

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390407

研究課題名（和文） 力学的負荷による関節軟骨変性の分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of cartilage degeneration by mechanical stress

研究代表者

星 和人（HOSHI KAZUTO）

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号 30344451

研究成果の概要：

メカニカルストレスは変形性関節症をはじめ、骨粗鬆症、骨折治癒など、整形外科における多くの病態で中心的な役割を果たす重要な因子と考えられている。しかし、その分子メカニズムについては殆ど解明されていない。本研究では、メカニカルストレスによる関節軟骨変性の分子機構を解明することを目的とし、軟骨において肥大分化促進因子として働く Runx2 (Runt related transcription factor 2) シグナルや軟骨初期分化に必須の Sox9 (SRY box containing gene 9) シグナルなどに着眼し、各種遺伝子欠損マウスにおける膝関節不安定性モデル(メカニカルストレス過剰負荷モデル)実験モデルの解析を行い、関節軟骨変性に関連する分子シグナルの詳細を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2007年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：関節軟骨、力学的負荷、軟骨細胞、遺伝子改変マウス、Runx2、Sox9

## 1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は、骨格に可動性を与える重要な組織である。血管・リンパ管・神経組織等を欠き、荷重負荷によって引き起こされる関節液の浸透や拡散を介して、栄養や情報伝達が行われている。これまでの国内外の研究では、ラットの成長板や椎間板および初代軟骨細胞において、微小重力環境が軟骨の初期分化マーカー発現とプロテオグリカン合成を抑制することが報告されている (*Adv Space Res*

24:821,1999、*Gravit Space Biol Bull* 12:57,1999、*Bone* 27:535,2000、*Spine* 27:1286,2002)。また、長期間のギブス固定や免荷により関節への力学的負荷(メカニカルストレス)が減弱すると、関節軟骨細胞は脱分化して変性萎縮する (*Osteoarthritis Cartilage* 10:408,2002)。一方、関節に過剰なメカニカルストレスがかかると不可逆性の関節軟骨変性破壊が起こり、最終的に変形性関節症の病像を呈するが、この過程で関節軟

骨細胞は肥大化する (*Arthritis Rheum* 35:806, 1992, *Arthritis Rheum* 41:1287, 1998, *J Orthop Res* 17:495, 1999)。これらのことから、関節軟骨の恒常性維持には軟骨細胞の分化制御が深く関与していることが示唆される。

このように、メカニカルストレスは変形性関節症をはじめ、骨粗鬆症、骨折治癒など、整形外科における多くの病態で中心的な役割を果たす重要な因子と考えられている。しかし、その分子メカニズムについては殆ど解明されていない。

## 2. 研究の目的

我々は関節に過剰なメカニカルストレスを負荷するモデルとして、マウスの膝関節不安定性モデル (メカニカルストレス過剰負荷モデル) を独自に開発した (*Osteoarthritis Cartilage* 13:632, 2005)。このモデルを活用すれば変形性関節症を引き起こす分子機構が明らかになる可能性がある。本研究の目的は、軟骨において肥大分化促進因子として働く Runx2 (Runt related transcription factor 2) シグナルや軟骨初期分化に必須の Sox9 (SRY box containing gene 9) シグナルに着目し、上記の実験モデルなどを活用し、メカニカルストレスによる関節軟骨変性の分子機構を解明することである。

## 3. 研究の方法

我々は、

- ・生理的メカニカルストレス環境下の関節軟骨では、肥大分化は抑制され、関節軟骨の恒常性が維持される。
- ・過剰なメカニカルストレスが関節軟骨に負荷されると、軟骨細胞の肥大分化が進んで基質分解が亢進する。

などといった仮説を考え、以下の5点について検討した。

- (1) メカニカルストレス負荷モデルにおける関節軟骨変性と分子シグナルの検討
- (2) Runx2 遺伝子改変マウスなどを用いた関節軟骨変性の検討
- (3) メカニカルストレスで誘導される Runx2 あるいは Sox9 の上流シグナル分子の同定
- (4) メカニカルストレスで誘導される Runx2 あるいは Sox9 の下流シグナル分子の同定
- (5) 関節軟骨変性関連分子の検討

## 4. 研究成果

(1) メカニカルストレス負荷モデルにおける関節軟骨変性と分子シグナルの検討

野生型マウスにおいて、膝関節不安定性モデル (メカニカルストレス過剰負荷モデル) を作製し、形態学的ならびに生化学的に解析した。その結果、変形性関節症初期においては、関節軟骨において X 型コラーゲンや Runx2 の発現が見られ軟骨細胞の肥大化が観察され

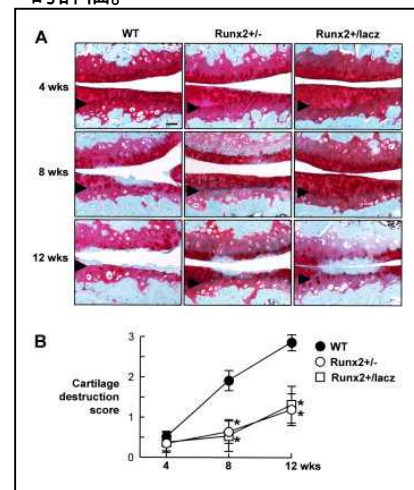
るとともに、それに後続して MMP-13 などの発現が確認された。したがって、関節軟骨ではメカニカルストレスに敏感に反応し、X 型コラーゲン、Runx2、MMP-13 などの肥大分化マーカーが発現上昇することが実証された。

(2) Runx2 遺伝子改変マウスなどを用いた関節軟骨変性の検討

関節軟骨細胞の肥大化に関わる Runx2 のヘテロ遺伝子欠損マウスにおいて膝関節不安定性モデル (メカニカルストレス過剰負荷モデル) を作製し、組織所見や X 線所見を野生型と比較した。その結果、Runx2

ヘテロ遺伝子欠損マウスにおいては野生型に比べ、関節軟骨破壊や骨棘形成などの変形性関節症様変化が抑制されており、Runx2 などの発現減少が確認された

図1 Runx2 ヘテロ遺伝子欠損マウスにおける膝関節不安定性モデル。A 組織像、B 経時的評価。



(Kamekura, Hoshi, Kawaguchi et al 2006 *Arthritis Rheum*) (図1)。したがって、Runx2 は、関節軟骨細胞の肥大化を通じ、変形性関節症の発症機構の一翼を担うことが示唆された。

(3) メカニカルストレスで誘導される Runx2 あるいは Sox9 の上流シグナル分子の同定

メカニカルストレス過剰負荷刺激にตอบสนองし、変形性関節症の発症機構の一翼を担うと予想される Runx2 において、発現調節を行う分子の同定を行った。既に塩基配列が決定している Runx2 のプロモーター領域について、長さの異なるプロモーター断片とルシフェラーゼ遺伝子を組み合わせるレポーター遺伝子を作成し、これを軟骨細胞株 ATDC5 細胞へ stable transfection してクローンを単離した。この細胞に細胞伸張システム (Flexcell II 社製) による伸張刺激を加え、メカニカルストレスにより誘導される活性を維持するための最小単位までの絞り込みを行った。更に数塩基ごとに変異を入れた変異体を作成し転写因子が直接結合するシスエレメントを同定した。得ら

れたシスエレメントに対して実際に配列特異的に結合する転写因子が存在することを、インスリン刺激により分化を促した ATDC5 の核抽出物との electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を用いて証明した。

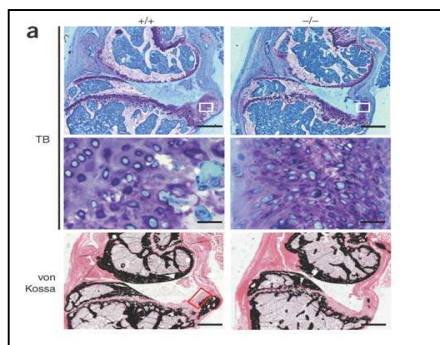
(4) メカニカルストレスで誘導される Runx2 あるいは Sox9 の下流シグナル分子の同定

Sox9 の下流シグナルについては、ヒト間葉系幹細胞に Sox9 および Sox5/6 を共発現させる系を用いた DNA マイクロアレイ解析で、603 遺伝子を同定した。その中で特に高値を示した S100A1 ならびに S100B について着眼した。未分化軟骨細胞株 ATDC5 において retrovirus を用いて S100A1、S100B を強制発現させると軟骨細胞肥大分化や石灰化が抑制させ、逆に siRNA で抑制すると肥大分化・石灰化が促進された。このように、Sox9 下流シグナルとして S100A1 ならびに S100B を同定し、関節軟骨の再生・維持や変形性関節症の治療など幅広い応用の可能性を示唆した。

(5) 関節軟骨変性関連分子の検討

我々は、軟骨の肥大化・石灰化に関する因子として Carminerin を同定した。さらにこの分子は、関節軟骨変性にも関与することが予想されたため、同分子の遺伝子欠損マウスを作製し、生理的条件下における表現型、ならびにメカニカルストレス過剰負荷モデルにおける表現型を解析した。生理的条件下のホモ型遺伝子欠損マウスは、骨格の発生も成長もほぼ正常で、詳細な画像・組織学的解析では、長幹骨成長板下端の石灰化抑制と成長板直下の一次海綿骨量の減少が観察された。この遺伝子欠損マウスに、マウスの膝関節不安定性モデル(メカニカルストレス過剰負荷モデル)を作製すると、骨棘形成などの変形性関節症性変化が明らかに抑制されていることがわかった(Yamada, Hoshi, Kawaguchi et al 2006 Nature Med)(図2)。このように、生理的な骨化には大きな影響を与えず、変形性関節症性変化に選択的に関与している Carminerin は、変形性関節症の発症に関与し、画期的な治療標的になりうる可能性が示唆された。

図2 Carminerin 遺伝子欠損マウスにおける膝関節不安定性モデル。



## 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28件)

1. Komura M, Komura H, Kanamori Y, Tanaka Y, Suzuki K, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Hatanaka A, Hoshi K, Ikada Y, Tabata Y, Iwanaka T 2008 An animal model study for tissue engineered trachea fabricated from a biodegradable scaffold using chondrocytes to augment repair of tracheal stenosis. J Pediatr Surg 43(12):2141-6 (査読有)
2. Asawa Y, Ogasawara T, Takahashi T, Yamaoka H, Nishizawa S, Matsudaira K, Mori Y, Takato T, Hoshi K 2008 Aptitude of auricular and nasoseptal chondrocytes cultured under a monolayer or three dimensional condition for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part A. (査読有)
3. Tanaka Y, Ogasawara T, Asawa Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Mori Y, Takato T, Hoshi K 2008 Growth factor contents of autologous human sera prepared by different production methods and their biological effects on chondrocytes. Cell Biol Int 32(5):505-14 (査読有)
4. Komura M, Komura H, Tanaka Y, Kanamori Y, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Suzuki K, Hoshi K, Iwanaka T 2008 Human tracheal chondrocytes as a cell source for augmenting stenotic tracheal segments: the first feasibility study in an in vivo culture system. Pediatr Surg Int 24(10):1117-21 (査読有)
5. Shinoda Y, Ogata N, Higashikawa A, Manabe I, Shindo T, Yamada T, Kugimiya F, Ikeda T, Kawamura N, Kawasaki Y, Tsushima K, Takeda N, Nagai R, Hoshi K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H 2008 Kruppel-like factor 5 causes cartilage degradation through transactivation of matrix metalloproteinase 9. J Biol Chem 283(36):24682-9 (査読有)
6. Kawasaki Y, Kugimiya F, Chikuda H,

- Kamekura S, Ikeda T, Kawamura N, Saito T, Shinoda Y, Higashikawa A, Yano F, Ogasawara T, Ogata N, Hoshi K, Hofmann F, Woodgett JR, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H 2008 Phosphorylation of GSK-3 $\beta$  by cGMP-dependent protein kinase II promotes hypertrophic differentiation of murine chondrocytes. *J Clin Invest* 118(7):2506-15 (査読有)
7. Fujihara Y, Asawa Y, Takato T, Hoshi K 2008 Tissue reactions to engineered cartilage based on poly-L-lactic acid scaffolds. *Tissue Eng Part A*. (査読有)
  8. Kawamura N, Kugimiya F, Oshima Y, Ohba S, Ikeda T, Saito T, Shinoda Y, Kawasaki Y, Ogata N, Hoshi K, Akiyama T, Chen WS, Hay N, Tobe K, Kadowaki T, Azuma Y, Tanaka S, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H 2007 Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling. *PLoS ONE* 2(10):e1058 (査読有)
  9. Kono SJ, Oshima Y, Hoshi K, Bonewald LF, Oda H, Nakamura K, Kawaguchi H, Tanaka S 2007 Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. *Bone* 40(1):68-74 (査読有)
  10. Hosoya A, Nakamura H, Ninomiya T, Hoshi K, Yoshida K, Yoshida N, Takahashi M, Okabe T, Sahara N, Yamada H, Kasahara E, Ozawa H 2007 Hard tissue formation in subcutaneously transplanted rat dental pulp. *J Dent Res* 86(5):469-74 (査読有)
  11. Liu G, Kawaguchi H, Ogasawara T, Asawa Y, Kishimoto J, Takahashi T, Chung UI, Yamaoka H, Asato H, Nakamura K, Takato T, Hoshi K 2007 Optimal combination of soluble factors for tissue engineering of permanent cartilage from cultured human chondrocytes. *J Biol Chem* 282(28):20407-15 (査読有)
  12. Takahashi T, Ogasawara T, Asawa Y, Mori Y, Uchinuma E, Takato T, Hoshi K 2007 Three-dimensional microenvironments retain chondrocyte phenotypes during proliferation culture. *Tissue Eng* 13(7):1583-92 (査読有)
  13. Ogata N, Kawaguchi H, Chung UI, Roth SI, Segre GV 2007 Continuous activation of G $\alpha_q$  in osteoblasts results in osteopenia through impaired osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 282(49):35757-64 (査読有)
  14. Katagiri M, Ogasawara T, Hoshi K, Chikazu D, Kimoto A, Noguchi M, Sasamata M, Harada S, Akama H, Tazaki H, Chung UI, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H 2006 Suppression of adjuvant-induced arthritic bone destruction by cyclooxygenase-2 selective agents with and without inhibitory potency against carbonic anhydrase II. *J Bone Miner Res* 21: 219-27 (査読有)
  15. Kugimiya F, Ohba S, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI 2006 Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis. *J Bone Miner Metab* 24: 95-9 (査読有)
  16. Yoshimura N, Kinoshita H, Hori N, Nishioka T, Ryujin M, Mantani Y, Miyake M, Takeshita T, Ichinose M, Yoshida M, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Cooper C 2006 Risk factors for knee osteoarthritis in Japanese men: a case-control study. *Mod Rheumatol* 16: 24-9 (査読有)
  17. Seichi A, Takeshita K, Kawaguchi H, Matsudaira K, Higashikawa A, Ogata N, Nakamura K 2006 Neurological level diagnosis of cervical stenotic myelopathy. *Spine* 31: 1338-43 (査読有)
  18. Sakanishi H, Hoshi K, Nakajima S, Akune T, Takeshita K, Yamamoto M, Kawaguchi H, Nakamura K, Seichi A 2006 Vertebral hemangioma compressing the thoracic spinal cord: application of computer-aided navigation and intraoperative spinal sonography for surgery through anterior and posterior approaches. *J Orthop Sci* 11: 294-7 (査読有)
  19. Yamada T, Kawano H, Koshizuka Y, Fukuda T, Yoshimura K, Kamekura S,

- Saito T, Ikeda T, Kawasaki Y, Azuma Y, Ikegawa S, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Kato S, Kawaguchi H 2006 Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification. *Nature Med* 12: 665-670
20. Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, Koshima I, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K 2006 Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res A* 78: 1-11 (査読有)
21. Horikoshi T, Maeda K, Kawaguchi Y, Chiba K, Mori K, Koshizuka Y, Hirabayashi S, Sugimori K, Matsumoto M, Kawaguchi H, Takahashi M, Inoue H, Kimura T, Matsusue Y, Inoue I, Baba H, Nakamura K, Ikegawa S 2006 A large-scale genetic association study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Hum Genet* 119: 611-6 (査読有)
22. Oka H, Yoshimura N, Kinoshita H, Saiga A, Kawaguchi H, Nakamura K 2006 Decreased activities of daily living and associations with bone loss among aged residents in a rural Japanese community: the Miyama Study. *J Bone Miner Metab* 24: 307-13 (査読有)
23. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H 2006 Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Runx2* contributes to pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum* 54: 2462-70 (査読有)
24. Yoshimura N, Kinoshita H, Oka H, Muraki S, Mabuchi A, Kawaguchi H, Nakamura K 2006 Cumulative incidence and changes in prevalence of vertebral fractures in a rural Japanese community: A 10-year follow-up of the Miyama cohort. *Arch Osteoporosis* (online publication @ DOI 10.1007/s11657-006-0007-0) (査読有)
25. Shinoda Y, Yamaguchi M, Ogata N, Akune T, Kubota N, Yamauchi T, Terauchi Y, Kadowaki T, Takeuchi Y, Fukumoto S, Ikeda T, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H 2006 Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J Cell Biochem* 99: 196-208 (査読有)
26. Koshizuka Y, Ogata N, Shiraki M, Hosoi T, Seichi A, Takeshita K, Nakamura K, Kawaguchi H 2006 Distinct association of gene polymorphisms of estrogen receptor and vitamin D receptor with lumbar spondylosis in postmenopausal women. *Eur Spine J* 15: 1521-1528, 2006.
27. Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Nakamura K, and Kawaguchi H: Grafting of biocompatible polymer for longevity of artificial hip joints. *Clin Orthop Rel Res* 453: 58-63 (査読有)
28. Igawa K, Mochizuki M, Sugimori O, Shimizu K, Yamazawa Y, Kawaguchi H, Nakamura K, Takato T, Nishimura R, Suzuki S, Anzai M, Chung UI, Sasaki N 2006 Tailor-made tricalcium phosphate bone implant directly fabricated by a three-dimensional ink-jet printer. *J Artif Organs* 9: 234-40 (査読有)
- [学会発表](計8件)
1. 星和人、川口 浩、鄭 雄一、高戸 毅、中村耕三、関節軟骨再生の現状と展望：シンポジウム3 骨関節老化の基礎と臨床：第9回日本骨粗鬆症学会：東京都新宿区：2007・11・14
2. 川口 浩、阿久根徹、緒方直史、星和人、篠田裕介、河村直洋、山口雅之、鄭雄一、門脇孝、中村耕三、糖代謝・脂質代謝調節分子による骨代謝制御：マウスジェネティクスからのアプローチ：シンポジウム6 骨粗鬆症と骨関節疾患の遺伝学：第9回日本骨粗鬆症学会：東京都新宿区：2007・11・16
3. 川口 浩、河村 直洋、緒方 直史、阿久根 徹、山口 雅之、星 和人、門脇 孝、中村 耕三、糖代謝と骨代謝に関連するAktシグナル：生活習慣と骨代謝：第



- 25 回日本骨代謝学会学術集会：大阪府  
大阪市：2007・7・19
4. **星 和人**、中村 耕三、**川口 浩**、永久  
軟骨を再生させるための軟骨細胞増  
殖・基質産生培養法の開発とその作用機  
序：ワークショップ11 軟骨の変性と  
再生機序：第 51 回日本リウマチ学会総  
会・学術集会：神奈川県横浜市：2007・4・  
26
  5. **川口 浩**、阿久根 徹、**緒方 直史**、**星  
和人**、篠田 裕介、河村 直洋、山口 雅  
之、鄭 雄一、門脇 孝、中村 耕三、  
糖代謝、脂質代謝調節分子による骨代謝  
制御：第 24 回日本骨代謝学会学術集会：  
東京都江東区：2006・7・6 - 8
  6. **Hoshi K**, Liu G, Ogasawara T, Asawa Y,  
Takahashi T, Yamaoka U, Chung UI,  
Takato T, Nakamura K, **Kawaguchi H**,  
Optimal Combination of Soluble  
Factors for Tissue Engineering of  
Permanent Cartilage with High Quality  
and Quantity from Autologous Human  
Chondrocytes : ASBMR 28<sup>th</sup> Annual  
Meeting : Philadelphia, Pennsylvania,  
USA : 2006・9・15 -19
  7. **星 和人**、鄭 雄一、中村 耕三、**川口  
浩**、永久軟骨を再生させるための軟骨細胞  
再分化誘導法の検討と作用機序の解  
明：第 21 回 日本整形外科学会基礎学  
術集会：長崎県長崎市：2006・10・19 -  
20
  8. **星 和人**、劉 光耀、小笠原 徹、浅輪  
幸世、高橋嗣明、鄭 雄一、高戸 毅、  
中村 耕三、**川口 浩**、自家軟骨細胞か  
ら大量永久軟骨再生のための最適シグ  
ナル条件の系統的・網羅的検索：第 24  
回日本骨代謝学会学術集会：東京都江東  
区：2006・7・6 - 8
- 〔図書〕(計 4 件)
1. 症候 6 四肢の症候 小項目 6 「背部  
痛」 **星 和人** **原 慶宏** 森井太郎  
松平 浩 2008 pp1491 -1492 永井  
良三(編) 看護に役立つ疾患・症候事  
典 メジカルフレンド 東京
  2. 第 1 章 移植細胞の生物医学 1) 「成  
熟細胞 軟骨細胞」 **星 和人** 高戸  
毅 2008 pp32 -37 田畑 泰彦(編) 進  
みつづける細胞移植治療の実際 メディ  
カルドゥ 大阪
3. Experimental Murine Model of  
Ossification of Spinal Ligaments  
Induced by Bone Morphogenetic  
Protein-2 **Hoshi K** 2006 pp93 -100  
Yonenobu K, Nakamura K, Toyama Y (eds)  
Ossification of the Posterior  
Longitudinal Ligament 2nd Edition,  
Springer, Tokyo
  4. 第 6 章「骨」 **星 和人** 2006 pp75 -87  
加藤隆史(編) バイオミネラリゼーシ  
ョンとそれに倣う新機能材料の創製  
シーエムシー出版 東京
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者  
2006 -2007 年  
星地 亜都司 (SEICHI ATSUSHI )  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：70236066  
2008 年  
星 和人(HOSHI KAZUTO)  
東京大学・医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号：30344451
- (2)研究分担者  
2006 年  
川口 浩 (KAWAGUCHI HIROSHI )  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：40282660
- 2006 -2007 年  
星 和人(HOSHI KAZUTO)  
東京大学・医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号：30344451
- 2006 -2008 年  
緒方 直史(OGATA NAOSHI)  
東京大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号：10361495
- 2006 -2008 年  
原 慶宏(HARA YOSHIHIRO)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：00422296
- 2006 -2007 年  
原 由紀則(HARA YUKINORI)  
東京大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：30396741
- (3)連携研究者  
特になし