

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670634

研究課題名(和文) 周期的静水圧負荷モデルによる軟骨細胞の物理的ストレス受容経路の探索

研究課題名(英文) Analyses of mechano-sensing pathways in chondrocytes using cyclic hydrostatic pressure model

研究代表者

齋藤 琢 (Saito, Taku)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30456107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス初代関節軟骨細胞を用いて細胞伸展装置にて軟骨変性関連遺伝子の発現を誘導する条件を最適化し、その条件にて得られたcDNAをマイクロアレイにて解析した。ストレス負荷によって発現量が大きく変動する遺伝子を選別し、軟骨細胞での発現が多いものを絞り込み、候補遺伝子としてGremlin1に注目して解析を進めた。Gremlin1は伸展負荷だけでなく、周期的静水圧負荷装置を用いた系でも発現が増強した。Gremlin1は細胞培養レベルでも生体レベルでも軟骨基質を分解に導く作用があることが示唆され、その経路としてNF-κBシグナルを経由することも判明した。

研究成果の概要(英文)：We first optimized experimental conditions to induce catabolic factors in mouse primary chondrocytes by cell stretch system, and analyzed gene expressions by microarray. We identified Gremlin1, which was induced by excessive cell stretch or by excessive hydrostatic pressure. Gremlin1 exerted catabolic effects in primary cultured chondrocytes and mouse knee joints, and its effects were mediated by NF-κB signaling pathway.

研究分野：整形外科学

キーワード：整形外科学 軟骨代謝

1. 研究開始当初の背景

昨今の高齢者社会において、要介護の主要な原因の一つであるロコモティブシンドロームは大きな社会問題であり、その中で最大の疾患である変形性関節症に対する新規治療法の開発は喫緊の課題となっている。変形性関節症は遺伝的要素、代謝疾患要素、環境的要素、そして物理的ストレスなど様々な要因からなる多因子疾患であるが、中でも過度の体重増加もしくは過度の運動などが高いリスクであることから、過剰な物理的ストレスは変形性関節症の最大の誘因と考えられている。しかしながら、物理的ストレスによる変形性関節症の発症・進行における病態生理メカニズムは未だにごく部分的にしか解明されていない。

申請者らはこれまで軟骨細胞を制御するシグナル群の解明に取り組み、Sox9, Runx2 などの転写因子群から cGKII, GSK3, Akt などのリン酸化酵素、HIF-2, NF- κ B シグナルなど多様なシグナルを解明するとともに、独自に開発した変形性関節症のマウスモデルを用いて変形性関節症の分子病態生理の解明でも世界トップクラスの成果を挙げた (Nat Med 16:678,2010; Arthritis Rheum 62:826,2010; PLoS One 4:e4543,2009; J Clin Invest 118:2506,2008; Dev Cell 14:689,2008; Gene 416:53,2008; EMBO Rep 8:504,2007; Nat Med 12:665,2006)。特に軟骨内骨化の後期にみられる軟骨細胞の肥大分化に類似した現象が変形性関節症においてもみられること、また肥大分化促進分子を抑制することによって変形性関節症の発症・進展を抑えられることを申請者らは証明してきたが、過剰な物理的ストレスがどのようにこれらの現象に繋がるのかは現時点でも詳しくは分かっていない。これまでの uniaxial 細胞伸展装置を用いた先行研究では、高頻度もしくは高伸展率で軟骨細胞を刺激した場合は IL-1, MMP の産生が誘導され軟骨に対して catabolic に働くが、低頻度もしくは低伸展率での刺激は逆に軟骨に anabolic に作用することなどが報告されている (J Biochem 125:966,1999; Arthritis Rheum 44:608,2001; Arthritis Rheum 50:3541,2004)。しかし、これらの伸展装置の刺激は本来関節において軟骨細胞が受けるストレスとは性質が全く異なり、申請者らも追試を行ったが安定した成果を挙げるができなかった。そこで申請者らはより生理的な物理ストレス負荷方法として周期的な静水圧負荷を考案した。

2. 研究の目的

本研究では、下肢の荷重関節軟骨が受けるストレスの性質を考慮し、最も生体内の負荷環境に近いものとして静水圧負荷を選択した。また歩行すると下肢の荷重関節軟骨は周期的にストレスを受けることから、負荷条件と

して 1Hz 程度の周期的な負荷を想定している。このような生体内の関節軟骨が受ける物理的ストレスを忠実に再現する in vitro の系は、研究を推進する上で必須のものとして待望されてきたが未だ確立されておらず、本研究はそれに正面から取り組もうとするものである。近年は分子生物学の技術革新は目覚ましく、マイクロアレイの性能はより確かで安価なものとなり、また次世代シーケンサーが登場して ChIP-sequence の手法が普及し、全ゲノム・エピゲノムの解析がラボ単位で実施可能となりつつある。このような網羅的な解析手法は未知の分子やシグナルを見つけるのに強大な力を発揮するが、いずれも in vitro の解析手法であるため、現時点では変形性関節症研究に直接応用することが困難である。本研究の最大の目的は、このような分子生物学の最新技術を変形性関節症研究に持ち込むことである。より生理的な物理的ストレスの in vitro 負荷モデルが確立されれば、適度な物理的ストレスが関節軟骨の維持を促進する過程や、過剰な物理的ストレスが関節軟骨を変性させる過程、さらにそのスイッチングのメカニズムを、最先端の実験手法によって詳しく解析することが可能となり、変形性関節症の病態や治療に関する研究が一気に加速することが期待される。

3. 研究の方法

軟骨系細胞株を用いて、静水圧を負荷する圧と周期、時間、負荷後の培養期間に関して基礎検討を行い、静水圧が catabolic に作用する条件と anabolic に作用する条件を探索する。適切な負荷条件が確立されれば、マウスおよびヒト由来の初代培養軟骨細胞を用いて条件をさらに最適化する。catabolic な条件と anabolic な条件で負荷したサンプルを用いて最先端の発現スクリーニングを行い、圧負荷が細胞にもたらす多様な変化を網羅的に解析して、それぞれの主要シグナル経路を解明する。また物理的ストレスと並んで関節軟骨変性の原因とされる炎症シグナルとも比較するため、catabolic な条件での物理的ストレス負荷系と、炎症性サイトカイン添加による軟骨変性系との間でも同様の解析を行い、変形性関節症の二大要素間でのシグナル経路の違いを探る。

4. 研究成果

マウス初代関節軟骨細胞を用いて細胞伸展装置にて軟骨変性関連遺伝子の発現を誘導する条件 (伸展率、伸展周期、負荷時間、負荷後の培養期間) を最適化し、その条件にて得られた cDNA をマイクロアレイにて解析した。ストレス負荷によって発現量が大きく

変動する遺伝子を選別し、軟骨細胞での発現が多いものを絞り込み、候補遺伝子とした。その一つ、Gremlin1 について、注目して解析を進めた。Gremlin1 は BMP のアンタゴニストとして知られ、肢芽発生時に重要な役割を果たすことが知られており、変形性関節症の発症によって関節軟骨での発現が増加することも報告されているが、その役割は解析されてこなかった。Gremlin1 は伸展負荷だけでなく、周期的静水圧負荷装置を用いた系でも発現が増強した。リコンビナント Gremlin1 を培養関節軟骨細胞の培地に加えると、軟骨細胞の基質産生能は低下し、Mmp13 など軟骨基質分解酵素の発現が増強した。マウス変形性関節症モデルの膝にリコンビナント Gremlin1 を注射すると、著しく変形性関節症が促進された。反対に Gremlin1 抗体をマウス変形性関節症モデルの膝に注射すると、変形性関節症の発症は抑制された。Gremlin1 の過剰発現系で種々のレポーターアッセイを行ったところ、Gremlin1 は NF- κ B シグナルを活性化することが分かった。そこで NF- κ B の代表的転写因子 RelA の flox マウスを用いて検証したところ、RelA をノックアウトした軟骨細胞もしくは軟骨組織では Gremlin1 の catabolic な作用はほとんど観察されなかった。この現象は IKK 阻害剤を用いた系でも同様であった。

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 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, Kobahashi 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- κ B and TNF- α 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- κ 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. β -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 α and GSK-3 β proteins are involved in early stages of chondrocyte differentiation with functional redundancy through RelA protein phosphorylation. *J Biol Chem*. 287:29227-36, 2012.
- 〔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 α 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

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

(2) 研究分担者

澤田 良子 (Sawada Ryoko) 東京大学・医学部
附属病院・助教
研究者番号：30648308

池田 敏之 (Ikeda Toshiyuki) 東京大学・医学部
附属病院・助教
研究者番号：80322759