

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20689028

研究課題名(和文) 転写因子 HIF2A による軟骨細胞の発生・分化の制御機構の解明

研究課題名(英文) Research of transcriptional regulation by HIF2A during chondrocyte generation and differentiation.

研究代表者

齋藤 琢 (SAITO TAKU)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：30456107

研究成果の概要(和文)：

変形性関節症(OA)の発症には軟骨細胞の肥大分化以降の軟骨内骨化過程が関与する。OA治療標的分子の同定を目指して、まず肥大分化マーカー*COL10A1*のpromoterを用いて上流分子のスクリーニングを行ったところ、hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  (HIF2A)が最も強い転写活性を示した。*HIF2A*ヘテロ欠損(+/-)マウスは軟骨細胞の肥大分化と骨化の障害による成長遅延を呈した。HIF2Aはマウス実験モデルとヒト手術摘出膝関節軟骨においてOAの進行に伴って発現が亢進しており、+/-マウスでは関節軟骨破壊が抑制された。また培養軟骨細胞にHIF2Aを過剰発現および発現抑制したところ、*COL10A1*, *MMP3*, *9*, *13*, *VEGF*, *IHH*, *PTH1R*, *RUNX2*などの軟骨内骨化マーカーの発現が、それぞれ増加および減少した。これらの発現は+/-マウスの軟骨では低下しており、luciferase assay、EMSA、ChIPによりHIF2Aがこれらの分子のpromoterの各応答配列に結合して直接転写を誘導することが示された。続いて*HIF2A*promoterを用いたスクリーニングでは、NF- $\kappa$ B family分子RELAがNF- $\kappa$ B motifを介して強力にHIF2Aを転写誘導した。RELAはOA関節軟骨でHIF2Aと共に発現が上昇し、培養軟骨細胞でIL-1、TNF- $\alpha$ がHIF2Aを誘導することから、NF- $\kappa$ BがHIF2Aの上流シグナルであることが示された。さらにROADスタディ住民コホートのゲノム関連解析(397 OA vs. 437 対照)において*HIF2A*遺伝子5'UTRのSNP(+18C/T)が有意な疾患感受性(p=0.013; OR=1.44)を示し、培養軟骨細胞では疾患allele(+18C)promoterが対照(+18T)より有意に高い転写活性を示した。この活性の差は上記のNF- $\kappa$ B motif内の変異導入によって見られなくなったため、本SNPはNF- $\kappa$ BによるHIF2A誘導を介してOAに関与していることが示された。以上より、マウスのみならずヒトでもHIF2A/NF- $\kappa$ Bシグナルは複数の軟骨内骨化関連分子を転写誘導することでOAを制御しており、強力な治療標的の候補であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

Chondrocyte hypertrophy followed by cartilage matrix degradation and vascular invasion, characterized by expression of type X collagen (*COL10A1*), matrix metalloproteinase-13 (*MMP-13*) and vascular endothelial growth factor (*VEGF*), respectively, are central steps of endochondral ossification during normal skeletal growth and osteoarthritis development. A *COL10A1* promoter assay identified hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ , encoded by *EPAS1*) as the most potent transactivator of *COL10A1*. HIF-2 $\alpha$  enhanced promoter activities of *COL10A1*, *MMP13* and *VEGFA* through specific binding to the respective hypoxia-responsive elements. HIF-2 $\alpha$ , independently of oxygen-dependent hydroxylation, was essential for endochondral ossification of cultured chondrocytes and embryonic skeletal growth in mice. HIF-2 $\alpha$  expression was higher in osteoarthritic cartilages versus nondiseased cartilages of mice and humans. *Epas1*-heterozygous deficient mice showed resistance to osteoarthritis development, and a functional single nucleotide polymorphism (SNP) in the human *EPAS1* gene

was associated with knee osteoarthritis in a Japanese population. The *EPASI* promoter assay identified RELA, a nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) family member, as a potent inducer of HIF-2 $\alpha$  expression. Hence, HIF-2 $\alpha$  is a central transactivator that targets several crucial genes for endochondral ossification and may represent a therapeutic target for osteoarthritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2009年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	17,500,000	5,250,000	22,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

#### 1. 研究開始当初の背景

高齢人口の増加によって運動器疾患の患者数は増え続けているが、関節軟骨の変性予防や、修復・再生といった本質的な治療技術は現在も確立されておらず、変形性関節症・軟骨代謝に関する研究は骨粗鬆症・骨代謝のそれと比較すると未だ低調であった。変形性関節症の画期的治療法の実現には何よりもまず分子レベルで軟骨細胞を制御しているシグナル群の解明が必須であると考え、研究代表者は様々なスクリーニングを繰り返してきた。その中で、10型コラーゲンプロモーターを用いたスクリーニングによって、Hypoxia-Inducible Factor (HIF) ファミリーに属する HIF2A が 10 型コラーゲンを強く誘導することを突き止めた。HIF ファミリーは低酸素状態に抗して起こる様々な生体防御反応を誘導する転写因子として知られており、その代表的分子 HIF1A は軟骨細胞の増殖、分化、基質産生に関係していることも知られているが (Genes Dev 15:2865, 2001)、HIF2A に関する報告は乏しかった。研究代表者は HIF2A が軟骨細胞において何らかの重要な作用を持つ可能性を考え、様々な基礎検討を行った結果、HIF2A は 10 型コラーゲンだけでなく、軟骨細胞の肥大分化を全体的に制御する可能性を突き止めた。

#### 2. 研究の目的

本研究は転写因子 Hypoxia-Inducible Factor 2A (HIF2A) による軟骨細胞の発生からアポトーシスまでの全段階での制御機構を *in vitro*, *in vivo* 両面で詳細に解析することを目的と

した。

#### 3. 研究の方法

軟骨細胞分化における HIF2A の作用を、培養細胞系を用いた *in vitro* の系と、ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の系に分けて解析を行った。特に *in vivo* の系では、マウスの骨格形成について解析だけでなく、研究代表者らのグループが独自に発展させたマウス変形性関節症モデルを用いた解析も行った。また HIF2A の標的分子を広く探索するとともに、HIF2A の上流分子についてもスクリーニングを行った。また、研究代表者らのグループが保有している国内最大の変形性関節症の住民コホートのデータを基に、変形性関節症の発症における HIF2A 遺伝子周辺の多型の関与も検索した。

#### 4. 研究成果

*HIF2A* ヘテロ欠損 (+/-) マウスは、胎生期から軟骨細胞の肥大分化と骨化の障害による成長遅延を呈したが、これらの差は生後 1 週ほどで消失した。HIF2A はマウス実験モデルとヒト手術摘出膝関節軟骨において OA の進行に伴って発現が亢進していた。 +/- マウスで変形性関節症モデルを作成したところ、関節軟骨破壊と骨棘形成が著明に抑制された。また培養軟骨細胞にレトロウイルスベクターを用いて HIF2A を安定的に過剰発現したところ、COL10A1, MMP3, MMP9, MMP13, VEGF, IHH, PTH1R, RUNX2 などの軟骨内骨化マーカーの発現が、増加した。反対に siRNA の発現カセットをレトロウイルスベクターを用いて安定

的に発現させたところ、これらのマーカー遺伝子の発現は減少した。これらのマーカー遺伝子の発現は+/-マウスの軟骨でも低下しており、luciferase assay、EMSA、ChIPにより HIF2A がこれらの分子の promoter の各応答配列に結合して直接転写を誘導することも示された。続いて HIF2A promoter を用いて様々な転写因子のスクリーニングを行ったところ、NF- $\kappa$ B family 分子 RELA が NF- $\kappa$ B motif を介して強力に HIF2A を転写誘導することが判明した。RELA は OA 関節軟骨で HIF2A と共に発現が上昇し、培養軟骨細胞で IL-1、TNF- $\alpha$  が HIF2A を誘導することから、NF- $\kappa$ B シグナルが HIF2A の上流シグナルであることが示された。さらに ROAD スタディ住民コホートのゲノム関連解析(397 OA vs. 437 対照)において HIF2A 遺伝子 5' UTR の SNP(+18C/T) が有意な疾患感受性(p=0.013; OR=1.44)を示し、培養軟骨細胞では疾患 allele(+18C) promoter が対照(+18T)より有意に高い転写活性を示した。この活性の差は上記の NF- $\kappa$ B motif 内の変異導入によって見られなくなったため、本 SNP は NF- $\kappa$ B による HIF2A 誘導を介して OA に関与していることが示された。

#### 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 13 件) 全て査読あり。

- 1) Ishiyama N, Moro T, Ohe T, Miura T, Ishihara K, Konno T, Ohyama T, Yoshikawa M, Kyomoto M, Saito T, Nakamura K, Kawaguchi H. Reduction of peritendinous adhesions by hydrogel containing biocompatible phospholipid polymer MPC for tendon repair. *J Bone Joint Surg Am*. 93:142-9, 2011.
- 2) Saito T, Kawaguchi H. HIF-2 $\alpha$  as a possible therapeutic target of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 18:1552-6, 2010.
- 3) Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, Kawaguchi H. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 $\alpha$  during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med*. 16:678-86, 2010
- 4) Kato M, Takaishi H, Yoda M, Tohmonda T, Takito J, Fujita N, Hosogane N, Horiuchi K, Kimura T, Okada Y, Saito T, Kawaguchi H, Kikuchi T, Matsumoto M, Toyama Y, Chiba K. GRIP1 enhances estrogen receptor alpha-dependent extracellular matrix gene expression in chondrogenic cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 18:934-41, 2010
- 5) Fukai A, Kawamura N, Saito T, Oshima Y, Ikeda T, Kugimiya F, Higashikawa A, Yano F, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Akt1 in murine chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiologic and pathologic conditions. *Arthritis Rheum*. 62:826-36, 2010
- 6) Shinoda Y, Kawaguchi H, Higashikawa A, Hirata M, Miura T, Saito T, Nakamura K, Chung UI, Ogata N. Mechanisms underlying catabolic and anabolic functions of parathyroid hormone on bone by combination of culture systems of mouse cells. *J Cell Biochem*. 109:755-63, 2010.
- 7) Kan A, Ikeda T, Saito T, Yano F, Fukai A, Hojo H, Ogasawara T, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Screening of chondrogenic factors with a real-time fluorescence-monitoring cell line ATDC5-C2ER: identification of sorting nexin 19 as a novel factor. *Arthritis Rheum*. 60:3314-23, 2009.
- 8) Ushita M, Saito T, Ikeda T, Yano F, Higashikawa A, Ogata N, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H. Transcriptional induction of SOX9 by NF-kappaB family member RelA in chondrogenic cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 17:1065-75, 2009.
- 9) Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, Kawasaki Y, Saito T, Yano F, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. C/EBPbeta promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57. *PLoS ONE*. 4:e4543, 2009.
- 10) Higashikawa A, Saito T, Ikeda T, Kamekura S, Kawamura N, Kan A, Hirata M, Oshima Y, Ohba S, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type x collagen gene. *Arthritis Rheum*. 60:166-78, 2009.
- 11) 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. Phosphorylation of GSK-3beta by cGMP-dependent protein kinase II promotes hypertrophic differentiation of murine chondrocytes. *J Clin Invest.* 118:2506-15, 2008.
- 12) Ohba S, Kawaguchi H, Kugimiya F, Ogasawara T, Kawamura N, **Saito T**, Ikeda T, Fujii K, Miyajima T, Kuramochi A, Miyashita T, Oda H, Nakamura K, Takato T, Chung UI. Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. *Dev Cell.* 14:689-99, 2008.
- 13) Tamiya H, Ikeda T, Jeong JH, **Saito T**, Yano F, Jung YK, Ohba S, Kawaguchi H, Chung UI, Choi JY. Analysis of the Runx2 promoter in osseous and non-osseous cells and identification of HIF2A as a potent transcription activator. *Gene.* 416:53-60, 2008.

[学会発表] (計 11 件)

- 1) **齋藤琢** 他 : HIF2A/NF-kBシグナルは変形性関節症を制御する 第 28 回日本骨代謝学会、東京、2010. 7. 23
- 2) **Saito T**, et al. : Comprehensive control of endochondral ossification by HIF-2 $\alpha$  during skeletal growth and osteoarthritis progression. 31th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Denver, USA. 2009. 9. 14.
- 3) **Saito T**, Hikata T, et al. : Notch/RBPJk/Hes1 Signaling Controls Terminal Differentiation of Chondrocytes during Endochondral Ossification. 31th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. Denver, USA. 2009. 9. 14.
- 4) **Saito T** et al. : Hypoxia-Inducible Factor 2 $\alpha$  ( HIF-2 $\alpha$  ) controls sequential steps of endochondral ossification during skeletal growth and .osteoarthritis progression. Second Joint Meeting of the International Bone & Mineral Society and the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society, Sydney, Australia. 2009. 3. 24.
- 5) **齋藤琢** 他 : Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) は軟骨内骨化を統合的に促進し、骨格成長と関節軟骨変性の両者を制御する 第 22 回日本軟骨代謝学会、

名古屋、2009. 3. 6.

- 6) **齋藤琢** 他 : Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) は軟骨内骨化を統合的に制御する転写因子である 第 3 回 Bone Research Seminar、東京、2009. 2. 27.
- 7) **齋藤琢** 他 : Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) は軟骨内骨化を統合的に制御する転写因子である 第 26 回日本骨代謝学会、大阪、2008. 10. 29.
- 8) **齋藤琢** 他 : HIF2Aは軟骨内骨化における軟骨細胞の後期分化を広く制御する転写因子である 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会、京都、2008. 10. 24.
- 9) **齋藤琢** 他 : Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) は軟骨内骨化を統合的に制御する転写因子である 第 11 回骨発生・再生研究会、東京、2008. 10. 11.
- 10) **Saito T** et al. : Hypoxia-Inducible Factor 2A (HIF2A) Controls Sequential Steps in the Late Stage of Endochondral Ossification. 2008 World Congress on Osteoarthritis, Rome, Italy. 2008. 9. 19.
- 11) **Saito T** et al. : Hypoxia-Inducible Factor 2A (HIF2A) Controls Sequential Steps in Endochondral Ossification. 5th Meeting of the Bone Biology Forum, Susono, Japan. 2008. 8. 23.

[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 :  
 出願年月日 :  
 国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 取得年月日 :  
 国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 琢 (SAITO TAKU)

(東京大学・医学部附属病院・特任准教授)

研究者番号：30456107

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：