

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790364

研究課題名(和文)

軟骨下骨組織の改築と RECK 分子に着目したヒト変形性関節症の病態解析

研究課題名(英文)

Expression and function of RECK in human osteoarthritic subchondral bone tissue

研究代表者

木村 徳宏 (KIMURA TOKUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40445200

研究成果の概要(和文):

ヒト変形性関節症(OA)関節軟骨下骨における RECK 分子の発現を免疫染色で検討したところ、軟骨下骨の骨芽細胞(特に立方状に腫大した骨芽細胞)に発現していた。ヒト OA 関節軟骨下骨から単離・培養した骨芽細胞様細胞やマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 が RECK を発現しており、分化培地による骨芽細胞分化の過程で RECK 発現が上昇することがわかった。また培養時の細胞密度も RECK 発現量と関連していた。これらの細胞を用いた、siRNA による RECK 発現抑制実験の方法を確立した。

研究成果の概要(英文):

Expression of RECK in human osteoarthritic (OA) subchondral bone tissue was examined by immunohistochemistry. We found that the subchondral bone osteoblasts, especially those with plump cuboidal cytoplasm, express RECK protein. We showed that cultured osteoblastic cells isolated from human OA subchondral bone and the murine osteoblast-like cell line MC3T3-E1 express RECK. The expression of RECK in these cells was up-regulated during osteoblastic differentiation in vitro. The expression level was also related to cell density in culture. We established the method of RECK down-regulation in these cells by siRNA.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：関節、骨、軟骨下骨、変形性関節症、細胞外マトリックス、細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(osteoarthritis, OA)は高齢者を中心に高頻度に発生し、関節の痛みや可動域制限をきたし日常生活を著明に障害する最も重要な関節疾患のひとつである。膝・股関節等の荷重関節の OA は進行性であり、関節が破壊され、最終的に人工関節置換を余儀なくされる患者が多い。高齢化社会となったわが国において、人々の quality of

life (QOL) の向上の観点からも本疾患の病態解明は急務と言え、障害された関節の再生を目指した治療戦略の開発が必要である。現在、OA の病態として、加齢や関節の力学的ストレスを背景に、関節軟骨の破壊、軟骨の不完全な再生、軟骨下骨組織の改築等が重要と考えられているが、疾患メカニズムの十分な解明には程遠い状況である。

OA の病態研究においては、従来より軟骨破

壊の視点から研究が行われてきた。OA 関節軟骨組織ではプロテアーゼ、特にマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)ファミリーと ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) ファミリーの子が発現し、軟骨の細胞外マトリックスであるプロテオグリカン(アグリカン等)やコラーゲンの分解が起こり、軟骨組織の断裂や摩耗につながる。研究代表者はこれまでに ADAM ファミリーの中の ADAMTS 群に属する ADAMTS4 分子(アグリカナーゼ 4) がヒト OA 軟骨のアグリカン分解に関与することを明らかにし(Naito S et al. Pathol Int 57:703-11, 2007)、OA の治療薬のひとつであるヒアルロン酸が ADAMTS4 発現を抑制することを報告してきた(Yatabe T et al. Ann Rheum Dis 68:1051-8, 2009)。

また、軟骨細胞は組織破壊に反応して増殖等の再生性変化を起こす。ヒト OA 軟骨では軟骨細胞が増殖し細胞集団を形成する像(cloning と呼ばれる)が高頻度に見られ、軟骨の不完全再生の所見と考えられる。研究代表者はこの cloning のメカニズムのひとつとして、OA 軟骨細胞に ADAM12 が高発現し IGF-1 の系を介して細胞増殖に関与することを提唱した(Okada A et al. Arthritis Rheum 58:778-89, 2008)。さらに研究代表者は、複数の MMP および一部の ADAM 分子に対し分泌・活性阻害作用を有する細胞膜結合型分子 RECK(reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) に新規に注目し、この分子がヒト OA の cloning 軟骨細胞に高発現しており、軟骨細胞の増殖と細胞伸展に必要であることを発見し(第 97 回日本病理学会総会ワークショップにて発表)、投稿準備を進めている(Kimura T et al. 投稿準備中)。

しかし関節の構造を考えると、関節軟骨は骨(軟骨下骨, subchondral bone)と密着した組織であり、OA の病態は軟骨の変化だけで説明できるものではないことも事実である。OA 患者の関節 X 線写真を見ると、軟骨下骨が組織改築を起こし、力学的負荷部では骨の硬化像を示し、関節周辺部では骨棘(骨軟骨組織の突出)の形成をきたすことがわかる。従来は、軟骨下骨の改築は軟骨破壊後の二次的な現象と想定されてきたが、OA の動物モデルを用いた最近の研究では、これらの骨変化は OA の初期から起こり、むしろ軟骨の変化に先行しているとも言われている(Carlson CS et al. J Bone Miner Res 11:1209-17, 1996; Quasnicka HL et al. Biorheology 43:389-97, 2006)。さらに骨改築を抑制する薬剤(ビスフォスホネート)の投与により OA の軟骨病変も抑制されるという報告も見られる(Hayami T et al. Arthritis Rheum 50:1193-206, 2004)。このように軟骨下骨の細胞外マトリックス改築は OA の病態を規定する重要な因子であり、関節を軟骨と軟骨下骨の機能的複合体として研究することが OA 病態の解明に今後は必須となってくると研究代表者は考えている。

OA の軟骨下骨改築には MMP-2 産生が関与し

ているという文献があり(Mansell JP et al. J Clin Invest 101:1596-603, 1998)、骨芽細胞には MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, ADAM10 が発現していると言われている(Accorsi-Mendonca T et al. J Mol Hist 39:201-8, 2008; Verrier S et al. Bone 35:34-46, 2004)。これらの酵素の分泌および活性に対して RECK が阻害作用を示すので、RECK によるプロテアーゼ活性調節が軟骨下骨改築に関与する可能性が高いと考えられる。一方、RECK 分子の骨組織での発現についてはラット顎骨での記載的な論文が 1 報あるのみで(Accorsi-Mendonca T et al. J Mol Hist 39:201-8, 2008)、その機能や軟骨下骨での発現に関しては全く知られていない。

2. 研究の目的

- (1) ヒト OA 軟骨下骨での RECK 分子の発現を免疫組織化学等で調べ、骨硬化等の組織改築のある部とない部の間での発現の差や特徴を明らかにする。
- (2) ヒト OA 軟骨下骨(骨硬化部、非硬化部)から骨芽細胞様細胞を単離・培養し、骨硬化の有無により RECK 発現に差が見られるかを検討する。
- (3) 軟骨下骨由来骨芽細胞様細胞や骨芽細胞様細胞株を用いて、骨芽細胞の分化過程にともなう RECK 発現の変化、サイトカイン・増殖因子による RECK 発現の調節について調べる。
- (4) siRNA を用いて RECK 発現を抑制し、骨芽細胞の機能に影響が見られるかを検討する。
- (5) (4)で見られた影響について分子メカニズムを検討し、RECK がどの分子系を制御しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ヒト OA 軟骨下骨における組織改築と RECK 発現との組織学的相関

ヒト OA 関節組織から軟骨下骨を十分に含む組織標本を切り出し、4%パラホルムアルデヒド固定、EDTA 脱灰後にパラフィン切片を製作する。軟骨下骨組織での RECK 分子の発現を免疫組織化学的に検討し、骨硬化等の組織改築のある部とない部の間での陽性率の差や発現細胞の分布の特徴を明らかにする。

- (2) 軟骨下骨由来骨芽細胞様細胞・骨芽細胞様細胞株における RECK 発現の検討

ヒト OA 軟骨下骨組織(骨硬化部、非硬化部)を細切し、文献(Sanchez C et al. Osteoarthritis Cartilage 13:979-87, 2005)の方法に従って骨芽細胞様細胞を単離・培養する。すなわち、骨片をヒアルロニダーゼおよびコラゲナーゼ処理した後、培養フラスコ内に静置して培養する。骨片から遊出してきた骨芽細胞様細胞を培養ディッシュに移し、RECK 発現を RT-PCR 法、Western

blot 法により解析する。骨芽細胞様細胞株 (マウス MC3T3-E1) についても同様に RECK 発現を調べる。

(3) 骨芽細胞の分化過程にともなう RECK 発現変化の検討

ヒト軟骨下骨由来骨芽細胞様細胞を、アスコルビン酸、グリセロリン酸、デキサメサゾンを含んだ骨芽細胞分化誘導培地を用いて培養し、骨芽細胞分化と RECK 発現量の変化を解析する。骨芽細胞の分化状態については、アルカリホスファターゼ染色、アリザリンレッド染色、オステオカルシンの発現等を基準として評価する。また、同様の実験を骨芽細胞様細胞株 (マウス MC3T3-E1) についても行う。

(4) サイトカイン・増殖因子による RECK 発現の変化の検討

ヒト軟骨下骨由来骨芽細胞様細胞、骨芽細胞様細胞株について、OA 病態・骨代謝に重要な役割を果たす各種のサイトカイン・増殖因子 (IL-1, TNF- α , TGF- β , IGF-1 等) を作用させ、RECK 発現に変化がおこるか調べる。

(5) siRNA による RECK 発現の抑制によっておこる骨芽細胞機能の変化

ヒト軟骨下骨由来骨芽細胞様細胞もしくは骨芽細胞様細胞株に RECK を標的とする siRNA を導入する。導入方法としては電気穿孔法および lipofection 法を試し、導入効率の良いものを選ぶ。RECK 発現の抑制を RT-PCR 法と Western blot 法で確認する。RECK 発現を抑制した細胞と control 細胞を用意し、骨芽細胞の機能 (MMP 分泌、ADAM 発現、コラーゲン産生、増殖、分化、遊走) に影響が見られるか検討する。コラーゲン産生については I 型コラーゲン mRNA 発現量の定量 RT-PCR 法による測定、I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチドの ELISA 法による測定を行う。増殖については BrdU (bromodeoxyuridine) と組み合わせたアッセイ、骨芽細胞分化についてはアルカリホスファターゼ染色、アリザリンレッド染色、オステオカルシン発現による評価、遊走については monolayer wounding assay (Liang C et al. Nature Protocols 2:329-33, 2007) を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト OA 関節軟骨下骨における RECK 分子の発現を、関節組織切片の免疫組織化学により調べたところ、軟骨下骨の骨芽細胞に発現が見られた。骨芽細胞における RECK 陽性率は、骨硬化の有無よりも骨芽細胞の形態と関連しており、平坦な形態を示す細胞よりも立方状に腫大した active な形態を示す細胞に陽性率が高い傾向が認められた。また、マウ

ス骨組織における RECK 免疫染色を行い、マウス正常骨においても骨芽細胞に RECK 発現が見られることを確認した。

(2) ヒト軟骨下骨由来骨芽細胞様細胞、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 における RECK 発現を RT-PCR 法および Western blot 法を用いて調べたところ、RECK の発現が認められた。

(3) ヒト軟骨下骨由来骨芽細胞様細胞、マウス MC3T3-E1 は、アスコルビン酸、グリセロリン酸、デキサメサゾンを加えた培地 (分化培地) で培養すると骨芽細胞へと分化し、アルカリホスファターゼ活性を示し、コラーゲンやオステオカルシンを産生した。この分化過程において RECK は初期に発現が上昇し、その後はほぼ一定の発現量を維持することがわかった。またヒト軟骨下骨由来骨芽細胞様細胞では、RECK 発現量は細胞密度とも関連しており、培養ディッシュ上で細胞が密に増殖している条件下で発現が上昇していた。

(4) 骨に存在する数種のサイトカイン・増殖因子 (IL-1, TNF- α , TGF- β , IGF-1 等) を作用させ、ヒト軟骨下骨由来骨芽細胞様細胞、マウス MC3T3-E1 細胞の RECK 発現が増減するか RT-PCR 法で調べたが、発現量の変動は小さかった。

(5) ヒト軟骨下骨由来骨芽細胞様細胞に RECK を標的とする siRNA を電気穿孔法によって導入し、RECK 発現抑制細胞を作製する方法を確立し、RT-PCR 法・Western blot 法で発現抑制を確認した。マウス MC3T3-E1 においても同様の発現抑制細胞を作製し比較したところ、MC3T3-E1 細胞株よりもヒト骨芽細胞様細胞の方が siRNA の効果が高いことがわかった。発現抑制細胞と control 細胞のコラーゲン産生・増殖・骨芽細胞分化に明らかな差は見いだせていないが、培養条件や測定法に改善の余地があると考えられた。Monolayer wounding assay により細胞遊走を評価したところ、発現抑制細胞と control 細胞との間に遊走能の有意な差は認めない。今後さらに発現抑制細胞と control 細胞の機能的差異を検討する必要がある。

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1件)

Kimura T, Okada A, Yatabe T, Okubo M, Toyama Y, Noda M, Okada Y. RECK Is Up-Regulated and Involved in Chondrocyte

Cloning in Human Osteoarthritic Cartilage.
査読有. *Am J Pathol.* 2010; 176(6):
2858-67.

〔学会発表〕(計3件)

大久保匡、木村徳宏、藤田貴也、戸山芳昭、岡田保典. 変形性関節症軟骨における Semaphorin 3A の発現と VEGF165 による軟骨細胞遊走における競合について. 第24回日本軟骨代謝学会. 2011年3月4日. 九州大学医学部(福岡県)

木村徳宏、岡田保典. ヒト変形性関節症軟骨における、RECK分子による軟骨細胞の遊走・増殖調節. 第23回日本軟骨代謝学会. 2010年4月2日. 鹿児島県医師会館(鹿児島県)

木村徳宏、岡田保典. ヒト変形性関節症軟骨における膜結合型プロテアーゼインヒビター-RECKの発現と機能. 第14回日本病態プロテアーゼ学会学術集会. 2009年8月21日. 千里ライフサイエンスセンター(大阪府)

〔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〕

ホームページ <http://keio-okada-lab.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 徳宏 (KIMURA TOKUHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 40445200

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし