

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293316

研究課題名(和文) Runx2・Runx3を基点とした軟骨変性のシグナルネットワークの解明

研究課題名(英文) Roles of Runx2 and Runx3 in cartilage degeneration

研究代表者

竹下 克志 (TAKESHITA, Katsushi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：30262009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子Runx2, Runx3が関節軟骨で果たす役割についてin vivo, in vitroで解析した。まずRunx2-floxマウスを作出し、設計通りのノックアウトが起きることを確認した。次にRunx3-floxマウスとともに、薬剤誘導性軟骨細胞特異的Creマウスと交配させ、変形性関節症モデルなどを作成したところ、いずれもノックアウトによって変形性関節症の進行は促進した。in vitroの実験系では、これらの転写因子は軟骨分化を促進させ、基質産生を促す作用があることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed roles of transcription factor Runx2 and Runx3 in articular chondrocytes. First, we generated Runx2-flox mice, and confirmed that the gene deletion was successful. We then crossed Runx2-flox mice with cartilage-specific Cre mice, and created osteoarthritis model. Deletion of these factors modified cartilage degeneration. We analyzed the molecular mechanisms by in vitro experiments.

研究分野：整形外科学

キーワード：整形外科学 変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

社会の急速な高齢化により運動器変性疾患の患者数は増え続けている。変形性関節症はその代表的な疾患であるが、その詳しい分子病態の研究はまだ始まって日が浅く、本質的な治療法を産み出すには至っていない。申請者らのグループでは変形性関節症の *in vivo* での解析を可能にすべく世界に先駆けてマウス変形性関節症モデルを樹立し

(*Osteoarthritis Cartilage* 13:632-41, 2005) 変形性関節症の分子生物学的研究にブレークスルーをもたらした。申請者らはマウスモデルをベースに多くの研究を積み重ね、変形性関節症の発症・進行において軟骨内骨化に酷似した現象が見られることを見出し、多くの軟骨内骨化制御分子が変形性関節症に関与することを解明してきた (*Nat Med* 12:665-70, 2006, *PLoS One* 4:e4543, 2009, *Nat Med* 16:678-86, 2010, *Arthritis Rheum.* 62:826-36, 2010, *Arthritis Rheum.* 64:198-203, 2012, *Hum Mol Genet.* 21:1111-23, 2012)。この学説は現在の変形性関節症研究の重要な柱となっているが、その中心に位置するのが転写因子 Runx2 である。Runx2 は軟骨内骨化の制御分子として最初に同定された転写因子であり、そのファミリー分子 Runx3 とともに軟骨細胞の肥大分化やその後の骨芽細胞の発生分化に必要不可欠な役割を果たすことが 2004 年までに報告された。このように Runx2 は軟骨内骨化の主役であるが、さらに変形性関節症においても促進的に作用することを申請者らはマウスモデル樹立直後に Runx2 ヘテロノックアウトマウスを用いて報告した (*Arthritis Rheum* 54:2462-70, 2006)。

このように Runx2 は変形性関節症研究のさきがけとなり黎明期に盛んに研究されたが、最近の研究においても新たな側面がいくつか報告されている。変形性関節症には炎症や過剰なメカニカルストレス、遺伝的要素など様々な要因が複雑に交錯することが広く知られており、最近ではこれらの要因ごとに *in vitro* の実験系が構築され、個別に検証されるようになってきた。その結果として申請者らは、炎症性サイトカインが NF- κ B シグナルの活性化と HIF-2 の誘導を經由して Runx2 の発現を誘導すること (*Nat Med* 16:678-86, 2010, *Gene* 416:53-60, 2008) を明らかにした。また最近、軟骨細胞にメカニカルストレスを負荷することによって軟骨変性マーカーである MMP-13、ADAMTS-5 とともに Runx2 が発現増加することも報告された (*Osteoarthritis Cartilage* 19:222-32, 2011)。

このように Runx2, Runx3 は古くから知られた分子であるが、変形性関節症の発症・進

行に関わる多くのシグナルに關与する可能性が示唆されており、変形性関節症の背景にある複雑な分子ネットワークを紐解く鍵となりうると思われる。

2. 研究の目的

本研究では、時間特異的・空間特異的なノックアウトマウスやマイクロアレイ、ChIP-シーケンスなどの最新の技術を投入し、炎症、メカニカルストレス、エイジングといった変形性関節症の要因ごとのモデルを解析することで、Runx2, Runx3 を皮切りに変形性関節症の分子病態の全貌解明に挑む。

3. 研究の方法

本研究では、時間特異的・空間特異的なノックアウトマウスを作出し、メカニカルストレスモデル、エイジングモデルによって先行研究で示唆されている Runx2, Runx3 の多様な作用を *in vivo* で検証する。またマイクロアレイと ChIP-シーケンスによって Runx2, Runx3 の標的遺伝子を網羅的に解析し、これらを総合して分子ネットワークの全体像を評価する。具体的には以下のサブテーマに分けて実施する。

- (1) Runx2, Runx3 のコンディショナルノックアウトマウスの作出
- (2) 関節軟骨の形成、成熟、変性、老化に伴う Runx2, Runx3 の発現量の変化の解析
- (3) *in vivo* モデルにおける Runx2, Runx3 の発現抑制系の解析
- (4) *in vitro* モデルにおける Runx2, Runx3 の標的遺伝子群の解析

4. 研究成果

まず Runx2-flox の作成を行った。数多くの transcript variant がある中で、5 末端側の共通の exon にターゲットを絞って、ノックアウトすることによってフレームシフトが起こるものを選定してターゲティングベクターを設計、作成した。マウス ES 細胞にて相同組み換えを行い、セレクションした細胞にてキメラを作成し、継代によって F1 の中から flox アレルを有する個体を得た。Runx3-flox マウスはジャクソンラボラトリーから供与を受けた。

次に全身性に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと Runx2-flox マウスを交配させ、表現型を確認した。ヘテロノックアウト、ホモノックアウトとも過去のコンベンショナルノックアウトマウスの報告と同じ骨格形成異常がみられたことから、flox マウスの作動は設計通りと考えられた。

次に Runx2-flox, Runx3-flox を薬剤誘導性軟骨細胞特異的 Cre マウスと交配させ、Cre あり、Cre なしの flox/flox マウスを作成した。これらに生後 7 週目に Cre 誘導をかけ、翌週に変形性関節症モデルの手術を行った。

Cre(+)のRunx3-flox/flox マウスは変形性関節症の進展がCre(-)のそれと比較して、有意に進行した。また同様に Cre(+) のRunx2-flox/flox マウスも変形性関節症の進展がCre(-)のそれと比較して、有意に進行した。

このメカニズムを解析するため、軟骨系細胞株 ATDC5 を用いて、薬剤誘導性の Runx2, Runx3 過剰発現細胞株を作成した。分化段階ごとにそれぞれを過剰発現させたが、いずれも軟骨分化や基質産生を促進された一方、軟骨基質分解酵素の発現については一定の傾向を見出さなかった。炎症性シグナルについても大きな影響は見られなかった。

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 21 件)

1. Aini H, Itaka K, Fujisawa A, Uchida H, Uchida S, Fukushima S, Kataoka K, Saito T, Chung UI, Ohba S. Messenger RNA delivery of a cartilage-anabolic transcription factor as a disease-modifying strategy for osteoarthritis treatment. *Sci Rep*. 6:18743, 2016. doi: 10.1038/srep18743.
2. Chang SH, Yasui T, Taketomi S, Matsumoto T, Kim-Kaneyama J, Omiya T, Hosaka Y, Inui H, Omata Y, Yamagami R, Mori D, Yano F, Chung UI, Tanaka S, Saito T*. Comparison of mouse and human ankles and establishment of mouse ankle osteoarthritis models by surgically-induced instability. *Osteoarthritis Cartilage*. 24:688-97, 2016. doi: 10.1016/j.joca.2015.11.008.
3. Saito T*, Yano F, Mori D, Kawata M, Hoshi K, Takato T, Masaki H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Chung UI, Tanaka S. Hyaline Cartilage Formation and Tumorigenesis of Implanted Tissues Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Biomed Res*. 36:179-86, 2015. doi: 10.2220/biomedres.36.179.
4. Sugita S, Hosaka Y, Okada K, Mori D, Yano F, Kobahashi H, Taniguchi Y, Mori Y, Okuma T, Chang SH, Kawata M, Taketomi S, Chikuda H, Akiyama H, Kageyama R, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, Ohba S, Saito T*. Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112:3080-5, 2015. doi: 10.1073/pnas.1419699112.
5. Tokuyama N, Hirose J, Omata Y, Yasui T, Izawa N, Matsumoto T, Masuda H, Ohmiya T, Yasuda H, Saito T, Kadono Y, Tanaka S. Individual and combining effects of anti-RANKL monoclonal antibody and teriparatide in ovariectomized mice. *Bone Reports*. 2:1-7, 2015.
6. Okuma T, Hirata M, Yano F, Mori D, Kawaguchi H, Chung UI, Tanaka S, Saito T*. Regulation of Mouse Chondrocyte Differentiation by CCAAT/Enhancer-binding Proteins. *Biomed Res*. 36:21-9, 2015. doi: 10.2220/biomedres.36.21.
7. Omata Y, Yasui T, Hirose J, Izawa N, Imai Y, Matsumoto T, Masuda H, Tokuyama N, Nakamura S, Tsutsumi S, Yasuda H, Okamoto K, Takayanagi H, Hikita A, Imamura T, Matsuo K, Saito T, Kadono Y, Aburatani H, Tanaka S. Genome-wide comprehensive analysis reveals critical cooperation between Smad and c-Fos in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*. 30:869-77, 2015. doi: 10.1002/jbmr.2418.
8. Okada K, Fukai A, Mori D, Hosaka Y, Yano F, Chung UI, Kawaguchi H, Tanaka S, Ikeda T and Saito T*. Identification of SCAN domain zinc-finger gene ZNF449 as a novel factor of chondrogenesis. *PLoS One*. 9:e115169, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0115169.
9. Fujiwara S, Hoshikawa S, Ueno T, Hirata M, Saito T, Ikeda T, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S, Ogata T. SOX10 Transactivates S100B to Suppress Schwann Cell Proliferation and to Promote Myelination. *PLoS One*. 9:e115400, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0115400.
10. Mori Y, Chung UI, Tanaka S, Saito T*. Determination of differential gene expression profiles in superficial and deeper zones of mature rat articular cartilage using RNA sequencing of laser microdissected tissue specimens. *Biomed Res*. 35:263-70, 2014.
11. Mori Y, Mori D, Chung UI, Tanaka S, Heierhorst J, Buchou T, Baudier J, Kawaguchi H, Saito T*. S100A1 and S100B are dispensable for endochondral

- ossification during skeletal development. *Biomed Res.* 35:243-50, 2014.
12. Yano F, Ohba S, Hosaka Y, **Saito T**, Chung UI. Disease-modifying effects of TD-198946 on progressed osteoarthritis in a mouse model. *Ann Rheum Dis.* 73:2062-4, 2014. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205672.
 13. Kanke K, Masaki H, **Saito T**, Komiyama Y, Hojo H, Nakauchi H, Lichtler AC, Takato T, Chung UI, Ohba S. Stepwise Differentiation of Pluripotent Stem Cells into Osteoblasts Using Four Small Molecules under Serum-free and Feeder-free Conditions. *Stem Cell Reports.* 2:751-60, 2014. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.04.016.
 14. Mori Y, **Saito T**, Chang SH, Kobayashi H, Ladel CH, Guehring H, Chung UI, Kawaguchi H. Identification of fibroblast growth factor-18 as a molecule to protect adult articular cartilage by gene expression profiling. *J Biol Chem.* 289:10192-200, 2014. doi: 10.1074/jbc.M113.524090.
 15. Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, Nakagawa M, Kumano K, Arai S, Kobayashi H, **Saito T**, Iwakura Y, Kurokawa M. Positive feedback between NF- κ B and TNF- α promotes leukemia-initiating cell capacity. *J Clin Invest.* 124:528-42, 2014. doi: 10.1172/JCI68101.
 16. **Saito T***, Yano F, Mori D, Ohba S, Hojo H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Tanaka S, Chung UI, Kawaguchi H. Generation of Col2a1-EGFP-iPS cells for monitoring chondrogenic differentiation. *PLoS One* 8:e74137, 2013.
 17. Kobayashi H, Hirata M, **Saito T**, Itoh S, Chung UI, Kawaguchi H. Transcriptional induction of ADAMTS5 by an NF- κ B family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. *J Biol Chem.* 288:28620-9, 2013.
 18. Yano F, Hojo H, Ohba S, **Saito T**, Honnami M, Mochizuki M, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Cell-sheet technology combined with a thienopyridazine derivative small compound TD-198946 for cartilage regeneration. *Biomaterials.* 34:5581-7, 2013.
 19. Oichi T, Oshima Y, Taniguchi Y, Matsubayashi Y, Chikuda H, Takeshita K, Tanaka S. Cervical Anterolisthesis: A Predictor of Poor Neurological Outcomes in Cervical Spondylotic Myelopathy Patients After Cervical Laminoplasty. *Spine* (Phila Pa 1976). 2016 41(8):E467-73
 20. Matsudaira K, Hara N, Oka H, Kunogi J, Yamazaki T, Takeshita K, Atsushi S, Tanaka S. Predictive Factors for Subjective Improvement in Lumbar Spinal Stenosis Patients with Nonsurgical Treatment: A 3-Year Prospective Cohort Study. *PLoS One.* 2016 Feb 10;11(2):e0148584.
 21. Matsubayashi Y, Takeshita K, Sumitani M, Oshima Y, Tonosu J, Kato S, Ohya J, Oichi T, Okamoto N, Tanaka S. Psychometric Validation of the Japanese Version of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. *PLoS One.* 2015 Nov 24;10(11):e0143350
- 全て査読あり
- 〔学会発表〕(計 10 件)
- 1) 齋藤琢：転写因子を起点とした変形性関節症のメカニズム 第 29 回日本軟骨代謝学会、広島、2016.2.19
 - 2) Taku Saito: Roles of Notch signaling in skeletal development and osteoarthritis. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会、神戸、2015.12.2
 - 3) 齋藤琢：Roles of HIF and Notch signaling in articular cartilage 12th Meeting of the Bone Biology Forum, Makuhari, 2015.08.21
 - 4) 齋藤琢：Notch/Rbpj/Hes1 経路による変形性関節症の制御機構 第 33 回日本骨代謝学会、東京、2015.7.23
 - 5) 齋藤琢：分子生物学からみた変形性関節症の背景と病態 第 47 回ひむか運動器セミナー、宮崎、2015.7.6
 - 6) 齋藤琢：変形性関節症の分子メカニズム 第 15 回日本抗加齢医学会総会、福岡、2015.5.30
 - 7) 齋藤琢：軟骨内骨化研究から生まれる実用的研究 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、鹿児島、2014.10.10
 - 8) 齋藤琢：変形性関節症への応用を目指した軟骨再生研究 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、鹿児島、2014.10.9
 - 9) 齋藤琢：変形性関節症の制御メカニズムの解明 第 32 回日本骨代謝学会、大阪、2014.7.25
 - 10) Taku Saito: Research on pathophysiology and therapeutic target of osteoarthritis.

16th Asia Pacific League of Associations
for Rheumatology Congress (APLAR),
Cebu City, Philippines, 2014. 4. 4.

〔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

竹下克志 (TAKESHITA, Katsushi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：30262009

(2) 研究分担者

齋藤琢 (SAITO, Taku)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30456107

武富修治 (TAKETOMI, Shuji)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70570018

(3) 連携研究者

()
研究者番号：