

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10996

研究課題名(和文) 転写因子HIF-1 の抗炎症作用・軟骨保護作用の分子メカニズム解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying anti-inflammatory and cartilage protective roles of HIF-1alpha

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子HIF-1alphaは低酸素下で安定化し、低酸素状態におかれた細胞を助けるような様々な機能を発揮することが知られている。本研究では関節軟骨におけるHIF-1alphaの役割を解析し、HIF-1alphaがなくなると関節軟骨は早期に変性してしまうこと、HIF-1alphaは軟骨を分解する酵素の発現を抑制すること、そこには液性因子C1qtnf3が介在していることなどを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIF-1alphaを中心とした、低酸素下での細胞の適応に関する研究に対して昨年ノーベル医学生理学賞が授与された。HIF-1alphaは様々な組織の維持に重要な役割を果たすが、本研究は関節軟骨におけるHIF-1alphaの役割を示したものである。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るが、いまだ本質的な予防薬、治療薬は存在せず、本研究はそれらに繋がりうる重要な知見と考える。

研究成果の概要(英文)：A transcription factor HIF-1alpha is stabilized under the hypoxic condition, and exerts various effects for survival of hypoxic cells. The present study investigated roles of HIF-1alpha in articular cartilage. We have revealed that loss-of-function of HIF-1alpha leads to enhanced osteoarthritis development. We have further shown that HIF-1alpha suppresses MMP-13 expression, and that C1qtnf3 mediates the effects.

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、我々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)。その治療法として、末期の患者には人工関節置換術が行われ、良好な成績を挙げているが、進行期の患者に対する治療は対症療法的なものにとどまっておらず、病態を制御しようとするような治療法や予防法はいまだ存在しない。

このような本質的な治療法、予防法を開発するためには変形性関節症の分子病態を知る必要があると考え、我々のグループでは 2002 年から本格的な軟骨研究を開始した。軟骨内骨化研究を通じて軟骨細胞の発生、分化を研究するとともに、2005 年にはマウスを用いた変形性膝関節症モデルを開発 (Osteoarthritis Cartilage 13:632-41,2005)、軟骨細胞の肥大分化や変性のマーカー遺伝子の発現をたどる手法によって、変形性関節症を制御する数多くのシグナルや分子を解明してきた。その中で重要な成果の一つが hypoxia-inducible family (HIF) に属する転写因子 HIF-2 である。我々は当初、軟骨細胞の肥大分化の特異的マーカーとして知られる 10 型コラーゲンの上流転写因子として HIF-2 を同定したが、HIF-2 は変形性関節症の初期に NF- κ B シグナルに誘導される形で関節軟骨の中間層、深層に発現をはじめ、軟骨基質分解酵素 MMP-13、MMP-9 など多くの変性関連分子を強く誘導することによって変形性関節症を促進的に制御することを解明した (Nat Med 16:678-86,2010)。次に NF- κ B シグナルに焦点を当てて解析したところ、健康な軟骨細胞では NF- κ B シグナルの活性は低く抑えられ、Rela/p65 は抗アポトーシス分子を誘導して軟骨を保護するが、NF- κ B シグナルが活性化すると Rela/p65 は HIF-2 を誘導して軟骨を変性させることが明らかとなった (Nat Commun 7:13336, 2016)。

HIF-2 が関節軟骨を変性させる作用を持つ一方、同じ HIF のメンバーである HIF-1 は軟骨の発生、分化に重要な役割を果たし、軟骨細胞で HIF-1 を欠損させたマウスでは骨格形成が胎生期から著しく障害されることが知られている (Genes Dev 15:2865-76,2001)。HIF-1 は低酸素下でタンパクが安定化し、エネルギー代謝、細胞増殖など多くの現象を制御し、低酸素状態で細胞が生き抜くために必要な働きをする転写因子であり、HIF-2 より有名で古くから多くの分野で研究されてきたが、2012 年当時、HIF-1 の関節軟骨での作用は知られていなかった。過去の軟骨内骨化での解析結果からも HIF-1 と HIF-2 の関節軟骨での作用は正反対であることが予想されたため、我々は HIF-1 の flox マウス (Hif1a-flox) を Col2a1-CreERT2 マウスと交配させ、骨格成長後にタモキシフェンを投与して軟骨細胞特異的に HIF-1 をノックアウトしたところ、変形性関節症が著しく促進された。また培養細胞レベルでの予備実験ではあるが、我々は HIF-1 が NF- κ B シグナルの活性を抑制すること、HIF-2 などの軟骨変性促進分子や IL-6 などの炎症性サイトカインの発現を抑制することを見出した。これは変形性関節症のみならず、関節リウマチなどの炎症性疾患、さらには組織の急性炎症などに広く敷衍される分子メカニズムと予想され、証明されれば生物学的な意義に加え、医学・医療上の重要性も高いと考えられる。

2. 研究の目的

以上の経緯から、我々は HIF-1 の抗炎症作用と軟骨保護作用の分子メカニズムに焦点を当てた研究計画を提案した。まず培養細胞レベルで、HIF-1 の抗炎症作用と軟骨保護作用が最も明確に観察できる条件を検討する。軟骨細胞の培養系に TNF- α を添加すると、NF- κ B シグナルが活性化され、それに誘発して炎症性サイトカイン、軟骨変性促進分子が発現増加することが知られている。そこで、まずその系において、酸素濃度や HIF-1 の発現量を変化させた場合にこれら炎症性サイトカインや軟骨変性促進分子の発現がどのように変化するかを詳細に条件検討する。HIF-1 の抗炎症作用、軟骨保護作用のそれぞれが最も強くみられる条件が定まれば、各種の網羅的解析を行い、HIF-1 が転写因子としてどのように抗炎症作用、軟骨保護作用を惹起するかを解析する。また in vivo では、Hif1a-flox を用いてマウス変形性関節症モデルを作成し、生体レベルでの検証を行う。

HIF-1 が軟骨保護作用を有すること自体は 2001 年の報告 (Genes Dev 15:2865-76,2001) から容易に想像できることであり、決して新しい切り口ではないが、その分子機序については実は多くは分かっていない。HIF-1 が直接 Sox9 や Col2a1 など軟骨細胞の分化誘導や維持に必須の分子を誘導するという報告や、HIF-1 が Wnt シグナルの抑制を介して軟骨を保護しているという報告もあるが、最新のエピゲノム解析や転写解析の手法に基づいた研究は報告されておらず、いずれも決めうちによる断片的な研究に過ぎない。HIF-1 の軟骨保護作用の統合的な解析から、創薬の起点となる知見が得られることは十分に期待できる。

また当然ながら、HIF-1 は軟骨細胞に限った転写因子ではない。腎、肺、血管などの、多くの臓器の形成や維持に重要な役割を果たし、ガンの転移のメカニズムの一端も担うなど、生理学的、病理学的に多大な可能性を有する分子である。NF- κ B シグナルも細胞生存、組織の恒常性維持から、炎症、ガンに至るまで多彩な生命現象に制御に関わっており、分子生物学で最も研究されているシグナルといっても過言ではない。炎症という概念も、当初の組織レベルでの現象にとどまらず、近年分子生物学の世界で拡大を続けており、老化や過剰な力学的ストレス負荷など、多くの生命現象の根幹に NF- κ B シグナルと炎症性シグナル経路が関わるということが明らかになってきた。HIF-1 が NF- κ B シグナルを抑制するメカニズムが解明されれば、関節軟骨に限らず、

炎症性疾患、老化など極めて広い領域に応用できる干渉手段が得られる可能性もあり、その医学・医療上の波及効果は計り知れない。

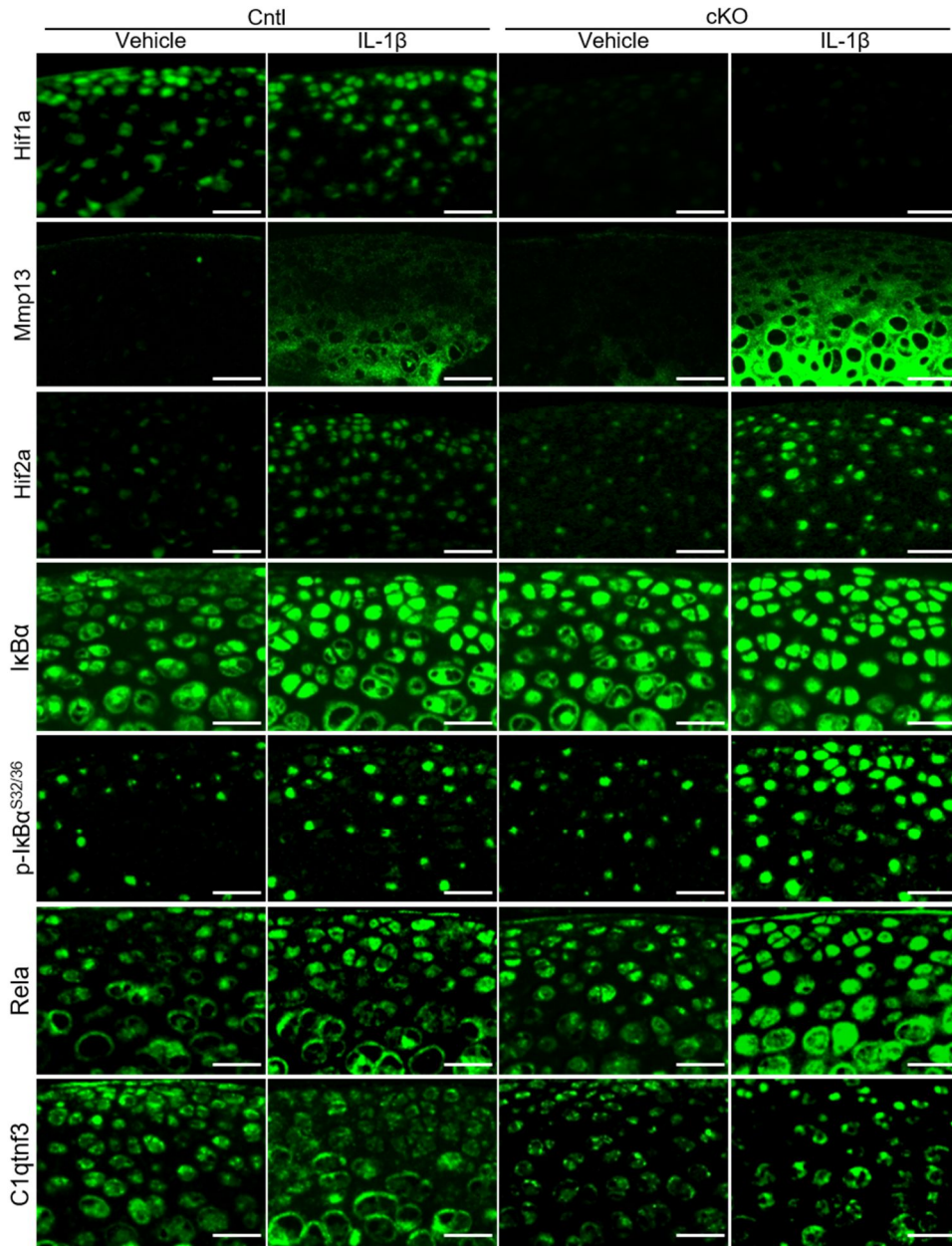
3. 研究の方法

まずマウス変形性関節症モデルの時系列のサンプルにおいて、免疫組織染色にて HIF-1 α の発現を調べた。また本学薬学部花岡准教授らが開発した低酸素プローブを用いて関節内の酸素濃度を調べた。次に培養軟骨細胞にて、HIF-1 α を強制発現し、あるいは siRNA やノックアウトマウス由来の細胞を用いて HIF-1 α の発現を抑制して、HIF-1 α の炎症抑制作用の解析を行った。培養軟骨組織においても同様の解析を行い、免疫組織染色にて評価を行った。次に Col2a1-CreERT2 と Hif1a-flox マウスを交配させ、タモキシフェン誘導性に軟骨細胞特異的に HIF-1 α をノックアウトできるマウスを作成した。骨格成長後にタモキシフェンを投与し、内側側副靭帯と内側半月板を切除する外科的変形性関節症モデルを作成、8週間後にサクリフェイスして組織学的解析を行った。HIF-1 α の作用機序を調べるため、軟骨細胞特異的 HIF-1 α ノックアウトマウスとその対照マウスから軟骨細胞を単離し、マイクロアレイ解析を行った。その中で変化の大きかった遺伝子について機能解析を行い、HIF-1 α の下流でどのような役割を果たしているかを解析した。

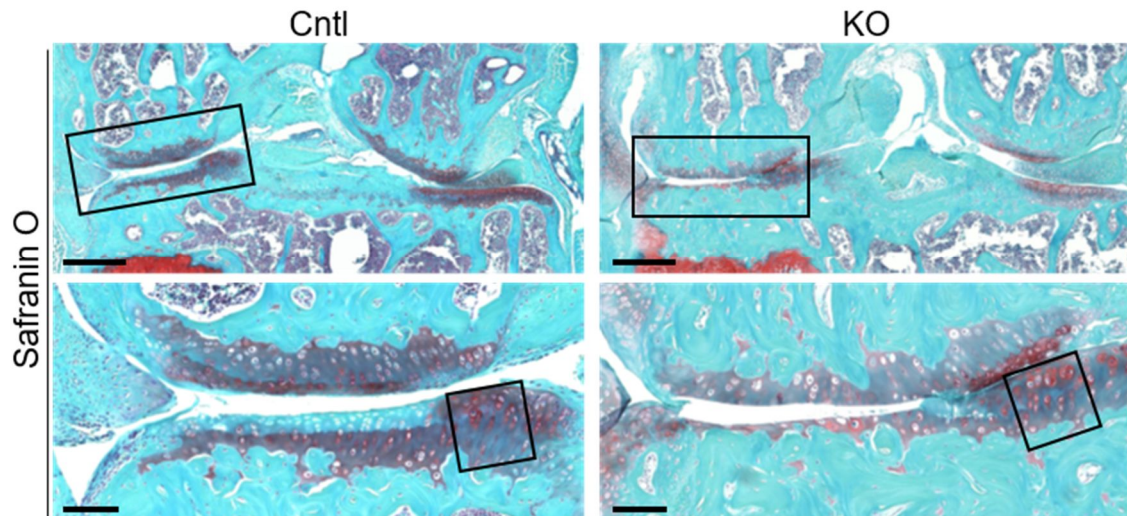
4. 研究成果

マウス変形性関節症モデルにおける HIF-1 α タンパクの発現を免疫組織染色で調べたところ、健全な関節で豊富に発現していた HIF-1 α が軟骨の変性とともに減少し、また低酸素プローブを用いて関節内酸素分圧を調べたところ、変性とともに酸素分圧は増加していた。培養関節軟骨細胞において HIF-1 α を強制すると、炎症性サイトカイン IL-1 による軟骨基質分解酵素 MMP-13 の発現や軟骨変性のマスターレギュレーターである HIF-2 α の発現が抑制された。反対に HIF-1 α をノックアウトするとこれらの因子の発現は増加した。ノックアウトマウスと対照マウスから培養軟骨組織を採取し、IL-1 の存在下で培養したところ、HIF-1 α ノックアウト軟骨組織では IL-1 による MMP-13 の発現誘導が劇的に増加し、その上流である HIF-2 α も誘導されていた。(図1)。次に軟骨組織特異的 HIF-1 α をノックアウトしたマウスにおいて変形性関節症モデルを作成して解析を進めたところ、HIF-1 α のノックアウトによって変形性関節症の進行は促進され(図2)、関節における MMP-13 の発現は増加した。また HIF-2 α -MMP-13 経路の上流である NF-kappaB シグナルは活性化されていた。最後に HIF-1 α が NF-kappaB を抑制するメカニズムを探索した。マイクロアレイを用いて HIF-1 α ノックアウト細胞で著明に発現が低下する分子として、C1qtnf3 を同定した。C1qtnf3 は NF-kappaB の活性を抑制しうる液性因子として知られていたが、HIF-1 α の強制発現によって C1qtnf3 の発現は増加し、HIF-1 α のノックアウトによって C1qtnf3 の発現は減少した。また HIF-1 α による NF-kappaB 抑制作用の一部は C1qtnf3 によって仲介されていることも判明した。これらの成果は Sci Rep 10:5425, 2020 に論文発表された。

1



2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Omata Yasunori, Frech Michael, Lucas Sebastien, Primbs Tatjana, Knipfer Lisa, Wirtz Stefan, Kadono Yuhō, Saito Taku, Tanaka Sakae, Sarter Kerstin, Schett Georg, Zaiss Mario M.	4. 巻 136
2. 論文標題 Type 2 innate lymphoid cells inhibit the differentiation of osteoclasts and protect from ovariectomy-induced bone loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115335 ~ 115335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115335	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Okada Keita, Mori Daisuke, Makii Yuma, Nakamoto Hideki, Murahashi Yasutaka, Yano Fumiko, Chang Song Ho, Taniguchi Yuki, Kobayashi Hiroshi, Semba Hiroaki, Takeda Norihiko, Piao Wen, Hanaoka Kenjiro, Nagano Tetsuo, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 10
2. 論文標題 Hypoxia-inducible factor-1 alpha maintains mouse articular cartilage through suppression of NF- κ B signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62463-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Murahashi Yasutaka, Yano Fumiko, Chijimatsu Ryota, Nakamoto Hideki, Maenohara Yuji, Amakawa Masahiro, Miyake Yoshihide, Yamanaka Hiroyuki, Iba Kousuke, Yamashita Toshihiko, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 9
2. 論文標題 Oral administration of EP4-selective agonist KAG-308 suppresses mouse knee osteoarthritis development through reduction of chondrocyte hypertrophy and TNF secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56861-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 SUGIMOTO Hikaru, MURAHASHI Yasutaka, CHIJIMATSU Ryota, MIWA Satoshi, YANO Fumiko, TANAKA Sakae, SAITO Taku	4. 巻 41
2. 論文標題 Primary culture of mouse adipose and fibrous synovial fibroblasts under normoxic and hypoxic conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 43 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.41.43	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Xuan Fengjun, Yano Fumiko, Mori Daisuke, Chijimatsu Ryota, Maenohara Yuji, Nakamoto Hideki, Mori Yoshifumi, Makii Yuma, Oichi Takeshi, Taketo Makoto Mark, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke, Chung Ung-il, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 21
2. 論文標題 Wnt/ -catenin signaling contributes to articular cartilage homeostasis through lubricin induction in the superficial zone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-019-2041-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawata Manabu, Mori Daisuke, Kanke Kosuke, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke, Chung Ung-il, Yano Fumiko, Masaki Hideki, Otsu Makoto, Nakauchi Hiromitsu, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 13
2. 論文標題 Simple and Robust Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells toward Chondrocytes by Two Small-Molecule Compounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 530 ~ 544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2019.07.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yano Fumiko, Ohba Shinsuke, Murahashi Yasutaka, Tanaka Sakae, Saito Taku, Chung Ung-il	4. 巻 9
2. 論文標題 Runx1 contributes to articular cartilage maintenance by enhancement of cartilage matrix production and suppression of hypertrophic differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43948-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chang Song Ho, Mori Daisuke, Kobayashi Hiroshi, Mori Yoshifumi, Nakamoto Hideki, Okada Keita, Taniguchi Yuki, Sugita Shurei, Yano Fumiko, Chung Ung-il, Kim-Kaneyama Joo-ri, Yanagita Motoko, Economides Aris, Canalis Ernesto, Chen Di, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 10
2. 論文標題 Excessive mechanical loading promotes osteoarthritis through the gremlin-1-NF- B pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-09491-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Murahashi Yasutaka, Yano Fumiko, Kobayashi Hiroshi, Makii Yuma, Iba Kousuke, Yamashita Toshihiko, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 8
2. 論文標題 Intra-articular administration of I B kinase inhibitor suppresses mouse knee osteoarthritis via downregulation of the NF- B/HIF-2 axis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34830-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Taku, Tanaka Sakae	4. 巻 19
2. 論文標題 Molecular mechanisms underlying osteoarthritis development: Notch and NF- B	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-017-1296-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 齋藤琢
2. 発表標題 関節軟骨の維持・変性を制御するシグナル群
3. 学会等名 第3回日本筋学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 牧井優磨、他
2. 発表標題 転写因子HIF-2 α 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
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村橋靖崇、他
2. 発表標題 I kappa B alphaキナーゼ阻害剤の関節内投与はNF-kappa Bの制御を介して変形性関節症モデルマウスの病態進行を抑制する
3. 学会等名 第31回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永田向生、他
2. 発表標題 Runx3は関節軟骨に保護的に作用する
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤琢
2. 発表標題 変形性関節症の分子病態と治療法の研究
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤琢
2. 発表標題 変形性関節症の分子病態と治療法開発
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤琢
2. 発表標題 変形性関節症の分子病態と治療法開発
3. 学会等名 第68回東日本整形災害外科学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 寛 (Kobayashi Hiroshi) (20407951)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	齋藤 琢 (Saito Taku) (30456107)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	