

令和元年6月14日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16674

研究課題名(和文) Rho修飾因子による関節軟骨基質形成の制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory mechanism of the formation of articular cartilage matrix by Rho modifiers

研究代表者

森 芳史 (Mori, Yoshifumi)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：60757954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々が以前に行っていた研究で、今回解析したRho修飾因子ファミリー分子が、関節軟骨で階層特異的に発現している事が判明しており、また、それらが、関節軟骨の基質形成を制御している可能性が示唆されている。本研究におけるin vitro解析により、これらのRho修飾因子の発現が、Wnt/ $\beta$ -catenin経路や、いくつかの、関節軟骨である階層に局限して発現する液性因子により制御される事が判明した。In vivo解析では、遺伝子改変マウスの関節軟骨の形態を組織学的手法やmicro-CTによって解析した。Rho修飾因子が実際に関節軟骨の基質形成に関与している事を示す実験結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節軟骨は階層構造を持ち、各階層がそれぞれ異なる機能をもつ細胞外基質を形成する事で、適切な生理的機能を持った関節軟骨が構成されるが、この階層構造の発生・維持のメカニズムはこれまでに殆ど知られていなかった。今回の研究によって、関節軟骨形成にRho修飾因子が関与する事を見出した。本研究で見出したメカニズムの解明がさらに進めば、関節軟骨の再生医療や変性治療に進展をもたらす事ができると期待される。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies have shown that the Rho modifier family molecules analyzed in this study are expressed in a layer-specific manner in the articular cartilage, and it has also been suggested that they control matrix formation of the articular cartilage. In this study, in vitro analyses revealed that the expression of these Rho modifiers is regulated by the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and some humoral factors whose expression is limited to specific layers of the articular cartilage. In vivo analysis of the morphology of articular cartilage of genetically modified mice was performed by histology and micro-CT, and our results show that Rho modifiers are actually involved in formation of the articular cartilage matrix.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：Rhoタンパク 関節軟骨

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は階層構造を持ち、関節腔側から最表層(superficial zone, SFZ)、中間層、深層、石灰化層に区分される。機能的には、SFZはProteoglycan4(Prg4)を分泌し潤滑に関わる一方、SFZより深い中間層や深層ではAggrecanや2型コラーゲン等の軟骨基質タンパクが多く産生され衝撃吸収に関わる。関節軟骨が正しい階層構造を持つ事は臨床的に重要な意味をもつが、その分化・維持の分子メカニズムについては殆ど知られていなかった。

### 2. 研究の目的

(1) Rhoファミリーは低分子GTP結合タンパクで、代表的なサブタイプとしてRhoA、Rac1、Cdc42がある。Rhoは無刺激の状態では不活性型のGDP結合型として存在するが、メカニカルストレスやサイトカイン等の細胞外からの刺激によってGDP-GTP交換反応が生じGTP結合型になり、Effectorを活性化することで生理機能を発揮する。Rhoはサブタイプ毎に異なるEffectorを活性化するので、サブタイプ

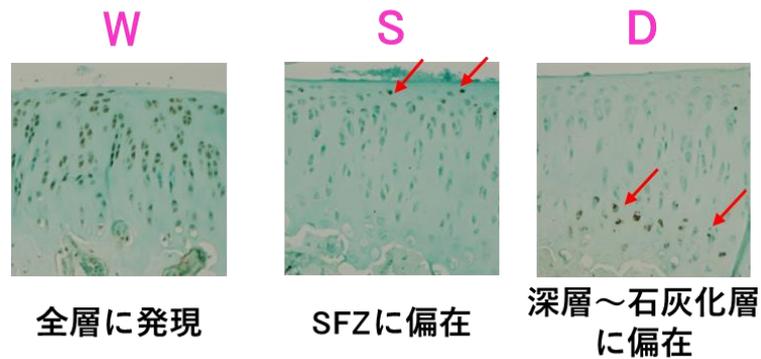


図1 マウス膝関節におけるRho修飾因子の発現(IHC)

特異的な下流シグナルが生じる。軟骨細胞での機能としては、RhoAは肥大分化を抑制する事が知られ、Rac1はMMP活性を亢進し軟骨変性を促進する事が知られ、また、Cdc42は関節軟骨の肥大分化・アポトーシスに関与する事が判明している(引用文献①, ②)。この様に、Rhoは関節軟骨の分化・維持の主要な調節因子の一つとして機能している。

(2) 本研究で対象としたのは、このRhoの機能を修飾する分子ファミリーである。我々は以前の研究で、成熟した硬組織の微小領域からlaser microdissection(LMD)によりRNAを回収し増幅、RNA-seqにより網羅的遺伝子発現解析を行う一連の手法を独自に開発し、関節軟骨の層毎の遺伝子発現の特徴を解析した(引用文献③)。この研究の結果、本研究で対象とする分子ファミリーの3つのサブタイプが、関節軟骨でそれぞれ異なった階層特異性を持って発現している事を発見した。具体的には、関節軟骨全層に発現するサブタイプ(以下Wとする)、表層のSFZに偏在するサブタイプ(以下Sとする)、逆に深層~石灰化層に偏在するサブタイプ(以下Dとする)があった(図1、未発表)。

(3) さらに、in vitroでの実験により、SはPrg4産生を誘導し、WはPrg4産生・軟骨基質産生の双方を誘導し、Dは軟骨基質産生を誘導し、かつ石灰化を促進する事を見出した(未発表)。この結果から、Rho修飾因子の3つのサブタイプは、その発現する階層にとって適切な基質形成を誘導すると推定される。以上に記した今までの研究成果から、以下の仮説に至った。即ち、『今回研究対象とするRho修飾因子の3つのサブタイプが関節軟骨で層特異的に発現し、各層に特異的な基質形成を誘導する事で、関節軟骨の階層構造が形成される』。この仮説の妥当性を検討し、関節軟骨の発生・維持についての知見を深め、それによって関節軟骨の再生医療や変性治療に有用な知見を得る事を目的として、本研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) In vitro 解析

哺乳4-6日齢の野生型マウスの膝関節から関節軟骨細胞を採取した(引用文献⑥)。

液性因子のsiRNAをリポフェクションにより投与し、培養後にRNAを抽出した。

Wnt経路を修飾する薬剤(SKI2001, JW74, PNU74656)やRhoタンパクの阻害剤を投与し、培養後にRNAを抽出した。

各サブタイプのRhoの変異型(恒常活性型、ドミナントネガティブ、タンパク結合部位に変異を加えたもの)を発現するレンチウイルスを作製した。これを投与し、培養後にRNAを抽出した。RNAを逆転写してcDNAとし、real-time RT-PCRにより、遺伝子発現の変動を解析した。

#### (2) 組織学的解析

野生型及びRho修飾因子のノックアウトマウスの膝関節を採取した。EDTAによる脱灰を行った後、パラフィン切片を作製し、組織染色を行い解析した。

#### (3) micro-CTを用いた解析

野生型及びRho修飾因子のノックアウトマウスの脛骨を採取した。可及的にトリミングした後microCTを撮像し、画像解析によって軟骨下骨の厚さを計測した。

### 4. 研究成果

#### (1) In vitro 解析

① 階層特異的に発現する液性因子による Rho 修飾因子発現の調節の解析

我々は以前の研究で、関節軟骨内で階層特異的に発現している液性因子を多数同定している(引用文献③)。これらの因子が、本研究で対象としている Rho 修飾因子の発現に与える影響を解析した。Grem1 と sFRP (Frzb) は共に、関節軟骨内の深い層に偏在している事が判明している(引用文献③)。これらを siRNA を用いてノックダウンした際の、Rho 修飾因子の発現変動を real-time RT-PCR (qPCR) によって解析した(図2)。その結果、これらのノックダウンにより、表層寄りのサブタイプである S の発現が有意に増加し、また、深層寄りのサブタイプである D の発現が有意に低下した。以上より、関節軟骨の深い層で発現し、関節軟骨内で濃度勾配を形成すると考えられる Grem1 や sFRP が、Rho 修飾因子の階層特異的な発現に寄与している可能性が示唆された。

② Wnt/ $\beta$ -catenin 経路による Rho 修飾因子発現の調節の解析

①で Rho 修飾因子の発現調節に関与していると示された Grem1, sFRP は共に Wnt/ $\beta$ -catenin 経路に関与している事、及び、先行研究で Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が SFZ 形成に関与していると示されている事から、Rho 修飾因子発現調節に対する Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の関与の解析を行った(引用文献④、⑤)。

Wnt Activator である SKL2001 の投与では S・D 共に発現が有意に亢進し、Wnt inhibitor で

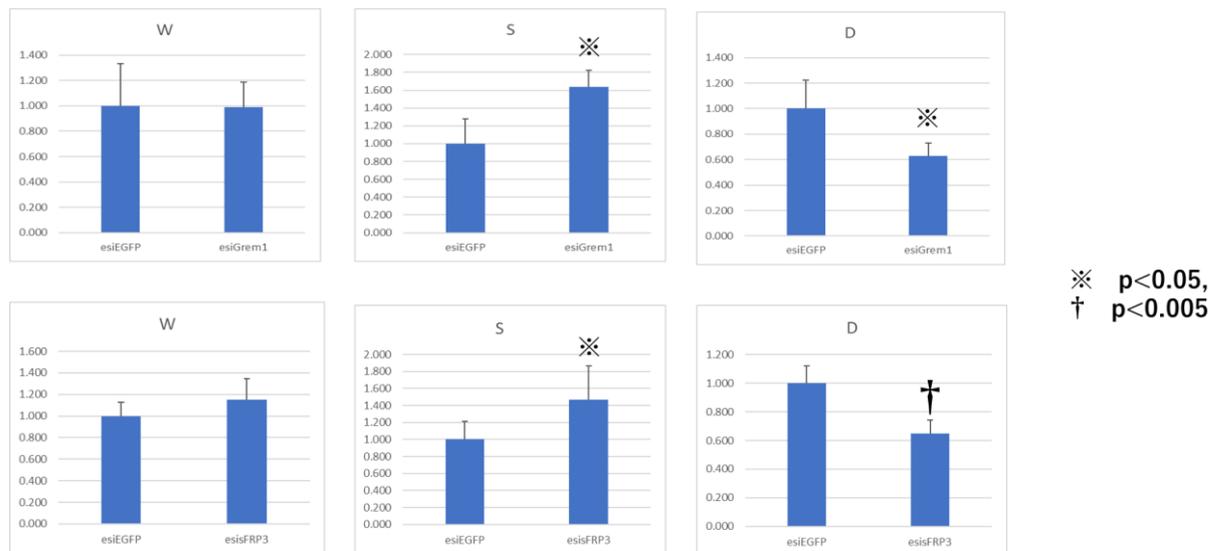


図2 液性因子による Rho 修飾因子発現の調節 (qPCR)

ある JW74 や PNU74654 の投与では、S・D 共に発現が有意に低下した(図3)。この事から、最表層に発現する S と深い層に発現する D は共に、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路によって発現誘導されていると示唆された。

Grem1 や sFRP と Wnt/ $\beta$ -catenin 経路との関わりの詳細については、本研究では明確な結論が出なかった。また、関節軟骨に広範に発現する W については、これら液性因子や Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の関与を明確に示すデータが得られなかったため、また別の経路での発現誘導がなされている可能性がある。Rho 修飾因子の発現誘導に関するこれらの未解明の課題は、今後の研究によって明らかにしていきたい。

③ Rho 修飾因子の基質形成作用を仲介する Rho タンパクの同定

本研究で対象とする Rho 修飾因子が、どの Rho を介して基質形成作用を発揮しているかを、Rho 阻害剤や Rho タ

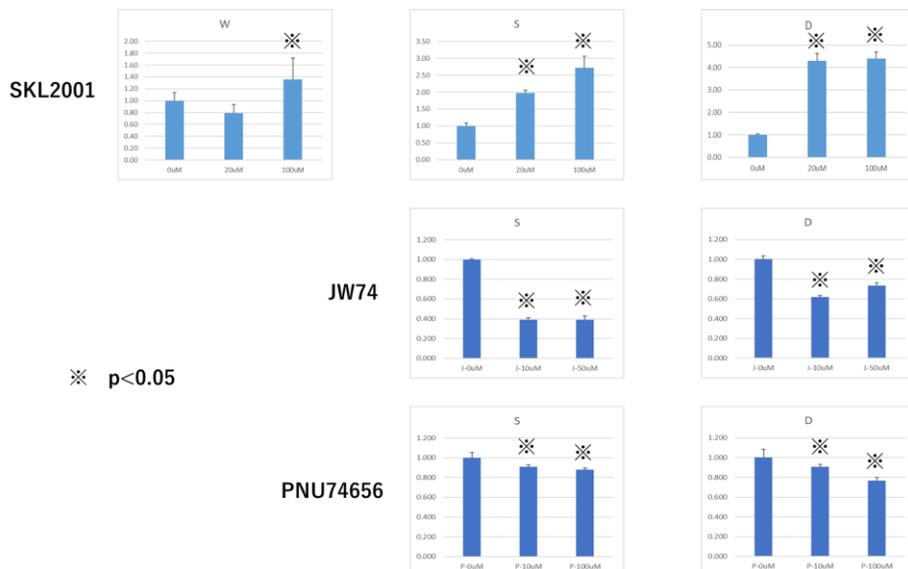


図3 Wnt/ $\beta$ -catenin 経路による Rho 修飾因子発現の調節 (qPCR)

ンパク変異体を用いて解析した。real-time RT-PCRにより、Wの作用はRhoAを介している可能性が示唆された。また、Dの作用については、RhoBやRhoGの関与を示唆する結果が得られている。今後の研究では、実験手法の改良を進め、より明確かつ網羅的に、それぞれのRho修飾因子の作用を仲介するRhoサブタイプを見出していきたい。

(2) Knockoutマウスを用いたin vivo解析

①generalなdevelopmentのスクリーニング

Wは、Col2a1-Creマウス、及びPrx1-Creマウスとの交配によって得たconditional knockoutマウスを作出し、また、SとDは、既に自らCRISPR-Cas9 systemによって作出していたglobal knockoutマウスを用いて解析した。いずれのマウスも、胎生期や発生早期での致死等は無く、概ね関節軟骨が成熟する12週齢まで生存していた。しかし、Sのknockoutマウスについては、雌で、発生後6週及び8週で野生型に比して有意に体重が減少していた(雄については現在解析中)。WやDのknockoutマウスについては、現在解析を進めている段階である。

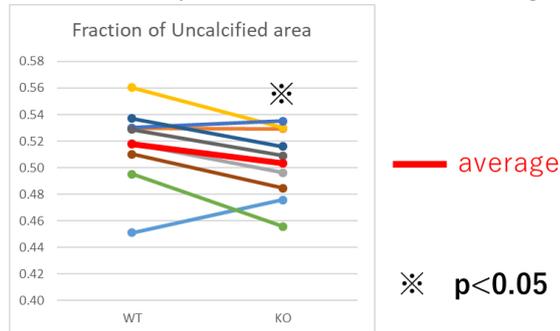


図4 S knockoutマウスの関節軟骨の厚さの解析

②組織学的解析

関節軟骨のパラフィン切片に対してHE染色を行い解析した。Sのknockoutマウスの8週齢の雌を用いた解析では、関節軟骨の、全層に対するtidemarkより上の浅い部分の割合が有意に低下しているという結果を得られている(図4)。これは、Sが関節軟骨の浅い層の基質形成を制御する、という仮説を支持する結果である。今後はSのより関節軟骨の成熟した12週齢での解析を進める。また、WやDのknockoutマウスについても、同様の解析を進めていく。

③micro-CTを用いた解析

深層から石灰化層に偏在するDは、以前のin vitro研究で関節軟骨細胞の石灰化を制御していると推定されていた。従って、Dのknockoutマウスでは、軟骨下骨の形成に異常が生じるという作業仮説を設定し、micro-CTを用いた解析によってこれを検証した。その結果、膝関節近位脛骨の内側・外側・内外側両側いずれでも、Dのknockoutマウスでは軟骨下骨の厚さが野生型に比して有意に減少していた(図5)。これにより、Dが関節軟骨の深い層での石灰化を制御しているという仮説が裏付けられた。

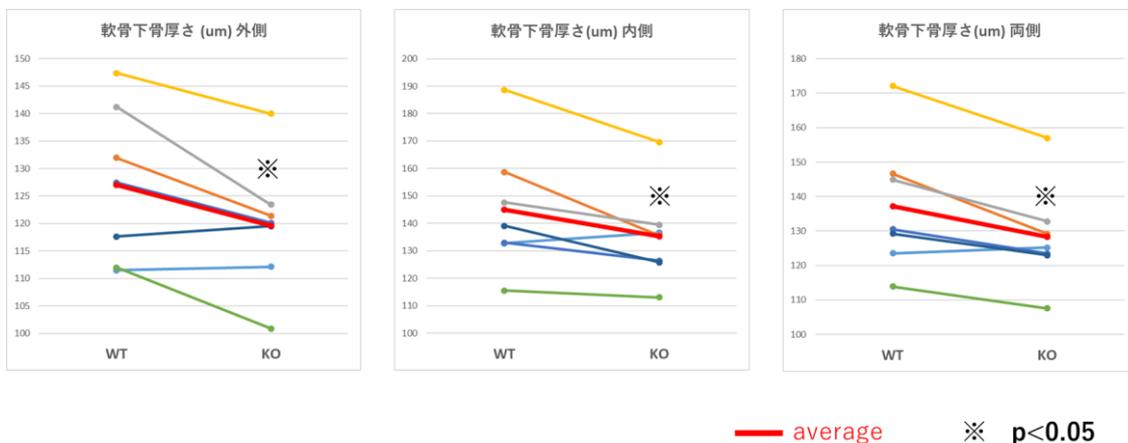


図5 D knockoutマウス脛骨近位関節軟骨下骨の厚さの解析 (micro-CT)

<引用文献>

- ① Zhu S, Liu H, Wu Y, Heng BC, Chen P, Liu H, Ouyang HW. Wnt and Rho GTPase signaling in osteoarthritis development and intervention: implications for diagnosis and therapy. *Arthritis Res Ther.* 2013 Jul 11;15(4):217. doi: 10.1186/ar4240.
- ② Suzuki W, Yamada A, Aizawa R, Suzuki D, Kassai H, Harada T, Nakayama M, Nagahama R, Maki K, Takeda S, Yamamoto M, Aiba A, Baba K, Kamijo R. Cdc42 is critical for cartilage development during endochondral ossification. *Endocrinology.* 2015 Jan; 156(1):314-22. doi: 10.1210/en.2014-1032.
- ③ 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.* 2014;35(4):263-70.
- ④ Yasuhara R, Ohta Y, Yuasa T, Kondo N, Hoang T, Addya S, Fortina P, Pacifici M, Iwamoto

M, Enomoto-Iwamoto M. Roles of  $\beta$ -catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells. Lab Invest. 2011 Dec;91(12):1739-52. doi: 10.1038/labinvest.2011.144.

- ⑤ Yuasa T, Otani T, Koike T, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Wnt/beta-catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. Lab Invest. 2008 Mar;88(3):264-74. doi: 10.1038/labinvest.3700747.
- ⑥ Gosset M, Berenbaum F, Thirion S, Jacques C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. Nat Protoc. 2008;3(8):1253-60. doi:10.1038/nprot.2008.95.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名: ,

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 齋藤 琢

ローマ字氏名: Saito Taku

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。