

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659705
 研究課題名（和文） 軟骨細胞のメカノシグナル解明への in vitro 肥大化・変性モデルの樹立と応用
 研究課題名（英文） Establishment and application of in-vitro hypertrophic and degeneration model designed to clarify the mechanism of mechanical signal transduction in chondrocytes.
 研究代表者
 筑田 博隆（CHIKUDA HIROTAKA）
 東京大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：30345219

研究成果の概要（和文）：

軟骨細胞のメカノシグナル解明を目指し、変形性関節症において起きている軟骨細胞の病的肥大分化および変性を物理的な刺激を用いて in vitro で再現する実験系の確立を目指して検討を行った。各種細胞を用いた静水圧負荷による軟骨細胞変性マーカーの発現検討を行い、マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5、初代マウス関節軟骨細胞においては変性マーカーの発現誘導に 20MPa、1 時間の圧負荷が最適であることを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to establish in-vitro hypertrophic and degeneration model designed to clarify the mechanism of mechanical signal transduction in chondrocytes. The examination of expressions of degeneration markers of chondrocytes under various conditions of hydrostatic pressure revealed that pressure of 20MPa for 1 hour was the optimum stimulus condition to induce degenerative change in mouse chondrogenic ATDC5 cells and mouse primary articular chondrocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症などの運動器変性疾患は高齢者の生活の質を低下させるロコモティブシンドロームの中心的な疾患であり、関節軟骨の変性予防や、修復・再生といった本質的な治療技術は緊喫の社会的要請となっている。我々のグループは軟骨細胞を制御するシグナル群の解明に取り組み、Sox9, Runx2 などの転写因子群から cGK II, GSK3 β , Akt などのリン酸化酵素、HIF-2 α , NF κ B シグナルなど多様なシグナルを解明するとともに、独自に開発した変形性関節症のマウスモデルを用いて変形性関節症の分子病態生理

の解明に成果をあげている。その中で我々は軟骨内骨化の後期にみられる軟骨細胞の肥大分化に類似した現象が変形性関節症においてもみられること、また肥大分化促進分子を抑制することによって変形性関節症の発症・進展を抑えられることを証明した。しかしながら、その主因である過剰なメカニカルストレスが関節軟骨の肥大分化・変性をどのように誘導するかはいまだに不明である。

我々はマウスを用いたモデルを確立することによって、これまで変形性関節症に関わる数多くの分子メカニズムを解明してきた。しかしながら、遺伝子スクリーニングや薬物

スクリーニングなど、最新の分子生物学的解析法を用いてのさらなる研究拡大に不可欠な大規模スクリーニングは動物モデルだけでは困難であり、*in vitro* での変形性関節症モデルの確立が急務の課題と考えていた。

現在、細胞培養液にインスリンを添加することにより軟骨細胞の肥大分化を誘導する培養系は確立されているが、この培養環境で起きている軟骨細胞の肥大分化が、変形性関節症においてメカニカルストレス負荷により生じている軟骨細胞の肥大分化とまったく同じ現象であるとは断言できず、より正確なメカニカルシグナル解明のためには、薬剤のみではなく物理的な刺激で起きる肥大分化を *in vitro* で再現する必要がある。

生理的なメカニカルストレスは正常な軟骨細胞代謝と関節軟骨の恒常性の維持に必須であり、関節軟骨にかかるメカニカルストレスに酷似した静水圧負荷という手法は再生医療研究の分野において用いられてきた手法の一つである。軟骨細胞は生理的な静水圧を負荷することによって軟骨基質の産生が亢進し脱分化が抑制されることが、これまでの再生医療研究によって明らかとなっている。我々はこの軟骨細胞に静水圧を負荷する系を用いて基礎検討を行い、過剰な静水圧を負荷すると軟骨細胞がその形質を維持できず肥大分化・変性マーカー遺伝子が発現することを突き止めた。我々はこの現象に注目し、変形性膝関節症患者で実際に起きている軟骨細胞の変性を擬似できるような、過剰静水圧負荷による軟骨細胞肥大分化誘導 *in vitro* 実験系を確立すべく本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、軟骨内骨化の後期にみられる軟骨細胞の肥大分化に類似した現象が変形性関節症においてもみられることに着目し、軟骨細胞の肥大分化・変性を過剰なメカニカルストレス負荷によって再現する *in vitro* 実験系を確立することを目指す。メカニカルストレスとしては、関節軟骨にかかるメカニカルストレスに酷似した静水圧負荷という手法を選択し、実験系の確立後は得られたサンプルを用いて最先端の多様なスクリーニングを行うことにより、軟骨細胞におけるメカニカルシグナルを解明し、運動器変性疾患の病態・治療研究を飛躍的に促進させることを目的とする。

本研究では、圧負荷による軟骨細胞の肥大分化・変性誘導の前後でサンプリングを行い、ChIP シークエンス、cDNA・mRNA・microRNA アレイ、プロテインアレイなど、ヒストン修飾から発現・翻訳に至る各ステップを総合的に検討し、既知の成長軟骨細胞の肥大分化との類似点・相違点を明らかにした上で圧負荷による肥大分化・変性に独自の

細胞内環境変化を解明することを計画している。この知見は変形性関節症の分子病態を理解する上で極めて有用であると考えられる。また細胞の遺伝子操作はマウスよりはるかに容易で安価、かつ迅速に行えることから、治療標的候補分子を操作した細胞を作成して圧負荷による肥大分化への関与を検証することも可能である。この過程は遺伝子改変マウスを作出する前段階の絞り込みに不可欠であり、結果的に研究期間の年単位での短縮に繋がるであろう。また本学の医学部附属病院には、国内最大の運動器疾患研究のためのコホート集団を有する ROAD (Research on Osteoarthritis Against Disability) プロジェクト研究チームがあり、変形性膝関節症や変形性腰椎症に関して我々と共同研究を展開している。過剰圧負荷による軟骨細胞の肥大分化・変性の傾向はマウス同様ヒト由来細胞でも確認されており、これらヒトゲノム発の変形性関節症感受性遺伝子の検証をヒト由来細胞で直接検討することができれば、その成果を臨床現場にフィードバックする時間が大幅に短縮されると予想される。また変形性腰椎症は変形性膝関節症と並び患者数が多い重大な運動器疾患であり、変形性膝関節症と同様に二足歩行による腰椎へのメカニカルストレスが発症要因の一つと考えられているが、四肢歩行動物では再現が困難であることが研究の大きな障壁であり、本実験系はこのような疾患の病態・治療研究にも大きく貢献すると予想される。

3. 研究の方法

(1)

細胞種としては、マウス由来未分化軟骨系・間葉系細胞株 (ATDC5, C3H10T1/2)、ヒト由来軟骨系細胞株 (OUMS-27, SW1353) の他、マウス・ヒトの初代軟骨細胞、間葉系幹細胞、iPS 細胞などがあり、それぞれ性質が異なるため、通常の肥大分化・変性誘導に必要な薬剤・サイトカインも大きく異なる。よって過剰圧負荷による肥大分化誘導系においても、要する負荷圧、負荷時間、その後の培養期間などは大きく異なるものと予想され、細胞ごとに詳細に条件検討を行う。また、static な圧負荷、ヒトの歩行を再現する cyclic な圧負荷においても検討を行う。それぞれの条件について、負荷する静水圧と時間、負荷後の培養期間に関して基礎検討を行い、肥大分化・変性を評価するのに最適な系の検討を行った。そしてそれぞれの時系列のサンプルを用いて、マウス変形性関節症モデルやヒト変形性関節症において既に知られている肥大分化・変性マーカー遺伝子の発現を評価し、変形性関節症の *in vitro* モデルとしての妥当性を検証する。

(2)

適切な実験系が確立されれば、過剰圧負荷による in vitro 肥大分化・変性系が確立されることにより、圧負荷によって細胞内の転写環境がどのように変化するかを分子レベルで探索することが可能となる。生理的な圧を負荷すると軟骨細胞の特性が保持され、さらに過度の圧を負荷すると肥大分化・変性が生じるという現象がどのような細胞内変化を介しているのかを探索すべく、それぞれの圧負荷前後のサンプルを用いて、ChIP シークエンスを用いたエピゲノム情報の解析、マイクロアレイによる cDNA、mRNA、microRNA の解析、プロテインアレイによる蛋白レベルの解析などを行う。

4. 研究成果

(1)

今回の研究では、細胞を播種した小型ディッシュをメディアムを充填したガス交換可能なポリオレフィン製パック内に封入し、そのパックごと静水圧負荷装置内に入れ圧不可を行った。負荷後はパックからディッシュを取り出し、通常の培養装置内で培養後サンプルを回収した。

各細胞種において、静水圧負荷により多様な反応性がみられた。ヒト由来軟骨系細胞株 (OUMS-27, SW1353) では今回の負荷環境においてはあまり強い反応性がみられなかったが、軟骨前駆細胞株 ATDC5 およびマウス由来の初代関節軟骨細胞において再現性のある結果を得ることができた。

これらの細胞においては 20MPa、1 時間の圧負荷により軟骨細胞変性マーカーである Mmp13 および Vegfa、Adamts4、Adamts5 の発現が上昇することが確認された。また、軟骨細胞変性マーカーの発現上昇に伴い、軟骨細胞基質マーカーである II 型コラーゲンの発現低下がみられた。負荷解除後の培養期間における発現のピークについても検討を行ったが、ATDC5 では 1 日、マウス由来初代関節軟骨細胞では 7 日に変性マーカーの発現ピークがあり、その後は緩やかに発現の低下がみられた。マウス由来初代関節軟骨細胞においては、負荷後に培養を継続すると、最終的には通常の培養と同様に脱分化した。30MPa、2 時間以上の圧負荷では、細胞の形態が紡錘状になっており、肥大化ではなく、変性のみが起きている可能性が考えられた。

マウス初代軟骨細胞においては、 β -glycerophosphate、アスコルビン酸のメディアム中への添加により、軟骨細胞の分化誘導が生じることが報告されており、各種薬剤の添加による発現への変化をみるため、インスリン、 β -glycerophosphate、アスコルビン酸、各種サイトカインなどを添加したメディアムにて検討を行ったが、薬剤添加の有無

では静水圧負荷後の変性マーカーの発現変化に明らかな差はみられなかった。

static な圧負荷とヒトの歩行を再現する cyclic な圧負荷における検討は、静水圧負荷装置からの回収時に細胞の負荷が強いためか、再現性のあるデータは得られなかった。

(2)

変性マーカーの発現解析にて再現性のみられた条件 (20MPa、1 時間の圧負荷後 7 日間培養) で圧負荷を行ったマウス初代関節軟骨細胞からサンプリングを行い、採取した mRNA を用いて軟骨変性マーカーの発現を確認し、マイクロアレイによる解析を行った。現在、その結果から圧負荷の前後で有意な発現上昇および発現低下が見られていた分子に対してレトロウイルスベクターを作成し、候補分子の過剰発現細胞・発現抑制細胞を作出し、圧負荷実験を行っている。

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)

なし

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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

筑田 博隆 (CHIKUDA HIROTAKA)

東京大学医学部附属病院・講師

研究者番号：30345219

(2) 研究分担者

松原 全宏 (MATSUBARA TAKEHIRO)

東京大学医学部附属病院・助教

研究者番号：40361498