

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592222

研究課題名(和文)変形性関節症の治療標的探索を目的としたNotchシグナル活性化機構の解明

研究課題名(英文)Analyses of Notch signaling pathway in osteoarthritis

## 研究代表者

武富 修治 (Taketomi, Shuji)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70570018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症におけるNotch関連分子の発現パターンをマウス関節軟骨細胞にて測定したところ、Notchシグナルの上流に位置するAdam10,17は強く発現していた。siRNAをもちいてこれらの遺伝子をノックアウトしたところ、分化誘導過程において後期分化が抑制されることが分かった。下流としては転写因子Hes1がAdamts5、Mmp13を誘導することにより軟骨破壊を進行させることが判明した。Hes1の過剰発現系を用いてマイクロアレイを行ったところ、炎症性サイトカインであるIL6や、IL33受容体として知られるIL1RL1の発現も誘導されていた。

研究成果の概要(英文)：Adam10 and Adam17 were abundantly expressed during articular cartilage degeneration of mouse osteoarthritis model. When we suppressed them by their specific siRNA, hypertrophic differentiation of chondrocytes was inhibited. As downstream signal, we showed that Hes1 promoted cartilage degeneration by inducing Adamts5 and Mmp13. We further performed microarray analysis and identified IL6 and IL1RL1 as its direct target.

研究分野：整形外科学

キーワード：整形外科学 変形性関節症

## 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は高齢者の生活の質を脅かす口コモティブシンドロームの主たる疾患であり、その患者数は高齢人口の増加とともに増え続けている。しかしながら、そ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、および変性した軟骨の修復・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。

我々は従来より変形性関節症の病態解明のための基礎的研究を続けており、世界に先駆けてマウス変形性関節症モデルを確立する (Osteoarthritis Cartilage 13:632,2005) とともに、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ほか (Arthritis Rheum 54:2462,2006, Nature Med 12:665,2006, PLoS One 4:e4543,2009) 最近では転写因子 HIF2A が軟骨内骨化制御分子 Runx2 や IHH、軟骨基質分解酵素 MMP13、血管誘導因子 VEGF などを広く誘導して、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するなど、変形性関節症の分子背景の解明に多大な業績を上げてきた (Nature Med 16:678,2010)。またこれらの研究と平行して我々は MMP13 のプロモーターを用いたスクリーニングもを行い、その強力な誘導シグナルとして HIF2A とは別に Notch を同定した。

Notch は細胞膜状に存在する受容体であり、隣接細胞のリガンドが結合することによって Notch の細胞内ドメインが切断されて核内に移行し、核内の共役分子 RBPJ と複合体を形成して標的遺伝子の転写を誘導する、という特徴的なシグナル経路を持つ。神経系の発達過程などで重要な役割を果たすことが古くから知られていたが、近年 RBPJ の組織特異的ノックアウトマウスの解析から Notch シグナルが骨格形成において軟骨内骨化を強く制御していることが報告された。

我々はこれら内外の知見を基に基礎検討として軟骨特異的 RBPJ ノックアウトマウスを用いてマウス変形性関節症モデルを作成し、その進行が著明に抑制されることを突き止めた。Notch シグナルの遮断は変形性関節症に対して抑制的な効果が期待される。遮断方法としては、リガンドに対する antagonist の作成や切断酵素の阻害因子の使用などが考えうる。よってこれらのリガンド、切断酵素の軟骨分化および変性に対する機能解析は極めて重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究ではまず軟骨分化におけるこれらのリガンド、ならびに切断酵素の役割を網羅的に解析し、その全貌を明らかにする。さらにその結果から変形性関節症における役割を解明し、最適たりうる治療候補の選定を行う。

## 3. 研究の方法

マウス変形性関節症モデルを用いて Notch リガンド、受容体、その他関連分子の発現を時系列で解析した。

対象遺伝子の flox マウスを軟骨特異的タモキシフェン誘導性 Cre マウス (Col2a1-CreERT2) と交配させ、骨格成長後にタモキシフェンを投与してノックアウトを起こしたのち、内側半月板と内側側副靭帯の切除を行い、変形性関節症を惹起させて検証を行った。

## 4. 研究成果

変形性関節症における Notch 関連分子の発現パターンをマウス関節軟骨細胞にて測定したところ、Notch シグナルの上流に位置する Adam10,17 は強く発現していた。さらに、軟骨分化誘導細胞株である ATDC5 に対して、siRNA をもちいてこれらの遺伝子をノックアウトしたところ、分化誘導過程においての後期分化マーカーである Mmp13、Col10a1 などの発現が抑制されるようになり、これらの遺伝子が後期分化に対して影響を与えうる事が予想された。また、細胞染色においても ATDC5 の石灰化が抑制されている傾向が見られた。これらは、既知の因子である Notch シグナルの中流に位置する Rbpj に対する我々の先行研究の結果と相同した結果となった (Y.Hosaka et al. PNAS 2013 Jan 29;110(5):1875-80)。

次に Notch シグナルの下流に存在する転写因子 Hes1 について検討した。この転写因子は、基質分解酵素である Adamts5、Mmp13 を誘導することにより軟骨破壊を進行させることが判明した。さらに、この Hes1 はリン酸化酵素である Camk2 と共同してこれらの基質分解酵素を誘導していることも判明した。また Notch シグナルが関節軟骨の変性を促進的に制御するメカニズムについて、培養細胞レベルの実験にて、下流の転写因子として Hes1 がほぼ独占的に仲介していることが判明した。Hes1 を軟骨特異的に KO すると Notch シグナルをブロックした場合と同様に変形性関節症の進行は抑制された。その下流として Hes1 の過剰発現系を用いてマイクロアレイを行ったところ、軟骨基質分解酵素 Mmp13、Adamts5 などが誘導されたほか、炎症性サイトカインである IL6 や、IL33 受容体として知られる IL1RL1 の発現も誘導されていた。Hes1 タンパクを標的としたクロ

マチン免疫沈降シーケンスを行ったところ、これらの多くは Hes1 による直接の誘導であることも判明した。Hes1 は転写抑制因子であることから、Hes1 がどのような機構によってこれら標的分子の転写を促進するかを検討したところ、Hes1 はカルモジュリンキナーゼ II と結合し、修飾されることによって転写促進ユニットを形成することも判明した。

#### 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 25 件 )

1. Saito T, Yano F, Mori D, Kawata M, Hoshi K, Takato T, Masaki H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Chung UI, Tanaka S. Hyaline Cartilage Formation and Tumorigenesis of Implanted Tissues Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Biomed Res*. In press.
2. Sugita S, Hosaka Y, Okada K, Mori D, Yano F, Kobayashi H, Taniguchi Y, Mori Y, Okuma T, Chang SH, Kawata M, Taketomi S, Chikuda H, Akiyama H, Kageyama R, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, Ohba S, Saito T. Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112:3080-5, 2015. doi: 10.1073/pnas.1419699112.
3. Tokuyama N, Hirose J, Omata Y, Yasui T, Izawa N, Matsumoto T, Masuda H, Ohmiya T, Yasuda H, Saito T, Kadono Y, Tanaka S. Individual and combining effects of anti-RANKL monoclonal antibody and teriparatide in ovariectomized mice. *Bone Reports*. 2:1-7, 2015.
4. Okuma T, Hirata M, Yano F, Mori D, Kawaguchi H, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Regulation of Mouse Chondrocyte Differentiation by CCAAT/Enhancer-binding Proteins. *Biomed Res*. 36:21-9, 2015. doi: 10.2220/biomedres.36.21.
5. Okada K, Fukai A, Mori D, Hosaka Y, Yano F, Chung UI, Kawaguchi H, Tanaka S, Ikeda T and Saito T. Identification of SCAN domain zinc-finger gene ZNF449 as a novel factor of chondrogenesis. *PLoS One*. 9:e115169, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0115169.
6. Fujiwara S, Hoshikawa S, Ueno T, Hirata M, Saito T, Ikeda T, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S, Ogata T. SOX10 Transactivates S100B to Suppress Schwann Cell Proliferation and to Promote Myelination. *PLoS One*. 9:e115400, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0115400.
7. Omata Y, Yasui T, Hirose J, Izawa N, Imai Y, Matsumoto T, Masuda H, Tokuyama N, Nakamura S, Tsutsumi S, Yasuda H, Okamoto K, Takayanagi H, Hikita A, Imamura T, Matsuo K, Saito T, Kadono Y, Aburatani H, Tanaka S. Genome-wide comprehensive analysis reveals critical cooperation between Smad and c-Fos in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*. 2014. [Epub ahead of print] doi: 10.1002/jbmr.2418.
8. Mori Y, Chung UI, Tanaka S, Saito T. 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*. 35:263-70, 2014.
9. Mori Y, Mori D, Chung UI, Tanaka S, Heierhorst J, Buchou T, Baudier J, Kawaguchi H, Saito T. S100A1 and S100B are dispensable for endochondral ossification during skeletal development. *Biomed Res*. 35:243-50, 2014.
10. Yano F, Ohba S, Hosaka Y, Saito T, Chung UI. Disease-modifying effects of TD-198946 on progressed osteoarthritis in a mouse model. *Ann Rheum Dis*. 73:2062-4, 2014. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205672.
11. Kanke K, Masaki H, Saito T, Komiyama Y, Hojo H, Nakauchi H, Lichtler AC, Takato T, Chung UI, Ohba S. Stepwise Differentiation of Pluripotent Stem Cells into Osteoblasts Using Four Small Molecules under Serum-free and Feeder-free Conditions. *Stem Cell Reports*. 2:751-60, 2014. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.04.016.
12. 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. doi: 10.1074/jbc.M113.524090.
13. Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, Nakagawa M, Kumano K, Arai S, Kobayashi H, Saito T, Iwakura Y, Kurokawa M. Positive feedback between NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  promotes leukemia-initiating cell capacity. *J Clin Invest*. 124:528-42, 2014. doi: 10.1172/JCI68101.

14. 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.
  15. Kobayashi H, Hirata M, Saito T, Itoh S, Chung UI, Kawaguchi H. Transcriptional induction of ADAMTS5 by an NF- $\kappa$ B family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. *J Biol Chem.* 288:28620-9, 2013.
  16. Yano F, Hojo H, Ohba S, Saito T, Honnami M, Mochizuki M, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Cell-sheet technology combined with a thienopyridone derivative small compound TD-198946 for cartilage regeneration. *Biomaterials.* 34:5581-7, 2013.
  17. 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.
  18. 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.
  19. Yano F, Saito T (equally contributed), Ogata N, Yamazawa T, Iino M, Chung UI, Kawaguchi H.  $\beta$ -catenin Regulates PTH/PTHrP Receptor Signals and Chondrocyte Hypertrophy through Binding to Its Intracellular C-terminal Region. *Arthritis Rheum.* 65:429-35, 2013.
  20. 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.
  21. 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.
  22. Itoh S, Saito T, Hirata M, Ushita M, Ikeda T, Woodgett JR, Algül H, Schmid RM, Chung UI, Kawaguchi H. GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  proteins are involved in early stages of chondrocyte differentiation with functional redundancy through RelA protein phosphorylation. *J Biol Chem.* 287:29227-36, 2012.
  23. Missed Medial Malleolar Fracture Associated With Achilles Tendon Rupture: A Case Report and Literature Review. Nakajima K, Taketomi S, Inui H, Nakamura K, Sanada T, Tanaka S. *J Foot Ankle Surg.* 2014 Nov 1. pii: S1067-2516(14)00456-6. doi: 10.1053/j.jfas.2014.09.027
  24. Clinical features and injury patterns of medial collateral ligament tibial side avulsions: "wave sign" on magnetic resonance imaging is essential for diagnosis. Taketomi S, Uchiyama E, Nakagawa T, Takeda H, Nakayama S, Fukai A, Sanada T, Iwaso H. *Knee.* 2014 Dec;21(6):1151-5. doi: 10.1016/j.knee.2014.08.019.
  25. Remnant-preserving anterior cruciate ligament reconstruction using a three-dimensional fluoroscopic navigation system. Taketomi S, Inui H, Sanada T, Nakamura K, Yamagami R, Masuda H, Tanaka S, Nakagawa T. *Knee Surg Relat Res.* 2014 Sep;26(3):168-76. doi: 10.5792/ksrr.2014.26.3.168.
- 〔学会発表〕(計 5 件)
1. Chang SH, Saito T, et al. Identification of Grem1 as a catabolic factor induced by mechanical stress loading in articular chondrocyte. Annual meeting of Osteoarthritis Research Society International. Seattle 2015.4.30
  2. Chang SH, Saito T, et al. Establishment of Surgical Destabilization Model of Mouse Ankle Osteoarthritis. Annual meeting of the Orthopaedic Research Society. Las Vegas, USA 2015.3. 28-31
  3. Chang SH, Saito T, et al. Identification of Grem1 as a catabolic factor induced by mechanical stress loading in articular chondrocyte. Annual meeting of the American Society for bone and mineral research. Houston 2014.9.15
  4. Okada K, Saito T, et al. HIF-1 $\alpha$  IS ESSENTIAL FOR ARTICULAR CARTILAGE HOMEOSTASIS THROUGH INDUCTION OF ANABOLIC FACTORS AND SUPPRESSION OF CATABOLIC

FACTORS. Annual meeting of the American Society for bone and mineral research. Houston 2014.9.16

5. Okuma T, Saito T, et al. Expression and function of CCAAT/enhancer-binding protein family in chondrocytes. Annual meeting of the American Society for bone and mineral research. Houston 2014.9.12

〔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〕

<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

武富 修治 (Taketomi Shuji) 東京大学・  
医学部附属病院・講師  
研究者番号：70570018

### (2)研究分担者

緒方 直史 (Ogata Naoshi) 帝京大学・医  
学部・教授  
研究者番号：10361495

筑田 博隆 (Chikuda Hirotaka) 東京大学・  
医学部附属病院・准教授  
研究者番号：30345219

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