の患者がいる。それゆえ、いかに健康寿命を延伸させられるかは、運動器の維持によるところが大きい。しかし、現在の主な治療法は、鎮痛消炎剤等による対症療法および最終的には人工関節置換となり、軟骨変性を抑制し、かつ修復させることができる疾患修飾性 OA 治療薬 (DMOAD) などによる治療法の確立には至っていない。これまでの OA 研究は、軟骨変性について関節軟骨を構成している唯一の細胞である関節軟骨細胞に注目して行われてきた。しかし近年、遺伝子改変マウスによる細胞系統解析やシングルセル RNA シークエンスなど解析技術の急速な進歩から、骨膜、骨髄中や成長板など様々な部位に存在し、いくつかのマーカーにより特徴づけられる骨格幹細胞 (Skeletal Stem cells: SSC) の存在が報告され、骨格系の損傷修復などに関与していることが明らかになり始めている。しかし、骨などに比べてリモデリングがほとんど起こらないと考えられている成体期の関節軟骨において軟骨の維持や修復にどの程度 SSC が関与しているのかについてほとんど明らかになっていない。そこで、新たな OA 治療法の開発のためには、改めて関節軟骨の維持や再生に関与するであろう SSC あるいは軟骨前駆幹細胞 (Chondrocyte Progenitor Cell: CPC) について理解することが重要であると考えた。

### 2. 研究の目的

関節に存在する SSC/CPC を探索し、その動態や関節維持や修復への関与を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) SSC/CPC 陽性細胞の局在と動態

##### SSC/CPC マーカー *Cre<sup>ERT</sup>tdTomato* マウスの作製

SSC マーカーとして報告されている *Grem1* (*Grem1*) に着目し、SSC/CPC を追跡するために *Grem1Cre<sup>ERT</sup>-tdTomato* マウスを作製した。*Grem1Cre<sup>ERT</sup>* マウスと *CreERT* リコンビナーゼ活性依存的に CAG プロモーターにより赤色蛍光タンパク質変異体 (tdTomato) を発現する *Rosa26-CAG-*lsl*-tdTomato* マウスを交配し、タモキシフェン (TAM) 依存的に *Grem1* 陽性細胞を蛍光標識することで系統追跡・細胞単離が容易な *Grem1Cre<sup>ERT</sup>tdTomato* マウスを作製した。加えて、CPC マーカー候補として *Tpp3* に着目し、同様に *Tpp3Cre<sup>ERT</sup>* マウスを用いた *Tpp3Cre<sup>ERT</sup>-tdTomato* マウスを作製した。

##### 膝関節および腰椎椎間板における SSC/CPC の動態

膝関節における *Grem1* 陽性細胞の局在を評価した。さらに加齢による *Grem1* 陽性細胞の変化を明らかにするために、成長期 (3 週齢) に TAM を投与することで *Grem1* 陽性細胞を標識し、4 週齢、17 週齢 (成体) および 15 カ月齢 (老齢) における *Grem1* 陽性細胞の動態を膝関節および腰椎椎間板で評価した。また、外科的な処置による OA 誘導後の関節軟骨および軟骨損傷後の修復部における *Grem1* 陽性細胞を評価した。

##### SSC/CPC の解析

3 週齢から TAM を投与後、4 週齢の大腿骨頭軟骨を採取し、軟骨細胞を単離、培養した。蛍光標識された *Grem1* および *Tpp3* 陽性細胞を FACS によりソーティングし、*Grem1* および *Tpp3* 陽性細胞と陰性細胞の増殖能や分化能の評価、RNA シークエンス解析による microRNA を含めた網羅的な遺伝子発現解析を行い、*Grem1* および *Tpp3* 陽性細胞の特徴づけを行った。

## (2) SSC/CPC 陽性細胞の関節軟骨の維持や修復における役割

SSC/CPC マーカー  $Cre^{ERT}$ -ジフテリア毒素受容体 (DTR) tdTomato マウスの作製

*Grem1* および *Tppp3*  $Cre^{ERT}$  マウスと *Rosa-loxp-stop-loxp-DTR-tdTomato* マウスを交配することで、TAM 依存的に SSC/CPC マーカー陽性細胞を蛍光標識でき、かつジフテリア毒素 (DT) 投与により誘導的に標識した *Grem1* および *Tppp3* 陽性細胞を除去可能な *Grem1-Cre<sup>ERT</sup>:DTR-tdTomato* マウスおよび *Tppp3-Cre<sup>ERT</sup>:DTR-tdTomato* マウスを作製した。

ジフテリア毒素投与による SSC/CPC 標識細胞除去に向けた条件検討

作製した *Grem1Cre<sup>ERT</sup>-*、*Tppp3Cre<sup>ERT</sup>-DTR-tdTomato* マウスを用いて、DT 投与による標識した *Grem1* や *Tppp3* 陽性細胞の除去条件を検討した。さらに、*Grem1* や *Tppp3* 陽性細胞の除去マウスの加齢に伴う関節軟骨などの関節組織の恒常性維持や損傷修復への関与を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 膝関節における SSC/CPC 陽性細胞の局在と動態

SSC を追跡するために *Grem1Cre<sup>ERT</sup>-tdTomato* マウスの成長期 (3 週齢) より TAM を投与することで *Grem1* 陽性細胞を標識し、局在を確認した。*Grem1* 陽性細胞は、17 週齢における関節軟骨や

成長板軟骨の一部と骨髄内、骨膜で陽性細胞を認めた (図 1)。また、大腿骨骨頭軟骨、足関節の軟骨でも同様に陽性細胞を認めた。さらに、加齢に伴う陽性細胞の動態を調べるために 4 週齢 (若齢) および 15 カ月齢 (老齢) における *Grem1* 陽性の局在変化を関節軟骨で確認した。15 カ月齢マウスの膝関節では OARSI スコアが増加しており、関節軟骨細胞数の減少も認められ、加齢により OA が進行していた。そして、軟骨分化や軟骨維持に必須の転写因子 Sox9 陽性細胞は、4 週と比較し 15 カ月齢で著しく減少していた。しかし、全体の軟骨細胞数に対する *Grem1* 陽性 (赤色) の細胞数の割合に差はなく、*Grem1* 陽性系統細胞は加齢により減少していなかった (図 2)。

次に外科的な処置による OA 誘導後の関節軟骨および骨軟骨欠損後の修復部における *Grem1* 陽性細胞を評価した。OA 誘導モデルの術後 4 週では、sham 群と比較し OARSI スコアがわずかに増加し、OA が進行していた。そして、*Grem1* 陽性系統細胞は OA 誘導により減少しているように見えるが、全軟骨細胞数も減少しているため割合としては変化がなかった。骨軟骨欠損後の修復部における *Grem1* 陽性細胞数は非常に少なく、骨髄や周辺に局在する陽性細胞が遊走してくることは示さなかった。腰椎椎間板においては、線維輪、成長軟骨板における細胞で *Grem1* 陽性細胞を認めたが、髄核には陽性細胞は認められなかった (図 3)。4 週と比べて 15 カ月齢の線維輪における *Grem1* 陽性細胞の割合は、関節軟骨と同様に変化がなかった (図 3)。さらに SSC/CPC マーカ

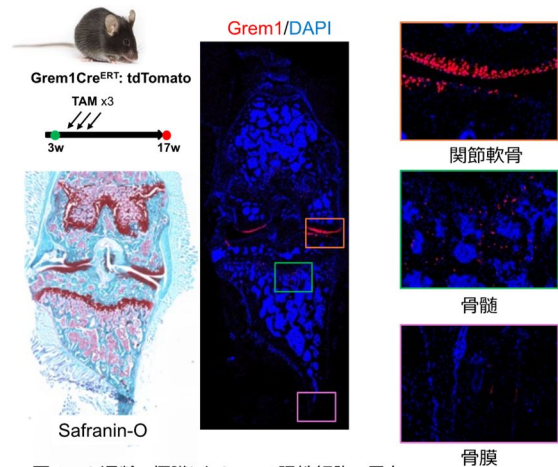


図 1. 3 週齢で標識した *Grem1* 陽性細胞の局在

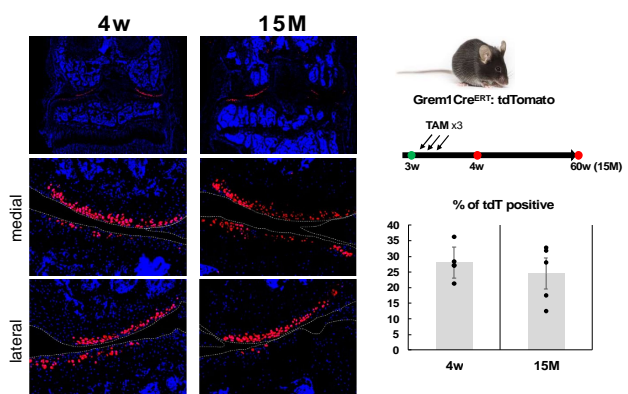


図 2. 加齢にともなう関節軟骨における *Grem1* 陽性細胞の変化

が進行していた。そして、*Grem1* 陽性系統細胞は OA 誘導により減少しているように見えるが、全軟骨細胞数も減少しているため割合としては変化がなかった。骨軟骨欠損後の修復部における *Grem1* 陽性細胞数は非常に少なく、骨髄や周辺に局在する陽性細胞が遊走してくることは示さなかった。腰椎椎間板においては、線維輪、成長軟骨板における細胞で *Grem1* 陽性細胞を認めたが、髄核には陽性細胞は認められなかった (図 3)。4 週と比べて 15 カ月齢の線維輪における *Grem1* 陽性細胞の割合は、関節軟骨と同様に変化がなかった (図 3)。さらに SSC/CPC マーカ

一候補として *Tpp3* に注目し、*Tpp3Cre<sup>ERT</sup>-tdTomato* マウスを作製した。3 週齢 *Tpp3Cre<sup>ERT</sup>-tdTomato* マウスに TAM を投与することで *Tpp3* 陽性細胞を標識した。*Tpp3* 陽性細胞は、4 週齢における膝関節における滑膜、半月板、十字靭帯、最表層の関節軟骨細胞で陽性細胞を認めた (図 4)。

腰椎椎間板においては、線維輪と髄核の細胞で *Tpp3* 陽性細胞を認めた。しかし、椎体終盤、成長板における軟骨様細胞では陽性細胞を認めなかった。

3 週齢で TAM を投与により蛍光標識された *Grem1* 陽性細胞を FACS ソーティングし、*Grem1* 陽性細胞と陰性細胞の増殖能やコロニー形成能の評価、RNA シーケンス解析による microRNA を含めた網羅的な遺伝子発現解析を行った。現在、網羅的な遺伝子発現解析を行っているところである。関節軟骨由来の *Grem1* 陽性細胞は、陰性細胞に比べてコロニー形成能は同程度であったが、一方 *Tpp3* 陽性細胞のコロニー形成能は高かった。

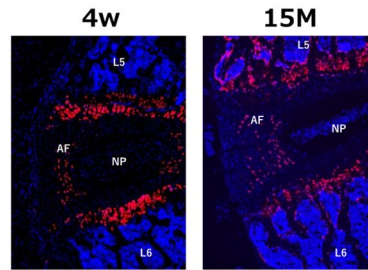


図 3. 加齢にともなう腰椎椎間板における *Grem1* 陽性細胞の局在と動態

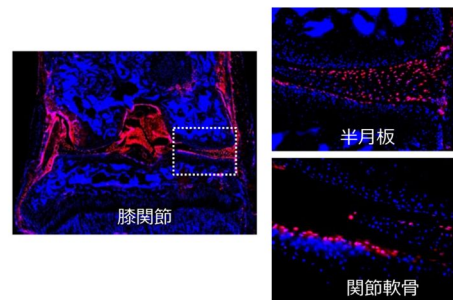


図 4. 膝関節における *Tpp3* 陽性細胞の局在

## (2) SSC/CPC 陽性細胞の関節軟骨の維持や修復における役割

TAM 依存的に SSC/CPC マーカー陽性細胞を標識でき、かつ DT 投与により誘導性に標識した *Grem1* および *Tpp3* 陽性細胞を除去可能な *Grem1-Cre<sup>ERT</sup>:DTR-tdTomato* マウスおよび *Tpp3-Cre<sup>ERT</sup>:DTR-tdTomato* マウスを作製し、DT 投与による標識 *Grem1* および *Tpp3* 陽性細胞の除去可能条件を決定した。

以上の結果からは、加齢モデルと外傷モデルにおいて OA 発症や修復に *Grem1* 陽性系統細胞は重要な役割は担っていない可能性が示唆されたが、一方で *Tpp3* 陽性細胞は、SSC/CPC としての可能性が期待できる。今後さらに加齢や損傷に伴う *Grem1* や *Tpp3* 陽性細胞の変化や DT 投与依存的な細胞除去による軟骨や半月板などの関節組織の恒常性維持や損傷修復への関与を明らかにしていく。また、シングルセル RNA シーケンス解析を行うことで *Grem1* もしくは *Tpp3* 陽性細胞の詳細な特徴を決定していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

なし

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	味八木 茂  (Miyaki Shigeru)  (10392490)	広島大学・病院(医)・特定教授   (15401)	
研究分担者	寺村 岳士  (Teramura Takeshi)  (40460901)	近畿大学・大学病院・准教授   (34419)	
研究分担者	亀井 直輔  (Kamei Naosuke)  (70444685)	広島大学・医系科学研究科(医)・准教授   (15401)	
研究分担者	中佐 智幸  (Nakasa Tomoyuki)  (60467769)	広島大学・医系科学研究科(医)・寄附講座准教授   (15401)	

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