

令和 5 年 4 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20942

研究課題名(和文) Runx2による軟骨細胞の制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory Mechanism of Chondrocytes by Runx2

研究代表者

永田 向生(Nagata, Kosei)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：10907801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症(OA)の根幹をなすのが軟骨を変性であり、そのシグナルの一つに軟骨内骨化が挙げられる。軟骨内骨化の中心に位置するのが転写因子Runx2である。本研究では、Runx2を成長後に軟骨細胞特異的に中等度ノックアウト(40%)したマウスではマトリックスメタロペプチダーゼ13(Mmp13)発現が低下してOAが抑制された。一方でRunx2を強くノックアウト(80%)したマウスではOAが加速しII型コラーゲン(Col2a1)発現が低下するという二相性の表現型が示された。総合的な転写解析の結果、炎症反応下でRunx2はイントロン6エンハンサーを介してCol2a1の発現を維持することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症は中高年の関節痛の最大の原因であり、疫学調査では膝関節だけで国内に2,530万人の患者がいると報告されていた。関節軟骨細胞は血流からの豊富な栄養が届きにくい環境で、2型コラーゲンなどの軟骨を構成するタンパクを作って軟骨組織を維持している。これまでの研究では、Runx2は成体の関節軟骨においては2型コラーゲンを分解するMMP-13という酵素を誘導し、軟骨破壊を促進してしまうことが知られていた。本成果は、Runx2にも炎症反応下で2型コラーゲンを誘導するという隠れた関節保護作用があることを示し、病態解明のみならず、新たな治療法開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The Runt-related transcription factor (Runx) family plays various roles in the homeostasis of cartilage. Runx2 conditional knockout mice showed biphasic phenotypes: heterozygous knockout inhibited osteoarthritis and decreased matrix metalloproteinase 13 (Mmp13) expression, while homozygous knockout of Runx2 accelerated osteoarthritis and reduced type II collagen (Col2a1) expression. Comprehensive transcriptional analyses indicated that Runx2 sustained Col2a1 expression through an intron 6 enhancer when Sox9 was decreased. Runx2 exerts both catabolic and anabolic effects under the inflammatory condition.

研究分野：整形外科

キーワード：Runx2 軟骨細胞 変形性関節症 2型コラーゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転写因子 Runx2 は軟骨細胞の変性や、肥大分化・骨化において必須の転写因子である。我々はこれまでの研究で、Runx2 は関節軟骨深に発現し、Runx2 を成長後に軟骨特異的にヘテロノックアウト(cKO)すると変形性関節症(OA)は抑制されるが、Runx2 をホモ cKO したマウスでは OA が進行するといった二層性の作用があること、Runx2 ヘテロ cKO マウス由来の関節軟骨では軟骨破壊促進因子の Mmp13 の発現が低下するが、Runx2 ホモ cKO マウス由来の関節軟骨では保護因子の Col2a1 も減少する事を示した。本研究は Runx2 のみならず、関節軟骨の転写制御機構の全体像を解明することが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、Runx2 が軟骨の状態に応じて、どのような遺伝子の転写を誘導して、成体関節軟骨を維持しているのか、Runx2 の作用のうち何が損なわれれば OA に繋がるのかを明らかにする事を目的とする。転写因子 Runx2 は軟骨細胞の肥大分化・骨化において必須の転写因子であることから、本研究は Runx2 のみならず、関節軟骨の転写制御機構の全体像を紐解く上でも大きく貢献するであろう。

3. 研究の方法

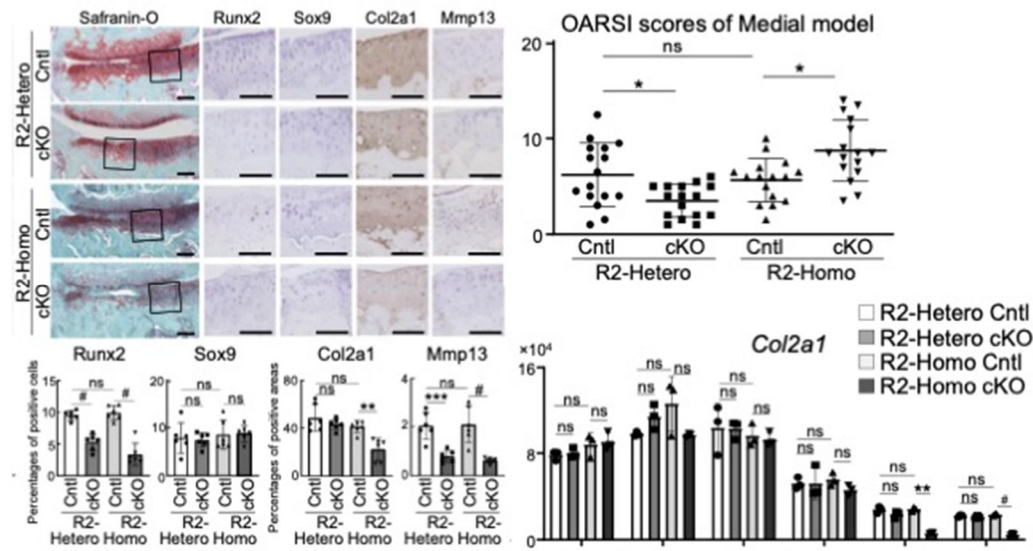
本研究は、Runx2 が軟骨細胞において、どのような遺伝子の転写を誘導して、成体関節軟骨を維持や変性に関わるのかを検討する。Runx2cKO マウスの開発および維持にはすでに成功しており、マウス由来の検体の採取も順調に進んでいる。このため令和 3-4 年度はさらに新規購入した手術器具を用いて生体由来の組織を採取して検定し、その解析に用いる解析ソフトを購入して統計分析を行い、軟骨細胞が炎症条件下や通常状態において Runx2 の多寡によって発現が変動する遺伝子を検討した。生体由来の組織については、免疫染色を行い、実際に生体内で発現が変動しているかを定量的に評価した。

4. 研究成果

まず野生型成体マウス C57BL/6J に手術で OA を行い、サンプルを 2 週ごとに経時的に採取して免疫染色を行った。関節軟骨保護因子の Col2a1 やその転写因子である Sox9 は OA に伴う炎症で減少するが、Runx2 の発現は維持されていることが判明した。これを *in vitro* で再現するため、マウスより採取した軟骨細胞に炎症誘導する IL-1 を加えて濃度・時間を検討して、1 ng/mL で 24 h の時点で採取した軟骨細胞が OA をよく再現しており、Sox9/Col2a1 は減少し、Runx2 は維持されて、軟骨破壊因子の Mmp13 は上昇することが確認された。

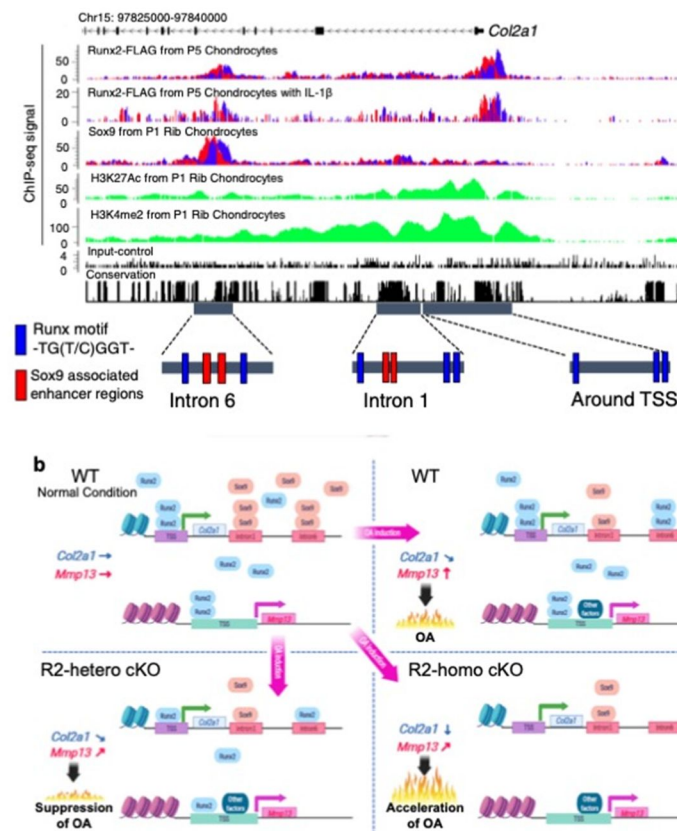
続いて Runx2 ヘテロ cKO マウスとその Control、及び Runx2 ホモ cKO マウスとその Control という 4 種のマウスに外科手術で OA を誘導する手術モデルを行なった。OA の進行度は OARSI スコアで定量的に評価した。既存の報告通り Runx2 ヘテロ cKO マウス(40% cKO)では Mmp13 が低下して OA が抑制されたが、Runx2 ホモ cKO マウス(80% cKO)では OA が進行して、軟骨保護因子である Col2a1 が低下していた。軟骨細胞で Col2a1 の発現が炎症反応下の Runx2 ホモ cKO マウス由来でのみ低下することは *in vitro* でも再現できた。このことから、Col2a1 を誘導する Sox9 が減少する炎症反応下において、本来安定発現している Runx2 を強く KO すると、Col2a1 も減少して OA が進行したのではないかと仮説を立てるに至った。

(図 1 cKO マウス OA モデルでの検討)



Runx2-FLAG マウスを疾患工学センターより提供いただいた。このマウス由来の軟骨細胞を用いて、IL-1 の負荷での機能変化を検討するために、転写因子の機能を網羅的に解析する ChIP-seq を行った。Collagen fibril の形成は Runx2 の主要な機能として炎症反応の有無 (IL-1 の負荷の有無 ; 赤負荷なし、青負荷あり) に関わらず維持された。その中心となるのが Runx motif とされる TGTGGT 配列であるが、これは炎症の有無でも維持された。

(図 2 ChIP-seq での解析及び結果の総括)



さらに、位置情報解析によりこの Runx motif が、Col2a1 遺伝子における Sox9 のエンハンサー領域の近傍にあることが判明した。特に Intron 6 では炎症反応を再現して、Runx2 を維持したまま Sox9 を減少させて活性が落ちるか再現したが、Runx2 が一定量あれば活性が維持されることを示せた。以上の結果及び既存の報告から、Runx2 は通常関節破壊因子 Mmp13 を誘導するだけでなく、炎症反応で Sox9 が減少した特殊な状況で関節保護因子 Col2a1 も誘導する二層性の機能を持つことを、本研究は解明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nagata K, Hojo H, Chang SH, Okada H, Yano F, Chijimatsu R, Omata Y, Mori D, Makii Y, Kawata M, Kaneko T, Iwanaga Y, Nakamoto H, Maenohara Y, Tachibana N, Ishikura H, Higuchi J, Taniguchi Y, Ohba S, Chung UI, Tanaka S, Saito T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Runx2 and Runx3 differentially regulate articular chondrocytes during surgically induced osteoarthritis development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-33744-5	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 Tachibana N, Chijimatsu R, Okada H, Oichi T, Taniguchi Y, Maenohara Y, Miyahara J, Ishikura H, Iwanaga Y, Arino Y, Nagata K, Nakamoto H, Kato S, Doi T, Matsubayashi Y, Oshima Y, Terashima A, Omata Y, Yano F, Maeda S, Ikegawa S, Seki M, Suzuki Y, Tanaka S, Saito T.	4. 巻 8
2. 論文標題 RSP02 defines a distinct undifferentiated progenitor in the tendon/ligament and suppresses ectopic ossification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabn2138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abn2138	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 Nagata Kosei, Nakamoto Hideki, Kato So, Takeshita Yujiro, Kawamura Naohiro, Ono Takashi, Higashikawa Akiro, Fukushima Masayoshi, Azuma Seiichi, Hara Nobuhiro, Oka Hiroyuki, Matsudaira Ko, Tanaka Sakae, Oshima Yasushi	4. 巻 30
2. 論文標題 Minimum clinically important change for outcome scores among patients aged 75 or over undergoing lumbar spine surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Spine Journal	6. 最初と最後の頁 1226 ~ 1234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00586-021-06815-2	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 Nagata Kosei, Nakamoto Hideki, Sumitani Masahiko, Tanaka Sakae, Oshima Yasushi, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Diabetes is associated with greater leg pain and worse patient-reported outcomes at 1 year after lumbar spine surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87615-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 -

1. 著者名 Kaneko Taizo, Horiuchi Keisuke, Chijimatsu Ryota, Mori Daisuke, Nagata Kosei, Omata Yasunori, Yano Fumiko, Inui Hiroshi, Moro Toru, Tanaka Sakae, Saito Taku	4. 巻 40
2. 論文標題 Regulation of osteoarthritis development by ADAM17/Tace in articular cartilage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 196 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-021-01278-3	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 Tachibana Naohiro, Doi Toru, Nakajima Koji, Nakamoto Hideki, Miyahara Junya, Nagata Kosei, Nakarai Hiroyuki, Tozawa Keiichiro, Ohtomo Nozomu, Sakamoto Ryuji, Kato So, Taniguchi Yuki, Matsubayashi Yoshitaka, Tanaka Sakae, Oshima Yasushi	4. 巻 Mar 29
2. 論文標題 Does Surgical Treatment Affect the Degree of Anxiety or Depression in Patients With Degenerative Cervical Myelopathy?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Global Spine Journal	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/21925682221088549	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 Nagata Kosei, Yamada Koji, Shinozaki Tomohiro, et al.	4. 巻 5
2. 論文標題 Effect of Antimicrobial Prophylaxis Duration on Health Care Associated Infections After Clean Orthopedic Surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JAMA Network Open	6. 最初と最後の頁 e226095 ~ e226095
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamanetworkopen.2022.6095	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 -

〔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
---------	---------