

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390352

研究課題名(和文) ルブリシンを標的とした関節表層特異的遺伝子発現制御及びメカノセンシング機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular and mechanosensitive mechanisms on lubricin-targeted gene expression specific to the surface of joint

研究代表者

山本 浩司 (YAMAMOTO, KOJI)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・特定准教授

研究者番号：70536565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：ルブリシンをエンコードするProteoglycan 4 (Prg4)のプロモーターにより蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変マウス(Prg4-RFP-Tg)を作製し、変形性関節症における発現動態を調べ、極初期にPrg4の発現低下を認めた。また、Prg4-RFP-Tg;Sox9-EGFPマウスの蛍光発現軟骨細胞をFACSで選別し、マイクロアレイにより関節表層の遺伝子プロファイルを得た。これらの結果を元にPrg4-Creマウスで表層特異的に遺伝子を欠失させると関節軟骨に異常を認めた。さらにPrg4発現に影響を与え得るプロモーター領域を同定しメカニカルストレス下におけるPrg4発現との関係性を調べた。

研究成果の概要(英文)：In vivo observation of Prg4, which encodes lubricin, using Prg4-RFP-Tg mice with the experimental osteoarthritis model showed that the expression of RFP on the cartilage surface was attenuated immediately after surgical operation. In addition, by using articular chondrocytes derived from Prg4-RFP-Tg;Sox9-EGFP mice, joint surface-specific gene expression profile was constructed through FACS and DNA microarray analyses. On the basis of these results, conditional gene deletion using Prg4-Cre mouse revealed an abnormal joint development. Furthermore, we identified a candidate region in the Prg4 promoter sequence associated with Prg4 expression and investigated molecular and mechanosensitive mechanisms on lubricin-targeted gene expression.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：ルブリシン Prg4 変形性関節症 メカノセンシング 関節表層遺伝子 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

我が国は高齢者社会を迎え、高齢者の日常生活動作や Quality of life の向上は社会的にも重要なテーマである。現在の変形性関節症の治療は疼痛に対する対症療法や運動療法が中心であり、保存的治療としては、ヒアルロン酸の関節内注射があるのみで、発症予防や軟骨変性からの保護、潤滑機能の恒常的な回復を目指した治療法は確立されていない。

我々はこれまで、軟骨発生過程において転写因子 Sox9 に着目し、conditional targeting、knock-in、transgenic などの遺伝子改変マウス技術を用いて、Sox9 が軟骨細胞の増殖、分化および軟骨基質産生に必須のマスター遺伝子として機能していることを明らかにし (Akiyama, Genes Dev., 2002; Akiyama, Genes Dev., 2004)、また Sox9 の型コラーゲン転写の分子メカニズムを解明してきた (Yamamoto, Nat Commu, 2011)。Sox9 を関節軟骨で過剰発現させたマウスは、軟骨基質の分解酵素である Mmp13 の遺伝子発現が野生型に比べて抑制されたことから (Kim et al., JBMM, 2010)、Sox9 が軟骨細胞の増殖や分化、マトリックス産生に寄与し、かつ変形性関節症の病態進行を抑制する有用な治療ターゲットとなることを報告している。しかし、初期の変形性関節症は関節表層における潤滑機能の破綻にも起因しており、関節軟骨層の基質産生だけではなく関節表層の分子機構を明らかにする必要がある。そこで我々は関節表層特異的に発現し潤滑機能に対して重要な機能を有する因子、ルブリシンに着目している。

ルブリシンは水和機能に富むムチン様ドメインを持ち、関節軟骨の低摩擦潤滑機能を司っている。変形性関節症の病態が進行すると膝関節滑液中のルブリシン濃度が減少するなどルブリシンのバイオマーカーとしての有用性も報告されているが (Catterall et al., AR&T, 2010)、関節表層においてどのような分子機構を介して発現するのかが解明されていない。また、ルブリシンの発現はせん断的なメカニカルストレスによって誘導されるが (Nugent et al., A&R, 2006)、組織発現と同様の分子機構を介して制御されるのかも未知である。そこで我々は、ルブリシンをエンコードする Proteoglycan 4 (Prg4) のプロモーターで Red Fluorescent Protein (RFP) を発現誘導するトランスジェニックマウス (Prg4-RFP-Tg) を作製し (未発表)、Prg4 の発現動態を共焦点レーザー顕微鏡や多光子励起レーザー顕微鏡によって時間的、空間的に可視化できるシステムを構築した。本システムを用いて、生体内で Prg4 の発現動態を明らかにし、メカニカルストレスに対する分子応答メカニズムの解明を目指す。

2. 研究の目的

ルブリシンは関節軟骨表層に発現し、ヒアルロン酸とともに低摩擦潤滑機能を司っており、変形性関節症などへの治療効果が期待されている。しかし、ルブリシンの関節表層での発現機構やメカニカルストレスに対する分子メカニズムは明らかにされていない。そこでまず本研究では、ルブリシンをエンコードする Proteoglycan 4 (Prg4) のプロモーターによって蛍光タンパク質の発現を誘導する遺伝子改変マウスを用いて、メカニカルストレスによって惹起された変形性関節症における Prg4 の発現動態を明らかにする。次に、関節表層の蛍光発現細胞を FACS により選定し、マイクロアレイを用いて関節表層特異的遺伝子発現を網羅的に解析することで、生体内における Prg4 の分子発現機構に関する知見を得る。さらに in vitro で軟骨細胞にメカニカルストレスを負荷し、Prg4 発現の分子発現機構を検討することで、関節軟骨における Prg4 の発現メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 変形性関節症モデルでの Prg4 発現解析
Prg4-RFP-Tg マウスと Sox9 遺伝子座に enhanced green fluorescent protein (EGFP) をノックインしたマウス (Sox9-EGFP) (Yamamoto, Nat Commu, 2011) を交配し、マクロ共焦点レーザー顕微鏡によって軟骨基質と関節表層の変性または再生に伴う Prg4、Sox9 の分子発現動態を解析する。生後 2 カ月齢の Prg4-RFP-Tg; Sox9-EGFP マウスを用いて、内側側副靭帯および内側半月板切除を行い、膝関節に過度なメカニカルストレスを施した変形性関節症 (OA) モデルを作製した。術後 1 週間以内の各日、および 2 週、4 週目における蛍光発現の解析および EDTA 脱灰後におけるパラフィン切片を用いた組織解析を行った。
- (2) マイクロアレイによる関節表層特異的遺伝子発現解析
Prg4-RFP-Tg; Sox9-EGFP マウスおよびリファレンス用に Prg4-RFP-Tg; wt, wt; Sox9-EGFP, wt マウスを用意し、生後 2 カ月齢の大腿骨骨頭および肩関節骨頭部位から 0.25% トリプシン-EDTA 処理、コラーゲナーゼ処理を経て軟骨細胞を採取した。Prg4-RFP-Tg; Sox9-EGFP マウスの軟骨細胞を対象として、RFP+; EGFP-、RFP-; EGFP+、RFP+; EGFP+ の細胞を FACS によりソーティングし、Affymetrix 社 GeneChip マイクロアレイによる発現解析を行う。
- (3) 関節表層における分子の機能解析
Prg4-Cre マウスを作製し、マイクロアレイの結果をもとに、Prg4 特異的に遺伝子を欠失させ、関節表層における生体内分子機能の解析を行う。Prg4 特異的遺伝子欠失マウスの生後 1、2、4、8 カ月齢の関節軟骨を摘出し、EDTA 脱灰後、パラフィン包埋し特殊染色および

び免疫染色を行い組織学的に検討した。

(4) メカニカルストレスに対する Prg4 発現メカニズムの検討

軟骨細胞において、せん断力を負荷することによって Prg4 の発現が亢進することが報告されているが、そのメカニズムは明らかでない。そこでまず種々の長さの Prg4 プロモーターおよびレポーター遺伝子を持つ発現ベクターを作製し、Prg4 遺伝子の発現に影響を与えるプロモーター領域の同定を行う。次に、*in vitro* でメカニカルストレスを与えた軟骨細胞の cDNA ライブラリーから酵母ワンハイブリッドを用いて同定したプロモーター領域と相互作用するタンパク質を選定し、Prg4 発現のメカニズムを探る。

4. 研究成果

(1) 図 1 に Prg4-RFP-Tg;Sox9-EGFP マウスの生後 1 カ月齢大腿骨骨頭のマクロ共焦点蛍光画像を示す。図 1 に示すように、RFP は表層付近に発現しており、EGFP とオーバーラップしていない細胞が観察された。この遺伝子改変マウスを用いて、OA モデルを作製した結果、術後 1 ~ 2 日目の早い段階から脛骨荷重関節面において、膝関節前方から後方にかけて広範囲に RFP の発現が低下しており、1 週の時点で RFP および GFP がともに検出できない部位が出現した。一方 Safranin-O 染色を用いたスコアリングでは、術後 2 週目から sham 側に対して OA の亢進を認めた。以上のことから、本モデルのように過度なメカニカルストレスによって誘発された変形性関節症の亢進は、早期に Prg4 の発現が低下(もしくは Prg4 発現細胞の消失)し、関節の潤滑機能が損なわれることに起因していることが示唆された。

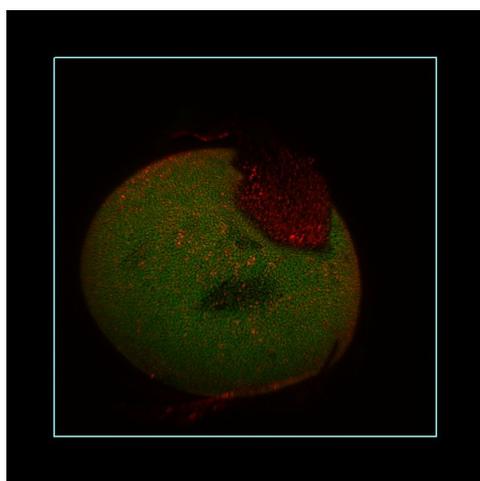


図 1 . マウス大腿骨骨頭のマクロ共焦点蛍光画像(RFP: Prg4、EGFP: Sox9)

(2) 図 2 にコラゲナーゼ処理前後の大腿骨骨頭を用いた RFP 発現画像を示す。酵素処理の条件を最適化することでほぼ関節軟骨表

層近傍の細胞が回収可能であった。これらの軟骨細胞を用いて FACS を行った結果、蛍光発現が検出された細胞のうち、約 0.5%が RFP+;EGFP-、3.5%が RFP+;EGFP+の細胞であり、大部分は RFP-;EGFP+の細胞であった。これらの細胞からそれぞれ mRNA を抽出し、Affymetrix 社の GeneChip マイクロアレイを用いた遺伝子発現比較を行った。酵素処理などの条件を変えて検討した結果、最も感度よく選別できた RFP+;EGFP-と RFP-;EGFP+細胞において、Prg4 遺伝子の発現が RFP+側で約 2.7 倍程度であった。一方、EGFP+側の細胞で相対的に高い値を示したのは Col9a1 や Runx2 など(ともに約 30 倍程度)の骨形成関連遺伝子が多く含まれることから、RFP+の細胞群は肥大軟骨層など軟骨下層部位をほとんど含んでいないと考えられる。実際、RFP+;EGFP+と RFP-;EGFP+の比較において、Sox9 の発現は前者の方が約 8 倍程度高い値を示した。これらの発現プロファイルをもとに、RFP+;EGFP+と RFP-;EGFP+の比較において、RFP+細胞において Tgfr1 遺伝子は約 6 倍の値を示し、リガンドである Tgfb1 は約 30 倍であった。TGF_Beta_Signaling_Pathway に含まれる他の遺伝子を比較すると、例えば Tgfr2 は約 4 倍、Tgfr3 は約 2.4 倍の値を示した。

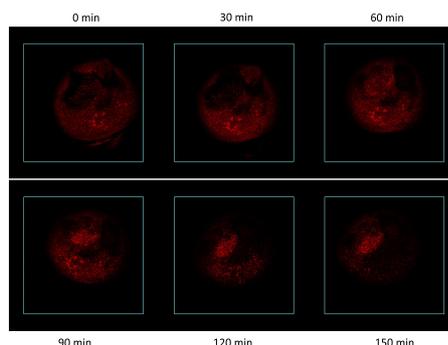


図 2 . 酵素処理による RFP 発現変化

(3) Prg4 プロモーター下に Cre recombinase を発現する Prg4-Cre マウスを作製し、関節表層における Prg4 の分子機能解析を行った。Prg4-Cre マウスと Rosa26 reporter マウスを交配し、生後 2 カ月のマウス関節軟骨凍結切片を用いて X-gal 染色を行ったのが図 3 の画像である。関節軟骨表層近傍に LacZ 陽性細胞が存在していることがわかる。マイクロアレイのデータから明らかとなった Tgf beta シグナルに関連する Tgfr2 flox マウスと交配することで、Prg4 特異的に Tgf beta シグナルを欠失させた。その結果、生後 1 カ月の時点で dwarfism が見られ(図 4)、生後 8 カ月においてもその傾向は維持されていた。パラフィン切片による組織学

的解析を行うと、異所的に肥大化した軟骨細胞が散見され、軟骨分化に異常をきたした可能性が示唆された。また、Safranin-O染色では $Tgfbr2^{-/-};Prg4-Cre$ マウスにおいて表層近傍の染色性が低下する傾向がみられ、潤滑機能の低減も示唆された。また、関節表層に Wnt/beta-catenin シグナルに關与する遺伝子が多く発現しているという報告があり、beta-catenin の flox マウスを用いた解析も行ったが、マクロ所見において著明な変化は観察されなかった。TGF beta1 は Prg4 遺伝子の発現を亢進させる報告もあり、関節表層における Tgf beta シグナルが関節機能の維持において極めて重要な役割を担っていることが示された。

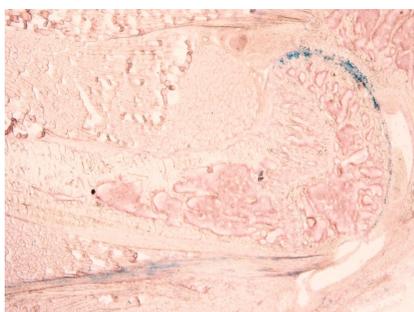


図3 . Prg4-Cre;Rosa26 マウスの膝関節軟骨における X-gal 染色画像

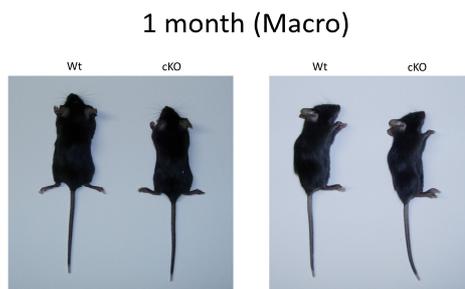


図4 . 生後1カ月齢 $Tgfbr2^{-/-};Prg4-Cre$ (右) マウスと野生型マウス(左)の比較

(4) マウス Prg4 の翻訳開始点を起点に 5' 上流側をクローニングし、種々のプロモーター-長およびレポーター遺伝子を持つコンストラクトを作製した。ルシフェラーゼをレポーターとする pGL4 発現ベクターを ATDC5 細胞および軟骨細胞にリポフェクションし、レポーター活性の変化から Prg4 発現に影響を与え得るプロモーター領域を同定した。次に、*in vitro* で軟骨細胞にせん断力を負荷するバイオリアクターを用いて (Yamamoto, TROL, 2008) 軟骨細胞培養を行った。軟骨細胞は胎生期の肋軟骨と生後の関節軟骨で機械刺激

に対する応答性が異なる傾向にあり、Prg4 遺伝子の発現変化割合から関節軟骨由来の細胞を用いた。現在上記のバイオリアクターを用いた Prg4-RFP-Tg マウス軟骨細胞の培養から cDNA ライブラリーを作製し、Clontech 社 Matchmaker™ Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System によって、同定したプロモーター領域に相互作用するタンパク質の同定を実施している。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山本 浩司 (YAMAMOTO KOJI)
京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・特定准教授
研究者番号：7 0 5 3 6 5 6 5

(2)研究分担者

秋山 治彦 (AKIYAMA HARUHIKO)
岐阜大学・医学部・教授
研究者番号：2 0 3 1 4 1 9 8

妻木 範行 (TSUMAKI NORIYUKI)
京都大学・iPS 細胞研究所・教授
研究者番号：5 0 3 0 3 9 3 8

(3)連携研究者

なし