

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861189

研究課題名(和文) 転写因子Nkx3.2をターゲットとした変形性関節症(OA)治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of treatment strategy against osteoarthritis targeting transcription factor Nkx3.2

研究代表者

梶名 耕介(Ebina, Kosuke)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70612076

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)：変形性関節症(OA)患者の軟骨でNkx3.2の遺伝子発現は非変性部より変性部において約1/2と低値であった。滑膜細胞を用いた軟骨再生効率を高めるために、Nkx3.2遺伝子を導入したプラスミドを作成して遺伝子導入し、Nkx3.2の遺伝子発現が約90～30000倍に、軟骨分化促進因子Sox9の遺伝子発現が約2～7倍に、軟骨分化誘導後もSox9の遺伝子発現が約2.8倍に増加していた。また滑膜細胞のバンク化による同種移植の可能性を検討するためOA患者と関節リウマチ患者の滑膜細胞をヌードラットの膝関節軟骨欠損部に移植したところ、良好な軟骨再生能を認めたことより、有効な選択肢となる可能性が示された。

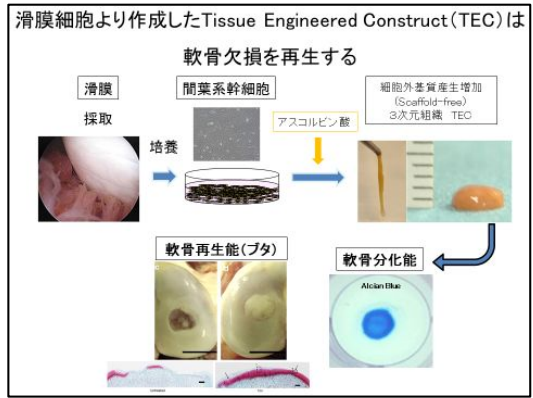
研究成果の概要(英文)：We confirmed that gene expression of Nkx3.2 is down-regulated in degenerated cartilage compared to intact cartilage of osteoarthritis patients. We developed scaffold-free tissue engineering construct (TEC) from synovial mesenchymal stem cells (SMSCs) which repairs cartilage defect. We also developed Nkx3.2 gene inserted plasmid, and transfected into synovial MSCs, which showed 90-30000 folds overexpression of Nkx3.2 gene and 2-7 folds of Sox9 gene. Finally, we induced chondrogenic differentiation to this Nkx3.2 gene overexpressed synovial MSCs, while failed to confirm significant increase in size and extra-cellular matrix production. Then, we tried to establish allogenic SMSCs bank to overcome the disadvantage of autogenic transplantation. We investigated that SMSCs from osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients exhibit good potential to repair the osteochondral defects of nude rat, indicating the possibility of promising cell sources for cartilage repair.

研究分野：骨・軟骨代謝/関節リウマチ

キーワード：軟骨再生 滑膜細胞 変形性関節症 関節リウマチ 同種移植 細胞バンク

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に伴い、関節軟骨が変性し疼痛や機能障害をもたらす変形性関節症 (Osteoarthritis : OA) の罹患頻度は今後徐々に増加すると考えられる。しかし未だその病態は不明な点が多く、治療法も対症療法が中心である。正常関節軟骨において軟骨細胞は2型コラーゲン (Col2) やグリコサミノグリカン (GAG : アグリカン [Agg]) などの軟骨基質を産生し、軟骨特有の弾性や張力を維持している。転写因子 Sox9 は Col2 などの発現を直接促進する一方、転写因子 Runx2 は内軟骨性骨化や骨棘形成を促進するため軟骨変性を促進する。実際に OA 患者の軟骨においては Col2 や Sox9 の発現が低下し、Runx2 の発現が上昇していることが報告されている。転写因子 Nkx3.2 は、軟骨成長帯に高発現する遺伝子群の一つである。我々は Nkx3.2 が Col2 や Sox9 の発現を増加させ、Runx2 の発現を抑制することより OA に対する有効な治療ターゲットと成り得ることを報告した (Kawato Y., Ebina K. et al. PLoS One. 2012)。また、我々は滑膜細胞を高密度・三次元培養した軟骨再生組織である三次元人工組織 (Tissue Engineered Construct : TEC)を開発し、軟骨再生医療の臨床試験を実施中である。しかし自家細胞移植では複数回の手術や細胞培養期間・コストなどの問題があり、滑膜細胞をバンク化した同種移植の有効性が期待されている。



2. 研究の目的

当院で臨床試験中の滑膜細胞由来三次元人工組織 (TEC) に Nkx3.2 遺伝子を導入することでより有効な軟骨再生促進効果を得られるかを検討すること。また、TEC による軟骨再生の効率を高める新たな方法として、滑膜間葉系幹細胞のバンク化による同種移植による軟骨再生の可能性を検討すること。

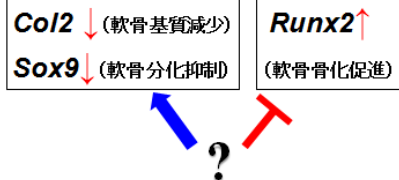
3. 研究の方法

膝人工関節置換術を実施した OA 患者の軟骨組織の変性部・非変性部に分けて採取し、軟骨関連遺伝子の発現を確認した。また、TEC による軟骨再生効率を高めるために、マウス・ヒト Nkx3.2 遺伝子を導入したプラスミドを作成した。このプラスミドをヒト・ラット滑膜細胞に遺伝子導入し、軟骨分化誘導した際の軟骨関連遺伝子の発現を確認した。また、手術で採取した OA 患者と関節リウマチ (RA) 患者の滑膜細胞より作成した TEC の軟骨分化能や、ヌードラットの膝関節軟骨欠損部に移植した際の軟骨再生能を評価した。

4. 研究成果

OA 患者の軟骨組織の Nkx3.2 遺伝子発現を確認したところ、変性部では非変性部より約 1/2 と低値であった。

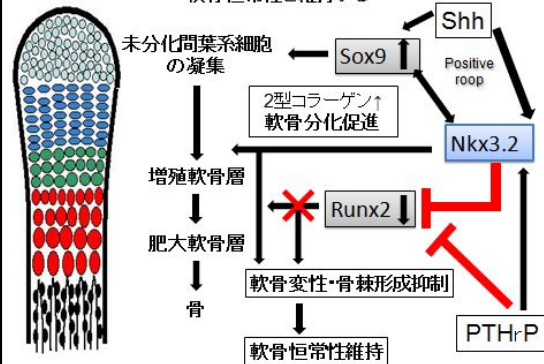
変形性関節症患者の軟骨では2型コラーゲン (Col2) と Sox9 の発現が抑制され、Runx2 の発現が上昇



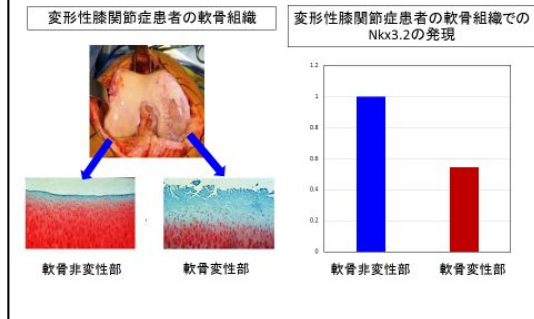
2型コラーゲンと Sox9 の発現を上昇させ、Runx2 の発現を抑制する因子は変形性関節症の有効な治療ターゲットである

Haag et al. Pathobiology, 2008
Orfanidou et al. J Cell Mol Med, 2009
Chen et al. Arthritis Rheum, 2012

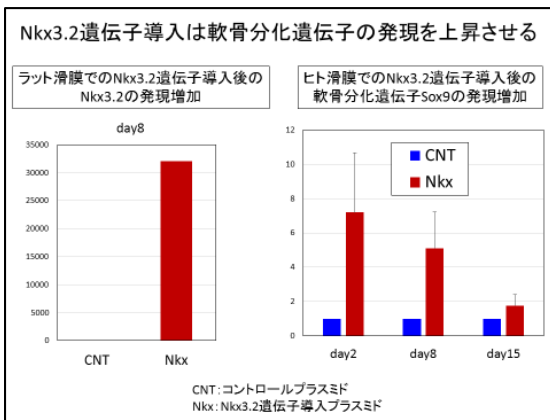
Nkx3.2 は軟骨分化を促進し、かつ内軟骨性骨化を抑制することで軟骨恒常性を維持する



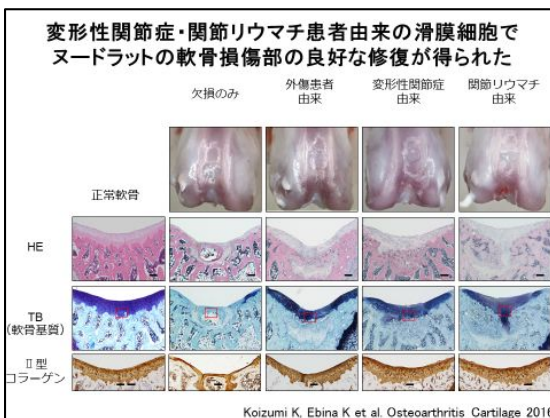
Nkx3.2 の遺伝子発現は軟骨変性部で低下している



また、マウス・ヒト Nkx3.2 遺伝子をヒト・ラット滑膜細胞に遺伝子導入したところ、Nkx3.2 の遺伝子発現が約 90 ~ 30000 倍に、軟骨分化に必須の転写因子 Sox9 の遺伝子発現が約 2~7 倍に増加していることを確認した。



この滑膜細胞を用いて TEC を作成し、軟骨への分化能を確認したところ Nkx3.2 遺伝子導入群では Sox9 の遺伝子発現がコントロール群の約 2.8 倍に増加していたが、軟骨ペレットや軟骨基質の有意な増大は認められなかった。そこで OA・RA 患者より採取した滑膜細胞による軟骨再生の可能性を検討した。現在臨床試験中の外傷性膝関節軟骨損傷患者より高齢であるにも関わらず、同等の細胞増殖能や TEC を作成した際も同等の軟骨遺伝子発現や基質産生を認めた。またヌードラットの膝関節軟骨欠損部に移植したところ、OA・RA 群いずれも良好な軟骨再生能を認めた。以上の結果より、OA 患者や RA 患者由来の同種滑膜細胞は軟骨損傷治療の有効な細胞バンクとなる可能性が示された (Koizumi K., Ebina K. et al. Osteoarthritis Cartilage. 2016)。



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 13 件)

1. Koizumi K, Ebina K et al. Synovial mesenchymal stem cells from osteo- or rheumatoid arthritis joints exhibit good potential for cartilage repair using a scaffold-free tissue engineering approach. Osteoarthritis Cartilage. 2016. Mar 10. 査読有 (2 番目)
2. Ebina K, Hashimoto J, Masafumi K, et al. The effects of switching daily teriparatide to

oral bisphosphonates or denosumab in patients with primary osteoporosis. J Bone Miner Metab. 2016. Jan 13. [Epub ahead of print] 査読有 (1 番目: [corresponding author](#))

3. Kaneshiro S, Ebina K, Hirao M et al. The efficacy and safety of additional administration of tacrolimus in patients with rheumatoid arthritis who showed an inadequate response to tocilizumab. Mod Rheumatol. 2016. In press 査読有 (2 番目: [corresponding author](#))
4. Hirao M, Hirai Y, Ebina K, et al. Hallux valgus deformity after total ankle arthroplasty for rheumatoid arthritis: a case report. Mod Rheumatol. 2016. In press 査読有 (3 番目)
5. Ebina K, Noguchi T, Hirao M, et al. Effects of switching weekly alendronate or risedronate to monthly minodronate in patients with rheumatoid arthritis: a twelve-month prospective study Osteoporosis International, 2015. Oct 16. [Epub ahead of print] 査読有 (1 番目: [corresponding author](#))
6. Ebina K, Hashimoto J, Shi K, et al. Undercarboxylated osteocalcin may be an attractive marker of teriparatide treatment in RA patients: response to Mokuda. Osteoporosis International, 2015. Apr;26(4):1445. 査読有 (1 番目: [corresponding author](#))
7. Ebina K, Noguchi T, Hirao M, et al. Comparison of the effects of 12 months monthly minodronate monotherapy and monthly minodronate combination therapy with vitamin K2 or eldcalcitol in patients with primary osteoporosis. J Bone Miner Metab. 2015. Aug 25. [Epub ahead of print] 査読有 (1 番目: [corresponding author](#))
8. Yoshida Y, Ogata A, Kang S, Ebina K, et al. Semaphorin 4D contributes to rheumatoid arthritis by inducing inflammatory cytokine production: Pathogenic and therapeutic implications. Arthritis Rheumatol. 2015. Jun;67(6):1481-90. 査読有 (4 番目)
9. Noguchi T, Ebina K, Hirao M, et al Progranulin plays crucial roles in preserving bone mass by inhibiting TNF- α -induced osteoclastogenesis and promoting osteoblastic differentiation in mice. Biochem Biophys Res Commun. 2015. Sep 25;465(3):638-43. 査読有 (2 番目:

corresponding author)

10. Ebina K, Miyoshi Y, Izumi S, et al. A case of adolescent giant parathyroid adenoma presenting multiple osteolytic fractures and postoperative hungry bone syndrome. *Clinical Case Reports* 2015. Oct;3(10):835-4. 査読有 (1 番目: corresponding author)
11. Kaneshiro S, Shi K, Ebina K, et al. Multiple subcutaneous xanthogranuloma at juxta-articular sites with bone cystic changes resembling rheumatoid arthritis: A case report *Mod Rheumatol.* 2015. Dec 23:1-4. [Epub ahead of print] 査読有 (3 番目)
12. Kashii M, Matsuo Y, Sugiura T, Fujimori T, Honda H, Kaito T, Ebina K, et al. Circulating sclerostin and dickkopf-1 levels in ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Miner Metab.* 2015 Jun 4. [Epub ahead of print] 査読有 (7 番目)
13. Kaneshiro S, Ebina K, Shi K, et al. Bruton tyrosine kinase (Btk) suppresses osteoblastic differentiation. *J Bone Miner Metab.* 2015. Sep;33(5):486-95. 査読有 (2 番目)

[学会発表] (計 8 件)

1. Ebina K, Koizumi K, Hirao M, et al. Synovial mesenchymal stem cells from osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients exhibit good potential for the development of scaffold-free tissue engineering constructs for cartilage repair. *Japan College of Rheumatology 2016 Annual Meeting, Yokohama (International Workshop Award).*
2. Koizumi K, Ebina K, Hirao M, et al. Cartilage repair ability of scaffold-free tissue engineered construct derived from osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients' synovial mesenchymal stem cells. *ASBMR 2015 Annual Meeting, Seattle (Young Investigator Travel Award).*
3. Noguchi T, Ebina K, Hirao M, et al. Apolipoprotein E (ApoE) plays a crucial role in maintaining trabecular and cortical bone mass by promoting osteoblastic differentiation via ERK1/2 pathway and suppressing osteoclast differentiation by down-regulation of c-Fos and NFATc1. *ASBMR 2015 Annual Meeting, Seattle (Young Investigator Travel Award).*
4. Ebina K, Hashimoto J, Hirao M, et al.

Assessment of the Effect of 12 Months Administration of Denosumab in Patients with Rheumatic Diseases. *American College of Rheumatology 2015 Annual Meeting, San Francisco.*

5. Ebina K, Hashimoto J, Hirao M, et al. Comparison of the effect of 18-months daily Teriparatide administration between rheumatoid arthritis and postmenopausal osteoporosis patients. *World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases 2015 Annual Meeting, Milano.*
6. Ebina K, Hashimoto J, Hirao M, et al. Assessment of the effect of 12 months administration of denosumab in patients with rheumatic diseases. *2015 Annual European Congress of Rheumatology - European League Against Rheumatism, Rome.*
7. 蛭名耕介, 野口貴明, 平尾眞ら
閉経後・男性骨粗鬆症患者に対する 12 か月間のミノドロネート単剤・エルデカルシドール併用・ビタミン K2 併用療法の治療効果の比較検討 第 88 回日本整形外科学会学術集会 2015 年 5 月 神戸
8. 蛭名耕介, 野口貴明, 平尾眞ら
テリパラチド連日製剤投与終了後の骨吸収亢進状態に対するビスフォスフォネートとデノスマブによる骨吸収抑制効果の比較検討 第 33 回日本骨代謝学会学術集会 2015 年 7 月 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

蛭名 耕介 (EBINA KOSUKE)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号 : 70612076