

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390369

研究課題名(和文)変形性関節症の新規動物モデルの提示と治療法開発への基礎研究

研究課題名(英文)Fundamental researches to presentation a new animal models and the therapy development of the osteoarthritis

研究代表者

井尻 幸成(IJIRI, KOSEI)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・客員研究員

研究者番号：00315417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症(OA)は高齢者の疼痛や機能障害の原因となる軟骨の病気として定義される。我々はGadd45 が初期OA軟骨の軟骨細胞のクラスターに強く発現していることを示した。C/EBP はGadd45 と協調して働き、軟骨の肥大化部位に発現が観察される。我々の研究は、C/EBP は関節軟骨におけるGadd45 遺伝子発現を調節する重要な働きをしており、C/EBP とGadd45 間の相互作用は、関節軟骨の劣化やOAの骨棘形成に密接に関係し、フィードバックループの構成要素を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Osteoarthritis (OA) is defined as a disease of cartilage, which causes the pain and disability in older adults. Our previous study suggested that Growth arrest and DNA damage-inducible protein 45 (GADD45) is overexpressed in chondrocyte clusters in OA cartilage, especially in early stage of progression. CCAAT enhancer binding protein (C/EBP) is expressed in hypertrophic zone of murine growth plate and with a function in synergy with Gadd45. Our studies suggested that C/EBP plays a central role in controlling GADD45 gene expression in articular chondrocytes and suggest that the interplay between C/EBP and GADD45 constitutes a feedback loop with implications in cartilage degradation and osteophyte formation in OA.

研究分野：医歯薬学

キーワード：関節病学 GADD45 C/EBP 変形性関節症

## 1. 研究開始当初の背景

加速する高齢化社会において、変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) はいわゆる common disease としてもっとも頻度の高い運動器疾患である。本疾患は高齢者の日常生活機能を著しく低下させ、また社会的には医療費急増の一因であり、病態解明・新規治療法の開発が極めて重要な課題である。しかし、未だその詳細な発生機序や治療法は明らかにされていない。

我々はOA軟骨の網羅的遺伝子解析を行い、Gadd45 $\beta$  (Growth arrest and DNA damage inducible 45 beta) という分子に着目し研究を行ってきた。Gadd45 $\beta$  は細胞障害性ストレス下に発現が亢進し、細胞周期調節やがん細胞での Apoptosis に関わる 18kDa のタンパク質である。軟骨ではヒト初期 OA に特徴的に見られる Cluster 細胞に発現が亢進し、OA モデルマウスである IX 型コラーゲンノックアウトマウスや XI 型コラーゲンヘテロノックアウトマウスで変性軟骨の肥大軟骨細胞に発現する。また、成長軟骨での軟骨分化の系では、Gadd45 $\beta$  は軟骨細胞の肥大化に重要で、そのマーカー遺伝子である X 型コラーゲンや MMP-13 の遺伝子発現調節を担っている。さらに Gadd45 $\beta$  の X 型コラーゲンの遺伝子調節には MTK1/MKK3/6/p38 を介した C/EBP $\beta$ -TAD4 の系が必須である。これらの事実から、我々は異常なストレス下で発現した Gadd45 $\beta$  が C/EBP $\beta$  と協調して軟骨の肥大化を来し、これが OA の発症・進行に重要な関与をしていると考えている。

以前より我々は、初期変形性関節症の肥大軟骨細胞において GADD45 $\beta$  が発現亢進すること、メカニカルストレスに反応して発現量が増加し、COL2 や MMP13 などの遺伝子発現を調節すること、また MAPK カスケードで MTK1/MKK3/6/p38 を介し、転写因子 CCAAT / enhancer binding protein beta(C/EBP $\beta$ )を活性化し、COL10 遺伝子の転写活性を亢進させることを報告した。

最近の研究では C/EBP $\beta$  は造血、発生、軟骨形成における遺伝子発現を調節していることが示されており、増殖から肥大型へ表現型を変化させる重要な役割を持っている。一方、C/EBP $\beta$  の overexpression は炎症性関節や OA の病態に関与している。我々は免疫組織学的に老化関節軟骨の Gadd45 $\beta$  陽性軟骨細胞に C/EBP $\beta$  の同時発現を観察した。しかし、C/EBP $\beta$  による GADD45 $\beta$  自体の発現亢進の詳細なメカニズムは分かっていない。

そこで、関節軟骨において、Gadd45 $\beta$  は重要な転写調節因子であると仮説し、軟骨細胞において、C/EBP $\beta$  が Gadd45 $\beta$  遺伝子転写を調節しているかどうかを検討した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、C/EBP $\beta$  が Gadd45 $\beta$  遺伝子発現を調節しているかどうか検討するために、in vitro、in vivo において関節軟骨細胞の Gadd45 $\beta$  遺伝子調節における C/EBP $\beta$  の影響を調べることである。

## 3. 研究の方法

ヒト関節軟骨のサンプルは人工股関節全置換術あるいは人工骨頭置換術を施行した 5 人の患者から採取された。採取された OA サンプルは advanced OA として分類された。採取した関節軟骨は免疫染色用に 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定され、パラフィンブロックに包埋された。

軟骨細胞培養には ATDC5 cell を用いた。単離された軟骨細胞は DMEM-Ham's F-12 in 10%FCS で培養された。

8 週齢の C/EBP $\beta$  ヘテロノックアウトマウス(C/ebp $\beta$ +/-)と WT マウスの膝関節から関節軟骨を採取して anti-Gadd45 $\beta$  と C/ebp $\beta$  抗体を用いた免疫染色を行った。

C/EBP $\beta$  transgenic mice は軟骨特異的に doxycycline (DOX)にて発現調整が可能な Double Tg (D-Tg)を作成した。Tet-off vector と COMP(Cartilage oligomeric matrix protein) promoter を用いて mCOMPTA/pcDNA3.1 mice を作成し、C/EBP $\beta$  の発現 vector を injection した pTR-Tight/ C/EBP $\beta$  mice と交配させ、Conditional C/EBP $\beta$  transgenic mice を作成した。

TDC5 cell を用い、1.7Kb の GADD45 $\beta$  promoter 上の、C/EBP $\beta$  が直接作用する領域を同定するため、deletion mutants を作成し、luciferase assay にて評価した。さらに point mutants を作成し、詳細に C/EBP $\beta$  に対する反応を担う領域を検討した。

qRT-PCR のために、DOX off 後 48 時間後の Comp-tTA; TRE-C/ebp $\beta$  マウスから単離された尾軟骨細胞から Total RNA が抽出された。

細胞における C/EBP $\beta$  の発現はウエスタンブロッティングによっても確認された。

## 4. 研究成果

C/ebp $\beta$ +/-マウスの膝関節軟骨で GADD 45 $\beta$  や C/EBP $\beta$  の発現を免疫組織学的に観察すると、GADD45 $\beta$  と C/EBP $\beta$  陽性軟骨細胞の割合は WT マウスと比較して統計学的有意に減少していた (図 1)。

次に GADD45 $\beta$  promoter 分析によって、C/EBP $\beta$  が直接 GADD45 $\beta$  遺伝子転写を調節しているのかが調べた。GADD45 $\beta$  promoter の欠失変異体分析によって、C/EBP $\beta$  反応分子は近位 promoter 領域に位置していることが示された (図 2, 3)。4 つの領域、1 つは TATA box 領域、1 つは近位 promoter 領域に高く保存された領域(High Homology

Area:HHA)が同定され、さらに近位 2 か所に C/EBPβ binding site が存在していた。GADD45β promoter を用いた luciferase assay では、HHA を delete することにより、反応性が大きく減少した (図 2)。さらに、この塩基配列内に point mutants を導入したレポーターでは、C/EBPβ に対する反応性が著しく減少したことから、この領域が重要であることが示唆された (図 3)。

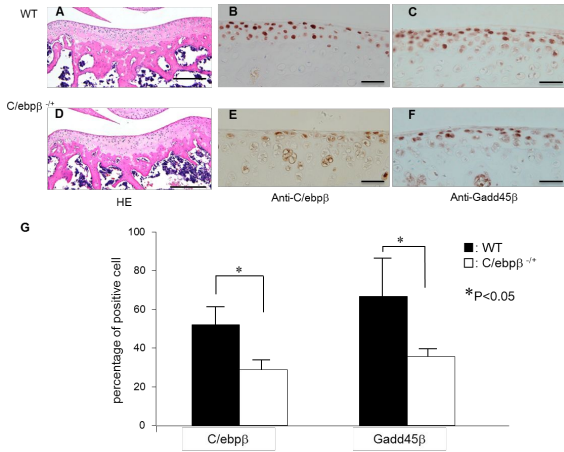


図 1 . Decreased Gadd45β expression in C/ebpβ<sup>+/-</sup> mice

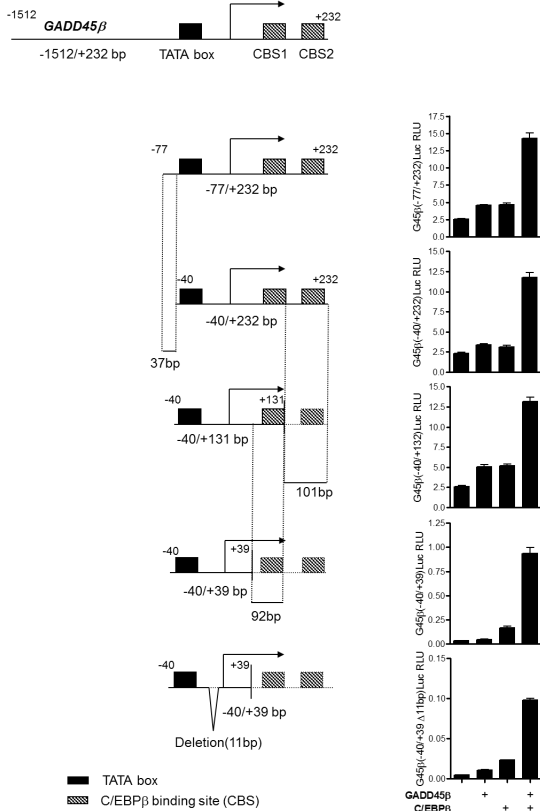


図 2 . Identification of the GADD 45β promoter element responsive to synergistic induction by C/EBPβ and GADD 45β.

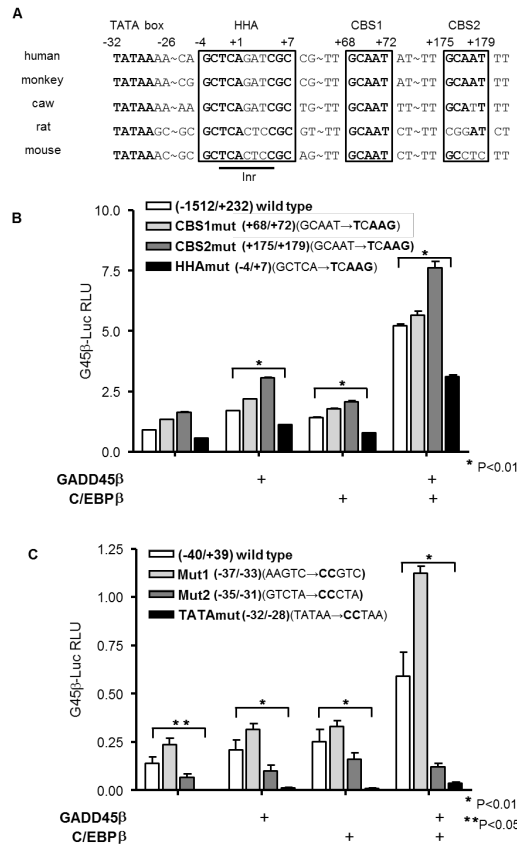


図 3 . C/EBPβ regulates GADD45β transcription in chondrocytes via proximal promoter sequences.

ヒト変形性関節症患者の関節軟骨に GADD45β と C/EBPβ の発現が免疫組織学的に観察された (図 4)。OA 軟骨細胞における GADD45β と C/EBPβ の同時発現が観察された。

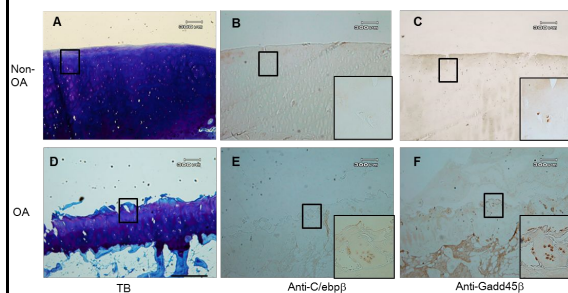


図 4 . Co-localization of C/EBPβ and GADD45β in articular chondrocytes from osteoarthritis (OA) patients.

最後に、COMP を用いて C/EBPβ を overexpression した Comp-tTA;TRE-C/ebpβ transgenic mice を使用した C/EBPβ の機能の影響を調べた。C/EBPβ の overexpression は、有意に関節軟骨における Gadd45β 遺伝子発現を刺激した (図 5)。

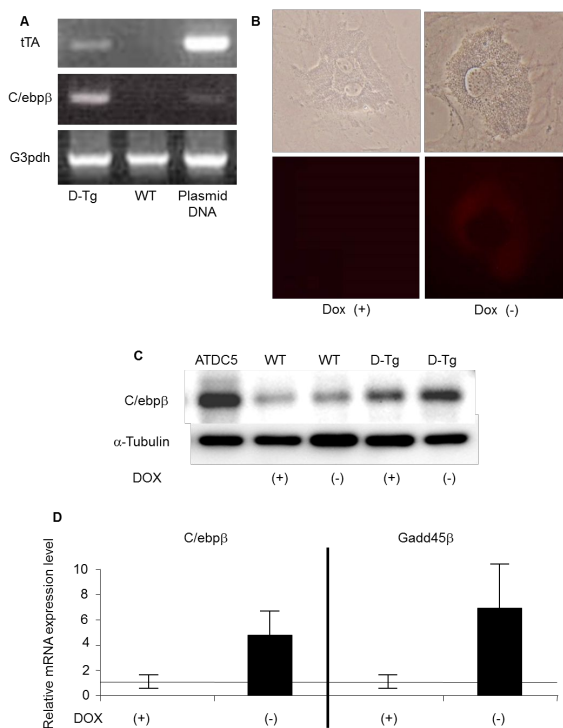


図 5 . Establishment of transgenic mice, Comp-tTA; TRE-C/ebpβ, overexpressing C/ebpβ controlled by the COMP promoter and the Tet-off system.

我々の研究は、C/EBPβ は関節軟骨における Gadd45β 遺伝子発現を調節する重要な働きをしており、C/EBPβ と Gadd45β 間の相互作用は、関節軟骨の劣化や OA の骨棘形成に密接に関係し、フィードバックループの構成要素を担っていることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- 井尻幸成、嶋田博文、土持兼之、小宮節郎. OA 軟骨細胞における Gadd45beta の発現と機能. 日関病誌 2013; 32: 88-87. (査読 ; 無)
- Sakakima H, Ijiri K, Matsuda F, Tominaga H, Biwa T, Yone K, Sankai Y. A newly developed robot suit hybrid assistive limb facilitated walking rehabilitation after spinal surgery for thoracic ossification of the posterior longitudinal ligament: a case report. Case Rep Orthop. 2013;2013:621405. (査読 ; 有)
- Nagano S, Yokouchi M, Nagayoshi R, Sasaki H, Shimada H, Setoguchi T, Ijiri K, Komiya S. Paget disease of bone in Japanese patients: a report of three cases. J

Orthop Surg (Hong Kong). 2013;21: 375-9. (査読 ; 有)

- Tsuneyoshi Y, Tanaka M, Nagai T, Sunahara N, Matsuda T, Sonoda T, Ijiri K, Komiya S, Matsuyama T. Functional folate receptor beta-expressing macrophages in osteoarthritis synovium and their M1/M2 expression profiles. Scand J Rheumatol. 2012; 41:132-40. (査読 ; 有)
- Kawamura H, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Miyano H, Hashiguchi T, Zenmyo M, Yamamoto T, Ijiri K, Kawano Y, Komiya S. Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections. FEMS Immunol Med Microbiol. 2011; 63:10-5. (査読 ; 有)
- Nagao H, Ijiri K, Hirotsu M, Ishidou Y, Yamamoto T, Nagano S, Takizawa T, Nakashima K, Komiya S, Setoguchi T. Combined posterior and delayed staged mini-open anterior short-segment fusion for thoracolumbar burst fractures. J Pathol. 2011; 224:169-79. (査読 ; 有)
- Shimada H, Abematsu M, Ishido Y, Kawamura I, Tominaga H, Zenmyo M, Yamamoto T, Taketomi E, Komiya S, Ijiri K. Classification of odontoid destruction in patients with rheumatoid arthritis using reconstructed computed tomography: reference to vertical migration. J Rheumatol. 2011; 38:863-7. (査読 ; 有)

〔学会発表〕(計 4 件)

- 嶋田 博文, 土持 兼之, 井尻 幸成, Goldring Mary, 瀬戸口 啓夫, 小宮 節郎. 軟骨細胞における C/ebpβ による Gadd45β プロモータ領域への直接的な制御の検討. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014 年 10 月 9-10 日 鹿児島市
- 嶋田 博文, 土持 兼之, 井尻 幸成, Goldring Mary B., 小宮 節郎. 軟骨細胞における C/EBPβ による GADD45β の直接的な制御. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 19-20 日 横浜市
- 嶋田 博文, 土持 兼之, Goldring M.B., 小宮 節郎, 井尻 幸成. 変形性関節症の関節軟骨における Gadd45β と C/ebpβ の発現 C/ebpβ による Gadd45β 遺伝子調

節. 第 27 回日本整形外科学会基礎学  
術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋市

4. 嶋田 博文, 土持 兼之, Goldring M.B.,  
小宮 節郎, 井尻 幸成, OA 関節軟骨にお  
ける GADD45 $\beta$  と C/EBP $\beta$  の遺伝子発現  
C/EBP $\beta$  による GADD45 $\beta$  遺伝子発現調  
節の機序. 第 26 回日本整形外科学会基  
礎学術集会 2011 年 11 月 20-21 日 前橋  
市

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

井尻 幸成 (KOSEI IJIRI)  
鹿児島大学・医歯学総合研究研・客員研  
究員  
研究者番号 : 00315417

### (2)研究分担者

小宮 節郎 (SETSURO KOMIYA)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号 : 30178371

榊間 春利 (HARUTOSHI SAKAKIMA)  
鹿児島大学・医学部・教授  
研究者番号 : 10325780

永野 聡 (SATOSHI NAGANO)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号 : 50373139