

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659663

研究課題名(和文)変形性関節症治療を目指した軟骨基質分解酵素誘導因子の網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of the inducer that degrades the extracellular matrix of articular cartilage

研究代表者

乾 洋 (Inui, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60583119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、軟骨基質分解酵素の中でも、ADAMTS5に着目し、解析を行った。ADAMTS5のプロモーター解析の結果、一つの転写因子がADAMTS5を強く誘導することを見いだした。さらに、この転写因子を欠失したマウス関節軟骨では、炎症性刺激による軟骨基質の分解は完全に抑制されていた。この転写因子を関節軟骨特異的にノックアウトしたマウスを用いて、実験的変形性関節症モデルの解析を行ったところ、骨細胞のアポトーシスが亢進し、変形性関節症の進行は促進した。今後は、阻害剤を用いて、この転写因子が作用するシグナルを適度に抑制することによって、変形性関節症の治療が可能であるかを検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：We identified transcription factor that induce ADAMTS5, a crucial proteinase for osteoarthritis development by promotor analysis. The endogenous Adamts5 expression in primary chondrocyte derived from knockout mouse of this gene was decreased. In the ex vivo culture of femoral head cartilage from mesenchymal cell-specific knockout of this gene, aggrecanolysis was significantly lower than that in the control cartilage. Finally, we performed the experimental mouse osteoarthritis model in conditional knockout mouse, the conditional knockout of this gene resulted in the acceleration of osteoarthritis development because of the up-regulation of chondrocyte apoptosis. We will investigate moderate suppression of this gene could suppress the osteoarthritis development by using inhibitor of signals related to this gene.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：関節病学

1. 研究開始当初の背景

近年、運動器の障害のために要介護となる危険の高い状態として口コモティブシンドロームが注目され、その主因となる変形性関節症を初めとした軟骨変性疾患に対する根本的治療法を目指した軟骨再生医療の確立は焦眉の課題となっている。しかしながら、関節軟骨を修復・再生する技術は確立されておらず、鎮痛剤や関節内注射、人工関節置換術など、姑息的あるいは侵襲的な治療に頼るしかないのが現状である。根本的な変形性関節症の予防・治療のためには、その発症・進展に関与する分子メカニズムを網羅的に解明することが必須である。現在までに我々は変形性関節症発症の大きな要因が、永久軟骨である関節軟骨の脱分化、肥大化に伴う ADAMTS、MMPs などの軟骨基質分解酵素の誘導であることを見出してきた (*Arthritis Rheum* 50:3561,2004、*Nature Med* 12:665,2006、*Arthritis Rheum* 54:2462,2006、*EMBO Rep* 8:504,2007、*J Clin Invest* 118:2506,2008)。(腫瘍と基質分解酵素について)しかし、現在のところ軟骨基質分解酵素を抑制しうる画期的な薬は未だ確立されていない。近年我々は軟骨肥大化の重要なマーカー遺伝子である X 型コラーゲン(COL10)のプロモーター領域に着目し、種間で高度に保存されているコアエンハンサー領域 HY box を同定した(*Arthritis Rheum* 60:166,2009)。また一方で、軟骨増殖、形成をリアルタイムに観察可能な蛍光モニタリング細胞システムを樹立し、それを用いて新規軟骨誘導因子の同定に成功した(*Arthritis Rheum* in press)。本研究の第 1 の目的は、この手法を用いた独自の軟骨基質分解酵素誘導の蛍光モニタリングシステムを樹立し変形性関節症の発症に関与する遺伝子を網羅的に解析、同定すること、そして第 2 の目的は、得られた候補遺伝子の機能解析を通じ軟骨変性を抑制しうる創薬を達成するための基礎的データを得ることである。

2. 研究の目的

変形性関節症の根本的治療法を目指し、変形性関節症発症の原因とされる軟骨基質分解酵素の誘導を可視的に判定できる細胞システムを樹立し、それを用いて新規軟骨基質分解酵素誘導因子を同定することに挑戦する。さらに同定された遺伝子の中から治療ターゲットとなりうる分子を選択しその機能解析を行うことで軟骨再生薬開発の創生のための基礎的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 軟骨基質分解酵素誘導モニタリングシステムの構築と新規誘導因子の同定
軟骨基質分解酵素誘導モニタリングシステムの確立のため、まず各分解酵素のプロモーター解析を行う。ヒト、サル、マウスなどデータベースで利用可能な生物種におけるプロモーター領域を comparative mapping により同源性調べ、種間により

高度に保存された領域を抽出し、この下流に蛍光レポーターをつないだコンストラクトを作成する。このレポーターコンストラクトを軟骨細胞前駆細胞株 ATDC5 に安定導入した後、インスリン刺激や炎症サイトカイン刺激で基質分解酵素の発現を誘導して、基質分解酵素の発現と蛍光が一致するクローンを選別する(基質分解酵素誘導モニタリングシステムの構築)。次に、この細胞システムにヒト正常関節軟骨と変形性関節症関節軟骨を起源とする cDNA からそれぞれ作成したレトロウィルスライブラリーを導入し発現クローニングを行う。その中で蛍光陽性細胞を選別し、その細胞にとりこまれたレトロウィルス遺伝子をシークエンスで確認、基質分解酵素誘導候補遺伝子を網羅的にスクリーニングする。そのなかで、2 つのライブラリーを比較し、変形性関節症関節軟骨のライブラリーで特異的に発現する候補遺伝子の選別と検証を行う。本研究課題は上述したように直接治療ターゲットになりうる分子の同定に挑むものであることから、リガンド、膜タンパク、受容体など創薬の観点から有望なターゲットを優先的に選択する。また、ヒト組織 cDNA パネルを用いた逆転写リアルタイム PCR により、同定された遺伝子が軟骨組織で発現しているかを確認する。その後、候補遺伝子の発現プラスミドベクターを作成、一過性強制発現系でルシフェラーゼ・レポーターアッセイにて基質分解酵素の転写活性を上昇させ、かつレトロウィルスによる安定導入系で RT-PCR により基質分解酵素 mRNA を誘導することを確認する。これらの実験により、候補因子の中でも基質分解酵素誘導に特に強く関与する因子を絞りこむ。また平成 24 年度以降の解析に備えて、候補遺伝子の gain-of-function のモデルとして II 型コラーゲンプロモーターの制御下に軟骨特異的に過剰発現するトランスジェニックマウス、loss-of-function のモデルとして Cre/loxP システムを用いたコンディショナルロックアウトマウスを作出する。すでに我々は軟骨特異的に標的遺伝子の機能をロックダウンするための Col2a1-Cre マウス、タモキシフェン誘導型 Col2a1-Cre マウスを保有している。さらに in vivo における候補遺伝子の局在を知る準備のため、まず初年度は同定遺伝子に対するポリクローナル抗体を宿主動物としてウサギを用いて作成する。

2) 得られた候補遺伝子についての機能解析
(a) In vitro における候補遺伝子の機能解析
既知軟骨基質分解酵素誘導のシグナル伝達系には、SMAD 経路、p38-MAPK 経路、Wnt-カテニン 経路、NF B 経路などが存在する。1)で得られた候補遺伝子を過剰発現させた細胞および siRNA を用いてその機能を抑制した系におけるこれらシグナル伝達分子の量的変化、リン酸化などの質的变化をウエ

スタンプロットティングにて評価し、候補因子と既知のシグナルとの関連について検討を行う。また、既に軟骨基質分解酵素誘導能が明らかになっている p63、C/EBP、HIF2 などの転写因子群について、候補遺伝子との相互作用の有無を *in vitro* における一過性の共導入および レトロウイルスによる安定導入の系で検証する。さらに、候補遺伝子の機能ドメインを Pfam や InterProScan などの web 上のツールを用いて同定する。同部位を欠失させたコンストラクトを作成することで、軟骨基質分解酵素誘導に関与しているドメインを確認する。(b) *In vivo* における候補遺伝子の機能解析

前年度作成した候補遺伝子に対するポリクローナル抗体を用いて、胎生および成体マウス成長

板・関節軟骨組織切片の免疫染色を行い、生理的条件下での発現パターンを評価する。前年度作成した候補遺伝子の改変マウスを用いて、不安定膝変形性関節症モデル(OAモデル)として我々が独自に開発した膝内側側副靭帯および内側半月板を切除したモデルを使用し、同定遺伝子改変マウスで変形性関節症の発症頻度や時期に差がみられるかどうか、軟骨破壊、骨棘形成の国際的な評価基準である OARSI スコアを用いて評価、検討する(Osteoarthritis Cartilage 13:632,2005)。同時に、軟骨マーカー分子、アグリカン分解産物などの発現パターンを比較検討する。また、遺伝子改変マウスの大腿骨頭を採取し、*ex vivo* culture を行い、炎症性サイトカイン刺激で上昇する基質分解酵素の発現、アグリカンの分解能に差があるか検討する。

最後に、*in vivo* における治療モデルの確立に挑むため、候補遺伝子の siRNA をコードしている アデノウイルスを作成し、これを週に 1 度の頻度でマウス膝関節内に注射する。実験的 OA モデルを作成し、siRNA アデノウイルスを注射した側で OA の進行が抑制できるかを確認する。アデノウイルスの発現範囲は特異的なポリクローナル抗体を用いて判定する。もし候補遺伝子に対する特異的なインヒビターが存在すれば、これを siRNA アデノウイルスの代わりに優先させて行う。また我々は、臨床応用を目指しアデノウイルスやレトロウイルスに変わる遺伝子導入技術の一つとして、高分子ナノミセル型キャリアーを開発している。(Mol Ther 15:1655,2007)。これにより副作用の少ない生体内への遺伝子導入が可能になる。以上より、新規基質分解酵素関連因子が変形性関節症発症に及ぼす影響を *in vivo* で評価でき、治療効果をも検討することが可能になる。

4. 研究成果

軟骨基質分解酵素の中でも、ADAMTS5 に着目し、解析を行った。ヒト、サル、マウスの ADAMTS5 promoter 5' 末端側約 2 kb の比較マッピングを行ったところ、転写開始点の上流約 1.4kb が種間で高度に保存されていた。さらに、この領域における結合モチーフとして NF- κ B、C/EBP、GATA、RUNX、AP-1、OCT、SOX、STAT および HIF を同定した。各モチーフに結合する転写因子全 12 因子を、非軟骨系細胞 HeLa および軟骨前駆細胞 ATDC5 に過剰発現させたところ、NF- κ B ファミリーメンバーである RelA が最も強力に ADAMTS5 転写活性を促進した (luciferase assay)。ADAMTS5 promoter 転写開始点上流 -1,196/-1,187、-896/-887 および -424/-415 bp の部位に NF- κ B モチーフが存在し、段階的 deletion、mutagenesis、tandem-repeat コンストラクトを用いた luciferase assay により、-1,196/-1,187 ではなく、-896/-887、-424/-415 の部位に応答領域を同定した。これらのモチーフと RelA との結合は、gel-shift assay で示され、その特異性は probe mutagenesis、非標識 probe による競合阻害、抗 RelA 抗体による supershift によって証明された。続いて RelA の機能解析を行った。ATDC5 細胞へのレトロウイルスベクターによる RelA の過剰発現は、内在性の ADAMTS5 遺伝子の mRNA 発現を強力に促進した。さらに、NF- κ B シグナルの誘導因子である IL-1 の ATDC5 細胞への投与は、RelA 遺伝子の mRNA 発現を反映して ADAMTS5 遺伝子の mRNA 発現を促進した。さらにこの IL-1 による ADAMTS5 遺伝子の発現誘導は、RelA 特異的な siRNA および NF- κ B シグナル阻害剤投与により抑制された。最後に、8 週齢のマウス実験モデルにおいて、RelA と ADAMTS5 は OA の進行とともに発現誘導され、変性した関節軟骨の軟骨細胞に共局在していた。この転写因子を欠失したマウス関節軟骨では、炎症性刺激による軟骨基質の分解は完全に抑制されており、Adamts5 の発現も抑制されていた。この転写因子を関節軟骨特異的にノックアウトしたマウスを用いて、実験的変形性関節症モデルの解析を行ったところ、骨細胞のアポトーシスが亢進し、変形性関節症の進行は促進した。

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1件)

Kobayashi H, Hirata M, Saito T, Itoh S, Chung UI, Kawaguchi H.

Transcriptional Induction of ADAMTS5 Protein by Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) Family Member RelA/p65 in Chondrocytes during Osteoarthritis Development.

J Biol Chem. 2013 Oct 4;288(40):28620-9. doi: 10.1074/jbc.M113.452169. Epub 2013 Aug 20.

Hosaka Y, Saito T, 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. 2013 Jan 29;110(5):1875-80

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. 2014 Apr 4;289(14):10192-200.

〔学会発表〕(計4件)

第26回 日本軟骨代謝学会

小林寛、平田真、伊藤祥三、齋藤琢、鄭雄一、中村耕三、川口浩

NF- B ファミリーメンバーRelA/p65 は、軟骨細胞のアポトーシスを阻害することで、骨格形成と変形性関節症の進行を制御する。

第28回日本整形外科学会基礎学術集会

小林寛、平田真、伊藤祥三、齋藤琢、鄭雄一、中村耕三、川口浩

NF- B ファミリーメンバーRelA/p65 は、軟骨細胞のアポトーシスを阻害することで、骨格形成と変形性関節症の進行を制御する。

OARSI Young investigator award

Kobayashi H, Hirata M, Saito T, Itoh S, , Hosaka Y, Akiyama H, Chung UI, Kawaguchi H.

NF- B family member RelA/p65 in chondrocytes controls skeletal growth and osteoarthritis development by inhibiting chondrocyte apoptosis.

ASBMR Young investigator award

Kobayashi H, Hirata M, Saito T, Itoh S, , Hosaka Y, Akiyama H, Chung UI, Kawaguchi H.

NF- B family member RelA/p65 in chondrocytes controls skeletal growth and osteoarthritis development by inhibiting chondrocyte apoptosis.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾 洋 (INUI HIROSHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60583119

(2) 研究分担者

伊藤 英也 (ITO HIDEYA)

東京大学・医学部附属病院・臨床登録医

研究者番号：30436464

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