

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591764

研究課題名（和文）炎症性骨・軟骨破壊に対する MMP の役割

研究課題名（英文）A Role of MMP -13 in Inflammatory Bone and Cartilage Destruction

研究代表者

高石 官成（TAKAISHI HIRONARI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60236180

研究成果の概要：

軟骨マトリックスの主要分解酵素である MMP -13 の炎症性骨軟骨破壊における役割を検討した。MMP -13 欠損マウス（KO）は野生型と比べて、変形性関節症の誘導には差を認めなかったが、II 型コラーゲン抗体カクテル投与による関節炎モデルにおいて亜急性期のミエロイド系細胞の集積および滑膜増生とその後の骨軟骨破壊が抑制されていた。MMP -13 は炎症環境下における骨髄由来細胞の末梢への動員および関節炎局所への集積を調節する新規機能をもつ可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：外科、再生医学、細胞・組織、発現制御、トランスレーショナルリサーチ

## 1. 研究開始当初の背景

Matrix metalloproteinase (MMP)は細胞外基質の分解に中心的な役割を担う一方で、様々な生理活性物質のプロセッシングに関与することが知られている。また既報から、MMP は関節リウマチにおける炎症滑膜をはじめ、多くの炎症組織において発現が強力に誘導されることが確認されている。これらのことから、MMP は炎症ネットワークの形成に参加するとともに、組織破壊と改変に effector として作用し、炎症性骨軟骨破壊に対して多

機能かつ強力な影響を及ぼしていると考えられる。炎症環境における MMP の役割については、これまでにいくつかの遺伝子欠損マウスにおける病態モデルの解析が報告されている。MMP -13 は炎症滑膜に強く発現し、I 型および II 型コラーゲンの分解活性が極めて高い。われわれが作製した MMP -13 遺伝子欠損マウスは軟骨性骨原基への血管侵入遅延により肥大軟骨細胞層の延長をきたすが、生理的な骨代謝および炎症環境下での表現型はいまだ詳細には解析されていない。

## 2. 研究の目的

これまでの報告では、硬組織形成に重要な働きをもつ 3 つの MMP ファミリー分子 (MMP-9・MMP-13・MMP-14) に関して各々の関与が発表されてきた。しかしながら、より臨床に近い病態解析につながる報告は少なく、また上記 3 つの MMP に関して同一の実験系での比較研究はなされてこなかった。今後、炎症性骨・軟骨破壊の病態解明にむけてターゲットをしぼるためには、より臨床に近い基礎研究が不可欠である。本研究では、MMP-13 遺伝子欠損マウスに変形性関節症 (OA) モデル、抗体カクテル関節炎 (CAIA) モデルを作成し、炎症環境下の骨軟骨破壊における役割を解析した。

## 3. 研究の方法

(1) OA モデル: 8 週齢 MMP-13 KO および同腹の WT (C57BL) の膝靭帯・半月板を切除することにより関節不安定性を誘発し、術後 4 週・8 週にサフラニン O 染色により軟骨損傷・骨棘形成の程度を組織学的に評価した。  
(2) CAIA モデル: 8 週齢 MMP-13 KO および同腹の WT (C57BL) に 2 mg Type II collagen 抗体カクテル (chondrex) を投与し 3 日後に 50µg LPS を腹腔内注射し、関節炎モデルを作製した。経時的に関節炎スコアを計測し、10 日後に後肢を回収し組織学的検討をした。  
(3) 骨髄移植: 放射線照射 (10.5 gray) した 6 週齢 WT に MMP-13 KO の全骨髄細胞  $1 \times 10^6$  個を静注した。同様に放射線照射後の MMP-13 KO マウスに WT の全骨髄細胞を移植した。骨髄移植後 8 週間で脛骨を採取し、組織学的解析を行った。  
(4) 共存培養系における破骨細胞形成: 新生仔頭蓋骨をコラゲナーゼとデイスパーゼ処理をすることにより、初代骨芽細胞を得た。骨髄細胞は、8 週齢マウス脛骨より採取した。24 穴デイッシュに、初代骨芽細胞と骨髄細胞を  $\alpha$ -MEM, 10% FBS 存在下で培養した。破骨細胞分化は、10 nM 活性型ビタミン D と 1 microM  $PGE_2$  添加により誘導した。培養 7 日後に細胞を固定後、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を施し、3 核以上の巨大細胞を破骨細胞として計数した。  
(5) MMP-9&13 遺伝子二重欠損マウスの作製: MMP-9KO と MMP-13 KO を交配しダブル KO を作製した。

## 4. 研究成果

(1) OA モデルの誘導では、MMP-13 KO と WT の間に有意な差を認めなかった。  
(2) CAIA モデルにおける関節炎では、MMP-13 KO では亜急性期における関節炎スコアが有

意に低く、ミエロイド系細胞の集積が減少し、滑膜増生と骨軟骨破壊が抑制されていた。

(3) MMP-13 KO の骨硬化症は WT 由来の全骨髄移植によってその表現型は回復した。一方、致死量の放射線を照射した WT の骨髄造血減少環境は MMP-13 KO 由来の全骨髄移植によって改善されなかった。

(4) 生理的な表現型として MMP-13 KO は加齢とともに骨硬化症を示した。骨形態計測では骨形成パラメータに差を認めなかったが、MMP-13 KO では骨吸収面が有意に減少し、結果として二次海綿骨量が明らかに増加していた。その原因を探るために、共存培養系における破骨細胞形成能を評価した。MMP-13 KO 由来の骨芽細胞と WT あるいは MMP-13 KO 由来の骨髄を用いた共存培養で誘導される破骨細胞は小型で大きく広がらず、象牙質切片上での吸収窩形成活性が低下していた。この結果は、MMP-13 KO で観察された骨硬化症は骨芽細胞の障害に起因する破骨細胞形成の低下、あるいは破骨細胞吸収能の低下によるものと考えられた。

(5) MMP-9&13 ダブル KO は胎生期肢芽への血管侵入の障害と肥大軟骨細胞層の延長が相乗的に増強され、一次骨化の開始が著明に遅延していた。その後、骨髄腔は海綿骨骨梁によって閉鎖し、四肢短縮型の骨硬化症を呈した。

以上の結果から、MMP-13 分子はメカニカルストレス誘導性の関節破壊ではなく、炎症環境下での関節破壊に関与することが示唆された。MMP-13 KO の CAIA モデルでミエロイド系細胞の集積が減少していたこと、また骨髄移植実験で致死性放射線照射した WT の骨髄造血減少環境は MMP-13 KO 由来全骨髄細胞の移植によって回復しなかったことから、MMP-13 は炎症環境局所へのミエロイド系細胞の動員、および内軟骨性骨化過程において末梢を循環する造血系細胞のホーミングに関与していると推察された。

## 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 13 件)

Furukawa M, Takaishi H et al., 11 名中 2 番目. IL-27 Abrogates RANKL-mediated Osteoclastogenesis of Human Granulocyte Macrophage CFU Cells through STAT1-dependent Inhibition of c-Fos. J Immunol. 2009. in press. 査読有. Corresponding Author.

Sakai S, Takaishi H et al., 13 名中 2

番目. 1 alpha, 25-dihydroxy vitamin D3 inhibits osteoclastogenesis through IFN-beta dependent NFATc1 suppression. J Bone Miner Metab. 2009. in press. 査読有

Hattori N, Mochizuki S et al., 7 名中 5 番目. MMP-13 plays a role in keratinocyte migration, angiogenesis and contraction in mouse skin wound healing. Am J Pathol. 2009. in press. 査読有

Horiuchi K, Morioka H et al., 6 名中 3 番目. Ectodomain shedding of FLT3 ligand is mediated by TACE. J Immunol. 2009. in press. 査読有

Hikata T, Takaishi H, et al., 14 名中 2 番. PIAS3 negatively regulates RANKL-mediated osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblasts. Blood. 113(10). 2202-2212. 2009. 査読有. Corresponding Author.

Horiuchi K, Kimura T, et al., 11 名中 6 番目. Conditional inactivation of TACE by a Sox9 promoter leads to osteoporosis and increased granulopoiesis via dysregulation of IL-17 and G-CSF. J Immunol. 182(4). 2093-2101. 2009. 査読有

Takaishi H, Kimura T, Dalal S, Okada Y, D'Armiento J. 5 名中 1 番目 Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13. Curr Pharm Biotechnol. 9:47-54. 2008. 査読有. Corresponding Author.

Horiuchi K, Morioka H, et al., 13 名中 9 番目. Growth suppression and apoptosis induction in synovial sarcoma cell lines by a novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ). Cancer Lett. 272. 336-344. 2008 査読有

Horiuchi K, Miyamoto T. et al., 13 名中 3 番目 Cell surface colony-stimulating factor 1 can be cleaved by TNF-alpha converting enzyme or endocytosed in a clathrin-dependent manner. J Immunol. 179:6715-6724, 2007. 査読有

Horiuchi K, Kimura T et al., 7 名中 4 番目. TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from

endotoxin shock. J Immunol. 179:2686-2689, 2007. 査読有

Niki Y, Takaishi H et al., 8 名中 2 番目. Administration of cyclooxygenase-2 inhibitor reduces joint inflammation but exacerbates osteopenia in IL-1 alpha transgenic mice due to GM-CSF overproduction. J Immunol. 179: 639-646, 2007. 査読有

Morita K, Miyamoto T et al., 14 名中 12 番目. Reactive oxygen species induce chondrocyte hypertrophy in endochondral ossification. J Exp Med. 204:1613-1623, 2007. 査読有

Kosaki N, Takaishi H et al., 12 名中 2 番目. Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice. Biochem Biophys Res Commun. 354:846-851, 2007. 査読有

[学会発表](計 6 件)

加藤 雅敬 (KATO MASANORI)  
卵巣摘出ラットにおける椎間板変性機序の解析(第2報) ER を介した II 型コラーゲン遺伝子の転写制御について  
第23回 日本整形外科学会基礎学術集会  
2008年10月24日  
国立京都国際会館

田島 康介 (TAJIMA KOSUKE)  
STAT1 ノックアウトマウスでは骨折後の膜性骨化と仮骨リモデリングが亢進する  
第23回 日本整形外科学会基礎学術集会  
2008年10月24日  
国立京都国際会館

内川 伸一 (UTIKAWA SHINICHI)  
MEK5-ERK5 経路は RANKL 依存性の破骨細胞分化を制御する  
第23回 日本整形外科学会基礎学術集会  
2008年10月24日  
国立京都国際会館

古川 満 (FURUKAWA MITSURU)  
IL-27/WSX-1 シグナルは LPS 刺激によって誘導され、RANKL 依存性の破骨細胞形成を STAT1 の活性化を介して抑制する  
第23回 日本整形外科学会基礎学術集会  
2008年10月24日  
国立京都国際会館

日方 智宏(HIKATA TOMOHIRO)  
トランスジェニックマウスは破骨細胞の分化障害により骨量増加を示す  
第23回 日本整形外科学会基礎学術集会  
2008年10月24日  
国立京都国際会館

坂巻 裕介(SAKAMAKI YUSUKE)  
マトリックスメタロプロテアーゼ-13(MMP-13)欠損マウスでは巣状系球体硬化症の発症が抑制される  
第51回 日本腎臓学会学術総会  
2008年5月31日  
国立京都国際会館

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高石 官成(TAKAISHI HIRONARI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号:60236180

### (2)研究分担者

戸山 芳昭(Toyama Yoshiaki)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号:40129549  
(2007年度)

堀内 圭輔(Horiuchi Keisuke)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号:30327564  
(2007年度)

箱崎 彰裕(Hakozaki Akihiro)  
慶應義塾大学・医学部・嘱託(非常勤)  
研究者番号:10365299  
(2007年度)

(3)連携研究者  
なし