

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659664

研究課題名(和文)新規分子ZNF449の軟骨と間葉系組織における機能解析

研究課題名(英文)Function of ZNF449 in chondrocyte and mesenchymal tissues

研究代表者

西田 匡宏(Nishida, Masahiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40622741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：新規分子ZNF449の軟骨における機能解析を中心に研究を行った。成長板軟骨では広範に発現し、特に前肥大細胞層で多く発現が見られた。プロモーター解析や軟骨分化誘導系を使用したin vitroの実験では肥大分化関連因子への作用が示唆された。そこで軟骨内骨化や軟骨恒常性維持への関与をみるためにノックアウトマウスを作製した。しかしながら成長障害は見られず、マウス変形性関節症モデル、老齢化モデルでも野生型マウスと比較し大きな差は見られなかった。また筋肉や骨などの間葉系組織の解析も行ったが明らかな萎縮や骨形成の異常は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：We carried out research on a new molecule named ZNF449 and focused on its function in chondrocytes. We started by investigating the expression pattern in the growth plate and found that it was expressed ubiquitously but mainly in the prehypertrophic region. In vitro experiments, such as promoter analysis and ATDC5 differentiation suggested involvement in the process of hypertrophy. Therefore, we created a knockout mouse and assessed its phenotype. Unfortunately, it did not show any growth retardation, nor did it show any difference when we created a surgically induced osteoarthritis model. We also analysed other mesenchymal tissues such as muscles and bones but we could not find any apparent difference between the wild-type mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：軟骨

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会となった今、医療全体を取り巻く環境が変化し、疾患に対する治療の他に高齢者の生活の質 (Quality of life:QOL) を高めることの重要性が取り沙汰されている。身体運動に関わる骨、筋肉、関節、神経などを包括する運動器の障害が注目され、日本整形外科学会によってロコモティブシンドロームとして啓発活動が行われている。これらの原因疾患の中で最も頻度が高いのが変形性関節症であり、我々は以前よりその分子機序について解析を行い、Runx2, CEBPB, HIF2A, NF- κ B 関連分子など様々な分子の機能解析で成果を挙げている。肥大分化に関与する分子の多くが変形性関節症の発症・進展にも深く関与することが明らかとなったため、その中で強力な軟骨分化制御能を有する新規転写因子 ZNF449 の同定に成功した。予備実験で ZNF449 は軟骨以外の間葉系組織にも発現していることが確認されており、軟骨細胞以外の間葉系組織の分化にも関わる可能性がある。このように ZNF449 は多くの可能性を秘めた新規転写因子であることから、今回の研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は ZNF449 の役割を *in vitro*、*in vivo* の多様な実験によって明らかにする。まずその発現パターンを詳細に解明するとともに、様々な細胞株や初代培養細胞を用いて各系統への分化に対する作用を検討する。また *In vivo* ではノックアウトマウスを作製し、四肢を中心に成長・発達および成長板の組織学的解析を詳細に行う。分化過程における既知のシグナル伝達系との相互作用や骨・筋肉などの軟骨以外の間葉系組織における機能解析も行う。

3. 研究の方法

1) ZNF449 の全身および成長板での発現パターンの解析

C57/B6J マウス (8 週齢) から多種類の臓器や組織を採取し、ホモジナイザーを用いて mRNA を回収後、逆転写し、マウス cDNA 組織パネルを自作した。これを用いてリアルタイム RT-PCR 法で ZNF449 の発現パターンをより詳細に解析した。特に軟骨、骨、筋などの間葉系組織については様々な部位から採取したほか、胎児期のマウスからも組織採取し、時期による発現の変化も詳細に調べた。またマウス胎児を用いて全身および成長板軟骨の凍結組織切片やパラフィン切片を作製し、免疫組織染色を行い空間的な発現の分布も解析した。

2) ZNF449 の軟骨細胞における *in vitro* の機能解析

成長板の軟骨細胞は静止細胞層、増殖層、前肥大細胞層、肥大細胞層に分かれており、これらの分化過程のどの段階で最も強く発現するかを検討した。マウス由来未分化軟骨系・間葉系細胞株 (ATDC5, C3H10T1/2)、ヒト由来軟骨系細胞株 (OUMS-27, SW1353) の他、マウス・ヒトの初代軟骨細胞などを使用した。強制発現系および siRNA を用いた抑制系のレトロウイルスやアデノウイルスを作製し、これらの細胞株や初代軟骨細胞に遺伝子導入した。リアルタイム RT-PCR で発現解析を行った。またレトロウイルスを用いて ZNF449 を抑制した ATDC5 細胞を分化誘導し、軟骨分化における機能を解析した。

3) ZNF449 ノックアウトマウスの作製および解析

ZNF449 のノックアウトマウスを作製し、各種臓器、特に膝関節を中心に解析した。まず成長への関与を観察するため体長、体重、四肢長を胎生期から 8 週まで計測した。また成長板を含めた膝関節を H&E 染色、Safranin O 染色、Alcian blue 染色、von Kossa 染色などで軟骨細胞の形態、細胞数、軟骨基質、骨基質など詳細に検討した。

免疫組織染色では II 型コラーゲン、X 型コラーゲン、MMP13 など分化マーカーをはじめ、PTHrP、Ihh、HIF2A などの抗体を用いて各分化段階に与える影響を検討した。

さらに、マウスの成長板、関節軟骨、肋軟骨から細胞を採取し初代培養を行い、*ex vivo* にてその分化能、増殖能について詳細な定量的解析を行った。

またマウスの変形性関節症モデル (内側側副靭帯切除、内側半月板切除) や自然経過モデルを用いて、軟骨恒常性維持における機能解析も行った。Safranin-O 染色、免疫組織学染色、TUNEL 染色を行い、基質分解酵素の発現やアポトーシスについて詳細に検討した。

最後に軟骨以外の間葉系組織に発現が確認されたので、骨や骨格筋での発現および機能も解析した。

4. 研究成果

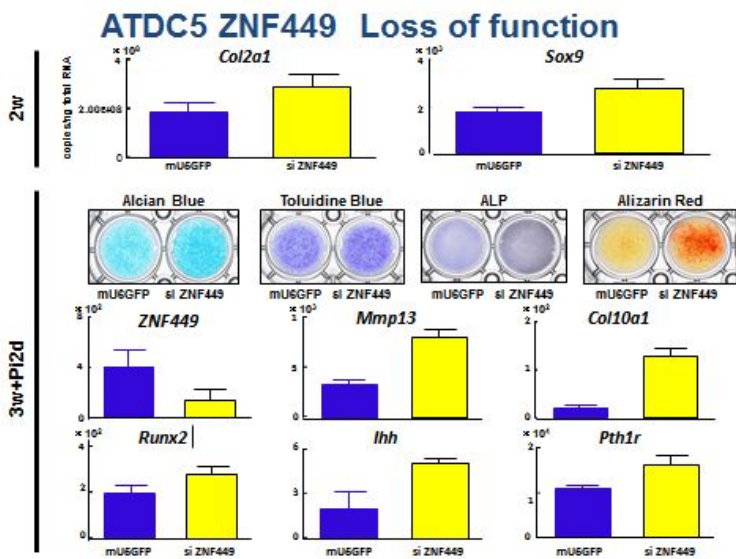
1) ZNF449 の全身および成長板での発現パターンの解析

C57/B6J マウス (8 週齢) より各臓器を採取し cDNA 組織パネルを作製した。ZNF449 は多くの組織に発現しており、特に筋肉、骨、軟骨と間葉系組織に多く発現していた。タンパクレベルの発現を調べるため胎生

18.5日のマウス成長板軟骨で免疫組織染色を行った。増殖層から肥大層にかけてユビキタスに発現していたが、特に前肥大層に発現が多く見られた。8週齢のマウスの膝関節では関節軟骨、筋肉、骨に発現しており、組織パネルで得られた結果と合致していた。

2) ZNF449の軟骨細胞における in vitro の機能解析

ZNF449をATDC5, C3H10T1/2, OUMS-27, SW1353など様々な細胞にLipofectinやアデノウイルスを用いて強制発現すると代表的な軟骨形成マーカーであるCol2a1やAggrecanに大きな変化は見られなかった。しかしsiRNAをレトロウイルスでATDC5に安定導入し、インスリンで分化誘導をかけるとCol10a1, Mmp13, Ihhなどの後期分化マーカーの発現が亢進した。同様の実験系で細胞をAlizarin redとアルカリフォスファターゼで染色すると3週以降でZNF449の抑制系で石灰化が進行し、後期分化が促進されていた。

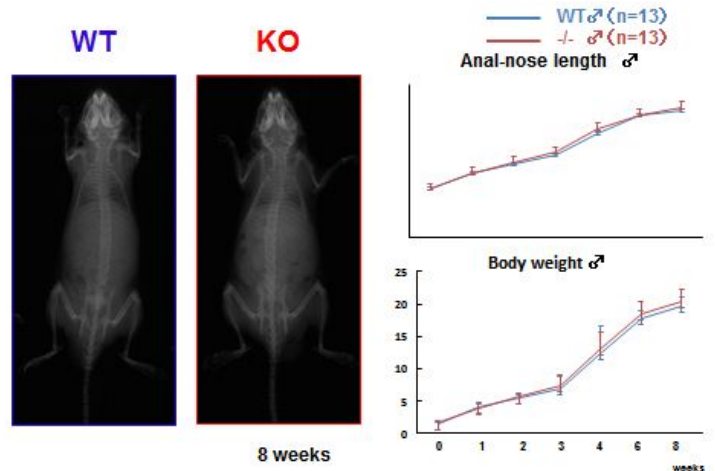


3) ZNF449ノックアウトマウスの作製および解析

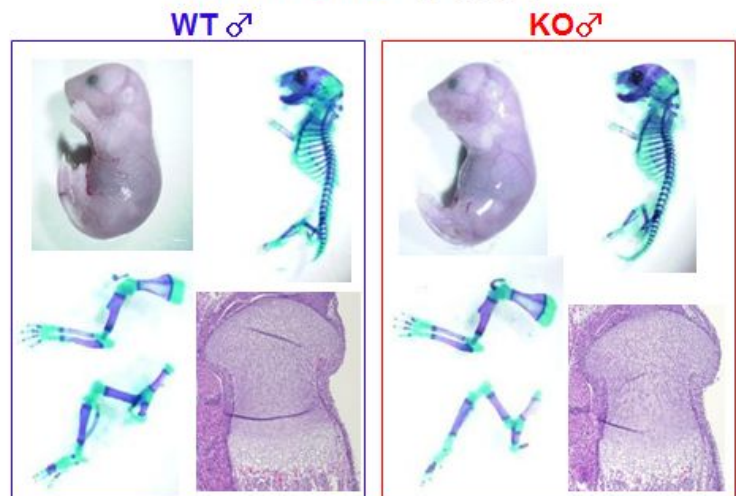
In vitroの結果を踏まえ、ノックアウトマウスを作製した。Exon1のみを残しGFPをtandemにつなげたネオマイシン耐性カセットの入ったターゲティングベクターを作製した。Injection後、マウスは無事に産出された。8週齢になるまで体長と体重を毎週計測し成長曲線をつけたがノックアウトマウスと野生型マウスでは差がなかった。そこで胎生期での成長障害をみるため、二重染色骨格標本作製したが、E15.5以降ではこちらも差は見られなかった。そこで成長板軟骨や膝関節の形態を詳細に比較するため、パラフィン切片や凍結切片を作製し、HE染色や

Safranin-O染色など行ったがこちらも明らかな差は見られなかった。

ZNF449欠損マウスの成長曲線



ZNF449 E17.5 骨格標本



免疫組織染色ではCol2a1, Sox9, Aggrecan, Col10a1, Mmp13, Ihh, Runx2, Hif2aなどの抗体を用いて発現解析したが有意差は見られなかった。TUNEL染色、Von Kossa染色でも同様に差はなかった。

ノックアウトマウスから初代関節軟骨細胞や肋軟骨を採取し、軟骨マーカーをリアルタイムRT-PCRで野生型マウスと比較したがin vitroの結果と異なり、後期分化マーカーはほとんど変わらず、細胞増殖能も差はなかった。

マウス変形性関節症モデルでは、術後8週で関節軟骨をSafranin-O染色で評価したが、変性の進行に明らかな差は見られなかった。

最後に骨密度、筋量を比較したがこちらも明らかな差は見られなかった。

現在自然経過を検討しているが、得られた少数個体のデータからはこれまでと同様に明らかな表現型は見られていない。

以上の結果より、ZNF449 は in vitro では軟骨後期分化への関与が示唆されたが、ノックアウトマウスでは筋骨格系に明らかな表現型はみられなかった。補因子的な作用の可能性が残されているため、現在多臓器の解析も含め検討している。

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 14 件)

- 1) Fukuda T, Ohashi N, Nishida M, Gunshin M, Doi K, Matsubara T, Nakajima S, Yahagi N. Application of cerebral oxygen saturation to prediction of the futility of resuscitation for out-of-hospital cardiopulmonary arrest patients: a single-center, prospective, observational study: Can cerebral regional oxygen saturation predict the futility of CPR? *Am J Emerg Med.* 2014 Mar 5. pii: S0735-6757(14)00131-4. [Epub ahead of print]
- 2) Kawata M, Inui H, Taketomi S, Nakamura K, Nakagawa T, Tanaka S. Recurrent hemarthrosis after total knee arthroplasty caused by the impingement of a remnant lateral meniscus: a case report. *Knee.* 2014 Mar;21(2):617-9.
- 3) Taketomi S, Inui H, Nakamura K, Hirota J, Sanada T, Masuda H, Takeda H, Tanaka S, Nakagawa T. Clinical outcome of anatomic double-bundle ACL reconstruction and 3D CT model-based validation of femoral socket aperture position. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013 Oct 2. [Epub ahead of print]
- 4) Taketomi S, Inui H, Hirota J, Nakamura K, Sanada T, Masuda H, Tanaka S, Nakagawa T. Iliotibial band irritation caused by the EndoButton after anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction: report of two cases. *Knee.* 2013 Aug;20(4):291-4.
- 5) Inui H, Taketomi S, Nakamura K, Takei S, Takeda H, Tanaka S, Nakagawa T. Influence of navigation system updates on total knee arthroplasty. *BMC Sports Sci Med Rehabil.* 2013 May 2;5(1):10.
- 6) Inui H, Taketomi S, Nakamura K, Sanada T, Tanaka S, Nakagawa T. 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.
- 7) 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.
- 8) Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, Nakagawa M, Kumano K, Arai S, Kobayashi H, Saito T, Iwakura Y, Kurokawa M. Positive feedback between NF- κ B and TNF- α promotes leukemia-initiating cell capacity. *J Clin Invest.* 124:528-42,2014.
- 9) Saito T (corresponding author), 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.
- 10) Kobayashi H, Hirata M, Saito T, Itoh S, Chung UI, Kawaguchi H. Transcriptional induction of ADAMTS5 by an NF- κ B family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. *J Biol Chem.* 288:28620-9,2013.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Yano F, Saito T (equally contributed), Ogata N, Yamazawa T, Iino M, Chung UI, Kawaguchi H. β -catenin Regulates PTH/PTHrP Receptor Signals and Chondrocyte Hypertrophy through Binding to Its Intracellular C-terminal Region. *Arthritis Rheum.* 65:429-35,2013.
- 14) 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.

[学会発表](計 0 件)

[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：
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

西田 匡宏 (NISHIDA MASAHIRO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40622741

(2) 研究分担者

乾 洋 (INUI HIROSHI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60583119
齋藤 琢 (SAITO TAKU)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30456107