

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689065

研究課題名(和文)変形性関節症の主要制御分子HIFを中心とした治療標的の包括的探索

研究課題名(英文)Research of HIF function in pathophysiology and therapeutics of osteoarthritis

研究代表者

齋藤 琢(Saito, Taku)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：30456107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,000,000円、(間接経費) 6,300,000円

研究成果の概要(和文)：Hif2a^{+/-}マウスでは変形性関節症は著明に抑制されたが、タモキシフェン誘導性軟骨特異的ノックアウトマウス(Col2a1-CreERT2;Hif2a-f/f)でも類似した結果が得られた。反対にCol2a1-CreERT2;Hif1a-f/fでは著明に関節軟骨の変性が促進され、HIF1AとHIF2Aの関節軟骨における作用が反対であることが明らかとなった。更なる解析によって、HIF1Aは軟骨破壊に関与するタンパク分解酵素の発現を抑制することも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In Hif2a^{+/-} mice, osteoarthritis was markedly inhibited. In Col2a1-CreERT2;Hif2a-f/f mice, similar results were obtained. In contrast, articular cartilage degradation was accelerated in Col2a1-CreERT2;Hif1a-f/f mice, indicating opposite functions of HIF1A and HIF2A in articular cartilage. Further analyses revealed that HIF1A suppressed expression of catabolic factors.

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：変形性関節症 軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

高齢人口の増加によって運動器変性疾患の患者数は増え続けているが、その主たる疾患である変形性関節症については加齢や物理的ストレス、炎症などの関与が示唆されているものの、分子レベルでの病態解明は始まったばかりであり、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現在も確立されていない。申請者らのグループでは従来から変形性関節症の基礎研究を展開しており、変形性関節症の *in vivo* での解析を可能にすべく世界に先駆けてマウスを用いた変形性関節症モデルを樹立し (*Osteoarthritis Cartilage* 13:632-41, 2005) そのモデルを用いて Runx2 や C/EBP などの軟骨内骨化を制御する転写因子群が変形性関節症の発症・進行をも強力に制御していることや、新規分子 Carminerin による軟骨の石灰化メカニズムを明らかにした (*Arthritis Rheum* 54:2462-70, 2006, *Nat Med* 12:665-70, 2006, *PLoS One* 4:e4543, 2009) 。そして軟骨内骨化の制御機構の網羅的解析のために肥大化マーカー 10 型コラーゲンのプロモーター解析を行い (*Arthritis Rheum* 60:166-78, 2009) その強力な上流転写因子として HIF2A を同定した。そして科学研究費補助金・若手研究 A (H20-22, 課題番号 20689028) の中で、HIF2A がコラーゲン分解酵素 MMP13 や血管誘導分子 VEGF、軟骨内骨化促進分子 Runx2、IHH などを広く誘導し、マウスだけでなくヒトにおいても変形性関節症の発症・進行に強く関与していることを解明した (*Nat Med* 16:678-86, 2010) 。

一方 HIF2A のホモログである HIF1A は軟骨基質を誘導し、軟骨細胞の生存にも重要な役割を果たすことが以前から知られており (*Genes Dev* 15:2865-76, 2001) 関節軟骨にとっても保護的な作用を持つと考えられている。また、HIF1A は低酸素状態で安定化・活性化されるが、HIF2A の軟骨変性作用には低酸素は重要でなく、種々の炎症性サイトカインや物理的ストレスの伝達シグナルである NF- κ B によって強く誘導される (*Nat Med* 16:678-86, 2010) など、HIF1A と HIF2A は軟骨において全く異なる役割を持つことが分かってきた。

HIF2A が変形性関節症の強力な促進分子であることは申請者らと同時に韓国のグループからも報告され (*Nat Med* 16:687-93, 2010) 。HIF シグナルは関節軟骨の保持と変性を制御するマスターシグナルとして変形性関節症研究の分野で世界中の注目を集めている。また申請者らはドミナントネガティブフォームの HIF2A をアデノウイルスベクターでマウス膝関節内投与を行うことによって軟骨変性の進行が有意に抑制できることを基礎検討によって確認しており、HIF シグナルは画期的な治療標的となる可能性を有している。

2. 研究の目的

変形性関節症を促進的に制御するマスター転写因子 hypoxia-inducible factor 2 (HIF2A) と、軟骨保持・形成作用を持つ HIF1A について、最新の *in vivo* システムを用いて関節軟骨における作用を詳細に分析するとともに、HIF を取り巻くシグナル群を最先端の分子生物学的手法で網羅的に解析し、安全かつ有効な治療標的を探索する。得られた治療標的候補について培養軟骨細胞、さらにマウスモデル上でも治療効果の検討を行い、変形性関節症の新規治療法の実現化を総合的に加速する。

3. 研究の方法

HIF1A と HIF2A の関節軟骨の保持と変性への関わりを生理的な条件下で解明すべく、それぞれの組織・時期特異的ノックアウトマウスとトランスジェニックマウスについて変形性関節症モデルを作成、解析する。関節軟骨における両者の標的分子群を解明するために ChIP-seq による解析を行う。また得られた HIF シグナルの関連候補分子群について、*in vivo* の発現解析にて整合性を検証するとともに、マウス・ヒト培養軟骨細胞を用いて HIF シグナルへの干渉作用を検討し、有望なものについてはマウスモデル上での治療効果検討を行う。具体的には以下の通りである。

(1) 組織・時期特異的ノックアウトマウスを用いた変形性関節症モデルの解析

研究協力者である E. Schipani 氏から提供された HIF1A-*fllox*, HIF2A-*fllox* マウスと、F. Long 氏から提供されたタモキシフェン誘導性 Col2a1-*cre* マウス (Col2a1-*cre*^{ER^{T2}}) を交配させ、骨格の成長が終わった時点から各遺伝子を軟骨特異的にノックアウトし、変形性関節症モデルを作成して関節軟骨の保持と変性について組織学的に詳細に検証する。

(2) 組織・時期特異的トランスジェニックマウスを用いた変形性関節症モデルの解析

HIF1A と HIF2A のそれぞれに biotin 化タグと Flag タグを組み込んだ *cre* 誘導性トランスジェニックマウス (CAG-EGFP-HIF1A, CAG-EGFP-HIF2A) の作成を開始する。樹立後は Col2a1-*cre*^{ER^{T2}} マウスと交配させて、骨格の成長が終わった時点から各遺伝子を軟骨特異的に過剰発現させ、変形性関節症モデルを作成して関節軟骨の保持と変性について組織学的に詳細に検証する。

(3) エピゲノムの手法を用いた HIF の標的分子群の網羅的検索

(2) のマウスのトランスジーンにあらかじめ組み込んだ biotin 化タグと Flag タグを利用して、正常および変性関節軟骨細胞において ChIP-seq を行い、同時に cDNA マイクロアレイも行う。これらの解析結果から、HIF1A と HIF2A がそれぞれ標的とする遺伝子群をより正確に把握することが可能となる。

(4) 候補分子を標的とした、in vivoでの治療効果検討

候補分子群の中に HIF シグナルを選択的かつ強力に制御しうる標的分子・シグナルが得られれば、これらを干渉する siRNA、低分子化合物、抗体などを探索あるいは作成し、モデルマウスの膝関節内に投与することによって OA に対する治療効果を in vivo で検討する。特に siRNA を膝関節内に投与する実験においては研究協力者の有するミセル担体技術を導入する。

4. 研究成果

Col2a1-Cre-ERT2;Hif1a-f1/f1 マウスでは関節軟骨の変性が著明に促進された。反対に Col2a1-Cre-ERT2;Hif2a-f1/f1 マウスでは関節軟骨の変性はおおむね抑制された。前者の組織学的解析によって Mmp13 などの軟骨基質分解酵素群の発現が著明に亢進しており、アポトーシスの亢進もみられた。

そこで関節形成期における Hif1a の役割も解析すべく Sox9-Cre と交配させたところ、胎児骨端軟骨中央から関節面に抜ける巨大な陥凹が生じ、関節軟骨形成が著しく障害された。Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl} の関節軟骨から直接 mRNA を回収してマイクロアレイおよびリアルタイム RT-PCR で解析すると、Mmp13、Mmp9 やアポトーシス関連分子の発現が増加し、Col2a1、Sox9 が減少していた。マウス初代関節軟骨細胞において、siRNA で HIF-1 を抑制すると Mmp13、Mmp9 の発現は増加し Col2a1、Sox9 は減少したが、Lentivirus で HIF-1 を軟骨前駆細胞株 ATDC5 に安定導入するとこれらの発現は反対の動きを示した。さらに 3 週齢マウス大腿骨頭を採取し CoCl₂ で HIF-1 を安定化させて器官培養するとアグリカンの放出が抑制され、また cKO マウスの大腿骨頭を器官培養すると放出は亢進した。

In vivo での HIF1A、HIF2A の機能亢進系を構築すべく、Cre 誘導性のトランスジェニックマウスを作成したが、Hif1a については良好な発現をみせるラインを得ることができなかった。Hif2a については Cre 依存的に良好な発現をみせるラインを得ることができたが、平成 25 年度末の時点でまだ変形性関節症モデルを解析するに至っていない。また当初はこれらの cDNA の 3 末端に FLAG タグ、Biotin 化タグを付加して ChIP シーケンスに供する予定であったが、3 末端のタグ付加によって本来の Hif の機能が半減することが予備実験で判明したため、トランスジェニックマウス作成はタグなしで行った。

次に Hif1a、Hif2a について、FLAG タグを付加した cDNA をレンチウイルスで軟骨細胞株 ATDC5 に安定導入し、抗 FLAG 抗体を用いて ChIP シーケンスを行った。マイクロアレイで明らかとなった発現変動遺伝子群の多くに

Hif1a の結合がみられたことから、現在その発現制御のメカニズムの解析を行っている。

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)

[雑誌論文](計 14 件)

- 1) Mori Y, Saito T, Chang SH, Kobayashi H, Ladel CH, Guehring H, Chung UI, Kawaguchi H. Identification of fibroblast growth factor-18 as a molecule to protect adult articular cartilage by gene expression profiling. *J Biol Chem*. 289:10192-200,2014.
- 2) Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, Nakagawa M, Kumano K, Arai S, Kobayashi H, Saito T, Iwakura Y, Kurokawa M. Positive feedback between NF-κB and TNF-α promotes leukemia-initiating cell capacity. *J Clin Invest*. 124:528-42,2014.
- 3) Saito T, Yano F, Mori D, Ohba S, Hojo H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Tanaka S, Chung UI, Kawaguchi H. Generation of Col2a1-EGFP-iPS cells for monitoring chondrogenic differentiation. *PLoS ONE* 8:e74137,2013.
- 4) Kobayashi H, Hirata M, Saito T, Itoh S, Chung UI, Kawaguchi H. Transcriptional induction of ADAMTS5 by an NF-κB family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. *J Biol Chem*. 288:28620-9,2013.
- 5) Yano F, Hojo H, Ohba S, Saito T, Honnami M, Mochizuki M, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Cell-sheet technology combined with a thienopyridazine derivative small compound TD-198946 for cartilage regeneration. *Biomaterials*. 34:5581-7,2013.
- 6) Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K,

- Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI. Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J Biol Chem.* 288:9924-32,2013.
- 7) Hosaka Y, **Saito T (equally contributed)**, Sugita S, Hikata T, Kobayashi H, Fukai A, Taniguchi Y, Hirata M, Akiyama H, Chung UI, Kawaguchi H. Notch signaling in chondrocytes modulates endochondral ossification and osteoarthritis development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:1875-80,2013.
- 8) Yano F, **Saito T (equally contributed)**, Ogata N, Yamazawa T, Iino M, Chung UI, Kawaguchi H. β -catenin Regulates PTH/PTHrP Receptor Signals and Chondrocyte Hypertrophy through Binding to Its Intracellular C-terminal Region. *Arthritis Rheum.* 65:429-35,2013.
- 9) Yano F, Hojo H, Ohba S, Fukai A, Hosaka Y, Ikeda T, **Saito T**, Hirata M, Chikuda H, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. A novel disease-modifying osteoarthritis drug targeting Runx1. *Ann Rheum Dis.* 72:748-53,2013.
- 10) Hojo H, Ohba S, Yano F, **Saito T**, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Gli1 Protein Participates in Hedgehog-mediated Specification of Osteoblast Lineage during Endochondral Ossification. *J Biol Chem.* 287:17860-9, 2012.
- 11) Itoh S, **Saito T**, Hirata M, Ushita M, Ikeda T, Woodgett JR, Algül H, Schmid RM, Chung UI, Kawaguchi H. GSK-3 α and GSK-3 β proteins are involved in early stages of chondrocyte differentiation with functional redundancy through RelA protein phosphorylation. *J Biol Chem.* 287:29227-36, 2012.
- 12) Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, **Saito T**, Yano F, Ikeda T, Mabuchi A, Sapkota BR, Akune T, Nishida N, Yoshimura N, Nakagawa T, Tokunaga K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. C/EBP β and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 α as the inducer in chondrocytes. *Hum Mol Genet.* 21:1111-23, 2012.
- 13) Fukai A, Kamekura S, Chikazu D, Nakagawa T, Hirata M, **Saito T**, Hosaka Y, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Lack of a chondroprotective effect of cyclooxygenase 2 inhibition in a surgically induced model of osteoarthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 64:198-203, 2012.
- 14) Ishiyama N, Moro T, Ohe T, Miura T, Ishihara K, Konno T, Ohya T, Yoshikawa M, Kyomoto M, **Saito T**, Nakamura K, Kawaguchi H. Reduction of peritendinous adhesions by hydrogel containing biocompatible phospholipid polymer MPC for tendon repair. *J Bone Joint Surg Am.* 93:142-9, 2011.

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1) 齋藤琢：軟骨における Notch シグナルの役割 第 27 回日本軟骨代謝学会、京都、2014.2.28
- 2) 齋藤琢：HIF による関節軟骨の変性メカニズム 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会、千葉、2013.10.18
- 3) 齋藤琢 他：軟骨分化モニタリングのための Col2a1-EGFP-iPS 細胞の樹立 第 12 回日本再生医療学会総会、横浜、2013.3.23

研究者番号：

- 4) 齋藤琢：変形性関節症の分子メカニズムの解明 第 12 回日本再生医療学会総会、横浜、2013.3.22
- 5) 齋藤琢：マウスモデルをベースにした変形性関節症の分子メカニズムの解明 第 30 回日本骨代謝学会、東京、2012.7.20
- 6) 齋藤琢：軟骨再生医療への新たな取り組み 第 30 回日本骨代謝学会、東京、2012.7.19

〔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
<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 琢 (SAITO TAKU)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：30456107

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()