

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390358

研究課題名(和文) 変形性関節症の新規治療法開発を目指したNotchシグナルの網羅的解析

研究課題名(英文) Research of Notch signal in pathophysiology and therapeutics of osteoarthritis

研究代表者

筑田 博隆(Chikuda, Hirotaka)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30345219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：Notchシグナルにおいては隣接する細胞表面に存在するリガンドが受容体(Notch1-4)に結合すると細胞内ドメイン(ICD)が核内移行して転写抑制因子Rbpjと結合し、転写促進複合体としてHes/Heyなどの標的転写因子を誘導する。Notch1,2はマウス・ヒト関節軟骨細胞に発現し、軟骨変性に伴ってICDが核内移行していたことから、タモキシフェン誘導性軟骨特異的Creマウスを用いて成長後にRbpjをノックアウトして変形性関節症(OA)モデルを作成したところ、OAの進行は抑制された。さらにHes1-floxマウスを用いて同様の解析を行ったところ、OAの進行は抑制された。

研究成果の概要(英文)：Notch signaling consists of 5 ligands and 4 receptors (Notch1-4). Upon ligand binding, the Notch receptor is cleaved and its intracellular domain (ICD) translocates to the nucleus, where it binds to Rbpj, a transcription repressor, and activates expression of target genes including Hes/Hey family member. Notch1 and 2 were expressed in mouse and human articular chondrocytes, and their ICDs were translocated to the nucleus with cartilage degradation. When we deleted Rbpj in chondrocytes after skeletal growth using tamoxifen-inducible Cre mice and created an experimental OA model, cartilage degradation and MMP13 expression were suppressed. We further investigated functions of Hes1, only target gene expressed abundantly in chondrocytes, using Hes1-flox mice. When we deleted Hes1 in the same way, OA development was suppressed while skeletal development was not affected.

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：関節軟骨 変形性関節症 Notchシグナル

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は高齢者の生活の質を脅かすロコモティブシンドロームの主たる疾患であり、その患者数は高齢人口の増加とともに増え続けているが、その疾患である変形性関節症については分子レベルでの病態解明は始まったばかりであり、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いない。

我々は従来より変形性関節症の病態解明のための基礎的研究を続けており、世界に先駆けてマウス変形性関節症モデルを確立するとともに (Osteoarthritis Cartilage 13:632,2005)、そのモデルを用いて Runx2 や C/EBP β などの軟骨内骨化を制御する転写因子群が変形性関節症の発症・進行をも強力に制御していることや、新規分子 Carminerin による軟骨の石灰化メカニズムを明らかにしたほか (Arthritis Rheum 54:2462-70,2006, Nature Med 12:665-70,2006, PLoS One 4:e4543,2009)、最近では転写因子 HIF2A が軟骨内骨化制御分子 Runx2 や IHH, 軟骨基質分解酵素 MMP13、血管誘導因子 VEGF などを広く誘導して、マウスだけでなくヒトにおいても変形性関節症の発症・進行に強く関与していることを解明するなど、変形性関節症研究に多大な業績を上げてきた (Nature Med 16:678-86,2010)。またこれらの研究と平行して我々は MMP13 のプロモーターを用いたスクリーニングも行い、その強力な誘導シグナルとして HIF2A とは別に Notch を同定した。Notch は細胞膜状に存在する受容体であり、隣接細胞のリガンドが結合することによって Notch の細胞内ドメインが切断されて核内に移行し、核内の共役分子 RBPJ と複合体を形成して標的遺伝子の転写を誘導する、という特徴的なシグナル経路を持つ。神経系の発達過程などで重要な役割を果たすことが古くから知られていたが、近年 RBPJ の組織特異的ノックアウトマウスの解析から Notch シグナルが骨格形成において軟骨内骨化の後期を強く制御していることが明らかにされた (Nature Med 14:306,2008, Proc Natl Acad Sci USA 106:14420,2009)。

我々はこれら内外の知見を基に、基礎検討として軟骨特異的 RBPJ ノックアウトマウスを用いてマウス変形性関節症モデルを作成したところ、その進行が著明に抑制されることを突き止めた (未発表)。現在のところ上述の HIF2A と Notch シグナルとの直接の関連を示す知見はなく、Notch シグナルは全く未知の経路を介して変形性関節症を制御している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、まず関節軟骨の保持と変性における Notch シグナルの役割を最新の分子生物学的手法を駆使して網羅的に解析し、その全貌を明らかにする。次に得られた知見と既知の情報をバイオインフォマティクスの手法

を用いて統合し、変形性関節症の治療標的候補分子を効率的に選定する。そしてその候補分子のターゲティングを複数の手法で行い、in vivo でその治療効果を検証することによって、遅滞なく前臨床の段階まで到達することを目指す。

3. 研究の方法

1) 組織・時期特異的ノックアウト／トランスジェニックマウスを用いた in vivo の機能解析

我々は Notch シグナルの抑制系として RBPJ-flox マウスを理研 BRC から供与済みであり、さらに Notch シグナルの強制活性化系として CAG-CAT-Notch1-ICD マウスについても理研 BRC から供与を予定している。後者のマウスは cre 誘導性に Notch1 の細胞内ドメイン (ICD) が発現するトランスジェニックマウスであり、これらのマウスをタモキシフェン誘導性 Col2a1-cre マウス (Col2a1-creERT2) と交配させることによって、軟骨特異的かつ時期特異的に Notch シグナルを抑制、あるいは活性化させることが可能となる。この最新の in vivo システムを駆使して、Notch シグナルが成長過程から老齢期にいたるまでのさまざまな段階において関節軟骨にどのような影響を及ぼすのかを、組織学的に詳細に検討する。またそれぞれのマウスにおいてマウス変形性関節症モデルも作成し、軟骨の変性過程の各段階における Notch シグナルの役割も詳細に検討する。組織学的検討には H&E 染色や Safranin O 染色のほか、II 型コラーゲンやアグリカンなどの軟骨基質タンパクと、X 型コラーゲン、MMP13, MMP3, MMP9, ADAMTS5, VEGF などの軟骨変性マーカーについて、免疫組織染色を行う。

2) Notch シグナルの活性化メカニズムの検討

Notch シグナルのリガンドとして DLL1, DLL3, DLL4, JAG1, JAG2 が、Notch シグナルの受容体として Notch1, Notch2, Notch3, Notch4 が知られている。またリガンド結合後に ADAM10, ADAM17 や γ -セクレターゼが Notch を段階的に切断することが ICD の分離・核内移行に必須とされるが、近年の研究では ADAM10, ADAM17 はリガンド結合と無関係に Notch シグナルを活性化することが明らかとなっている。これら Notch シグナルの活性化に関わる分子群のうち、関節軟骨の変性過程において最も重要な役割を有するものを同定するため、

①関節軟骨の変性過程における各分子の発現パターンと酵素活性の解析

②培養軟骨細胞の in vitro 変性系を用いた各分子の強制発現系、抑制系の解析

を行う。①の発現パターン解析については、組織切片の免疫染色と、組織から採取した mRNA のリアルタイム RT-PCR による定量にて行う。ADAM や γ -セクレターゼなどの酵

素については発現レベルとは別に酵素活性レベルで制御を受ける可能性もあり、市販の消光性蛍光基質を用いて活性を定量する。②については、マウス関節軟骨から採取した軟骨細胞にレトロウイルスベクターを用いて各分子のcDNAもしくはsiRNAを安定導入し、ペレット培養することによって変性を誘導する。細胞分画ごとのウェスタンブロッティング法にてNotch-ICDの核内移行を解析し、Notchシグナルの活性化の指標とするほか、軟骨基質や変性マーカーをリアルタイムRT-PCRにて定量し、変性の進行との関連を調べる。またADAM17は別名TACE (TNF- α -converting enzyme) としても知られ、NF- κ Bシグナルの代表的サイトカインTNF- α を活性化することから、これらの分子がNotchシグナル以外の経路を介して軟骨変性を惹起する可能性も含めて解析を行う。

3) Notchシグナルの標的分子群の網羅的検索

関節軟骨におけるNotchシグナルの標的分子を把握することは、Notchシグナルを干渉したときに起こる現象を予測・理解する上で必須である。まず1)の組織・時期特異的ノックアウト／トランスジェニックマウスの関節軟骨や2)の培養軟骨細胞の*in vitro*変性系から採取したmRNAを用いてマイクロアレイ解析を行うほか、野生型マウスの正常および変性関節軟骨細胞においてNotch-ICD抗体を用いたクロマチン免疫沈降-シーケンシング法(ChIP-Seq)を行い、Notchの標的分子群を網羅的に解析する。得られた候補分子群について、Notchシグナルによる誘導を1)の組織や2)の培養細胞系を用いて検証する。またNotchシグナルの重要な標的分子としてHes1, Hes5, Hes7, Hey1, Hey2, HeyLなどの転写因子群が知られており、これら既知の標的分子や軟骨変性に関与する分子についてはNotchシグナルによる発現の推移を重点的に検証する。

4) Notchシグナルの修飾シグナル群の網羅的検索

Notch切断後にNotch-ICDは細胞膜から核内へ移行して転写複合体の一部として機能するが、その切断後の移行過程については不明な点が多い。この移行過程を詳細に解明すべく、Notch-ICD抗体を用いた共免疫沈降を行い、結合タンパクをプロテインアレイによって網羅的に検索する。また2)においてADAMや γ -セクレターゼの活性化が軟骨変性と強く関連していた場合には、その活性化因子を同定すべく、それぞれの酵素に対する抗体を用いた同様のアッセイを行う。また既知のNotch関連分子・シグナルとしては、標的分子としてHes/Heyファミリーが、修飾分子としてDTXやMAMLファミリーが知られており、これらを介してNotchシグナルはp53シグナルやRunx

シグナル、WNTシグナル、NF- κ Bシグナルなどとクロストークすることが実証あるいは予測されている。これらの分子・シグナル群は関節軟骨の制御においても重要な役割を持っており、またそのほとんどは我々の研究チームで解析経験があることから、上述の網羅的検索とは別にそれぞれの主要分子の発現ベクターやsiRNAを用いて2)の培養細胞系にて個別に検討する。また反対に、これらのシグナルに対してNotchシグナルが及ぼす作用についても検討する。

4. 研究成果

Notchシグナルは隣接細胞間でシグナルを伝達する機構であり、隣接する細胞表面に存在するリガンド(Dll1, 3, 4, Jag1, 2)が受容体(Notch1-4)に結合するとAdam10や γ -セクレターゼにより受容体が切断され、その細胞内ドメイン(ICD)が核内移行して転写抑制因子Rbpjと結合し、転写促進複合体としてHes/Heyなどの標的転写因子を誘導する、という経路が広く知られている。我々はNotch1, 2がマウス胎児の四肢軟骨細胞に広く発現し、それらのICDが肥大軟骨層で核内移行すること、培養軟骨細胞にてNotch1-ICDがMmp13などの肥大軟骨マーカーを強く誘導することを突き止め、さらにRbpj-floxマウスを用いた*in vivo*の解析を行ったところ、軟骨前駆細胞でのノックアウトにより肥大層の延長を伴う成長障害が確認された。同様にNotch1, 2はマウス・ヒト関節軟骨細胞にも発現し、軟骨変性に伴ってICDが核内移行していたことから、タモキシフェン誘導性軟骨特異的Creマウスを用いて成長後にRbpjをノックアウトして変形性関節症(OA)モデルを作成したところ、OAの進行は抑制されMmp13などの発現も抑制された。さらに γ -セクレターゼ阻害剤のマウス膝関節内投与でも同様にOAの進行や変性マーカーの発現は抑制された。さらにその制御機構の詳細を調べるため、Notchシグナルの転写標的として軟骨細胞で唯一豊富に誘導されるHes1に注目し、Hes1-floxマウスを用いて同様の解析を行ったところ、成長障害は見られなかったがOAの進行は抑制された。Hes1のノックアウトによってMmp13をはじめとする軟骨分解酵素群が多く抑制されることが分かり、クロマチン免疫沈降シーケンス法とマイクロアレイ法によってHes1の標的遺伝子を網羅的に検索し、複数の候補を得た。現在はこれらの分子群につき詰めの解析を行っている。またHes1は転写抑制因子であるが、それが促進因子に転換するメカニズムについても同定し、現在確認の実験を行っている。

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 17 件）

- 1) Kato S, Shoda N, Chikuda H, Seichi A, Takeshita K. Morphological characteristics of cervical spine in patients with athetoid cerebral palsy and the accuracy of pedicle screw placement. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2014 Apr 15;39(8):E508-13.
- 2) Akiyama T, Chikuda H, Yasunaga H, Horiguchi H, Fushimi K, Saita K. Incidence and risk factors for mortality of vertebral osteomyelitis: a retrospective analysis using the Japanese diagnosis procedure combination database. *BMJ Open*. 2013 Mar 25;3(3).
- 3) Kato S, Chikuda H, Seichi A, Ohtsu H, Kimura A, Toyama Y. Radiographical risk factors for major intraoperative blood loss during laminoplasty in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012 Dec 1;37(25):E1588-93.
- 4) Chikuda H, Yasunaga H, Horiguchi H, Takeshita K, Kawaguchi H, Matsuda S, Nakamura K. Mortality and morbidity in dialysis-dependent patients undergoing spinal surgery: analysis of a national administrative database in Japan. *J Bone Joint Surg Am*. 2012 Mar 7;94(5):433-8.
- 5) Mori Y, Saito T, Chang SH, Kobayashi H, Ladel CH, Guehring H, Chung UI, Kawaguchi H. Identification of fibroblast growth factor-18 as a molecule to protect adult articular cartilage by gene expression profiling. *J Biol Chem*. 289:10192-200,2014.
- 6) Kato S, Takeshita K, Matsudaira K, Tonosu J, Hara N, Chikuda H. Normative score and cut-off value of the Neck Disability Index. *J Orthop Sci*. 2012 Nov;17(6):687-93.
- 7) Saito T, Yano F, Mori D, Ohba S, Hojo H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Tanaka S, Chung UI, Kawaguchi H. Generation of Col2a1-EGFP-iPS cells for monitoring chondrogenic differentiation. *PLoS ONE* 8:e74137,2013.
- 8) Kobayashi H, Hirata M, Saito T, Itoh S, Chung UI, Kawaguchi H. Transcriptional induction of ADAMTS5 by an NF- κ B family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. *J Biol Chem*. 288:28620-9,2013.
- 9) Yano F, Hojo H, Ohba S, Saito T, Honnami M, Mochizuki M, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Cell-sheet technology combined with a thienoinazole derivative small compound TD-198946 for cartilage regeneration. *Biomaterials*. 34:5581-7,2013.
- 10) Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI. Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J Biol Chem*. 288:9924-32,2013.
- 11) Hosaka Y, Saito T (equally contributed), Sugita S, Hikata T, Kobayashi H, Fukai A, Taniguchi Y, Hirata M, Akiyama H, Chung UI, Kawaguchi H. Notch signaling in chondrocytes modulates endochondral ossification and osteoarthritis development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:1875-80,2013.
- 12) Yano F, Saito T (equally contributed), Ogata N, Yamazawa T, Iino M, Chung UI, Kawaguchi H. β -catenin Regulates PTH/PTHrP Receptor Signals and

Chondrocyte Hypertrophy through Binding to Its Intracellular C-terminal Region.

Arthritis Rheum. 65:429-35,2013.

- 13) Yano F, Hojo H, Ohba S, Fukai A, Hosaka Y, Ikeda T, Saito T, Hirata M, Chikuda H, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. A novel disease-modifying osteoarthritis drug targeting Runx1. Ann Rheum Dis. 72:748-53,2013.
- 14) Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Gli1 Protein Participates in Hedgehog-mediated Specification of Osteoblast Lineage during Endochondral Ossification. J Biol Chem. 287:17860-9, 2012.
- 15) Itoh S, Saito T, Hirata M, Ushita M, Ikeda T, Woodgett JR, Algül H, Schmid RM, Chung UI, Kawaguchi H. GSK-3 α and GSK-3 β proteins are involved in early stages of chondrocyte differentiation with functional redundancy through RelA protein phosphorylation. J Biol Chem. 287:29227-36, 2012.
- 16) Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Yano F, Ikeda T, Mabuchi A, Sapkota BR, Akune T, Nishida N, Yoshimura N, Nakagawa T, Tokunaga K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. C/EBP β and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 α as the inducer in chondrocytes. Hum Mol Genet. 21:1111-23, 2012.
- 17) Fukai A, Kamekura S, Chikazu D, Nakagawa T, Hirata M, Saito T, Hosaka Y, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Lack of a chondroprotective effect of cyclooxygenase 2 inhibition in a

surgically induced model of osteoarthritis in mice. Arthritis Rheum. 64:198-203, 2012.

〔学会発表〕（計 3 件）

- 1) Sugita S, Hosaka Y, Kawaguchi H, et al. Notch/Rbpl/Hes1 signal in chondrocytes modulates osteoarthritis development. World Congress on Osteoarthritis (OARSI) 2012. 4.26 Barcelona, Spain
- 2) Hosaka Y, Kawaguchi H, et al. RBPjk-dependent Notch signaling in chondrocytes modulates skeletal growth and osteoarthritis development. Cold Spring Harbor Asia Conference 2012. 6. 11 Suzhou, China
- 3) Sugita S, Hosaka Y, Kawaguchi H, et al. Rbpj-dependent Notch signaling in chondrocytes modulates endochondral ossification during osteoarthritis development through transcriptional induction by Hes1. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2012. 10.12 Minneapolis, Minnesota, USA

〔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

筑田 博隆 (CHIKUDA HIROTAKA)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30345219

(2)研究分担者

川口 浩 (KAWAGUCHI HIROSHI)

東京大学・医学部附属病院・届出診療医

研究者番号：40282660

大橋 暁 (OHASHI SATORU)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20466767

(3)連携研究者

()

研究者番号：