

令和元年6月5日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20055

研究課題名(和文)変形性関節症における骨棘形成機序

研究課題名(英文)Mechanism of osteophyte formation in osteoarthritis

研究代表者

堀田 昌宏(Horita, Masahiro)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00708084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ADAM12の軟骨細胞分化への関与について検討した。マウス成長板において増殖軟骨細胞層と肥大軟骨細胞層でADAM12の発現を認めた。ATDC5細胞を用いた軟骨細胞分化過程において、Adam12の発現がピークに達した後にX型コラーゲンの発現の亢進を認めた。Adam12-KO ATDC5細胞ではwild typeと比較し分化誘導後にIgf-1の発現が抑制され、一方でRunx2やCol10a1のmRNAと蛋白の発現が亢進した。ADAM12はRUNX2やX型コラーゲンの発現を制御することで、軟骨細胞の分化過程において重要な働きをしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症(OA)は加齢とともに罹患率が増加することから、高齢化するわが国において患者数は今後ますます増えることが予想されている。しかし、OA軟骨変性の進行や骨棘形成に関与している内軟骨性骨化の機序はいまだ明らかになっていない。本研究結果より、内軟骨性骨化の過程においてADAM12が重要な役割をすることが示唆された。この分子が治療標的となり、OAの病態解明や症状緩和の一助になる可能性があり社会的意義は高いと考える。

研究成果の概要(英文)：ADAM12 was identified in chondrocytes of the proliferative and hypertrophic zones in mouse growth plates by immunohistochemistry. Adam12 was upregulated prior to Col10a1 during chondrogenic differentiation in wild-type ATDC5 cells. In Adam12-KO ATDC5 cells, following initiation of chondrogenic differentiation, we observed a reduction in Igf-1 expression along with an upregulation of hypertrophy-associated Runx2, Col10a1, and type X collagen protein expressions. In ATDC5 wild-type cells, stimulation with TGF-1 upregulated the expressions of Adam12 and Igf-1 and downregulated the expression of Runx2. In contrast, in Adam12-KO ATDC5 cells, these TGF-1-induced changes were suppressed. Adam12 overexpression resulted in an upregulation of Igf-1 and downregulation of Runx2 expression in ATDC5 cells. The findings suggest that ADAM12 has important role in the regulation of chondrocyte differentiation.

研究分野：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：軟骨細胞分化 ADAM12 IGF-1 RUNX2 Type X collagen

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) は、高齢者の膝や股関節等に好発し、加齢や慢性的な力学的ストレスを背景として整形外科領域で最も頻度の高い骨・関節疾患である。OA における関節軟骨破壊像は関節面の中央部で生じるのに対し、関節辺縁部では骨棘が形成される。これは、辺縁部以外の関節軟骨では残存した軟骨細胞は増殖するものの遊走、分散できず、クローニングと呼ばれる病変を形成し不完全な軟骨修復像を示すことによる。

本研究では、OA の疾患感受性遺伝子の一つとしてあげられている ADAM (a disintegrin and metalloprotease) 12 に着目した。ヒトにおいて ADAM12 は選択的なスプライシングによって膜貫通型ドメインを有する ADAM12-L と、膜貫通型ドメインが欠落した分泌型の ADAM12-S が生じる。OA の関節軟骨組織で TGF- β により誘導される ADAM12-L が高発現し、軟骨細胞の増殖促進とクラスター形成に関わることから、関節軟骨再生に何らかの役割を果たす可能性が示唆されている。ADAM12-S は軟骨細胞の増殖と成熟を制御し、骨成長を促進することが報告されている。さらに ADAM12 をノックアウトした動物モデルを用いた研究では、ADAM12 は脂肪細胞や筋細胞への分化に関与していることも報告されている。OA 軟骨変性の進行や骨棘形成過程に内軟骨性骨化が関与しているとされ、軟骨細胞の分化の制御は OA の治療ターゲットとして重要である。ADAM12 の軟骨細胞分化への関与についてはいまだ報告がなく、解明することにより、OA に対する新規治療法の開発に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

申請者らは、変形性関節症 (OA) 患者に対して施行した人工関節全置換術中に採取した骨棘組織を免疫染色し、増殖軟骨細胞層と肥大軟骨細胞層で ADAM12 の発現を認めた。この知見は、ADAM12 が内軟骨性骨化である骨棘形成過程に関与していることを示唆している。本研究では、OA 軟骨変性の進行や骨棘形成の原因となる内軟骨性骨化過程における ADAM12 の関与について、ATDC5 細胞やマウス、CRISPR/Cas9 system を用いて in vitro、in vivo で明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

6-7 週齢の DBA/1 マウス成長板を免疫染色し、X 型コラーゲンを肥大軟骨細胞層のマーカーとして用い、ADAM12 の発現とその局在について解析した。次に 6 well plate に 6.4×10^4 cells/well の ATDC5 細胞を播種し、70-80% confluence となった後、1% ITS (インスリン-トランスフェリン-亜セレン酸ナトリウム) を添加し軟骨分化させ、X 型コラーゲンを肥大化期のマーカー遺伝子とし、*Adam12*、*Col10a1* などの発現時期を real-time PCR により解析した。

Adam12-knockout (KO) ATDC5 細胞樹立のために、CRISPR/Cas9 system を用い single guide RNA expression vectors : target site of ADAM12 (5'-GCATCATGAACCCGTCACG-3' and 5'-TATTCTGACATCGACGATTG-3') と Cas9 プラスミドで DNA を切断し、それらの細胞集団から FACS Aria II cell sorter を用いてホモ切断の細胞だけを抽出した。ホモ KO 細胞は PCR を行い、シーケンスで確認した(図 1)。

ADAM12 の機能解析を行うために、*Adam12*-KO ATDC5 細胞に 1% ITS を添加し軟骨分化させ、*Igf-1* や *Runx2*、*Col10a1* の発現について、またそれぞれの蛋白の発現について wild type と比較検討した。次に、TGF- β 1 (10ng/ml) 刺激 24 時間後の *Igf-1* や *Runx2* の発現について、wild type と *Adam12*-KO ATDC5 細胞で比較検討した。さらに *Adam12* 過剰発現ベクターを ATDC5 細胞に transfection し、*Igf-1* と *Runx2* の発現について control と比較検討した。

4. 研究成果

DBA/1 マウス成長板において増殖軟骨細胞層と肥大軟骨細胞層で ADAM12 の発現を認めた(図 2)。

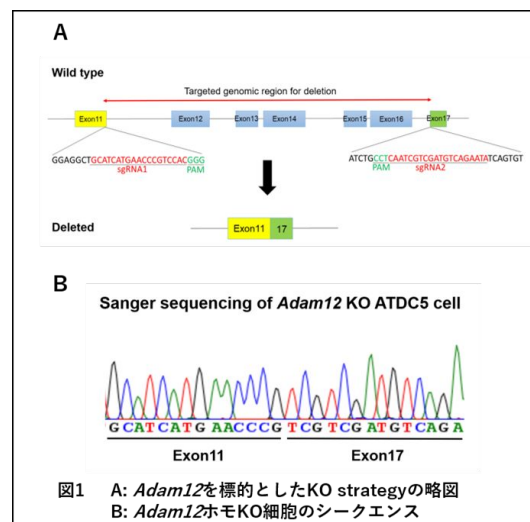


図1 A: *Adam12*を標的としたKO strategyの略図
B: *Adam12*ホモKO細胞のシーケンス

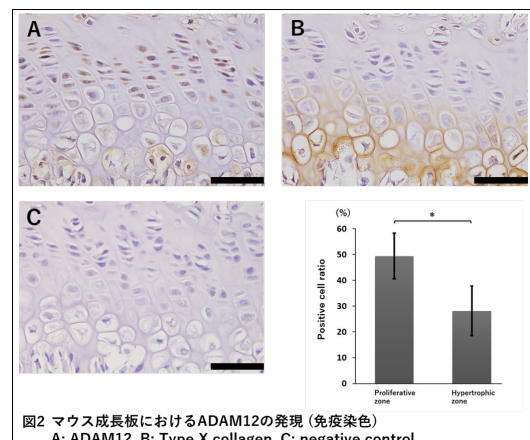


図2 マウス成長板におけるADAM12の発現(免疫染色)
A: ADAM12, B: Type X collagen, C: negative control

ATDC5 細胞に ITS を添加した軟骨細胞分化過程において、*Adam12* の発現がピークに達した後、*Col10a1* の発現の亢進を認めた (図 3)。

Adam12-KO ATDC5 細胞では wild type と比較し分化誘導後に *Igf-1* の発現が抑制され、一方で *Runx2* や *Col10a1* の発現が亢進した。さらに、*Adam12*-KO ATDC5 細胞において、wild type と比較し、分化誘導後 *Runx2* や X 型コラーゲンの蛋白の発現が亢進した (図 4)。

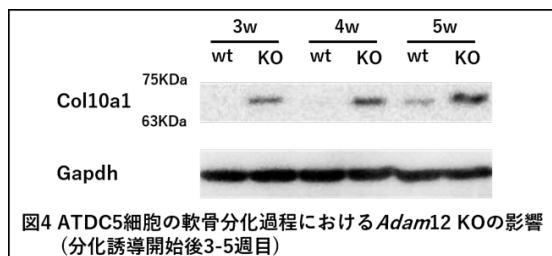


図4 ATDC5細胞の軟骨分化過程における *Adam12* KO の影響 (分化誘導開始後3-5週目)

本研究より ADAM12 は RUNX2 や X 型コラーゲンの発現を制御することで、軟骨細胞の分化過程において重要な働きをしていることが示唆された。ADAM12 の発現を人為的に調整することで、OA に対する新規治療薬の開発に繋がると考えられた。当初の研究計画では、ADAM12 は X 型コラーゲンの発現を促進するとの仮説のもとに研究を開始したが、これを否定する結果となった。マウスに発現している ADAM12 はヒトにおける ADAM12-L と類似しており、今後は ADAM12-L の上流シグナルである microRNA の OA 軟骨変性への関与について研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Horita Masahiro, Nishida Keiichiro, Hasei Joe, Furumatsu Takayuki, Sakurai Miwa, Onodera Yuta, Fukuda Kanji, Salter Donald M., Ozaki Toshifumi. Involvement of ADAM12 in chondrocyte differentiation by regulation of TGF- β 1-induced IGF-1 and RUNX-2 expression. *Calcif Tissue Int.*, 査読有, 2019, doi: 10.1007/s00223-019-00549-6
 堀田昌宏, 西田圭一郎: Vocabulary ADAM12 (解説), *整形外科*, 査読なし, Vol.69, No.8, 2018, pp.848

〔学会発表〕(計 6 件)

堀田昌宏 他, ADAM12 は RUNX2 を介した軟骨細胞肥大化の制御に重要である. 第 36 回日本骨代謝学会, 2018/7/26-28, 長崎
 堀田昌宏 他, 軟骨分化制御による骨棘形成過程への ADAM12 の関与. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2017/10/26-27, 沖縄
 Horita Masahiro et al, Involvement of microRNA-29b-ADAM12-L axis in the process of chondrocyte hypertrophy and osteophyte formation in osteoarthritis. Orthopaedic Research Society Annual Meeting, 2017/3/19-22, San Diego, USA
 堀田昌宏 他, 変形性関節症における骨棘形成過程への miR-29b を介した ADAM12 の関与. 第 30 回日本軟骨代謝学会, 2017/3/3-4, 京都
 堀田昌宏 他, 変形性関節症における骨棘形成に対する ADAM12 の関与. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016/10/13-14, 福岡
 堀田昌宏 他, 変形性関節症における骨棘形成に対する ADAM12 の関与, 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016/4/21-23, 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

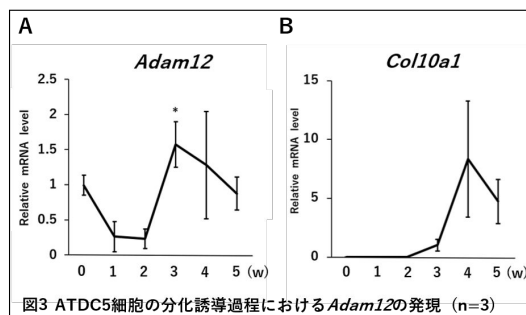


図3 ATDC5細胞の分化誘導過程における *Adam12* の発現 (n=3)

Adam12-KO ATDC5 細胞では、wild type への TGF- β 1 刺激により誘導された *Igf-1* の亢進や *Runx2* の抑制が阻害された。さらに、*Adam12* を過剰発現することにより、*Igf-1* の発現は亢進する一方で *Runx2* の発現は抑制された (図 5)。

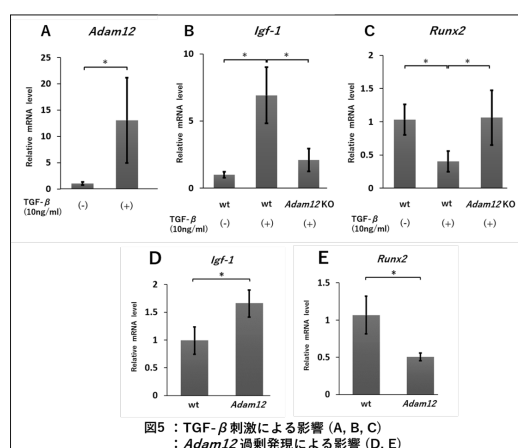


図5 : TGF- β 刺激による影響 (A, B, C)
 : *Adam12* 過剰発現による影響 (D, E)

取得状況（計 0 件）
〔その他〕
ホームページ等：なし

6．研究組織

(1)研究分担者
該当なし

(2)研究協力者
該当なし