

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713052

研究課題名(和文) 軟骨保護・再生因子Runx1をターゲットとした変形性関節症の治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Runx1 contributes to articular cartilage maintenance through enhancement of cartilage matrix production and suppression of hypertrophic differentiation

研究代表者

矢野 文子 (Yano, Fumiko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80529040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：関節軟骨の維持にRunx1の発現調節が関与している可能性を検証するためにCol2Cre-Runx1^{fl/fl}マウスを作成した。OAモデルを作成し、関節軟骨の保持と変性について組織学的に詳細に検証した結果、関節軟骨特異的にRunx1を欠如させたマウスではコントロール群に比べて、明らかに軟骨の変性と骨棘形成が促進されていた。In vitroでBapx1ノックアウトレンチウイルスを用いて、Runx1の発現を解析したところ、Bapx1の欠損状態ではRunx1は軟骨分化を制御することができなくなり、Runx1はBapx1を介して軟骨肥大化を抑制していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analysed OA development of Col2a1-Cre;Runx1^{fl/fl} and Runx1^{fl/fl} mice by surgical induction of joint instability, and expression of marker proteins in the articular cartilage by immunostainings. The cartilage degradation and the osteophyte formation of Col2a1-Cre;Runx1^{fl/fl} the joints after 8 weeks was accelerated compared with the Runx1^{fl/fl} littermate joints. To know the regulation of chondrocyte differentiation by Runx1, we analysed a function of downstream molecules and interaction with co-factors. Knockdown of Runx1 in articular chondrocytes increased hypertrophic markers, and decreased Bapx1 and chondrogenic markers. The similar results were observed in the Col2a1-Cre;Runx1^{fl/fl} knee joint cartilage. Notably, suppression of hypertrophic markers by Runx1 was diminished by silencing of Bapx1 by siRNA. The present data suggest that Runx1 contributes to articular cartilage maintenance through suppression of hypertrophic differentiation via Bapx1 induction.

研究分野：整形外科 関節軟骨

キーワード：Runx1 ルブリシン

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省では、国内での変形性膝関節症 (Osteoarthritis: 膝 OA) 患者数を、自覚症状を有する患者数で約 1000 万人、潜在的な患者数 (X 線診断による患者数) で約 3000 万人と推定しており、高齢人口の増加によって運動器変性疾患の患者数は増え続けている。その主たる疾患である変形性膝関節症については加齢や物理的ストレス、炎症などの関与が示唆されているものの、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や、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。その病因については加齢や物理的ストレス、炎症などの関与が示唆されているが、分子レベルでの病態解明は始まったばかりである。申請者らのグループでは従来から変形性膝関節症の基礎研究を展開しており、変形性膝関節症の in vivo での解析を可能にすべく世界に先駆けてマウスを用いた変形性膝関節症モデルを樹立し (*Osteoarthritis Cartilage* 13:632-41,2005) そのモデルを用いて Runx2 や C/EBP、Carminerin、HIF2A などの軟骨内骨化を制御する転写因子群が変形性膝関節症の発症・進行をも強力に制御していることを明らかにした (*Arthritis Rheum* 54:2462-2470,2006; *Nature Med* 12:665-670,2006; *PLoS One* 4:e4543,2009; *Nature Med* 16:678-686,2010)。そして軟骨内骨化の制御機構の網羅的解析のために肥大化マーカー-10 型コラーゲンのプロモーター解析を行い、その強力な上流転写因子として軟骨内骨化促進分子でもある Runx2 を同定した (*Arthritis Rheum* 60:166-178,2009)。そして **科学研究費補助金・若手研究 A (H22-24, 課題番号 22689052)** の中で、Runx1 が軟骨形成分化マーカー-2 型コラーゲンのプロモーターに直接結合し、Sox5、Sox6 と相互作用して、軟骨基質を促進的に誘導し、マウスだけでなくヒトにおいても Runx1 は変形性膝関節症の抑制遺伝子として、強く関与していることを解明した (*Ann Rheum Dis* 72:748-753,2012)。Runx1 が関節軟骨にとって、保護的な作用を持つと考えられており、申請者らと同じ時期に、幹細胞研究において、Runx1 はヒト間葉系幹細胞が軟骨分化するのに重要な役割を果たしていることが示され、Sox9 と同様に Runx1 は軟骨初期分化において、重要な因子であるとして世界中の注目を集めている (*Science* 336:717-721,2012; *N Engl J Med* 366:2522-2524,2012)。また申請者らは Runx1 を発現上昇させる化合物を、OA モデルマウス膝関節内投与を行うことによって、軟骨変性の進行が有意に抑制できることを基礎検討で確認しており、Runx1 シグナルは画期的な治療標的となる可能性を有している。

2. 研究の目的

関節軟骨保持・形成作用を持つ転写因子 Runx1 について、最新の in vivo システムを用いて関節軟骨における作用を詳細に分析するとともに、Runx1 を取り巻くシグナル群を最先端の分子生物学的手法で網羅的に解析し、安全かつ有効な治療標的を探索する。得られた治療標的候補について培養軟骨細胞、さらにマウスモデル上でも治療効果の検討を行い、変形性膝関節症の新規治療法の実現化を総合的に加速する。

3. 研究の方法

Runx1 の軟骨における作用を in vivo, in vitro の最新技術を駆使して解析し、得られた知見から候補分子を選定し、マウスモデル上での治療効果検討も行う。

具体的には以下のサブテーマに分けて研究を遂行する。

- (1) 組織・時期特異的ノックアウトマウスを用いた変形性膝関節症モデルの解析
- (2) エピゲノム的手法を用いた Runx1 と Runx2 の標的分子群の網羅的検索
- (3) プロテオミクス的手法を用いた Runx1 の修飾分子群の網羅的検索
- (4) 候補分子群の発現解析と in vitro での Runx1 のシグナル相互作用の検討
- (5) Runx1 の in vivo での治療効果の検討

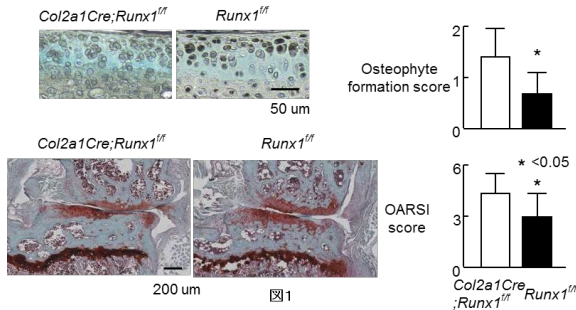
4. 研究成果

(1) 組織・時期特異的ノックアウトマウスを用いた変形性膝関節症モデルの解析

関節軟骨の維持に Runx1 の発現調節が関与している可能性を検証するために Col2Cre-Runx1flox マウス、Col2CreER-Runx1flox マウス、Sox9Cre-Runx1flox マウスの 3 種類の組織特異的ノックアウトマウスを作出した。Sox9Cre-Runx1flox マウスは発生期の段階で異常がみられたことから、関節軟骨全層特異的 Col2Cre-Runx1flox マウスと Col2CreER-Runx1flox マウスについて、OA モデルを作成して、関節軟骨の保持と変性について組織学的に詳細に検証した結果、関節軟骨特異的に Runx1 を欠如させたマウスでは変形性膝関節症モデルにおいて、明らかに軟骨の変性が起こることが判明した (図 1) (論文投稿準備中)。

さらに、Runx1 が関節軟骨層だけでなく、変形性膝関節症発症のきっかけとなる関節軟骨最表層 (Superficial Zone; SFZ) (図 2) に発現し、そこにおける保護作用が重要な働きをしていることが明らかとなった。関節軟骨最上層部位特異的 Cre マウス (Prg4EGFPCreERt2) を入手し、変形性膝関節症の発症のメカニズムと Runx1 の関連をより詳細に検討する予定である。(国際研究共同強化にて続行中)

(図1)



(図2)

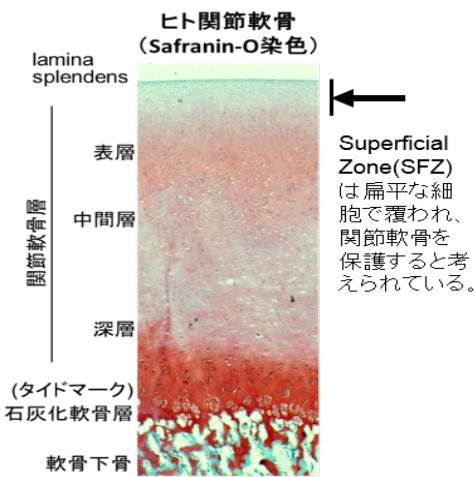


図2

(2) エピゲノムの手法を用いた Runx1 の標的分子群の網羅的検索

正常および変性関節軟骨細胞において Runx1 の ChIP-seq を行う準備をしている。同時に Runx1 flox マウス正常関節軟骨細胞にアデノウイルスで Runx1 を強制発現させた細胞群、Cre アデノウイルスで Runx1 を欠損させた細胞群で cDNA マイクロアレイも行う準備をしている。この2つの解析結果から、Runx1 が標的とする遺伝子群をより正確に把握することが可能となる。現在、サンプル準備中である。

(3) プロテオミクスの手法を用いた Runx1 の修飾分子群の網羅的検索

関節軟骨細胞においてより生理的な状態で Runx1 のタンパクに結合する修飾分子群を選別するため、共免疫沈降法を行っている。既知の軟骨必須転写因子である Sox5,6,9 は Runx1 と蛋白相互作用することが確認され、その必須ドメインも同定できている。さらに未知の蛋白を同定するため、LC/MS/MS を用いた解析を立命館大学・生命医科学科の下畑氏と共同研究として行っている。

(4) 候補分子群の発現解析と in vitro での Runx1 のシグナル相互作用の検討

(2) の解析で Runx1 の発現調節により、

Nkx3.2/Bapx1 が Runx1 の下流の分子である可能性が高いことが示唆されたため、マウス関節軟骨にて発現解析を行ったところ、組織切片において、Runx1 と同様に正常関節軟骨最表層から関節軟骨全体に発現しており(図3)、OA 関節軟骨層では発現していないことが示された。さらに in vitro で Bapx1 ノックアウトレンチウイルスを用いて、Runx1 の発現を解析したところ、Bapx1 の欠損状態では Runx1 は軟骨分化を制御することができなくなり、Runx1 は Bapx1 を介して軟骨肥大化を抑制していることが示唆された(論文投稿準備中)。

(図3)

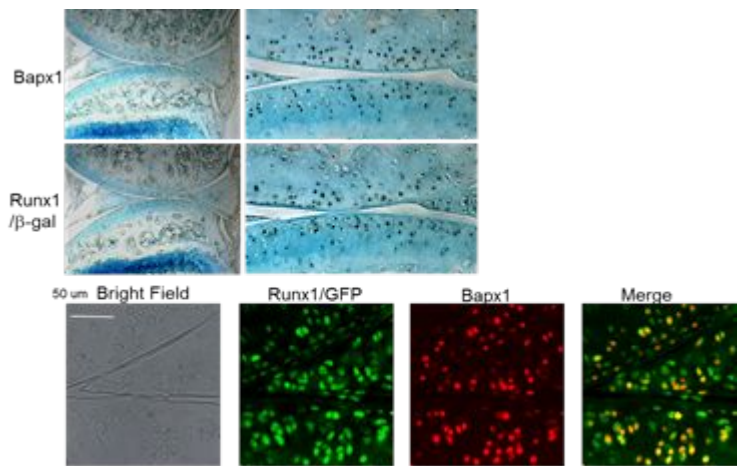


図3

5) Runx1 の in vivo での治療効果検討

軟骨破壊のトリガーである軟骨肥大化を選択的かつ強力に制御しうる Runx1 を OA モデルマウスの膝関節内に投与することによって OA に対する治療効果を in vivo で検討している。Runx1 mRNA を膝関節内に投与する実験においては研究協力者の有するミセル担体技術(ドラッグデリバリーシステム: DDS)を導入している。現在までのところ、Runx1 mRNA を投与することで、骨棘の抑制と軟骨破壊の抑制が示唆されている(研究協力者のグループより論文発表済み: *Sci Rep* 6:18743,2016)。さらに(4)で得られた Bapx1 mRNA を投与することで、OA の発症を抑制できないか検討する予定である。

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 15 件)

1. Kawata M, Taniguchi Y, Mori D, Yano F, Ohba S, Chung UI, Shimogori T, Mills AA, Tanaka S, Saito T. Different regulation of limb development by p63 transcript variants. *PLoS One*. 2017 Mar 23;12(3):e0174122. doi:10.1371/journal.pone.0174122. eCollection 2017 Mar 23.
2. Taniguchi Y, Kawata M, Ho Chang S, Mori D, Okada K, Kobayashi H, Sugita S,

- Hosaka Y, Inui H, Taketomi S, **Yano F**, Ikeda T, Akiyama H, Mills AA, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, Saito T. p63 Regulates Chondrocyte Survival in Articular Cartilage. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Mar;69(3):598-609. doi: 10.1002/art.39976.
3. Kobayashi H, Chang SH, Mori D, Itoh S, Hirata M, Hosaka Y, Taniguchi Y, Okada K, Mori Y, **Yano F**, Chung UI, Akiyama H, Kawaguchi H, Tanaka S, Saito T. Biphasic regulation of chondrocytes by Rela through induction of anti-apoptotic and catabolic target genes. *Nat Commun*. 2016 Nov 10;7:13336. doi: 10.1038/ncomms13336.
 4. Chang SH, Yasui T, Taketomi S, Matsumoto T, Kim-Kaneyama JR, Omiya T, Hosaka Y, Inui H, Omata Y, Yamagami R, Mori D, **Yano F**, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Comparison of mouse and human ankles and establishment of mouse ankle osteoarthritis models by surgically-induced instability. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016 Apr;24(4):688-97. doi: 10.1016/j.joca.2015.11.008.
 5. 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*. 2015;36(3):179-86. doi:10.2220/biomedres.36.179.
 6. Saito T, Ohba S, **Yano F**, Seto I, Yonehara Y, Takato T, Ogasawara T. Runx1 and Runx3 Are Downstream Effectors of Nanog in Promoting Osteogenic Differentiation of the Mouse Mesenchymal Cell Line C3H10T1/2. *Cell Reprogram*. 2015 Jun;17(3):227-34. doi:10.1089/cell.2014.0059.
 7. 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*. 2015;36(1):21-9. doi:10.2220/biomedres.36.21.
 8. 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*. 2015 Mar 10;112(10):3080-5. doi:10.1073/pnas.1419699112.
 9. Okada K, Fukai A, Mori D, Hosaka Y, **Yano F**, Chung UI, Kawaguchi H, Tanaka S, Ikeda T, Saito T. Identification of SCAN Domain Zinc-Finger Gene ZNF449 as a Novel Factor of Chondrogenesis. *PLoS One*. 2014 Dec 29;9(12):e115169. doi: 10.1371/journal.pone.0115169.
 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*. 2014 Nov;73(11):2062-4. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205672.
 11. 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*. 2013 Sep 16;8(9):e74137. doi: 10.1371/journal.pone.0074137.
 12. **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*. 2013 Jul;34(22):5581-7. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.04.008.
 13. **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 candidate targeting Runx1. *Ann Rheum Dis*. 2013 May;72(5):748-53. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201745.
 14. Komiyama Y, Ohba S, Shimohata N, Nakajima K, Hojo H, **Yano F**, Takato T, Docheva D, Shukunami C, Hiraki Y, Chung UI. : Tenomodulin expression in the periodontal ligament enhances cellular adhesion. *PLoS One*. 2013 Apr 10;8(4):e60203. doi:10.1371/journal.pone.0060203.
 15. 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*. 2013 Apr 5;288(14):9924-32. doi: 10.1074/jbc.M112.409342.

〔学会発表〕(計 18 件)

1. **Fumiko Yano**, Taku Saito, Shinsuke Ohba, Sakae Tanaka, Ung-il Chung: Runx1 contributes to articular cartilage maintenance through enhancement of cartilage matrix production and suppression of hypertrophic differentiation. Cold Spring Harbor Asia conference on Bone & Cartilage: From Development to Human Diseases, 2016.10.24-10.28 The Suzhou Dushu Lake Conference Center (Suzhou, China) (査読有・ポスター発表)
2. **矢野文子**, 齋藤琢, 大庭伸介, 鄭雄一: Runx1による軟骨分化制御機構 第31回日本整形外科学会基礎学術集会 2016.10.13-14 福岡国際会議場(福岡県, 福岡市)(シンポジウム口演)
3. **矢野文子**, 齋藤琢, 大庭伸介, 鄭雄一: Runx1による軟骨分化制御機構 第34回日本骨代謝学会学術集会 2016.7.20-23 大阪国際会議場(大阪府, 大阪市)(シンポジウム口演)
4. **矢野文子**, 齋藤琢, 大庭伸介, 田中栄, 鄭雄一: Runx1による軟骨分化制御機構 第2回骨免疫学会 2016.7.6-8 ホテルモントレ沖縄スパ&リゾート(沖縄県, 恩納村)(査読あり, ポスター発表)
5. **Fumiko Yano**, Taku Saito, Shinsuke Ohba, Ung-il Chung: Runx1 contributes to articular cartilage maintenance through enhancement of cartilage matrix production and suppression of hypertrophic differentiation. The second Herbert Fleisch Workshop, 2016.2.28-3.1 Novotel Brugge Centrum (Brugge, Belgium) (査読有・口頭発表・ポスター発表) **IBMS/ASBMR Award 2016**
6. **矢野文子**, 齋藤琢, 宮本健史: 変形性関節症の新規治療候補薬の作用解析 東大病院先端医療開発フォーラム 2016.2.2 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール(東京都, 文京区)(査読なし, 口頭・ポスター発表)
7. **矢野文子**: 軟骨再生を誘導する変形関節症治療候補薬のin vivoモデルにおける効果~そのメカニズムの解析とターゲット分子の探索~ 第18回骨代謝研究会 2015.11.30 慶応義塾大学医学部総合医科学研究棟(東京都, 新宿区) (口頭発表, 招待口演)
8. **Fumiko Yano**: A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1 LMU-Utokyo Symposium 2015. 2015, 10.27-31 Innovation Center for Biotechnology(Munich, Germany) (査読なし, ポスター発表)
9. **矢野文子**: Runx1による軟骨分化制御機構 第16回運動器科学研究会 2015.9.11-12 みなみホール(鹿児島県, 鹿児島市)(査読あり, 口頭発表)
10. **矢野文子**, 齋藤琢: 変形性関節症の新規治療候補薬の作用解析 東大病院先端医療開発フォーラム 2015.1.22 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール(東京都, 文京区)(査読なし, 口頭・ポスター発表)
11. **矢野文子**, 齋藤琢: 変形性関節症治療を目指した軟骨再生医療研究 第42回日本関節病学会 共催シンポジウム 2014.11.7 虎ノ門ヒルズ(東京都, 港区)(シンポジウム口演)
12. **矢野文子**, 北條宏徳, 大庭伸介, 深井厚, 保坂陽子, 池田敏之, 齋藤琢, 平田真, 筑田博隆, 高戸毅, 川口浩, 鄭雄一: 新規OA治療候補化合物はRunx1をターゲットとしている 第33回日本運動器移植・再生医学研究会 2014.9.27 第一ホテル両国(東京都, 墨田区)(査読あり, 口頭発表)
13. **Fumiko Yano**, Yoko Hosaka, Atsushi Fukai, Taku Saito, Hironori Hojo, Shinsuke Ohba, Hiroshi Kawaguchi, Tsuyoshi Takato, Ung-il Chung: A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1 第14回東京大学生命科学シンポジウム 2014.4.26 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール(東京都, 文京区)(査読なし, 口頭・ポスター発表)
14. **矢野文子**, 北條宏徳, 大庭伸介, 深井厚, 保坂陽子, 池田敏之, 齋藤琢, 平田真, 筑田博隆, 高戸毅, 川口浩, 鄭雄一: 新規OA治療候補化合物はRunx1をターゲットとしている. 第27回日本軟骨代謝学会 2014.2.28-3.1 京都府医師会館(京都府, 京都市)(**第19回日本軟骨代謝学会賞受賞口演**)
15. **矢野文子**, 保坂陽子, 齋藤琢, 北條宏徳, 大庭伸介, 高戸毅, 鄭雄一: 新規OA治療候補化合物はRunx1をターゲットとしている. FIRST合同国際シンポジウム 2014.2.21 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール(東京都, 文京区)(査読なし, 口頭・ポスター発表)
16. **矢野文子**, 大庭伸介, 鄭雄一: 変形性関節症の新規治療候補薬の発見 東大病院先端医療開発フォーラム 2014.1.24 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール(東京都, 文京区)(査読なし, 口頭・ポスター発表)
17. **Fumiko Yano**, Yoko Hosaka, Atsushi Fukai, Taku Saito, Hironori Hojo, Shinsuke Ohba, Hiroshi Kawaguchi, Tsuyoshi Takato, Ung-il Chung: A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1. Frontiers 2013 EPFL Symposium. 2013, 6.21-22 Swiss Federal Institute of Technology

in Lausanne (Lausanne, Switzerland)
(査読なし、ポスター発表)

18. **Fumiko Yano**, Yoko Hosaka, Atsushi Fukai, Taku Saito, Hironori Hojo, Shinsuke Ohba, Hiroshi Kawaguchi, Tsuyoshi Takato, Ung-il Chung : A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1 第13回東京大学生命科学シンポジウム 2013.6.8 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール(東京都、文京区)(査読なし、口頭・ポスター発表)

〔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 矢野 文子 (Yano, Fumiko)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80529040