

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06170

研究課題名（和文）関節・脊椎の維持・変性における酸素環境の役割と転写因子HIFによる制御機構の解明

研究課題名（英文）Function of HIFs in the joints and spine

研究代表者

岡田 慶太（Okada, Keita）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50759173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：低酸素誘導因子HIFは関節軟骨の維持や変性に重要な役割を担っている。我々はこれまでにHIF-2 が変形性関節症を促進、HIF-1 が関節軟骨に保護的に作用する転写因子であることを報告してきたが、本研究ではHIF-2 が関節軟骨再表層ではこれまでの結果とは異なり、関節軟骨に対して保護的作用を有することを発見した。またHIF-1 の標的因子をChIPシーケンスとマイクロアレイ解析を用いて絞り込むことに成功するとともに、変形脊椎症においてもHIFが関与していることを解明した。

研究成果の概要（英文）：Hypoxia inducible factors are known to have an important role in the development of osteoarthritis. We have reported that HIF-2 is a critical catabolic factor in OA and that HIF-1 is an anabolic factor opposed to its counterpart. Here we have found that HIF-2 has a different role in the superficial zone of the articular cartilage and might be an anabolic factor in this particular part. Also by using ChIP sequencing and microarray analysis, we found twelve candidate target genes of HIF-1 which might lead to our better understanding of its anabolic effect in the articular cartilage. Also we have found evidence of HIFs involvement in spondylosis, another important skeletal related degenerative disease.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：低酸素誘導因子 変形性関節症 変形性脊椎症

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会に突入し、医療や介護を必要とする高齢者の著しい増加が社会問題となっている。寝たきりの原因として整形外科分野では骨折・関節疾患・骨粗鬆症が常に上位につけており、日本整形外科学会を中心に運動器の衰えを未然に防ぐための新たな概念としてロコモティブシンドロームを提唱している。これまでに我々は変形性関節症における分子メカニズムの解明を進めており、HIF-2 が変形性関節症の重要な制御遺伝子であることを発見した。今回はこれをさらに発展させ、低酸素環境下にある関節軟骨および運動器科として扱う脊椎について低酸素誘導因子の機能解析を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では関節軟骨および脊椎における酸素環境に焦点を当て、研究を進める。まず関節軟骨最表層における生理的な HIF-2 の役割を調べるとともに、HIF-1、HIF-2 の発現調節やそれぞれの標的遺伝子の違いを探究していく。また関節軟骨のほかに血流の乏しい組織として椎間板があり、髄核細胞や線維輪の恒常性維持に HIF がどのように関与しているかを検討する。とくに脊椎・椎間板における酸素濃度分布と2つの HIF の発現に着目し、関節軟骨および脊椎・椎間板の維持・変性の分子メカニズムを *in vitro*、*in vivo* で解析していく。我が国に患者数が多い、変形性関節症と変形性脊椎症の包括的な病態解明を目指す。

3. 研究の方法

1) 関節軟骨における部位毎の HIF-2 の *in vivo* 機能解析

関節軟骨最表層特異的な誘導性 Cre マウスとして Prg4-GFP-CreERT2 マウスを用い、深層の軟骨細胞特異的な Cre マウスはないため Col2a1-CreERT2 マウスを用いる。HIF-2 の機能喪失実験には Hif2a-flox マウスを、機能増強実験には CAG-EGFP-Hif2a(Hif2a-cTg) マウスを、それぞれ使用する。胎生期から性成熟期までさまざまなタイミングでタモキシフェンを投与し、関節軟骨構造を詳細に観察して、表層の破たんや関節軟骨変性がみられた場合には免疫組織染色などでマーカー遺伝子発現を調べる。また遺伝子改変マウスを用いて検証する。具体的には Prg4-GFP-CreERT2; Hif2a-flox マウス、Prg4-GFP-CreERT2; Hif2a-cTg マウス、Col2a1-CreERT2; Hif2a-flox マウス、Col2a1-CreERT2; Hif2a-cTg マウスに、それぞれ生後7週でタモキシフェンを5日間連続腹腔内注射し、HIF-2 を部位毎にノックアウトまたは過剰発現させる。自然経過モデルは18か月齢まで飼育して評価する。変形性関節症モデルは生後8週で我々が開発

した内側半月板と内側側副靭帯を切除したモデルを作成し、術後8週間で評価する。レントゲン、組織切片のサフラニンO染色を評価項目として実施し、OARSI score を算出して比較検討する。これによって HIF-2 の関節軟骨の維持・変性への関与を部位毎に解明することができる。

2) 関節軟骨における部位毎の HIF-1、HIF-2 の標的遺伝子の網羅的探索
マウス関節軟骨から関節最表層細胞と深層軟骨細胞を特殊な酵素処理によって分離採取・培養する方法は既に確立されている。この手法を用いて野生型マウスの関節最表層細胞と深層軟骨細胞をそれぞれ分離採取し、さまざまな酸素濃度で培養してマイクロアレイを行い、発現遺伝子の比較を行う。酵素処理による細胞分離法に基づく解析だけでなく、我々は、粘着テープを用いて硬組織の凍結切片作成を行い、そこからレーザーマイクロダイセクション(LMD)にて微小領域からサンプリングを行い、mRNA を回収して増幅する一連の技術を確認済みである。この方法で正常マウス、もしくはそれぞれの遺伝子改変マウスの関節最表層、および深層軟骨細胞から微小組織を採取し、確立したプロトコールに準じて発現解析を行う。

3) 脊椎・椎間板における酸素濃度分布と、HIF の発現解析

我々は以前から低酸素プローブを用いたマウス関節軟骨の酸素濃度分布について研究を行っており、東京大学大学院薬学系研究科花岡研究室より組織浸透性および安定性に優れた最新の低酸素プローブをマウス膝関節内に注射、還流固定後に凍結切片で観察する方法によって、安定して関節内の酸素濃度の分布を解明することに最近成功している。この方法に準じて、この低酸素プローブをマウス後腹腔に十分量注射し、周囲に浸透させた後に同様の方法でサンプル調整し、脊椎・椎間板周囲の酸素濃度の分布を解析する。8週齢から18か月齢マウスまで幅広く行い、加齢に伴う脊椎・椎間板の酸素濃度分布の変化を解析する。胎生期の脊椎発生における酸素濃度分布と HIF-1、HIF-2 の関連性を解明するため、妊娠中の母体への投与を行い、出生直前の胎生18.5日で解析する。またこれらの切片を用いて H-E 染色、サフラニンO染色、免疫組織染色などを行い、組織的な変化や HIF-1、HIF-2 の発現との関連を評価する。さらに LMD を用いて組織を採取し、線維輪や髄核での mRNA の発現も確認する。これらの解析より、脊椎・椎間板の発生・維持・変性と酸素濃度分布との関連、さらに HIF-1、HIF-2 の役割までが判明すると考えられる。

4) 脊椎・椎間板における HIF-1、HIF-2 の *in vivo* 機能解析

3)の課題を基に、遺伝子改変マウスを用いて脊椎・椎間板におけるHIF-1、HIF-2の役割を*in vivo*で解析する。脊椎・椎間板に特異的なCreマウスは一般的ではないが、椎間板線維輪、髄核とも十分量の2型コラーゲンが発現している。Col2a1-CreERT2で両者をカバーできることは既に確認済みであり、本項ではこれを使用する。Col2a1-CreERT2; Hif1a-flox マウス、Col2a1-CreERT2; Hif1a-cTg マウス、Col2a1-CreERT2; Hif2a-flox マウス、Col2a1-CreERT2; Hif2a-cTg マウスを用いて、胎生期から性成熟期、さらには老齢期まで様々なタイミングでタモキシフェンを投与し、自然経過の中で脊椎・椎間板がどのように変化するかを組織学的に観察する。また加齢モデルマウスの脊椎サンプルを用いて、これらの遺伝子改変マウスでも同様の解析を行う。各組織での発現遺伝子の解析には免疫組織染色のほか、LMDも活用してmRNAレベルの解析も行う。これら3)4)のデータを総合的に検証することで、脊椎・椎間板変性において酸素濃度分布の変化とHIF-1、HIF-2がどの部位でどのように作用するかが明らかとなる。さらに2)で得られた標的遺伝子の知見を脊椎・椎間板のサンプルでも検証し、変形性関節症と変形性脊椎症の病態の類似性を確かめる。

4. 研究成果

1)関節軟骨における部位毎のHIF-2の*in vivo*機能解析

Prg4-GFP-CreERT2; Hif2a-flox マウス、Prg4-GFP-CreERT2; Hif2a-cTg マウス、Col2a1-CreERT2; Hif2a-flox マウス、Col2a1-CreERT2; Hif2a-cTg マウスに対し、変形性膝関節症モデルを作製し、変形性関節症の進行を比較した。Col2a1-CreERT2; Hif2a-flox マウス、Col2a1-CreERT2; Hif2a-cTg マウスではこれまでの結果の通り、Hif2aをノックアウトすることで、変形性関節症の進行は予防でき、過剰発現することで変形性関節症が悪化する傾向が見られた。しかしながら、Prg4-GFP-CreERT2; Hif2a-flox マウスを用いて、関節軟骨最表層でHif2aをノックアウトすると予想に反して変性が進行した。Prg4-CreERT2; Hif2a-cTg マウスは結果がばらつき一定した結果が得られなかった。これは最表層での発現増強が不安定であることが原因と考えられた。

発生段階でのノックアウトも試みたが、母体側の問題で経過中に死亡するなどのトラブルに見舞われ数は少なかったものの、明らかな差は見られなかった。

2)関節軟骨における部位毎のHIF-1、HIF-2の標的遺伝子の網羅的探索

HIF-1の標的遺伝子を解析するためにマイクロアレイとChIPシーケンスを行った。まず、HIF-1を強制発現するようにレンチウイルスを作製し、ATDC5細胞に感染させた。

これらを低酸素環境で培養し、mRNAを回収してマイクロアレイに提出した。また同様の細胞を使用し、HIF-1の抗体でChIPシーケンスを行った。まずマイクロアレイで発現がコントロールと比べ4倍以上変化した遺伝子を抽出した後、ChIP-シーケンスでHIF-1結合部位と比較して両者で合致する遺伝子を標的候補遺伝子とした。12遺伝子が抽出され、これらがどの部位で発現しているかを最表層の細胞と深層の細胞を比較したマイクロアレイで確認した。

現在これらの候補遺伝子の機能解析中である。特にTGF-βシグナルに関連する遺伝子があり、今後の解析が待たれる。

HIF-2も同様の実験を行ったが、マイクロアレイの解析は超えたが、ChIPシーケンスでは抗体がうまく機能せず、Flag-tagを付けたレトロウイルスを作製し、再度試みている。

3)脊椎・椎間板における酸素濃度分布と、HIFの発現解析

低酸素プローブを用いて脊椎および椎間板の酸素濃度解析を試みた。東京大学薬学部からプローブの提供を受け、実験を行ったが硬膜外投与、後腹膜経由など様々な投与経路を用いてもうまくプローブがされなかった。

市販されている製品を経静脈的に投与してみたが、結果は得られなかった。

4)脊椎・椎間板におけるHIF-1、HIF-2の*in vivo*機能解析

まず発現確認を行った。凍結切片を用いて免疫染色を行ったところ、8週齢マウスではHIF-1が髄核に多く発現し、HIF-2の発現はほとんど見られなかった。つづいて18か月齢のマウスで同様の実験をおこなったところ、変性が見られた部位ではHIF-1の発現が低下し、HIF-2の発現が骨棘付近の椎間板線維輪で上昇していた。

LMDで変性した椎間板線維輪と正常な椎間板線維輪を採取し、mRNAを抽出。増幅したのちにqPCRで発現解析を行うと、変性部位ではMmp13、Col10a1、Hif2aなどの変性マーカーが上昇していた。関節軟骨の標的候補遺伝子の発現もいくつか検証したところ、同様の発現傾向が見られた。検体量が少なかつたために、マイクロアレイには提出できていないが、今後行う予定である。

またCol2a1-CreERT2; Hif1a-flox マウス、Col2a1-CreERT2; Hif1a-cTg マウス、Col2a1-CreERT2; Hif2a-flox マウス、Col2a1-CreERT2; Hif2a-cTg マウスの自然経過を見ると脊椎では関節と同様にHif1aが減少することで変性は進行し、Hif2aが減少すると変性はおこりにくくなっていた。過剰発現系では有意差はみられなかったが、これは過剰にHIFを発現しても、即座に分解されてしまう可能性が考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 岡田慶太

『低酸素誘導因子 HIF による変形性関節症の制御について』第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 富山国際会議場、富山県富山市、2015.10.22

2. 岡田慶太

『低酸素誘導因子 HIF による軟骨分化制御』第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 福岡国際会議場、福岡県福岡市、2016.10.13

3. 牧井勇磨、岡田慶太 他: 転写因子 HIF-2a は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第 2 回日本骨免疫学会、ホテルモントレ沖縄スパ&リゾート、沖縄県国頭郡、2016.7.8

4. 牧井勇磨、岡田慶太 他: 転写因子 HIF-2a は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第 34 回日本骨代謝学会学術集会 大阪国際会議場、大阪府大阪市 2016.07.21

5. 牧井勇磨、岡田慶太、他: 転写因子 HIF-2a は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡国際会議場、福岡県福岡市、2016.10.13

6. Makii Y, Okada K, et al. Transcription factor HIF-2alpha is expressed in superficial zone of articular cartilage, and contributes to joint homeostasis. Australian and New Zealand Bone and Mineral Society Australia, Gold Coast. 2016.8.21

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 慶太 (OKADA, Keita)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 50759173