

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592218

研究課題名(和文) 関節軟骨変性過程において鍵となる遺伝子発現制御因子の探索

研究課題名(英文) Investigation for gene regulating factors in articular cartilage degeneration

研究代表者

岡崎 賢 (OKAZAKI, KEN)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：10398092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症や関節リウマチなど、関節軟骨が変性していく疾患において、軟骨変性に関与する遺伝子の発現調節の仕組みを解析することは重要である。転写因子C/EBPが、軟骨変性を引き起こす様々な遺伝子の発現調節で中心的役割を担っていることを発見した。C/EBPは患者の関節軟骨において、軟骨破壊酵素であるMMP-1, MMP-3, MMP-13の遺伝子発現を上昇させていることが証明された。また、主要な軟骨基質であるII型コラーゲンの発現を低下させた。さらに骨破壊を引き起こす破骨細胞を誘導する因子RANKLの発現を上昇させていた。関節軟骨変性の鍵となる遺伝子調節因子であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We found that a transcriptional factor, C/EBP plays crucial roles in gene regulation which affect cartilage degeneration in osteoarthritis or rheumatoid arthritis. C/EBP stimulates gene expressions of MMP1, MMP-3, MMP-13, which denature the cartilage matrix. C/EBP also stimulate RANKL expression to promote osteoclast formation that consequently promote bone destruction in rheumatoid arthritis. Furthermore, C/EBP repress the expression of type II collagen which is a major matrix molecule of cartilage.

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：関節炎 軟骨 遺伝子発現 転写因子

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症や関節リウマチに代表される関節軟骨変性疾患は、患者の日常生活動作、稼働性、労働力を著しく損なう、医学的にも医療社会経済的にも重要な疾患である。関節軟骨の変性を制御する分子生物学的メカニズムは十分に解明されておらず、その本質的治療法も開発されていない。関節軟骨変性には様々な因子が関与している。例えば軟骨基質分解酵素である種々の MMP や ADAMTS、炎症を惹起するサイトカイン、骨破壊を引き起こす破骨細胞誘導因子、軟骨細胞自身の表現系の変化と発現するコラーゲンの変化などである。これらの遺伝子発現の調節に中心的に働いている因子をさぐる必要がある。

2. 研究の目的

関節軟骨変性に関与するさまざまな遺伝子の発現の調節に関与する中心的因子を探索し、その機能を解析すること

3. 研究の方法

変形性関節症や関節リウマチの患者より関節軟骨と滑膜のサンプルを採取し、各種 MMP、RANKL、コラーゲンなどの発現を免疫染色にて解析した。転写因子 C/EBP の発現も同様に解析した。また、マウスの胎児成長軟骨板での II 型コラーゲンおよび X 型コラーゲンの発現パターンと Sox9 および C/EBP の発現パターンを免疫染色で比較検討した。

軟骨細胞培養系にて C/EBP の発現アデノウイルスベクターを感染させ、発現増強モデルを作成した。また、siRNA を導入して C/EBP の機能低下モデルを作成した。MMP1,3,13, ADAMTS4, 5, RANKL, osteoprotegerin, Col2a1, Col10a1, aggrecan, Runx2, indian hedgehog, VEGF, IL-6 遺伝子発現を real-time RT-PCR で解析した。

遺伝子発現調節メカニズムを、MMP-3, MMP-13, Col2a1, RANKL のプロモータ・レポーターアッセイにて詳細に解析した。結合配列に変異を導入し、C/EBP 結合の直接的影響を解析した。また、dominant negative 型変異 C/EBP 発現ベクターを用いて、C/EBP の機能変化に応じたプロモータ活性の変化を解析した。

免疫沈降法を用いて、核内での C/EBP の MMP-3, 13, Col2a1, RANKL 遺伝子プロモータ配列への直接結合を解析した。

他の転写因子である、Sox9, ATF2, RUNX2 との相互作用について、免疫沈降にて解析した。

C/EBP を導入したリウマチ患者滑膜と末梢血から採取した単核細胞を共培養し、破骨細胞の形成を検討した。

4. 研究成果

転写因子 C/EBP は変性した関節軟骨や滑膜に強く発現していた。その発現パターンは遺伝子発現を増強させる MMP1,3,13, RANKL の発現パターンとは類似していた。一方、マウスの成長軟骨板において、C/EBP の発現パターンは肥大軟骨細胞に強く、C/EBP が発現を増強させる作用のある、ColIX, Runx2, MMP13 の発現パターンと類似しており、逆に発現を低下させる作用のある Col2, Sox9 の発現パターンと相補的であった。

C/EBP の発現ベクターの導入によって、MMP1, 3, 13, ADAMTS5, RANKL, Col10, Indian hedgehog, Runx2 の遺伝子発現は数倍~数十倍に増強された。Col2a1 と aggrecan の遺伝子発現は低下した。siRNA によるノックダウンは前述と逆の作用を示した。

プロモータアッセイによって、C/EBP は MMP-3, 13, RANKL のプロモータに直接結合し転写活性を増強させることが明らかになった。結合部位に変異を導入すると転写活性の低下が認められた。Dominant negative 型変異 C/EBP 発現ベクターを導入すると、プロモータ活性は抑制された。一方、C/EBP は Col2a1 のエンハンサー領域にも結合し、転写を抑制していることが示された。C/EBP と Sox9 との競合作用が Col2a1 エンハンサー領域上で確認された。

クロマチン免疫沈降法にて C/EBP がプロモータアッセイで確認された結合部位に結合していることが、それぞれの遺伝子で確認された。

マウスの胎児長管骨器官培養系で C/EBP 発現ベクターを導入すると、Col2a1 と Sox9 の発現が低下し、ColIX, Runx2, indian hedgehog, MMP13 の発現が増強された。

関節リウマチ患者に C/EBP を導入すると、RANKL の発現が増強することが器官培養系で示された。C/EBP を導入した滑膜細胞と末梢血から採取した単核細胞を共培養すると、TRAP 陽性多核細胞として観察される破骨細胞の形成が認められた。

免疫沈降にて C/EBP と RUNX2 の結合、C/EBP と ATF2 との結合が確認され、これらの転写因子の共益因子としても機能していることが示された。

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6件)

1. Ushijima T, Okazaki K, Tsushima H, Iwamoto Y
CCAAT/enhancer binding protein β regulates the repression of type II collagen expression during the differentiation from proliferative to hypertrophic chondrocytes
J Biol Chem 289(5):2852-63, 2014.
2. Takayama Y, Hatakenaka M, Tsushima H, Okazaki K, Yoshiura T, Yonezawa M, Nishikawa K, Iwamoto Y, Honda H.
T1 ρ is superior to T2 mapping for the evaluation of articular cartilage denaturalization with osteoarthritis: Radiological-pathological correlation after total knee arthroplasty.
Eur J Radiol 82(4):e192-8, 2013 doi: 10.1016/j.ejrad.2012.11.031
3. Tsushima H, Okazaki K, Hayashida M, Ushijima T, Iwamoto Y
CCAAT/enhancer binding protein β regulates expression of matrix metalloproteinase-3 in arthritis
Ann Rheum Dis 71:99-107, 2012
4. Tsushima H, Okazaki K, Takayama Y, Hatakenaka M, Honda H, Izawa T, Nakashima Y, Yamada H, Iwamoto Y
Evaluation of cartilage degradation in arthritis using T1 ρ magnetic resonance imaging mapping
Rheumatol Int. 32(9):2867-75, 2012 doi: 10.1007/s00296-011-2140-3
5. 岡崎 賢
変形性膝関節症の病態生理と診断
整形外科看護 18(8):722-731, 2013
6. 岡崎 賢, 岩本 幸英
関節リウマチ・変形性関節症の軟骨変性における遺伝子発現の制御

福岡医学雑誌 103(9)175-180,2012

[学会発表](計3件)

第27回日本軟骨代謝学会(2014.2.28-3.1, 京都市)
岡崎 賢、牛島貴宏、津嶋秀俊、林田光正、岩本幸英
軟骨分化における CCAAT/enhancer-binding protein の関わり

第26回日本整形外科学会基礎学術集会(2011.10.20-21, 前橋市)

岡崎 賢、津嶋秀俊、牛島貴宏、岩本幸英
関節炎における転写制御と軟骨破壊

第24回日本軟骨代謝学会(2011.3.3-4, 福岡市)

Okazaki K, Tsushima H, Hayashida M, Ushijima T, Iwamoto Y
Gene regulation of cartilage degeneration in osteoarthritis

[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

岡崎 賢 (OKAZAKI, Ken)

九州大学病院・整形外科・講師

研究者番号：10398092

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：