

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 21日現在

機関番号： 12601  
 研究種目： 挑戦的萌芽研究  
 研究期間： 2010～2011  
 課題番号： 22659266  
 研究課題名（和文）変形性膝関節症の病因解明と治療を目指した軟骨肥大分化誘導因子の網羅的解析  
 研究課題名（英文）Screening of hypertrophic differentiation-related factors for innovative research of osteoarthritis.  
 研究代表者  
 武富 修治（TAKETOMI SHUJI）  
 東京大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号： 70570018

研究成果の概要（和文）：肥大軟骨分化モニタリングシステムの確立のため、代表的な肥大分化マーカーである X 型コラーゲン、VEGF および MMP13 遺伝子のプロモーター解析を行い、それぞれのコアエンハンサーを複数同定し、これらをタンデムにしてベーサルプロモイターとをつなぎ、さらに下流に各種蛍光蛋白を接合したレポーターコンストラクトを作成した。これらのレポーターカセットをレンチウイルスベースに組み替え、軟骨細胞前駆細胞株 ATDC5 に安定導入して、分化に伴って蛍光を良好に発色するクローンを樹立した。これらを用いた発現クローニングによって複数の陽性クローンを得、現在それに含まれる候補遺伝子の解析を継続している。

研究成果の概要（英文）： For establishment of a fluorescence monitoring system to detect hypertrophic differentiation of chondrocytes, we analyzed the promoter regions of the representative hypertrophic marker genes including COL10A1, VEGF and MMP13, and indentified the core enhancers in these genes. We constructed the reporter vectors by ligating the tandem-repeated core enhancers, the basal promoter sequences and fluorescent proteins, and lentivirally introduced them into ATDC5 cells. We performed the expression cloning by these reporter cells, and identified several positive clones which were still under analyses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学臨床医学・整形外科学

キーワード：関節病学

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症のメカニズムの中心をなす肥大分化についてまだ関連する分子の知見が少なく、病因の解明が進まない原因と考えられた。

### 2. 研究の目的

簡便なスクリーニング法の開発により、肥大分化のメカニズムのいっそうの解明を目指した。

### 3. 研究の方法

代表的な肥大分化マーカーであるX型コラーゲン、MMP-13、VEGFAのプロモーター解析を行い、コアエンハンサーを同定して強力なレポーターコンストラクトを開発し、それを用いて発現クローニングを行った。

### 4. 研究成果

肥大軟骨分化モニタリングシステムの確立のため、代表的な肥大分化マーカーであるX型コラーゲン、VEGFおよびMMP13遺伝子のプロモーター解析を行い、それぞれの転写開始点上流1kbから下流1kbの間に存在するコアエンハンサーを複数同定した。これらのコアエンハンサーをタンデムにつなぎ、さらに転写開始点付近のベータプロモーターをつなぎ、下流に各種蛍光蛋白を接合したレポーターコンストラクトを作成した。これらのレポーターカセットをレンチウイルスベクターに組み替え、軟骨細胞前駆細胞株ATDC5にレンチウイルスベクターによって安定導入し、薬剤セレクションによってクローンを選択し、さらにそれぞれATDC5の分化に従って蛍光を良好に発色するクローンを樹立した。これらを利用して様々な発現クローニングを行い、肥大分化誘導能を持った分子を複数同定した。これらの中にNotchシグナルやNFkBシグナルに関連する分子がひとつずつあり、これらの発現ベクターやsiRNAを用いた発現抑制ベクターを作成したところ、いずれも強力な肥大分化促進効果を示した。これらの分子の発現を免疫組織染色法で確認したところ、成長板軟骨、関節軟骨ともに発現がみられた。Notchシグナルの下流として同定した分子X（投稿に向けて現在も研究を推進中のため分子名は伏せる）は強力に軟骨変性マーカーを誘導することがin vitroの実験で確認されたため、現在コンディショナル・ノックアウトマウスを用いて変形性関節症の解析をin vivoで行っている。NFkBシグナルに関連する分子Y（投稿に向けて現在も研究を推進中のため分子名は伏せる）については強力に軟骨変性マーカーを誘導するとともに、2型コラーゲンなどの軟骨基質を誘導する作用もあり、相反する作用を発揮することが予想されたた

め、こちらもコンディショナル・ノックアウトマウスを用いて変形性関節症の解析をin vivoで行う準備をしている。この他にも肥大分化促進効果を有すると考えられる分子は複数あり、今後機会をみて解析を再開する予定である。

### 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8件）全て査読あり

1. Kato S, Takeshita K, et al. Neurological recovery after posterior decompression surgery for anterior dural compression in paralytic spinal metastasis. Arch Orthop Trauma Surg. E-pub 2012.
2. Tonosu J, Takeshita K, et al. The normative score and the cut-off value of the Oswestry Disability Index (ODI). Eur Spine J. E-pub 2012.
3. Hirata M, Nakagawa T, et al. C/EBPβ and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2α as the inducer in chondrocytes. Hum Mol Genet. 21:1111,2012.
4. Fukai A, Nakagawa T, et al. Lack of a chondroprotective effect of cyclooxygenase 2 inhibition in a surgically induced model of osteoarthritis in mice. Arthritis Rheum 64:198,2012.
5. Kato S, Taketomi S, et al. Immunohistological analysis of extracted anterior cruciate ligament graft impinged against posterior cruciate ligament. Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol. 3:26,2011.
6. Taketomi S, et al. Osteochondral autograft for medial femoral condyle chondral lesions in a patient with multiple epiphyseal dysplasia: long-term result. J Orthop Sci. E-pub 2011.
7. Taketomi S, et al. Anatomical placement of double femoral tunnels in anterior cruciate ligament reconstruction: anteromedial tunnel first or posterolateral tunnel first? Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 19:424-31,2011.
8. Saito T, Nakagawa T, et al. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2α during skeletal growth and osteoarthritis development. Nat Med 16:678,2010.

[学会発表] (計 1 件)

1. Takeshita K, et al. Predictability of surgical correction of scoliosis by supine, side-bending, fulcrum and traction radiographs 17<sup>th</sup> International Meeting on Advances Spine Techniques 2010. 7 21 Toronto, Canada

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[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

武富 修治 (TAKETOMI SHUJI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70570018

### (2) 研究分担者

竹下 克志 (TAKESHITA KATSUSHI)  
東京大学医学部附属病院・准教授  
研究者番号：30262009

中川 匠 (NAKAGAWA TAKUMI)  
東京大学医学部附属病院・講師  
研究者番号：90338385

増田 和浩 (MASUDA KAZUHIRO)  
東京大学医学部附属病院・助教  
研究者番号：70407948

### (3) 連携研究者

特になし