

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11010

研究課題名(和文) 関節リモデリングにおけるmicroRNAとADAM12の発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory system of microRNA and ADAM12 expression in the process of joint remodeling

研究代表者

西田 圭一郎 (Nishida, Keiichiro)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80284058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Adam12は、Wild type ATDC5細胞の分化過程において、Col10a1発現に先発って発現が上昇した。一方、Adam12-KO ATDC5細胞では、軟骨分化開始後、Runx2、Col10a1、およびX型コラーゲン蛋白発現が亢進し、Igf-1発現は抑制された。Wild type ATDC5細胞では、TGF- β 1刺激により、Adam12およびIgf-1の発現が亢進し、Runx2発現は抑制された。一方で、Adam12-KO ATDC5細胞では、TGF- β 1刺激による変化は抑制された。Adam12の過剰発現は、ATDC5細胞におけるIgf-1の発現亢進とRunx2の発現抑制をもたらした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、軟骨細胞において、ADAM12がTGF- β 1依存性シグナルに関与し、肥大化に関連するRUNX2およびX型コラーゲン発現を抑制することで軟骨細胞分化を調節していることを示した。また、我々は、ヒトから採取した変形性関節症の骨棘組織において、増殖期～肥大期の軟骨細胞にADAM12が局在することを突き止めている。このことは、ADAM12が変形性関節症の骨棘形成や関節リウマチにおける骨関節のリモデリングに関与していることを示唆する。また、miR-29bの人為的制御によって、ADAM12の発現が制御可能である可能性も示された。

研究成果の概要(英文)：Adam12 was upregulated prior to Col10a1 during chondrogenic differentiation in wild-type ATDC5 cells. In Adam12-KO ATDC5 cells, following initiation of chondrogenic differentiation, we observed a reduction in Igf-1 expression along with an upregulation of hypertrophy-associated Runx2, Col10a1, and type X collagen protein expressions. In ATDC5 wild-type cells, stimulation with TGF- β 1 upregulated the expressions of Adam12 and Igf-1 and downregulated the expression of Runx2. In contrast, in Adam12-KO ATDC5 cells, these TGF- β 1-induced changes were suppressed. Adam12 overexpression resulted in an upregulation of Igf-1 and downregulation of Runx2 expression in ATDC5 cells. The findings suggest that ADAM12 has important role in the regulation of chondrocyte differentiation, potentially by regulation of TGF- β 1-dependent signaling and that targeting of ADAM12 may have a role in management of abnormal chondrocyte differentiation.

研究分野：整形外科学

キーワード：軟骨代謝 miRNA 疾患修飾性OA治療薬 メカニカルストレス エピジェネティクス ADAM12

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)の疾患活動性のコントロールは近年の生物学的製剤や分子標的型疾患修飾性抗リウマチ薬の登場により飛躍的に向上した。一部の患者において、すでに損傷を受けた関節において炎症が完全に抑制されれば、関節リモデリングとともに機能回復をみる場合があるが、その分子基盤はいまだ十分に解明されていない。我々はRA関節における関節リモデリングのメカニズムを解明するために、軟骨細胞においてメカニカルストレスによる蛋白分解酵素発現を制御するmicroRNA(miRNA)の同定を行った。0.166Hz, 5%伸張, 30分の伸張刺激を与えた軟骨細胞と無刺激の軟骨細胞の遺伝子発現をマイクロアレイによって網羅的に解析・比較したところ、約60種類のmiRNAの発現が2倍以上変動していることが確認された(基盤研究C:26462299, 2014-2016)。このうち、本研究では細胞周期や細胞増殖に関与することが明らかになっているmiR-29bに着目した。

2. 研究の目的

本研究では、メカニカルストレスあるいはサイトカイン刺激により軟骨細胞においてmiRNA発現が変動し、Wntシグナルが活性化するとともにmiR-29bの標的遺伝子の一つであるADAM12の発現が亢進することによって関節リモデリングや骨形成が促進されるとの仮説をたてた。具体的には軟骨細胞で初めてmiR-29b-ADAM12シグナルの成立機構を解明し、miR-29bをターゲットとした関節破壊に対する治療薬の開発やリハビリテーションの効果的介入方法の開発の一助とすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) ADAM12 遺伝子のノックアウト(KO)は軟骨細胞の肥大化に抑制的に働く可能性があることから、本年度はATDC5細胞におけるADAM12過剰発現によるIgf-1、RUNX2の発現への影響を検討した。具体的には、細胞にTGF- β 1(10 ng/mL; Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA)を添加し24時間刺激した後にRNAを回収し、wild type ATDC5細胞とADAM12 KO ATDC5細胞とで比較した。さらにATDC細胞において、ADAM12過剰発現ベクターを用いて高発現させ、Igf-1、RUNX2 mRNAの発現に与える影響を検討した。
- (2) 軟骨細胞におけるADAM12発現とmiR-29bとの関連をみるため、TGF- β 1刺激によるADAM12-LとmiR-29bの発現を検討した。正常ヒト軟骨細胞(Lonza)に対しTGF- β 1刺激後24時間での、ADAM12-LとmiR-29bの発現をreal-time PCRにより検討した。さらに、TGF- β 1添加と同時に、TGF- β 1受容体1阻害剤であるSB525334(APEX BIO)を添加し、TGF- β 1刺激の阻害による影響についても検討した。
- (3) ADAM12-knockout(KO) ATDC5細胞樹立のために、CRISPR/Cas9 systemを用いてsingle guide RNA expression vectors: target site of ADAM12 (5' GCATCATGAACCCGTCACG-3' and 5' -TATTCTGACATCGACGATTG-3')とCas9プラスミドでDNAを切断し、それらの細胞集団からホモ切断の細胞だけを抽出するためにFACS Aria II cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)でsingle cell sortingを行った。ホモ切断できている細胞はPCRを行い、シーケンスで確認した。Wild type ATDC5細胞とADAM12 KO ATDC5細胞をDMEM/HAM's F12 (1%FBSを含む)で培養し、細胞を24 well plateにそれぞれ 2.0×10^4 cells/cm²ずつ播種した。次いでreal-time PCRで分化誘導過程におけるADAM12、IGF-1、RUNX2、Col10a1のmRNA発現をwild type ATDC5細胞とADAM12 KO ATDC5細胞で比較検討した。
- (4) miR-29b過剰発現によるADAM12-L発現への影響を調べるため、正常ヒト軟骨細胞に対して

miR-29b mimic (Applied Biosystems) 刺激 24 時間後における ADAM12-L の発現レベルを real-time PCR で測定した。さらに、miR-29b mimic 刺激と同時に TGF- β 1 刺激を加えて、刺激後 24 時間後の ADAM12-L の発現レベルを real-time PCR で測定した。

- (5) miR-29b の発現制御機構を調べるため、in vitro でヒト軟骨細胞に対する周期的伸張刺激が遺伝子発現に与える影響を検討した。正常ヒト軟骨細胞に対して、周期的伸張刺激 (CTS; 0.50Hz, 10% 伸張) を 30 分間負荷し、ADAM12-L と ADAMTS-5、miR-29b の発現を real-time PCR により解析した。

4 . 研究成果

- (1) TGF- β 1 刺激後 24 時間で、ADAM12 と Igf-1 の発現は亢進した一方で、RUNX2 の発現は抑制された。野生型 ATDC5 細胞で TGF- β 1 刺激後に認められた Igf-1 の発現亢進や RUNX2 の発現抑制は、ADAM12 KO ATDC5 細胞では阻害された。さらに、ATDC5 細胞において、ADAM12 を過剰発現すると、Igf-1 発現亢進し、RUNX2 発現は抑制された。
- (2) TGF- β 1 刺激により、濃度依存性に ADAM12-L の発現が有意に亢進し、一方で miR-29b の発現は抑制された ($p < 0.05$)。TGF- β 1 受容体 1 阻害することで、TGF- β 1 によって誘導された ADAM12-L の亢進と miR-29b の抑制が阻害された ($p < 0.05$)。
- (3) ADAM12 KO ATDC5 細胞では、wild type と比較して分化誘導過程に IGF-1 の発現は抑制された。一方で、RUNX2 の発現は 2 週目をピークに亢進した。分化誘導後 3 週と 4 週、5 週目において、ADAM12 KO ATDC5 細胞で、wild type と比較して Col10a1 の発現が有意に亢進した。ADAM12 KO ATDC5 細胞において、wild type と比較し western blot で 3 週と 4 週、5 週目で細胞内の Col10a1 の蛋白の発現が亢進した。以上の結果から、ADAM12 は X 型コラーゲン発現を負に調節し、軟骨細胞の肥大化に抑制的に働くことが示唆された。
- (4) ヒト軟骨細胞において miR-29b の過剰発現により、ADAM12-L の発現が有意に抑制された ($p < 0.05$)。さらに、miR-29b の過剰発現により、TGF- β 1 によって誘導された ADAM12-L の発現が抑制された ($p < 0.05$)。
- (5) 非刺激群と比較し CTS 群では、miR-29b の発現が有意に低下し ($p < 0.05$)、ADAM12-L と ADAMTS-5 の発現が有意に亢進した ($p < 0.05$)。この結果から、比較的強いメカニカルストレスは、miR-29b の発現を抑制することにより ADAM12-L と ADAMTS-5 の発現を亢進させることが判明した。

研究成果のまとめ: 本研究では、軟骨細胞において、ADAM12 が TGF- β 1 依存性シグナルに関与し、肥大化に関連する RUNX2 および X 型コラーゲン発現を抑制することで軟骨細胞分化を調節していることを示した。このことは、ADAM12 が変形性関節症の骨棘形成や関節リウマチにおける骨関節のリモデリングに関与していることを示唆する。また、miR-29b の人為的制御によって、ADAM12 の発現が制御可能である可能性も示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horita M, Nishida K, Hasei J, Furumatsu T, Sakurai M, Onodera Y, Fukuda K, Salter DM, Ozaki T.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Involvement of ADAM12 in Chondrocyte Differentiation by Regulation of TGF- β 1-Induced IGF-1 and RUNX-2 Expressions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Calcif Tissue Int	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00223-019-00549-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 堀田昌宏、西田圭一郎	4. 巻 69
2. 論文標題 ADAM12	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 整形外科	6. 最初と最後の頁 848
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀田昌宏、西田圭一郎、長谷井嬢、古松毅之、尾崎敏文
2. 発表標題 ADAM12はRUNX2を介した軟骨細胞肥大化の制御に重要である
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀田昌宏、西田圭一郎、長谷井嬢、古松毅之、宮澤慎一、那須義久、中原龍一、竹下歩、兼田大輔、大橋秀基、尾崎敏文
2. 発表標題 軟骨分化制御による骨棘形成過程へのADAM12の関与
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	大月 孝志 (Ohtsuki Takashi) (10534802)	岡山大学・保健学研究科・非常勤研究員 (15301)	
研究 分担者	廣畑 聡 (Hirohata Satoshi) (90332791)	岡山大学・保健学研究科・教授 (15301)	