

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：35308

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18540

研究課題名（和文）関節軟骨の階層構造の形成及び関節軟骨の維持におけるRho調節因子の機能の解析

研究課題名（英文）Analysis of Rho-modulator function in developing hierarchal structure and maintaining articular cartilage

研究代表者

森 芳史（Mori, Yoshifumi）

吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：60757954

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：関節軟骨で階層特異的に発現するRho調節因子であるW、S、Dの機能を解析した。Wの軟骨特異的KOマウスでは、表層から深層へ向かう細胞の配列が乱れ、通常は細胞体積の小さな表層部分で肥大化が顕著に生じ、さらに、細胞数が有意に減少していることを見出した。SのKOマウスでは、関節軟骨のうち、石灰化の有無による境界であるtidemarkよりも浅い層の割合が有意に増加していることを見出した。本研究以前の研究成果と併せ、これらの因子が関節軟骨の階層構造の形成に関与している可能性が強く示唆された。また、さらなる解析のために、関節軟骨の組織学的解析を自動的・非恣意的に行うAIモデルの開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節軟骨は均一な構造の組織ではなく、それぞれ特異的な機能を持った複数の階層から形成されている。変形性関節症や関節リウマチなどの関節疾患の病態解明や、機能的な関節軟骨の再生の実現のためには、この階層構造を形成・維持する機構の理解が欠かせないが、現在までに知られていることは少ないのが現状である。今回の研究によって、関節軟骨の階層構造の形成機構の一端が明らかになったことは、将来的な関節軟骨関連の医療の進歩の一助になると考えられる。また、本研究で関節軟骨の組織を解析するAIモデルの開発も行ったが、これは多くの研究に応用可能なものであり、科学・医療の発展に幅広く貢献するものであると考えている。

研究成果の概要（英文）：We investigated the function of Rho modulators: W, S, and D. In cartilage-specific knockout mice of W, we found disturbance in cell alignment from superficial to deeper cartilage layers. Significant decrease in cell numbers of articular cartilage and remarkable hypertrophic change in cells of superficial layers, where cells are usually small and flat was observed. In articular cartilage of knockout mice of S, the portion of area shallower than tidemark, which is the boundary to the calcified cartilage, was increased. Along with the findings of previous studies, our results strongly suggest that these factors might be involved in the hierarchical structure formation of articular cartilage. In addition, for use in further studies, we developed AI-based models to perform histological analysis of articular cartilage automatically and non-arbitrarily.

研究分野：関節軟骨

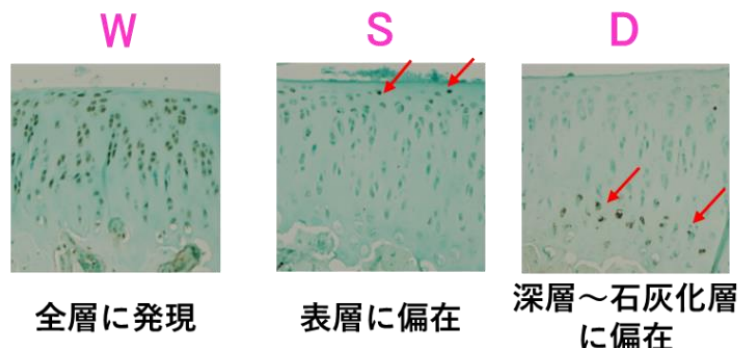
キーワード：関節軟骨 変形性関節症 Rho deep learning artificial intelligence

## 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り、中間層や深層ではAggrecanや2型コラーゲン等の軟骨基質が多く産生され衝撃吸収に関わる。更に、石灰化層では基質が石灰化することで、スムーズに軟骨下骨との接続がなされる。この様に各層が異なる基質組成を持つ事で、全体として適切な生理的機能を持つ関節軟骨が構成される。しかし、この階層構造の発生・維持のメカニズムは殆ど知られていなかった。

研究代表者は、以前の研究で関節軟骨において重要な役割を担うRhoタンパクの機能を修飾する3つの因子(W, S, および D とする)がそれぞれ関節軟骨で階層特異的に発現することを見出している。Wは全層に発現し、Sは表層に偏在し、Dは深層～石灰化層に偏在していた(図1)。Rhoシグナルの関節軟骨での重要性を示す先行研究と併せて、これらの因子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・維持されるのではないかと仮説に至った。その後のin vitro、およびin vivo両面の研究によって、上記仮説を支持するデータが得られてきていた。

図1 Rho調節因子の発現パターン



## 2. 研究の目的

1. に記した仮説に基づき、W, S, および D の、発生段階における関節軟骨の階層構造特異的な基質形成への関与、及び病的状態における関節軟骨維持への関与の2点について解析し、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ことを、本研究の目的とした。さらに、本研究の進展に伴い、関節軟骨の組織学的解析を客観的かつ非恣意的に行う技術が乏しいという問題に直面したため、これを解決すべく、deep learningの手法を用いて組織画像解析の技術開発も行った。

## 3. 研究の方法

### (1) KOマウスを用いたRho調節因子の関節軟骨形成への関与の解析

S, DについてはCRISPR-Cas9システムによるglobal knockout(KO)マウスを自ら作出済みであった。また、Wについては、他機関より供与されたfloxマウスがあり、これをCol2a1-Creマウスと交配させ、軟骨細胞特異的なKOマウスを作出済みであった。これらについて、発生の各段階で組織切片を採取し、関節軟骨の発生に異常がないかを検討した。

### (2) KOマウスを用いたRho調節因子の関節軟骨維持への関与の解析

KOマウスに対して外科的誘導変形性関節症(OA)モデル(引用文献①)を導入し、術後一定期間後にサンプルを採取し、各因子が関節軟骨の維持に関与している可能性を検討した。

### (3) 関節軟骨の組織病理学的解析を自動的・非恣意的に行う技術の開発

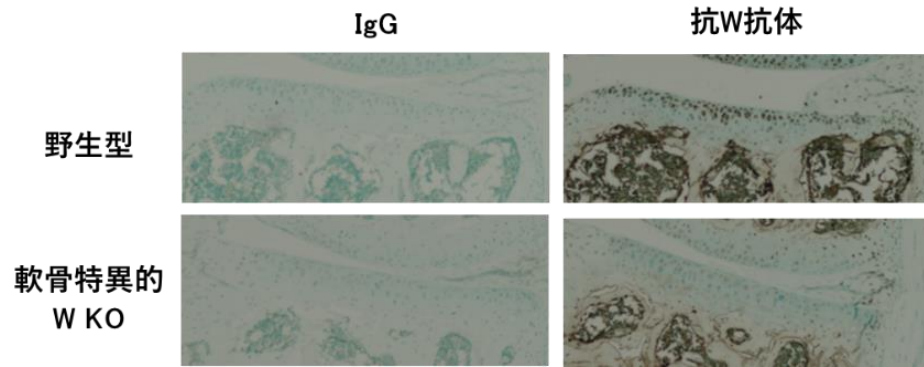
マウスの関節軟骨の組織切片の画像を収集した。これらに対して教師データの作成を行ったのち、training用:validation用=80:20の割合で分割した。コンピューターでの解析は、Google Colab ProまたはPro+を用いてクラウド上で行った。プログラムはPythonで記述し、機械学習用のライブラリとしてPyTorchを用いた。課題に対して適切なnetworkを選択したのち、本研究の課題に合わせて微修正した。これらに対してtraining用、validation用の画像・教師データを順次入力し、機械学習を行った。学習したモデルの評価には、ネットワークの出力と教師データとの間のIntersection over Union (IoU, 積集合/和集合の面積比)を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) Wのin vivo機能解析

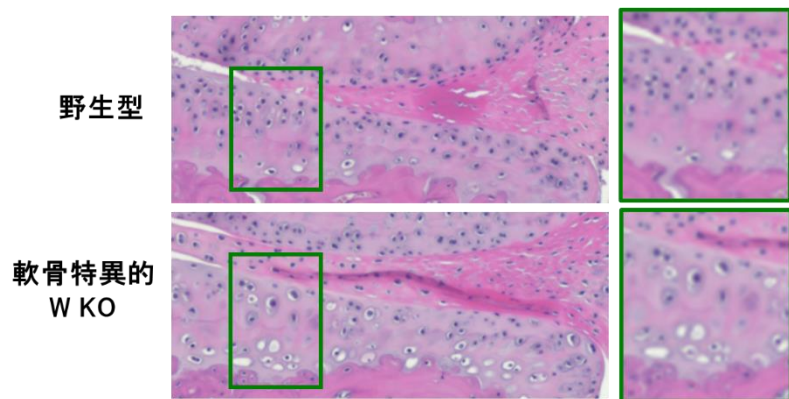
W の flox マウスと Col2a1-Cre マウスを交配させ、軟骨特異的 W KO マウスを作出した。まず、12 週齢の野生型 (flox/flox) 及び軟骨特異的 W KO マウスに対して、抗 W 抗体を用いた組織免疫染色を行った。その結果、期待通り軟骨特異的 W KO マウスの関節軟骨で、W が有意に発現抑制されていることが確認できた ( $p < 0.05$ , 図 2)。

図 2 W の軟骨特異的ノックアウトの確認



次いで、軟骨特異的 W KO マウスと野生型の 12 週齢の関節軟骨サンプルに対して、Hematoxylin-Eosin 染色した切片を用いて組織学的解析を行った。その結果、KO マウスでは、表層から深層へ向かう細胞の配列が乱れており、また、通常は細胞体積の小さな表層部分での肥大化が顕著に生じていることを見出した(図 3)。細胞数も KO マウスで有意に減少していた(図 4)。以上の結果から、このサブタイプが関節軟骨の階層構造の形成・維持に主要な役割を担っていることが強く示唆された。当初想定していた基質形成のみならず、関節軟骨細胞の形態や配列といったより根源的なレベルで階層構造形成へ関与していると考えられることから、とりわけWは関節軟骨の形成にとって極めて重要な因子であると考えられる。

図 3 軟骨特異的 W KO マウスの関節軟骨



その他、W の軟骨特異的 KO マウスでは、野生型に比して有意に低体重となっていた。このことは、関節軟骨の部分での長軸成長が阻害された結果である可能性もあるが、その他に、W が成長板の発生における機能にも関与している可能性も窺わせるが、この点については今後のさら

図 4 軟骨特異的 W KO マウスの関節軟骨の細胞密度

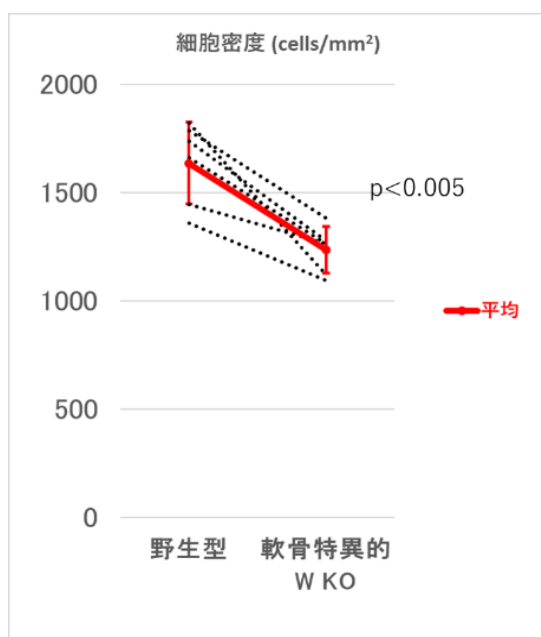
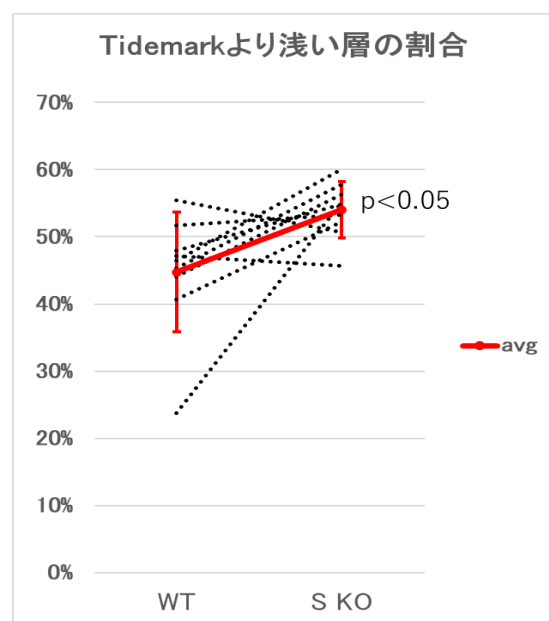


図 5 S KO マウスの関節軟骨の階層形成



なる検証が必要である。

### (2) S の in vivo 機能解析

最も表層に発現する S について、12 週齢で W と同様に関節軟骨の組織学的解析を行った。その結果、S の KO マウスでは、関節軟骨の石灰化部位を反映する tidemark より浅い層の比率が有意に増加していた(図 5)。このことは、S が KO されたことによって石灰化への分化過程が阻害された可能性を示唆する。しかし、8 週齢での解析ではこれと相反する結果も得られている。いずれにせよ、さらなる S の機能の解明のためには、より詳細な解析を行う必要がある。

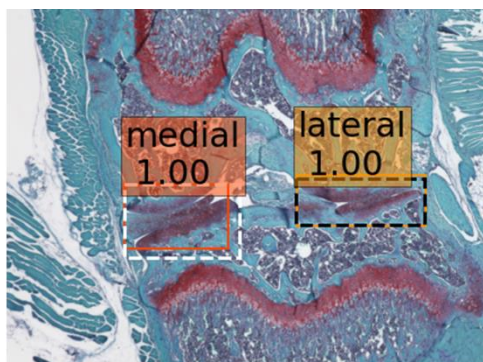
S の関節軟骨の維持に対する機能の評価のため、KO マウスに対して外科的誘導 OA モデルを導入した。これについては、現時点で野生型との有意な差は認められていない。今後、軟骨変性を別の方法で導入するなどにより、より多面的に機能解析を進めていく方針である。

### (3) 関節軟骨の組織病理学的解析を自動的・非恣意的に行う技術の開発

本研究以前から得られたデータ、および本研究で得られたデータから、W, S, および D すべての全身的・あるいは関節軟骨特異的 KO マウスには、関節軟骨の形成に異常がみられた。このことから、これらの 3 つの因子が関節軟骨形成において重要な役割を担っている可能性が強く示唆される。しかし、詳細なメカニズムはいまだ不明のまま、その解明のためにはさらに詳細・定量的な解析へと進む必要がある。しかし、関節軟骨の階層構造の乱れや軟骨細胞の形態や配列の乱れなどを組織切片から客観的・定量的に解析する有効な手法がなかった。この状況に対処するため、近年発展が著しい deep learning による画像解析技術を用いて関節軟骨の組織学的解析を行う手法の開発に着手した。現時点までに、マウス膝関節の組織学的切片から自動的に内外側コンパートメントを検出する手法を開発し、原著論文として発表している(図 6, 引用文献②)。さらに、マウスの dapi 染色した組織学的切片から、関節軟骨領域を自動的に高い精度で segmentation する手法を開発した。これは現在投稿中である(図 7)。

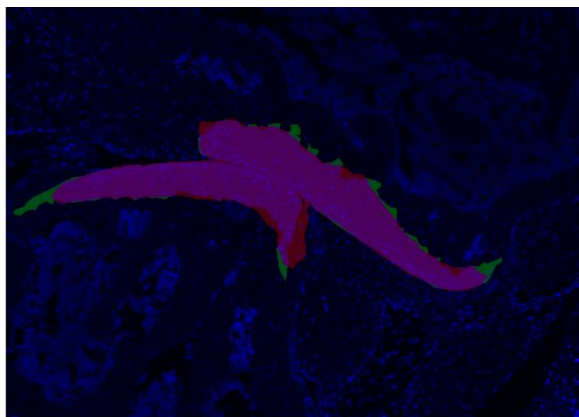
今後も AI 技術を用いた関節軟骨の定量的解析手法の開発を更に進め、その手法を用いて、Rho 調節因子のより詳細な機能解析を行っていく方針である。

図 6 開発した AI モデルによる膝関節内外側コンパートメントの検出



実線・・・モデルにより推論された内外側コンパートメントの領域  
破線・・・教師データにおける内外側コンパートメントの領域

図 7 開発した AI モデルによる dapi 染色切片からの関節軟骨領域の検出



赤・・・モデルにより推論された関節軟骨領域  
緑・・・教師データにおける関節軟骨領域

### <引用文献>

- ① Glasson SS, Blanchet TJ, Morris EA. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007. 15:1061-1069.
- ② Mori Y, Oichi T, Enomoto-Iwamoto M, Saito T. Automatic Detection of Medial and Lateral Compartments from Histological Sections of Mouse Knee Joints Using the Single-Shot Multibox Detector Algorithm. *Cartilage*. 2022. 13:19476035221074009.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 森 芳史	4. 巻 22
2. 論文標題 ディープラーニング技術を用いた組織切片の染色法の自動判別システムの構築.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 吉備国際大学 保健福祉研究所 研究紀要	6. 最初と最後の頁 23-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Mori Y, Oichi T, Enomoto-Iwamoto M, Saito T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Automatic Detection of Medial and Lateral Compartments from Histological Sections of Mouse Knee Joints Using the Single-Shot Multibox Detector Algorithm.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cartilage	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/19476035221074009.	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

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------