

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10461

研究課題名(和文) 転写因子Hes1による関節疾患発症の制御機構の解明

研究課題名(英文) Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development

研究代表者

武富 修治 (TAKETOMI, Syuji)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70570018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Notch シグナルの下流に位置する転写因子Hes1が変形性関節症発症(OA)に寄与するメカニズムを解明するために、タモキシフェン誘導性に軟骨細胞特異的にHes1をノックアウトするマウスを作成し、外科的OAモデルを作成したところ、OAの発症は抑制されていた。Hes1によって誘導される因子であったADAMTS5は配列内のHes1の応答領域が特定された。Hes1の補因子として知られているCaMK2は変形性関節症の発症に従い発現が増加していた。Hes1はCaMK2と共同して軟骨細胞において軟骨基質分解酵素を誘導し、変形性関節症の発症に寄与していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Notch signaling modulates skeletal formation and pathogenesis of osteoarthritis (OA) through induction of catabolic factors. OA development was suppressed when Hes1 was deleted from articular cartilage after skeletal growth in type II collagen (Col2a1)-CreERT;Hes1fl/fl mice. ChIP-seq identified Hes1-responsive regions in intronic sites of both genes; the region in the ADAMTS5 gene contained a typical consensus sequence for Hes1 binding. We further identified calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2 (CaMK2) as a cofactor of Hes1; CaMK2 was activated during OA development, formed a protein complex with Hes1, and switched it from a transcriptional repressor to a transcriptional activator to induce cartilage catabolic factors. Therefore, Hes1 cooperated with CaMK2 to modulate OA pathogenesis through induction of catabolic factors.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性膝関節症 Notch シグナル Hes1

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は高齢者の生活の質を脅かす代表的な運動器疾患であり、申請者らが属する東京大学医学部整形外科で実施している国内最大のコホート研究 (ROAD study) によると膝関節だけでも国内に 780 万人が痛みを苦しんでいる (*Osteoarthritis Cartilage* 17:1137,2009, *Ann Rheum Dis* 68:1401,2009, *J Bone Miner Metab* 27:620,2009)。その患者数は高齢人口の増加とともに増え続けている。その病因については加齢や物理的ストレス、炎症などの関与が示唆されているものの、分子レベルでの病態解明は始まったばかりであり、関節軟骨の変性予防や、修復・再生といった本質的な治療技術は現在も確立されていない。我々は従来から変形性関節症の病態解明のための基礎的研究を続けており、世界に先駆けてマウス変形性関節症モデルを確立する (*Osteoarthritis Cartilage* 13:632,2005) とともに、そのモデルを用いて Runx2 や C/EBP などの軟骨内骨化を制御する転写因子群が変形性関節症の発症・進行をも強力に制御していることや、新規分子 carminerin による軟骨の石灰化メカニズムを明らかにしたほか (*Arthritis Rheum* 54:2462,2006, *Nat Med* 12:665,2006, *PLoS One* 4:e4543,2009)、最近では転写因子 HIF2A が軟骨内骨化制御分子 Runx2 や IHH、軟骨基質分解酵素 MMP13、血管誘導因子 VEGF などを広く誘導して、マウスだけでなくヒトにおいても変形性関節症の発症・進行に強く関与していることを解明するなど、変形性関節症の分子背景の解明に多大な業績を上げてきた (*Nat Med* 16:678,2010)。またこれらの研究と平行して我々は MMP13 のプロモーターを用いたスクリーニングも行い、その強力な誘導シグナルとして HIF2A とは別に Notch を同定した。Notch は細胞膜状に存在する受容体であり、隣接細胞のリガンドが結合するこ

とによって Notch の細胞内ドメインが切断されて核内に移行し、核内の共役分子 RBPJ と複合体を形成して標的遺伝子の転写を誘導する、という特徴的なシグナル経路を持つ (次頁図)。近年 Notch シグナルが骨格形成において軟骨内骨化を強く制御していることが報告されており、我々はシグナルの中途に位置する転写共役分子である Rbpj の軟骨特異的ノックアウトマウスにおいてマウス変形性関節症モデルを作成し、その進行が著明に抑制される事を突き止めた (*PNAS* 110:1875,2013) さらに最近では申請者らが関節軟骨においては Hes/Hey Family のひとつ、Hes1 が Notch シグナルの下流標的分子であることを突き止め、マイクロアレイの結果、Hes1 はケモカインや炎症性サイトカインを強く誘導することが明らかとなった (データ未公表)。さらに他の研究室からは、Notch シグナルがマウス関節炎モデルにおいて炎症を強く制御することも報告された。転写抑制因子である Hes1 がどのような複合体を形成して機能するのか、またどのような遺伝子を制御するのかなど、そのメカニズムの多くはいまだ不明である。

2. 研究の目的

Notch シグナルは細胞膜表面の受容体の一部が核内移行して直接転写を制御する仕組みで、創薬の標的として魅力的であるが、Notch シグナルが変形性関節症や炎症性関節疾患に促進的に作用することが申請者らを含む最近の報告で明らかになりつつある。申請者らは、関節軟骨においては Hes1 が Notch シグナルの下流標的分子であることを突き止めたが、転写抑制因子である Hes1 がどのような複合体を形成して機能するのか、またどのような遺伝子を制御するのかなど、そのメカニズムの多くはいまだ不明である。本研究では、変形性関節症や炎症性関節疾患における Hes1 の作用を in vivo で検証するとともに、その共役分子および標的遺伝子の探索を

網羅的に行い、関節軟骨における Hes1 の作用の全貌解明を目指す。

3. 研究の方法

Hes1 が軟骨分化に果す役割を解明すべく軟骨前駆細胞特異的ノックアウトマウスを作成した。また変形性関節症に果す役割を解明すべくタモキシフェン誘導性に軟骨細胞特異的に Hes1 をノックアウトするマウスを作成し、外科的 OA モデルを作成した。培養軟骨細胞で Hes1 を過剰発現させ、誘導される因子を解析した。また、ChIP シークエンス、ならびにルシフェラーゼアッセイを用いて誘導される因子であった MMP13, ADAMTS5 の配列内の Hes1 の応答領域の特定を試みた。ChIP シークエンスの結果を踏まえてマイクロアレイ解析を行い、Hes1 による誘導される因子のさらなる同定を行った。さらに、通常転写抑制因子として知られている Hes1 が転写促進因子として働いているメカニズムの解明のため、Hes1 の補因子として知られている CaMK2 の変性軟骨での発現パターンを調べた。さらに、CaMK2 との結合能を欠損させた Hes1 と CaMK2 を培養軟骨細胞にて共同発現させ、Hes1 により誘導される因子の発現パターンの変化を調べた。

4. 研究成果

軟骨前駆特異的 Hes1 ノックアウトマウスは骨格発達において異常は見られなかった。タモキシフェン誘導性軟骨細胞特異的 Hes1 ノックアウトマウスの外科的 OA モデルにおいて OA の発生は抑制されていた。軟骨培養細胞に Hes1 を過剰発現させると、軟骨分解酵素である Adamts5 と Mmp13 の発現が誘導されていた。MMP13 の配列内には Hes1 の既知の結合配列は発見されなかった。ADAMTS5 の配列には既知の結合配列が発見された。また、マイクロアレイの結果より Hes1 がさらに Il6, Il11r11 を誘導していることも判明した。CaMK2 は関節軟骨において変形性関節症の発症に従い発現が増加していた。Hes1 は

CaMK2 との結合能を有しており、Hes1 のこの結合能を脱失させると、Hes1 による軟骨分解酵素の誘導能は培養軟骨細胞において失われた。Hes1 は CaMK2 と共同して軟骨細胞において軟骨基質分解酵素を誘導し、変形性関節症の発症に寄与していることがわかった。

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 19 件)

1. Taketomi S, Inui H, Yamagami R, Kawaguchi K, Nakazato K, Kono K, Kawata K, Nakagawa T, Tanaka S. Surgical Timing of Anterior Cruciate Ligament Reconstruction to Prevent Associated Meniscal and Cartilage Lesions. *Journal of Orthopaedic Science*. 2018 May;23(3):546-551. doi: 10.1016/j.jos.2018.02.006.
2. Inui H, Taketomi S, Yamagami R, Shirakawa N, Kawaguchi K, Tanaka S. The Relationship between Soft-Tissue Balance and Intraoperative Kinematics of Guided Motion Total Knee Arthroplasty. *J Knee Surg*. 2018 Mar 7. doi: 10.1055/s-0038-1636545.
3. Taketomi S, Inui H, Yamagami R, Shirakawa N, Kawaguchi K, Nakagawa T, Tanaka S. Bone-Patellar Tendon-Bone Autograft versus Hamstring Tendon Autograft for Anatomical Anterior Cruciate Ligament Reconstruction with Three-Dimensional Validation of Femoral and Tibial Tunnel Positions. *J Knee Surg*. 2017 Dec 28. doi: 10.1055/s-0037-1615813.
4. Oichi T, Taniguchi Y, Soma K, Chang SH, Yano F, Tanaka S, Saito T. A Mouse Intervertebral Disc Degeneration Model by Surgically-Induced Instability. *Spine (Phila*

- Pa 1976). 2017 Oct 9. doi:
10.1097/BRS.0000000000002427
5. Yamagami R, Taketomi S, Inui H, Tahara K, Tanaka S. The role of medial meniscus posterior root tear and proximal tibial morphology in the development of spontaneous osteonecrosis and osteoarthritis of the knee. *Knee*. 2017 Mar;24(2):390-395. doi: 10.1016/j.knee.2016.12.004.
 6. Kawata M, Sasabuchi Y, Taketomi S, Inui H, Matsui H, Fushimi K, Chikuda H, Yasunaga H, Tanaka S. Annual trends in arthroscopic meniscus surgery: Analysis of a national database in Japan. *PLoS One*. 2018 Apr 3;13(4):e0194854. doi: 10.1371/journal.pone.0194854.
 7. Taketomi S, Inui H, Tahara K, Shirakawa N, Tanaka S, Nakagawa T. Effects of initial graft tension on femoral tunnel widening after anatomic anterior cruciate ligament reconstruction using a bone-patellar tendon-bone graft. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2017 Sep;137(9):1285-1291. doi: 10.1007/s00402-017-2728-5.
 8. Yamagami R, Taketomi S, Inui H, Tahara K, Tanaka S. The role of medial meniscus posterior root tear and proximal tibial morphology in the development of spontaneous osteonecrosis and osteoarthritis of the knee. *Knee*. 2017 Mar;24(2):390-395. doi: 10.1016/j.knee.2016.12.004.
 9. Watanabe K, Moro T, Kyomoto M, Saiga K, Taketomi S, Kadono Y, Takatori Y, Tanaka S, Ishihara K. The effects of presence of a backside screw hole on biotribological behavior of phospholipid polymer-grafted crosslinked polyethylene. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018 Feb;106(2):610-618. doi: 10.1002/jbm.b.33837.
 10. Taniguchi Y, Kawata M, Ho Chang S, Mori D, Okada K, Kobayashi H, Sugita S, Hosaka Y, Inui H, Taketomi S, Yano F, Ikeda T, Akiyama H, Mills AA, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, Saito T. p63 Regulates Chondrocyte Survival in Articular Cartilage. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Mar;69(3):598-609. doi: 10.1002/art.39976.
 11. Isomura T, Sumitani M, Matsudaira K, Kawaguchi M, Inoue R, Hozumi J, Tanaka T, Oshima H, Mori K, Taketomi S, Inui H, Tahara K, Yamagami R, Hayakawa K. Development of the Japanese Version of the Leeds Assessment of the Neuropathic Symptoms and Signs Pain Scale: Diagnostic Utility in a Clinical Setting. *Pain Pract*. 2017 Jul;17(6):800-807. doi: 10.1111/papr.12528.
 12. Inui H, Taketomi S, Tahara K, Yamagami R, Sanada T, Tanaka S. A modified technique to reduce tibial keel cutting errors during an Oxford unicompartmental knee arthroplasty. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2017 Mar;25(3):710-716. doi: 10.1007/s00167-016-4151-9.
 13. Inui H, Taketomi S, Yamagami R, Tahara K, Tanaka S. Snapping Pes Syndrome after Unicompartmental Knee Arthroplasty. *Knee Surg Relat Res*. 2016 Jun;28(2):172-5. doi: 10.5792/ksrr.2016.28.2.172.
 14. Inui H, Taketomi S, Yamagami R, Sanada T, Shirakawa N, Tanaka S. Impingement of the Mobile Bearing on the Lateral Wall of the Tibial Tray in Unicompartmental Knee Arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2016 Jul;31(7):1459-64. doi: 10.1016/j.arth.2015.12.047.
 15. Yamagami R, Taketomi S, Inui H, Tahara K, Tanaka S. The role of medial meniscus posterior root tear and proximal tibial

- morphology in the development of spontaneous osteonecrosis and osteoarthritis of the knee. *Knee*. 2017 Mar;24(2):390-395. doi: 10.1016/j.knee.2016.12.004.
16. Yamagami R, Taketomi S, Inui H, Sanada T, Nakagawa T, Tanaka S. Myositis ossificans after navigated knee surgery: a report of two cases and literature review. *Knee*. 2016 Jun;23(3):561-4. doi: 10.1016/j.knee.2015.11.023.
 17. Chang SH, Yasui T, Taketomi S, Matsumoto T, Kim-Kaneyama JR, 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*. 2016 Apr;24(4):688-97. doi: 10.1016/j.joca.2015.11.008.
 18. Watanabe K, Kyomoto M, Saiga K, Taketomi S, Inui H, Kadono Y, Takatori Y, Tanaka S, Ishihara K, Moro T. Effects of Surface Modification and Bulk Geometry on the Biotribological Behavior of Cross-Linked Polyethylene: Wear Testing and Finite Element Analysis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:435432. doi: 10.1155/2015/435432.
 19. Inui H, Taketomi S, Yamagami R, Sanada T, Tanaka S. Twice cutting method reduces tibial cutting error in unicompartmental knee arthroplasty. *Knee*. 2016 Jan;23(1):173-6. doi: 10.1016/j.knee.2014.11.015.
- [学会発表](計 17 件)
1. 武富修治 乾洋 山神良太 川口航平 中里啓佑 田中栄 鏡視下前十字靭帯再建術におけるナビゲーション併用の有用性 第 30 回日本内視鏡外科学会シンポジウム (2017.12.9.京都)
 2. 武富修治 ACL 再建術の課題 骨孔拡大膝関節フォーラム (2017.12.2.東京)
 3. 武富修治 正常機能を目指した骨付き膝蓋腱を用いた解剖学的 ACL 再建術 第 4 回 Tokyo Knee & Hip Forum(2017.11.28.東京)
 4. 武富修治 乾洋 山神良太 川口航平 中里啓佑 河田学 河野賢一 中川匠 田中栄 骨付き膝蓋腱を用いた解剖学的長方形骨孔前十字靭帯再建術後の脛骨骨孔内腱長は脛骨骨孔拡大に影響する 第 44 回 日本臨床バイオメカニクス学会 (2017.11.24-25.愛媛)
 5. 武富修治 乾洋 山神良太 川口航平 中里啓佑 河田学 河野賢一 田中栄 ACL 再建術の現状 シンポジウム 第 45 回関節病学会 (2017.11.17.東京)
 6. 乾洋 武富修治 山神良太 田中栄 UKA の手術適応 主題:変形性膝関節症の手術適応 (TKA、UKA、HTO) 第 66 回 東日本整形災害外科学会 (2017.9.15-16.東京)
 7. 乾洋 武富修治 山神良太 白川展之 田原圭太郎 川口航平 河田学 田中栄 Guided motion TKA(Journey II)における大腿骨-脛骨間回旋ミスマッチが術中キネマティクスに及ぼす影響 第 9 回 JOSAKS (2017.6.22-24.札幌)
 8. 武富修治 乾洋 山神良太 白川展之 田原圭太郎 川口航平 河田学 中川匠 田中栄 解剖学的 ACL 再建術の術後 2 年成績 骨付き膝蓋腱と膝屈筋腱との比較 第 9 回 JOSAKS (2017.6.22-24.札幌)
 9. 武富修治 乾洋 田原圭太郎 白川展之 山神良太 川口航平 中川匠 田中栄 前十字靭帯再建術はどのくらいまで待機してよいか 半月・軟骨損傷の観点から 第 90 回日本整形外科学術総会 (2017.5.18-21.仙台)
 10. 武富修治 乾洋 中村謙介 武井聖良 武田秀樹 田中栄 中川匠 前十字靭帯再建術における 3D フルオロスコピーナビゲーションを用いた解剖学的大腿骨孔の作成 第 11 回日本 CAOS 研究会 2017.3.新潟
 11. 矢野文子 斎藤琢 大庭伸介 鄭雄一: Runx1 による軟骨分化制御機構 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 2016.10.13-14 福岡国際会議場、福岡
 12. 武富修治 乾洋 田原圭太郎 白川展之 中村春彦 中川匠 田中栄 膝前十字靭帯再建術の移植腱断面積の変化 第 8 回 JOSKAS 2016.07.28-30.
 13. 武富修治 乾洋 田原圭太郎 白川展之 中村春彦 中川匠 田中栄 骨付き膝蓋腱を用いた解剖学的前十字靭帯再建術における初期張力は術後大腿骨孔拡大に影響する 第 88 回日本整形外科学会学術集会 (2016.5.21-24 横浜)
 14. 武富修治 乾洋 山神良太 田原圭太郎 中川匠 田中栄 3 次元透視画像を基にしたナビゲーションを用いた解剖

学的前十字靭帯再建術(パネルディスカッション) 第7回 JOSKAS 2015.6.18-20.札幌

15. 武富修治 乾洋 山神良太 田原圭太郎 中川匠 田中栄 解剖学的前十字靭帯再建術後2年でのMRI評価 膝屈筋腱と骨付き膝蓋腱との比較 第7回 JOSKAS 2015.6.18-20.札幌
16. 武富修治 乾洋 田原圭太郎 山神良太 白川展之 眞田高起 大腿四頭筋腱を用いた後十字靭帯再建術の小経験 第23回よこはまスポーツ整形外科フォーラム(2015.5.31.横浜)
17. 武富修治 乾洋 山神良太 田原圭太郎 中川匠 田中栄 患者立脚型評価を用いた解剖学的前十字靭帯再建術後の疼痛の要因の解析-移植腱として骨付き膝蓋腱を用いると痛いのか- 第88回日本整形外科学会学術総会(2015.5.21-24.神戸)

〔図書〕(計 8件)

1. 武富修治 乾洋 田中栄 手術適応人工膝関節全置換術「TKA」のすべて メジカルビュー社 編集 勝呂徹 田中栄 改訂第2版 2017年 p32-39
2. 乾洋 人工膝関節-最新の動向 人工膝関節全置換術「TKA」のすべて メジカルビュー社 編集 勝呂徹 田中栄 改訂第2版 2017年 p343-347
3. 武富修治 膝靭帯再建手術における画像支援ナビゲーション 今日の整形外科治療指針 第7版 編集 土屋弘行ほか 2016 p776
4. 武富修治 膝半月板損傷 日本医師会雑誌 第144巻特別号(1) ロコモティブシンドロームのすべて 編集 中村耕三 田中栄 2015年6月 p140-142
5. 武富修治 変形性膝関節症の画像診断 日本医師会雑誌 第144巻特別号(1) ロコモティブシンドロームのすべて 編集 中村耕三 田中栄 2015年6月 p5
6. 武富修治 後十字靭帯再建術:膝屈筋腱を用いた解剖学的2重束再建術、大腿四頭筋腱を用いた bisocket 再建法 整形外科 Surgical Technique メディカ出版 2015 Vol.5 No.6 p57-65
7. 武富修治 解剖学的前十字靭帯再建術における大腿骨孔の偏心性拡大 臨床雑誌整形外科 2015;66(7):689-691
8. 武富修治 乾洋 眞田高起 山神良太 中川匠 田中栄 3次元画像を基にしたナビゲーションを用いたレムナント温存前十字靭帯再建術における大腿骨孔位置評価 Newest Information(国内学会トピックス)オルソタイムズ Vol.9No.2 2015 メディカルレビュー社

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

武富 修治(TAKETOMI, Syuji)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号:70570018

(2)研究分担者

矢野 文子(YANO, Fumiko)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号:80529040

乾 洋(INUI, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号:60583119