

## 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：24592253

研究課題名(和文) 運動器変性疾患への臨床応用を目指したIKKシグナルの系統的解析

研究課題名(英文) Analyses of IKK signaling pathway in locomotive diseases

## 研究代表者

松原 全宏 (Matsubara, Takehiro)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40361498

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)：IKKファミリー分子の発現をマウス胎児骨格とマウス変形性関節症モデルにて検証したところ、いずれも強く発現していた。NF- $\kappa$ Bシグナルの転写因子Rela/p65の細胞内局在を調べたところ、関節軟骨の変性とともに細胞内に局在が偏ることが確認された。Rela-floxマウスと薬剤誘導性軟骨細胞特異的Creマウスとを交配させ、ヘテロコンディショナルノックアウトマウスとホモコンディショナルノックアウトマウスを作成して、成長後に軟骨特異的に遮断してから変形性関節症モデルを作成したところ、ホモコンディショナルノックアウトマウスでは変形性関節症が促進したがヘテロでは抑制されることが判明した。

研究成果の概要(英文)：IKK family members were highly expressed in the mouse embryonic cartilage and articular cartilage of knee joints of osteoarthritis model mice. RelA, a transcription factor of NF- $\kappa$ B signaling pathway, was translocated from cytoplasm into nucleus in accordance with cartilage degradation. For in vivo analyses, we generated tamoxifen-inducible conditional knockout mice. Notably, osteoarthritis development was enhanced in homo knockout mice, while it was suppressed in hetero knockout mice.

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

近年の日本では少子高齢化が急速に進んでおり、高齢者の要支援・要介護者の増加、およびそれに伴う医療コストの増大が社会問題となっている。厚生労働省の国民生活基礎調査によると、要支援・要介護状態に陥る原因として変形性関節症に代表される軟骨変性を基盤とした関節変性疾患は上位に位置している。そのため関節変性疾患に対する新規の予防・治療法開発は整形外科に課せられた急務と言えるが、変性した関節軟骨を修復・再生する技術は確立されておらず、鎮痛剤や関節内注射、更には人工関節手術など、姑息的あるいは侵襲的な治療に頼るしかないのが現状である。

申請者らは軟骨再生による治療法の実現には、軟骨細胞の発生・分化に参与するシグナルネットワーク群の解明が不可欠と考え、地道な基礎研究を継続してきた(Nat Med 16:678, 2010, J Clin Invest 118:2506, 2008, Dev Cell 14:689, 2008, Nat Med 12:665, 2006, Gene Dev 18:2418, 2004)。特に変形性関節症研究に関しては画期的な成果を挙げており、世界に先駆けてマウス変形性関節症モデルを確立し(Osteoarthritis Cartilage 13:632, 2005)、そのモデルを用いた検討から関節軟骨表層の本来肥大分化しない永久軟骨細胞が肥大分化することが変形性関節症の発症に必須であることを明らかにした。

Inhibitor of  $\kappa$ -B kinase (IKK) は NF- $\kappa$ B シグナルにおける大部分のシグナル伝達経路の集合点となっているセリン・スレオニンキナーゼであり、I $\kappa$ B などのリン酸化を媒介し、活性化をもたらす。古典的経路においては通常 IKK $\alpha$ ・IKK $\beta$ ・IKK $\gamma$  (NEMO) で構成された複合サブユニットが TAK1 などの上流キナーゼによって活性化されると I $\kappa$ B をリン酸化し、ユビキチン化からプロテアソーム分解を引き起こす。その結果 NF- $\kappa$ B は核内移行して標的遺伝子の転写を促進する。また非古典的経路では NIK などにより IKK 複合体が活性化されると p100 (NF- $\kappa$ B2) をリン酸化して p52 への分解が誘導され、その後 NF- $\kappa$ B は核内移行する。

#### 2. 研究の目的

本研究では NF- $\kappa$ B シグナルのキー分子である IKK およびその関連分子と軟骨内骨化との関わりを複数の実験系を用いて検証し、運動器疾患の新規治療法開発に発展させることを目的とする。

#### 3. 研究の方法

マウス胎児骨格とマウス変形性関節症モデルを用いて IKK および NF- $\kappa$ B 関連分子の発現を時系列で解析した。

Prx1-Cre, Col2a1-Cre などを用いて成長過程での段階的な遺伝子のノックアウトを行い、軟骨内骨化に与える影響を検証した。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

IKK ファミリー分子の発現をマウス胎児骨格とマウス変形性関節症モデルにて検証したところ、いずれも強く発現していた。NF- $\kappa$ B シグナルの転写因子 RelA/p65 の細胞内局在を調べたところ、骨格形成期には著明な変化は認めなかったが、関節軟骨の変性とともに細胞内に局在が偏ることが確認され、NF- $\kappa$ B シグナルが変性に参与することが示唆された。

In vivo では RelA/p65 の flox マウスを用いて解析した。Prx1-Cre や Col2a1-Cre などと交配させて成長期の軟骨で NF- $\kappa$ B シグナルを遮断した場合には軽度の成長障害が認められたが、その主な原因は異所性のアポトーシスの誘導によるものと推察された。

次に RelA-flox マウスと薬剤誘導性軟骨細胞特異的 Cre マウス (Col2a1-CreERT2) とを交配させ、ヘテロコンディショナルノックアウトマウス (Col2a1-CreERT2; RelA-fl/+ ) とホモコンディショナルノックアウトマウス (Col2a1-CreERT2; RelA-fl/fl) を作成して、成長後に軟骨特異的に遮断してから変形性関節症モデルを作成したところ、ホモコンディショナルノックアウトマウスでは変形性関節症が促進することが明らかとなった。しかしながら興味深いことに、次にヘテロコンディショナルノックアウトマウスで同様の実験を行ったところ、反対に変形性関節症が抑制されることが判明した。ホモとヘテロで正反対になる理由を詳細に検討したところ、RelA が null の状態では複数の重要なアポトーシス抑制遺伝子の発現が抑制されていた。Promoter 解析、ゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降アッセイを行って検討したところ、これらは RelA の直接の転写標的であることも判明した。反対に RelA の半減した状態ではこれらの遺伝子の発現はほぼ平常と同程度に保たれていたが、アグリカン分解酵素の一部は発現が抑制されていた。Promoter 解析、ゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降アッセイを行って検討したところ、これらも RelA の直接の転写標的であることが判明した。

次に、変形性関節症モデルマウスの膝関節にさまざまな量の IKK の阻害剤を注射したところ、低容量では関節軟骨の変性は抑制

されたが、高容量を投与すると反対に変性が促進されることが判明した。これらの効果は IKK 阻害剤の種類によっても異なることも分かった。

#### 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 20 件)

1. Regulation of mouse chondrocyte differentiation by

CCAAT/enhancer-binding proteins.

Okuma T, Hirata M, Yano F, Mori D, Kawaguchi H, Chung UI, Tanaka S, Saito T. *Biomed Res.* 2015;36(1):21-9. doi: 10.2220/biomedres.36.21.

2. Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 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.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Mar 10;112(10):3080-5. doi: 10.1073/pnas.1419699112.

3. Identification of SCAN domain zinc-finger gene ZNF449 as a novel factor of chondrogenesis.

Okada K, Fukai A, Mori D, Hosaka Y, Yano F, Chung UI, Kawaguchi H, Tanaka S, Ikeda T, Saito T.

*PLoS One.* 2014 Dec 29;9(12):e115169. doi: 10.1371/journal.pone.0115169.

4. SOX10 transactivates S100B to suppress Schwann cell proliferation and to promote myelination.

Fujiwara S, Hoshikawa S, Ueno T, Hirata M, Saito T, Ikeda T, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S, Ogata T.

*PLoS One.* 2014 Dec 23;9(12):e115400. doi: 10.1371/journal.pone.0115400.

5. The association of combination of disc degeneration, end plate signal change, and Schmorl node with low back pain in a large population study: the Wakayama Spine Study.

Teraguchi M, Yoshimura N, Hashizume H, Muraki S, Yamada H, Oka H, Minamide A, Nakagawa H, Ishimoto Y, Nagata K, Kagotani R, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T, Yoshida M.

6. Mutual associations among musculoskeletal diseases and metabolic syndrome components: A 3-year follow-up of the ROAD study.

Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Tanaka S,

Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. *Mod Rheumatol.* 2015 May;25(3):438-48. doi: 10.3109/14397595.2014.972607.

7. S100A1 and S100B are dispensable for endochondral ossification during skeletal development.

Mori Y, Mori D, Chung UI, Tanaka S, Heierhorst J, Buchou T, Baudier J, Kawaguchi H, Saito T.

*Biomed Res.* 2014;35(4):243-50.

8. Association of dietary intake with joint space narrowing and osteophytosis at the knee in Japanese men and women: the ROAD study.

Muraki S, Akune T, En-yo Y, Yoshida M, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, Oka H, Yoshimura N.

*Mod Rheumatol.* 2014 Mar;24(2):236-42. doi: 10.3109/14397595.2013.854055.

9. Identification of fibroblast growth factor-18 as a molecule to protect adult articular cartilage by gene expression profiling.

Mori Y, Saito T, Chang SH, Kobayashi H, Ladel CH, Guehring H, Chung UI, Kawaguchi H.

*J Biol Chem.* 2014 Apr 4;289(14):10192-200. doi: 10.1074/jbc.M113.524090

10. Association of physical activities of daily living with the incidence of certified need of care in the long-term care insurance system of Japan: the ROAD study.

Akune T, Muraki S, Oka H, Tanaka S, Kawaguchi H, Tokimura F, Yoshida H, Suzuki T, Nakamura K, Yoshimura N.

*J Orthop Sci.* 2014 May;19(3):489-96. doi: 10.1007/s00776-014-0537-z.

11. Generation of Col2a1-EGFP iPS cells for monitoring chondrogenic differentiation.

Saito T, Yano F, Mori D, Ohba S, Hojo H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Tanaka S, Chung UI, Kawaguchi H.

*PLoS One.* 2013 Sep 16;8(9):e74137. doi: 10.1371/journal.pone.0074137.

12. Transcriptional induction of ADAMTS5 protein by nuclear factor- B (NF- B) family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development.

Kobayashi H, Hirata M, Saito T, Itoh S, Chung UI, Kawaguchi H.

*J Biol Chem.* 2013 Oct 4;288(40):28620-9. doi: 10.1074/jbc.M113.452169.

13. Cell-sheet technology combined with a thienopyridone derivative small compound TD-198946 for cartilage regeneration.

Yano F, Hojo H, Ohba S, Saito T, Honnami M, Mochizuki M, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI.

Biomaterials. 2013 Jul;34(22):5581-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.008.

14. The Contributions of Emergency Physicians to Out-of-hospital Cardiopulmonary Arrest: An Analysis of the National Utstein Registry Data. Fukuda T, Ohashi N, Matsubara T, Yahagi N. J Emerg Med. 2015 Apr;48(4):e81-92. doi: 10.1016/j.jemermed.2014.09.053.

15. Evaluation of urinary tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in acute kidney injury: a prospective observational study. Yamashita T, Doi K, Hamasaki Y, Matsubara T, Ishii T, Yahagi N, Nangaku M, Noiri E. Crit Care. 2014 Dec 19;18(6):716. doi: 10.1186/s13054-014-0716-5.

16. Effective pre-hospital care for out-of-hospital cardiac arrest caused by respiratory disease. Fukuda T, Fukuda-Ohashi N, Doi K, Matsubara T, Yahagi N. Heart Lung Circ. 2015 Mar;24(3):241-9. doi: 10.1016/j.hlc.2014.09.004.

17. Choice of renal replacement therapy modality in intensive care units: data from a Japanese Nationwide Administrative Claim Database. Iwagami M, Yasunaga H, Noiri E, Horiguchi H, Fushimi K, Matsubara T, Yahagi N, Nangaku M, Doi K. J Crit Care. 2015 Apr;30(2):381-5. doi: 10.1016/j.jcrc.2014.11.003.

18. Mortality prediction by acute kidney injury biomarkers in comparison with serum creatinine. Hiruma T, Asada T, Yamamoto M, Inokuchi R, Matsubara T, Ishii T, Sumida M, Isshiki R, Mayumi K, Noiri E, Nangaku M, Yahagi N, Doi K. Biomarkers. 2014 Dec;19(8):646-51. doi: 10.3109/1354750X.2014.968209.

19. Predictors of favorable and poor prognosis in unwitnessed out-of-hospital cardiac arrest with a non-shockable initial rhythm. Fukuda T, Matsubara T, Doi K, Fukuda-Ohashi N, Yahagi N. Int J Cardiol. 2014 Oct 20;176(3):910-5. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.08.057.

20. Perioperative plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin measurement in patients who undergo left ventricular assist device implantation surgery. Sumida M, Doi K, Kinoshita O, Kimura M, Ono M, Hamasaki Y, Matsubara T, Ishii T, Yahagi N, Nangaku M, Noiri E. Circ J. 2014;78(8):1891-9  
〔学会発表〕(計 5 件)

1. Chang SH, Kawaguchi H, et al. Identification of Greml 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, Kawaguchi H, 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, Kawaguchi H, et al. Identification of Greml 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, Kawaguchi H, 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, Kawaguchi H, 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  
松原 全宏 (Matsubara Takehiro) 東京大

学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40361498

(2)研究分担者

川口 浩 (Kawaguchi Hiroshi) 東京大学・  
医学部附属病院・届出診療医

研究者番号：40282660

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