

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390348

研究課題名(和文) 関節軟骨細胞の分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms underlying the differentiation of articular cartilage

研究代表者

小野 貴司 (Ono, Takashi)

東京大学・医学部附属病院・届出診療医

研究者番号：00506248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：関節軟骨で成長板軟骨に比して発現が大きい遺伝子を多数同定した。それらの中で、Fgf18は軟骨マトリクス分解酵素を阻害する作用を持つTimp1の発現を亢進させ、関節軟骨を保護する事を見出した。また、凍結切片からlaser microdissection(LMD)により関節軟骨の微小領域のサンプリングを行い、次世代シーケンサーを用いて遺伝子発現解析を行う一連の手法を確立した。関節軟骨は数層から成るが、この方法によって、各層毎の遺伝子発現の違いを調べた。

研究成果の概要(英文)：We identified many genes with higher expression in articular cartilage than in growth plate cartilage. Among them, Fgf18 was found to protect articular cartilage through the upregulation of Timp1, which has an inhibitory effect on matrix degrading enzymes. In addition, we established a series of experimental methods of sampling a minute region of articular cartilage from cryosections using laser microdissection (LMD), and then analyzing the gene expression profiles with a next generation sequencer. Using these means, we examined differences in the profiles among several layers which comprise articular cartilage.

研究分野：整形外科

キーワード：関節軟骨 変形性関節症 FGF18

### 1. 研究開始当初の背景

高齢人口の増加によって変形性関節症の患者数は増え続けているが、その発症メカニズムの詳細は不明なままであった。我々のグループは従来から変形性関節症の基礎研究を行っており、今までに軟骨代謝研究の発展に寄与する多くの成果を挙げてきた。

我々は軟骨変性病態の研究活動を通じて変形性関節症の発症や進行の予防につながる研究成果を挙げてきたが、同時にそれだけでは変性が進んだ関節を修復・再生させる方法には直接つながらないという限界にも直面した。

### 2. 研究の目的

変性した関節軟骨を正常な状態に戻すためには関節軟骨がどのようなメカニズムで正常な状態を維持しているのかを知る必要がある。また再生医療において成熟した関節軟骨を作るためには、関節軟骨細胞がどのようにして未成熟な軟骨細胞から分化・形成されるのかを知る必要がある。本研究は、まず、関節軟骨や関節軟骨の中の層毎の遺伝子発現プロファイルを調べる事から始め、それらにおいて特徴的に発現している遺伝子の機能を解析する事で、関節軟骨の形成・維持のメカニズムを調べるという方針で遂行した。こうして得られた知見を関節軟骨の再生・あるいは関節症病態の治療へと応用する事が本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

(1) infant および adult rat で、それぞれ関節軟骨と成長板軟骨(図1)の初代培養細胞を採取し、マイクロアレイで網羅的に遺伝子発現を比較し、さらに real-time RT-PCR で発現パターンの確認を行った。

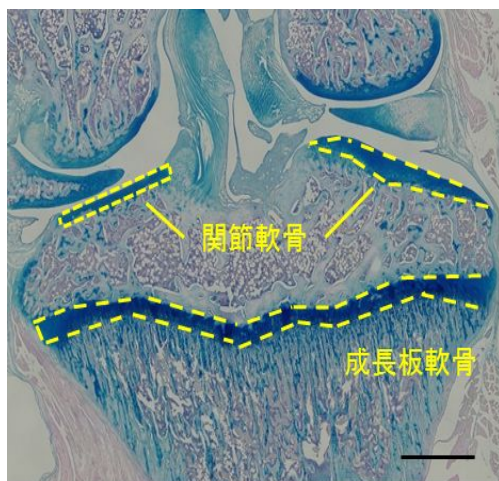


図1 関節軟骨と成長板軟骨

(2) adult rat の膝関節を採取し、固定・脱灰のち薄切した。それを用いて Fgf18 のタンパクレベルでの発現パターンを組織免疫染色で調べた。

(3) ヒトリコンピナント FGF18(rhFGF18)をマウス大腿骨頭に投与し、DMMB assay で硫酸化グリコサミノグリカンの分解量を調べた。また、Sensolyte Generic MMP Activity Kit を用いてマトリクス分解酵素である MMP の活性を調べた。さらに、マウスの大腿骨頭および初代培養軟骨細胞に rhFGF18 を投与したのち RNA を回収し、real-time RT-PCR で軟骨分解関連遺伝子の発現変化を調べた。ウェスタンブロットにより、rhFGF18 投与による Timp1 の発現量の変化をみた。rhFGF18 に加え抗 Timp1 中和抗体を投与した際の硫酸化グリコサミノグリカンの分解量・MMP 活性の変化も同様にして調べた。

(4) 川本法によって adult rat の凍結切片を作製し、LMD(laser microdissection)を行って関節軟骨の最表層(Superficial zone, SFZ)とそれより深い層(Deeper Articular Cartilage, Deeper AC)のサンプルを採取した。RNA 精製・増幅のち、RNA-seq によって両者の遺伝子発現プロファイルを比較した。また、両者で発現の差の大きかった遺伝子について real-time RT-PCR を行って RNA-seq の結果の妥当性を検討した。以上の一連の手法は、今回の研究を通じ我々が独自に開発したものである。

### 4. 研究成果

(1) マイクロアレイによる遺伝子発現の比較により、関節軟骨で成長板軟骨に比して発現が亢進している遺伝子を多数同定し、real-time RT-PCR で発現パターンの確認を行った。その結果、adult の関節軟骨で成長板軟骨に比して発現亢進している遺伝子を 40 個、infant の関節軟骨で成長板軟骨に比して発現亢進している遺伝子を 186 個、adult・infant 双方の関節軟骨で発現亢進している遺伝子を 16 個同定した。

(2) (1)で adult・infant 双方で、関節軟骨で成長板軟骨に比して発現が亢進していると判明した Fgf18 について、組織免疫染色を行った。これにより、タンパクレベルでも Fgf18 は関節軟骨で成長板軟骨でよりも強く発現していると確認できた(図2)。

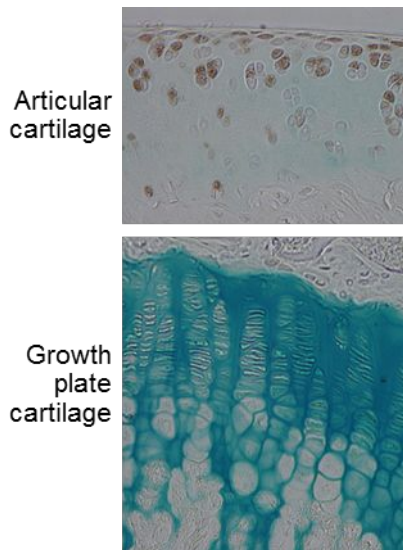


図 2 抗 Fgf18 抗体を用いた免疫染色

(3) real-time RT-PCR による解析の結果、大腿骨頭でも初代培養軟骨細胞でも、rhFGF18 の投与によって、軟骨マトリクス分解酵素を阻害する作用を持つ Timp1 の発現が著しく亢進していた(図 3)。ウェスタンブロットでも rhFGF18 投与後に Timp1 の発現が亢進していた。

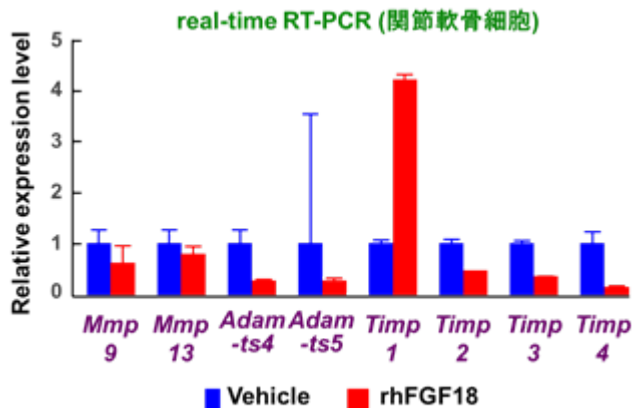


図 3 軟骨代謝関連遺伝子の発現変化

硫酸化グリコサミノグリカンの分解・及び MMP 活性は rhFGF18 投与によって低下したが、さらに抗 Timp1 中和抗体を加えると rhFGF18 による効果は減弱した(図 4)。このことから、Fgf18 は Timp1 の発現亢進を介した関節軟骨保護作用をもつ可能性が示唆された(図 4)。

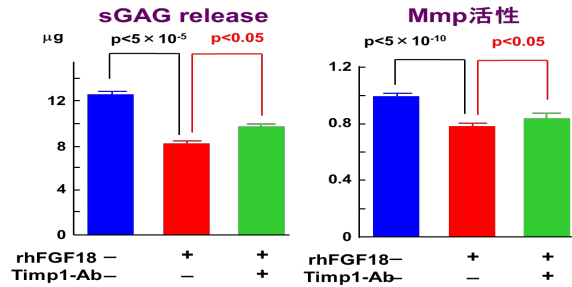


図 4 rhFGF18 投与が軟骨分解に与える影響

(4) 川本法により作製した凍結切片から、LMD によって SFZ、Deeper AC の組織を採取した(図 5)。RNA-seq による解析の結果、SFZ で Deeper AC に比して 4 倍以上発現亢進している遺伝子を 133 個、Deeper AC で SFZ に比して 4 倍以上発現亢進している遺伝子を 758 個同定した。

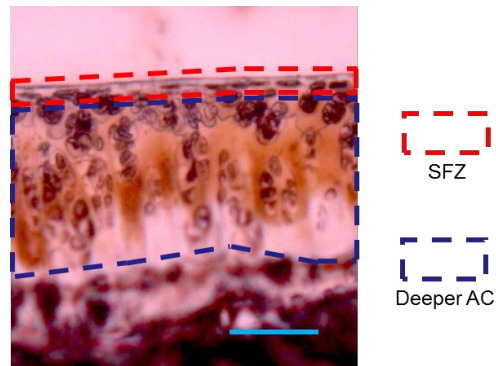
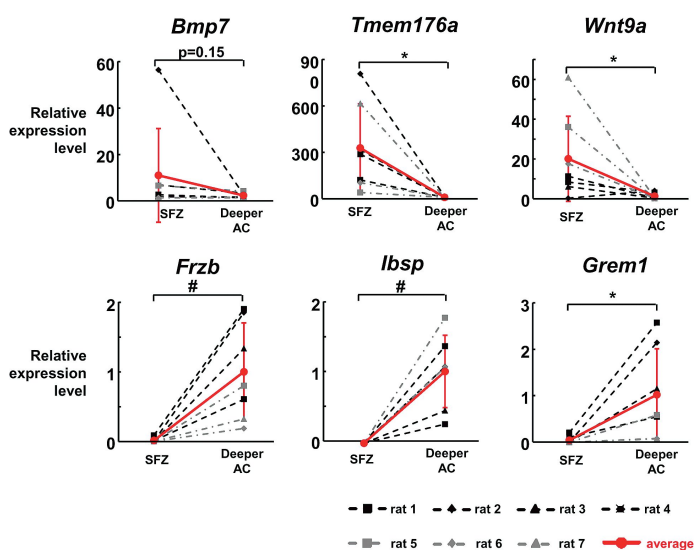


図 5 LMD によるサンプル採取

これらの内、SFZ/Deeper AC 及び Deeper AC/SFZ の発現比がそれぞれ最も大きかった 3 遺伝子(前者が Bmp7, Tmem176a, Wnt9a; 後者が Frzb, Ibsp, Grem1)について、real-time RT-PCR による発現比の確認を行った。その結果、全ての遺伝子で RNA-seq と同様の遺伝子発現パターンがみられ、我々の実験技術の妥当性が示された。



**図 6 real-time RT-PCR による  
発現パターンの確認**

#### 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 11 件)

Hirohiko Inanami, Yasushi Oshima, (他 4 名, 2 番目). Role of <sup>18</sup>F-fluoro-D-deoxyglucose PET/CT in diagnosing surgical site infection after spine surgery with instrumentation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2015 Jan 15;40(2):109-13. (査読有)  
DOI: 10.1097/BRS.0000000000000674.

Junichi Ohya, Yasushi Oshima, (他 6 名, 2 番目). Patient satisfaction with double-door laminoplasty for cervical compression myelopathy. *J Orthop Sci*. 2015 Jan;20(1):64-70. (査読有)  
DOI: 10.1007/s00776-014-0666-4.

Hiroshi Inui, (他 4 名, 1 番目). Twice cutting method reduces tibial cutting error in unicompartmental knee arthroplasty. *Knee*. 2014 Dec 7. pii: S0968-0160(14)00283-X. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.knee.2014.11.015.

Yoshifumi Mori, (他 3 名). Determination of differential gene expression profiles in superficial and deeper zones of mature rat articular cartilage using RNA sequencing of laser microdissected tissue specimens. *Biomed Res*. 2014;35(4):263-70. (査読有)  
DOI: 10.2220/biomedres.35.263

Hideki Nakamoto, Yasushi Oshima, Takashi Ono, (他 4 名, 2 番目, 5 番目). Usefulness of QuickDASH in patients

with cervical laminoplasty. *J Orthop Sci*. 2014 Mar;19(2):218-22. (査読有)  
DOI: 10.1007/s00776-013-0515-x.

Yoshifumi Mori, (他 8 名). Identification of Fibroblast Growth Factor-18 as a Molecule to Protect Adult Articular Cartilage by Gene Expression Profiling. *J Biol Chem*. 2014 Apr 4;289(14):10192-200. (査読有)

DOI: 10.1074/jbc.M113.524090.

Yoshitaka Matsubayashi, Yasushi Oshima, (他 8 名, 4 番目). Validity and reliability of the Japanese version of the painDETECT questionnaire: a multicenter observational study. *PLoS One*. 2013 Sep 30;8(9):e68013. (査読有)  
DOI: 10.1371/journal.pone.0068013.

Hiroshi Inui, (他 5 名, 1 番目). An additional reference axis improves femoral rotation alignment in image-free computer navigation assisted total knee arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2013 May;28(5):766-71. (査読有)

DOI: 10.1016/j.arth.2013.01.030.

Katsushi Takeshita, Yasushi Oshima, Takashi Ono, (他 8 名, 6 番目, 7 番目). Validity, reliability and responsiveness of the Japanese version of the Neck Disability Index. *J Orthop Sci*. 2013 Jan;18(1):14-21. (査読有)  
DOI: 10.1007/s00776-012-0304-y.

Takashi Ono, (他 2 名, 1 番目). Defining 2 components of shoulder imbalance: clavicle tilt and trapezial prominence. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012 Nov 15;37(24):E1511-6. (査読有)  
DOI: 10.1097/BRS.0b013e31826e2bbb.

Yasushi Oshima, Takashi Ono, (他 9 名, 1 番目, 5 番目). Natural course and prognostic factors in patients with mild cervical spondylotic myelopathy with increased signal intensity on T2-weighted magnetic resonance imaging. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012 Oct 15;37(22):1909-13. (査読有)  
DOI: 10.1097/BRS.0b013e318259a65b.

[学会発表](計 3 件)

Yoshifumi Mori, et al. Identification Of Fibroblast Growth Factor-18 as a Molecule to Protect and Regenerate Articular Cartilage. 2013 Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress, 45, Philadelphia, USA, April 18-21, 2013

森芳史, 他 FGF18 は変形性関節症の発症・進行を抑制する. 第 12 回日本再生医

療学会, 0-37-4, 横浜, 3月, 2013  
森芳史, 他 F g f 18 は関節軟骨を保護し  
再生する因子である. 第 26 回日本軟骨  
代謝学会, 0-29, 大阪, 3月, 2013

〔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:  
出願年月日:  
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

小野 貴司 (ONO, Takashi)  
東京大学・医学部附属病院・届出診療医  
研究者番号: 00506248

### (2) 研究分担者

大島 寧 (OSHIMA, Yasushi)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 50570016

乾 洋 (INUI, Hiroshi)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 60583119