

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 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：24592254

研究課題名(和文)軟骨疾患治療を目指した軟骨組織における血管形成制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of vascularization in cartilage tissue

研究代表者

石井 健 (ISHII, Takeshi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00222943

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)：成長板軟骨および関節軟骨における血管形成関連因子発現パターンの比較検討を行い、既知の血管形成抑制因子および血管形成促進因子についての発現を確認した。さらに軟骨肉腫および変形性関節症軟骨におけるこれら因子発現確認したところ、軟骨肉腫、変性軟骨において、血管形成促進因子の発現が確認できた。これら因子の発現と臨床像との相関を解析したが、有意に相関を示すような、因子、項目は同定できなかった。

新規血管形成関連因子を同定するための検討を行い、血管形成に關与する新規シグナル、遺伝子を見出した。これらの結果を元に血管形成阻害を標的とした新規治療薬の検討を行ったが、有効性は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：Vascularization related molecules were expressed in growth plate and/or articular cartilage. In addition, we found the induction of such molecules in chondrosarcoma tissues and osteoarthritis cartilage. The association between the expression of vascularization related molecules and clinical parameters, including overall survival and disease free survival in chondrosarcoma patients, but no significant association could be found.

To find novel vascularization related molecules, we performed DNA microarray and VEGF promoter analysis and found some novel signalling pathways and molecules could induce VEGF. Finally, we examined if the VEGF inhibitor, sunitinib could inhibit chondrosarcoma progression or osteoarthritis progression. Sunitinib did not significantly affect the progression of chondrosarcomas in xenograft model and osteoarthritis in mouse knee osteoarthritis model.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：軟骨 血管形成

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省国民生活基礎調査によると、高齢者が要支援の対象となる原因疾患の第1位は関節症である。我々が並行して遂行している ROAD (Research on Osteoarthritis Against Disability) study により、本邦においてレントゲン上の変形性膝関節症(膝OA)の患者数は約2500万人、日常生活に障害をもたらす痛みを伴う膝OAの患者数は約800万人と推計されることが判明した。また高齢化社会の急速な進行に伴い、膝OAの膨大な罹患数や医療経済的な側面も含めて考えると、膝OAの予防・治療法の開発に対する社会的ニーズの高さに疑いの余地はなく、膝OAに対する根本的治療法を目指した治療法の確立は焦眉の課題である。これまで膝OAの病因について細胞・分子レベルのメカニズムに関しては解明されつつあるが、根本的治療法には至っておらず、骨切り術、人工関節置換術などの侵襲的かつ対症的な治療法に頼らざるを得ないのが現状である。

一方、軟骨肉腫は骨原発の悪性腫瘍の中で骨肉腫に次いで2番目に発生頻度の高い悪性腫瘍であり、骨原発悪性腫瘍のおよそ20%を占める。軟骨肉腫の予後は、局所での再発コントロールや転移の有無等により大きく左右されるが、現在これらをコントロールできる手術以外の有効な治療法はなく、切除不能な局所再発を生じた症例や多発転移を生じた症例に対しては、緩和医療のみが行われているにすぎない。

これらの病態を考えたとき、いずれの疾患においても軟骨細胞は本来の永久軟骨としての特性を消失し、無血管組織であるはずの軟骨に血管を誘導している。さらに、この血管形成がOAの進行、腫瘍の浸潤、転移に重要な役割を担っていることも知られており、この血管形成を抑制することによりこれら疾患の治療につながることを示唆されている。これに対し、軟骨細胞が生理的に軟骨内に血管を誘導する現象も知られている。軟骨内骨化において、軟骨細胞は肥大分化し、X型コラーゲンなどの基質を産生すると同時にMatrixmetalloproteinase (MMPs)を放出し、基質を分解しながら、VEGFなどの成長因子の分泌により血管を誘導し、最終的には骨組織に置換される。この現象は骨折の治癒過程においても認められ、血管の誘導がうまくいかない場合、骨癒合遅延や偽関節が生ずる。軟骨は生理的に一方では無血管野を保ちながら、一方では血管を誘導するという、相反する作用をうまく使い分けており、これらの使い分けの破綻が軟骨関連疾患の進行に関与しているのである。

血管形成制御メカニズムとして、これまで永久軟骨における血管侵入阻害においてはChondromodulin-I(ChM-I)などの作用が報告されている。ChM-Iは、前駆体として生合成された後、糖鎖修飾、切断などを受けて細胞外に分泌される。この成熟型ChM-Iは

細胞外マトリックスに結合して保持され、血管内皮細胞の遊走、増殖、管腔形成を抑制することにより血管新生抑制因子として作用する。しかしそのメカニズムの詳細は不明であり、ノックアウトマウスにおいても成長板における血管新生に明らかな影響は認めなかったことから、他の因子が血管形成抑制に重要な役割を果たしている可能性も示唆されている(Mol Cell Biol. 23: 636, 2003)。

一方軟骨細胞に血管を誘導する軟骨内骨化について枝芽形成から四肢発生の過程を見ると、枝芽発生段階においてまず枝芽全体に血管網が形成される。枝芽発達に伴いその一部に無血管野が形成され、その部位に間葉系細胞の凝集が起こる。さらにこの間葉系細胞はVEGFを発現し、周囲の血管網を発達させながら軟骨細胞へと分化を進める(Development.136: 1263, 2009)。

軟骨細胞では一旦VEGFの発現は低下するが、さらに軟骨細胞が肥大分化すると、VEGFの発現は再度上昇する。それとともに肥大軟骨細胞はMMPなどの基質分解酵素を分泌し、軟骨基質を分解しながら、周囲の血管網より軟骨内に血管を引き込み骨へと置換される。この過程におけるVEGFの発現誘導には間葉系細胞ではSOX9や肥大軟骨細胞ではHIF1やHIF2などの転写因子が関与することも知られている。しかし、間葉系細胞においてはSOX9がVEGFの誘導しながら、軟骨細胞では引き続きSOX9が発現しているにも関わらずVEGFの発現が低下するなどVEGFの発現誘導メカニズムには未だ不明な点も多い。また、VEGFをターゲットとして、抗VEGF抗体やVEGFシグナル阻害剤などの開発が進み、一部では軟骨肉腫において古典的な化学療法との併用での効果を示す報告も出てきているが、その効果は必ずしも十分とは言えず、血管新生をターゲットとした新規治療薬の開発が急がれている。また、変形性関節症においては血管新生をターゲットとした治療法の検討についてはあまりなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

関節軟骨に代表される軟骨組織は本来、無血管組織である。しかし、一方で成長板軟骨において軟骨細胞は肥大分化した後、血管侵入を促し骨組織へと置換されていく。このように軟骨細胞は血管形成促進・抑制という2つの機能を生理的に使い分けている。しかし、骨折後の偽関節や変形性関節症、軟骨肉腫など各種軟骨関連疾患においては、血管形成促進・抑制作用の破たんが、その発症、進行に関与していることが知られている。

本研究では、血管形成において相反する2つの作用を有する軟骨組織に着目し、血管形成関連因子の発現パターンおよびその制御メカニズムの解析を行う。さらに、各種軟骨関連疾患の進行における血管新生関連因子の機能を *in vitro*、*in vivo* の複数の実験系お

よびバイオインフォマティクスを駆使して解析し、各種軟骨関連疾患の画期的な原因療法の確立および軟骨再生の創薬・技術開発に応用するための基礎検討を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まず血管形成阻害と誘導という観点から様々な生理的、病的状況下の軟骨における既知の血管形成関連因子の発現パターンを比較検討する。さらに網羅的な発現解析を行うことにより血管形成に関与する新たな因子を同定しつつ、各種軟骨疾患における血管形成修飾分子を用いた治療効果の検討を行う。

具体的に以下の4つのサブテーマについて検討を行う。

- (1) 成長板軟骨および関節軟骨における血管形成関連因子発現パターンの比較検討
- (2) 軟骨肉腫および変形性関節症軟骨における血管形成関連因子発現確認および臨床像との比較
- (3) 新規血管形成関連因子の同定
- (4) 既存の血管形成阻害分子投与による軟骨肉腫、変形性関節症進行への影響の検討

4. 研究成果

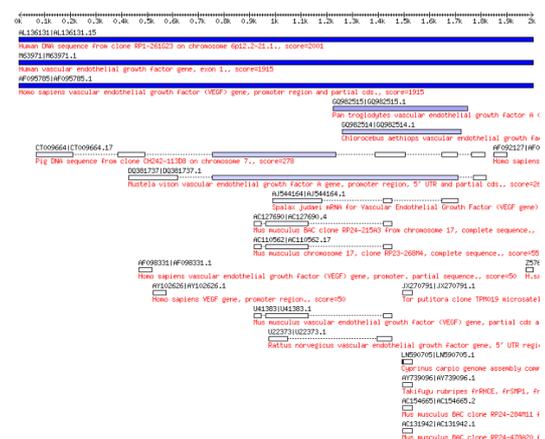
(1) 成長板軟骨および関節軟骨における血管形成関連因子発現パターンの比較検討：マウス成長板軟骨およびマウス軟骨系細胞株 ATDC5 細胞培養において既知の血管形成関連因子として ChM-1、TIMP ファミリー等の血管形成抑制因子および Vegf、MMP ファミリー等の血管形成促進因子についての発現を確認した。ChM-1 は主に増殖軟骨層で発現が強い傾向があり、TIMP ファミリーのうち、TIMP 1 の発現を胎生期の脊椎で確認した。TIMP1,2,3 の発現は ATDC5 においても確認した。TIMP1 は四肢長管骨ではあまり発現しておらず、TIMP4 は成長板軟骨、ATDC5 いずれの系においても発現を確認できなかった。さらに血管形成促進因子として Vegf および MMP ファミリーの発現を確認したところ、これらの因子は主に肥大軟骨細胞層で発現が確認され、ATDC5 においても分化に伴い、これらのうちの一部の因子の発現が促進されていることが確認できた。

(2) 軟骨肉腫および変形性関節症軟骨における血管形成関連因子発現確認および臨床像との比較：軟骨肉腫において、血管形成関連因子の発現を確認したところ、上記因子のうち VEGF、MMP13、MMP2、MMP9 等の発現を確認することができた。また、臨床像との相関を解析するために臨床データをまとめ、血管形成関連因子の発現パターンとの相関について検討を行ったが、有意に相関を示すような、因子、項目は同定できなかった。マウス変形性関節症モデルを作出し、血管形成抑制因子および血管形成促進因子につ

いての発現を確認したところ、Timp-1,2,3,4、MMP1,3,9,13 Vegfa が正常関節軟骨と比較し、発現上昇していた。また、ROAD Study のデータベースを用いて、発現変化のあった遺伝子周辺の SNP について GWAS により疾患感受性について解析を行ったが、有意な相関を示す遺伝多型は認めなかった。

(3) 新規血管形成関連因子の同定：マウス初代培養軟骨細胞より採取した mRNA サンプルを用いて DNA マイクロアレイを行い、既知の血管形成関連シグナルとの相関が示唆されている因子として、EGF シグナル、WNT シグナルを同定した。これらのシグナルにつき発現ベクターを作成し、既知の血管形成関連因子の発現変化を確認したところ、EGF シグナル関連因子の一つで、Vegfa が強く誘導されることを確認した。

さらに、VEGF-A プロモーターについての解析を行うべく、種々の生物種間よりプロモーター領域として転写開始点の上流 2kb を対象とし比較マッピングを行った。相同性の高い領域として、ヒト VEGF プロモーターの転写開始点の上流 1kb (約 60bp) および 500 bp 前後に Mouse, Rat, Pig 等の生物種との相同性の高い領域を認めた。この部分の遺伝子配列を確認したところ、同領域には複数の転写因子の結合モチーフが存在していることが明らかとなった (図 1)。



(図 1) VEGF プロモーターの比較マッピング

さらに、上記プロモーター領域をレポーターベクターに組み込み、候補遺伝子の発現ベクターを用いて転写活性を確認したところ、一部の遺伝子において転写活性の上昇を認めた。また、これらの遺伝子を軟骨細胞に導入したところ、実際に VEGF の発現が誘導されることを確認することができた。

(4) 既存の血管形成阻害分子投与による軟骨肉腫、変形性関節症進行への影響の検討：血管形成阻害分子として VEGFR 阻害剤である Sunitinib を用いて軟骨肉腫細胞株 SW1353 および軟骨肉腫細胞に対して、これらの分子を添加し、増殖能、遊走能、浸潤能を評価したところ、増殖能の抑制を確認することができ

た。しかし、これに基づき、ヌードマウスを用いた軟骨肉腫 xenograft モデルにおいて sunitinib の投与を行い、その影響を検討したが、腫瘍増大速度に対して明らかな差を認めることはなかった。
また、同様に変形性関節症モデルマウスに対して Sunitinib の投与を行ったが、変形性関節症進行に対する明らかな影響を認めることはなかった。

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 11 件)

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;9:e115400. doi: 10.1371/journal.pone.0115400.

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. 2014;1-11. [Epub ahead of print]

Blood pressure-lowering peptides from neo-fermented buckwheat sprouts: a new approach to estimating ACE-inhibitory activity.

Koyama M, Hattori S, Amano Y, Watanabe M, Nakamura K.
PLoS One. 2014;9:e105802. doi: 10.1371/journal.pone.0105802.

Simultaneous recovery and purification of rice protein and phosphorus compounds from full-fat and defatted rice bran with organic solvent-free process.

Watanabe M, Maeda I, Koyama M, Nakamura K, Sasano K.
J Biosci Bioeng. 2015;119:206-11. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.07.009.

Does osteophytosis at the knee predict health-related quality of life decline? A 3-year follow-up of the ROAD study.

Muraki S, Akune T, Nagata K, Ishimoto Y, Yoshida M, Tokimura F, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K, Oka H, Yoshimura N.
Clin Rheumatol. 2014. [Epub ahead of print]

Notch signaling in chondrocytes modulates endochondral ossification and osteoarthritis development.

Hosaka Y, Saito T, Sugita S, Hikata T, Kobayashi H, Fukai A, Taniguchi Y, Hirata M, Akiyama H, Chung UI, Kawaguchi H.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:1875-80. doi: 10.1073/pnas.1207458110.

Transcriptional induction of ADAMTS5 protein by nuclear factor- κ B (NF- κ 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;288:28620-9. doi: 10.1074/jbc.M113.452169.

A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1.

Yano F, Hojo H, Ohba S, Fukai A, Hosaka Y, Ikeda T, Saito T, Hirata M, Chikuda H, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI.
Ann Rheum Dis. 2013;72:748-53. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201745.

Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy with modified mesna, adriamycin, ifosfamide, and dacarbazine (MAID) regimen for adult high-grade non-small round cell soft tissue sarcomas.

Ogura K, Goto T, Imanishi J, Shinoda Y, Okuma T, Tsuda Y, Kobayashi H, Akiyama T, Hirata M, Yamamoto A, Kawano H.
Int J Clin Oncol. 2013;18:170-6. doi: 10.1007/s10147-011-0360-x.

GSK-3 α and GSK-3 β proteins are involved in early stages of chondrocyte differentiation with functional redundancy through RelA protein phosphorylation.

Itoh S, Saito T, Hirata M, Ushita M, Ikeda T, Woodgett JR, Algül H, Schmid RM, Chung UI, Kawaguchi H.
J Biol Chem. 2012;287:29227-36. doi: 10.1074/jbc.M112.372086.

C/EBP β and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 α as the inducer in chondrocytes.

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.
Hum Mol Genet. 2012;21:1111-23. doi: 10.1093/hmg/ddr540.

[学会発表](計 11 件)

Shinoda Y, Kawano H, Tsuda Y, Sawada R, Morizaki Y, Uehara K, Koshima I, Narushima M, Iida T, Tanaka S : A 30-Year-Old Female, Osteosarcoma of the Right Ulna. The 26th forum of the surgical society for musculoskeletal sarcoma. 2014.3.8, Tokyo (Japan)

篠田 裕介、澤田 良子、西坂 智佳、正田 奈緒子、緒方 直史、芳賀 信彦、津田 祐輔、田中 栄、河野 博隆：診療科横断的ながんサーボード診療体制による運動器マネジメントは骨転移患者のQOL維持に有用である。第51回日本リハビリテーション医学会学術集会、2014.6.5-7、名古屋国際会議場（名古屋）

篠田 裕介、澤田 良子、大熊 加恵、稲田 修士、金井 良晃、岩瀬 哲、中川 恵一、津田 祐輔、田中 栄、河野 博隆：骨転移手術における骨転移がんサーボード介入の効果。第19回日本緩和医療学会学術大会、2014.6.7-9、神戸国際展示場（神戸）

篠田 裕介、澤田 良子、津田 祐輔、大隈 知威、小林 寛、池上 政周、大木 孝裕、五嶋 孝博、田中 栄、河野 博隆：診療科横断的ながんサーボード診療体制による運動器マネジメントは骨転移患者のQOL維持に有用である（シンポジウム：骨転移治療戦略とがんのリハビリテーション）。第47回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、2014.7.17-18、大阪国際会議場（大阪）

篠田 裕介、澤田 良子、金井 良晃、中川 恵一、岩瀬 哲、津田 祐輔、五嶋 孝博、田中 栄、河野 博隆：骨転移がんサーボードの介入により骨転移患者のQOLが改善する。第52回日本がん治療学会学術集会、2014.8.28-30、パシフィコ横浜（横浜）

小林寛、他 NF-kB ファミリーメンバー RelA/p65 は、軟骨細胞のアポトーシスを阻害することで、骨格形成と変形性関節症の進行を制御する。第28回日本整形外科学会基礎学術集会、2013年10月17日、幕張メッセ（千葉）

Kobayashi H, et al NF-kB member RelA/p65 in chondrocytes controls skeletal growth and osteoarthritis development by inhibiting chondrocyte apoptosis. 2013 Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress. 2013年4月18日、Philadelphia (USA)

Kobayashi H, et al NF-kB member RelA/p65 in chondrocytes controls skeletal growth and osteoarthritis development by inhibiting chondrocyte apoptosis. ASBMR

2013, American Society for Bone and Mineral Research 2013年10月5日、Baltimore (USA)

Kobayashi H, et al. Transcriptional induction of ADAMTS5 by NF-kB family member RelA in chondrocytes during osteoarthritis development. 2012 Cold Spring Harbor Asia Conference: Bone & Cartilage 2012年6月11日-6月15日、Suzhou (China)

Sugita S, et al. Hes1, a transcriptional target of Notch signaling, modulates endochondral ossification during osteoarthritis development. 2012 Cold Spring Harbor Asia Conference: Bone & Cartilage 2012年6月11日-6月15日、Suzhou (China)

Hosaka Y, et al. RBPjk-dependend Notch signaling in chondrocytes modulates skeletal growth and osteoarthritis development. 2012 Cold Spring Harbor Asia Conference: Bone & Cartilage 2012年6月11日-6月15日、Suzhou (China)

〔図書〕(計3件)

篠田裕介、河野博隆：手術室における基本事項。整形外科レジデントマニュアル（田中栄、中村耕三、編集）、医学書院、51-64、2014

篠田裕介：腫瘍性疾患。整形外科レジデントマニュアル（田中栄、中村耕三、編集）、医学書院、339-356、2014

篠田裕介、河野博隆：高齢者骨転移患者の運動器管理。ベッドサイドの高齢者運動器の診かた（中村耕三、編集）、南山堂、291-297、2014

〔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

石井 健 (ISHII, Takeshi)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00222943

(2) 研究分担者

中村 耕三 (NAKAMURA, Kozo)
国立障害者リハビリテーションセンター・総長
研究者番号：60126133

平田 真 (HIRATA, Makoto)
東京大学・医学部附属病院・届出診療医
研究者番号：50401071

篠田 裕介 (SHINODA, Yusuke)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80456110

(3) 連携研究者

()

研究者番号：