

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670651

研究課題名(和文) Bach1により制御される関節軟骨保護機構の解明とZFPによる新規治療法の開発

研究課題名(英文) Bach1 deficiency reduces severity of osteoarthritis, and induction of HO-1 is a novel target in OA prevention.

研究代表者

味八木 茂 (Miyaki, Shigeru)

広島大学・大学病院・講師

研究者番号：10392490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症(OA)は、加齢や酸化ストレスなどに起因している。抗酸化物質であるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)は、加齢に伴い関節軟骨で発現が減少していた。しかし、HO-1の転写抑制因子であるBach1の欠損マウスは、加齢マウスの関節軟骨でHO-1が高発現しており、野生型マウスに比べて有意に関節組織におけるOA様変化を軽減していた。そして、Bach1の欠損マウスはオートファジー活性とSOD2の発現が維持されており、HO-1を介してSOD2の発現や酸化ストレスからアポトーシスの抑制に関与していた。それゆえ、HO-1の関節軟骨での誘導は、OA予防に有用であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Bach1 is a transcriptional repressor of Heme oxygenase-1 (HO-1), which is cytoprotective through its antioxidant effects. The objective of this study was to define the role of HO-1 in osteoarthritis (OA) development using in Bach1 deficient mice. HO-1 expression decreased with aging in articular cartilages. Bach1 deficient mice showed reduced severity of age-related OA and surgically-induced OA compared with wild-type mice. Autophagy marker LC3 and antioxidant SOD2 were increased in articular cartilage of Bach1 deficient mice compared with wild-type mice. The expression of SOD2 and the suppression of apoptosis in Bach1 deficient chondrocytes were mediated by HO-1. This may be due to maintenance of joint health by antioxidant effects through HO-1. These results suggest that HO-1 or inactivation of Bach1 is a novel target and signal pathway in OA prevention.

研究分野：整形外科 軟骨代謝学

キーワード：変形性関節症 酸化ストレス ヘムオキシゲナーゼ-1 SOD2 軟骨細胞 アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) は、我が国においてその患者数は約 2000 万人ともいわれている。OA は、主に加齢、メカニカルストレスの蓄積、炎症といった危険因子による関節環境の変化から軟骨代謝バランスの破綻をきたし、関節軟骨の変性・破壊を引き起こす。しかし、現在まで OA に対する治療は、痛みに対する対処療法であり、その原因療法や早期診断法の確立には至っていない。これらの問題を解決するためには、OA 発症の分子機構をより明らかにすることで、OA 予防・治療や初期診断につながる原因療法を目指した標的分子を解明していくことが必要である。

OA の発症には加齢や酸化ストレスなど様々な要素が関与している。ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) はヘム分解酵素であり、抗酸化や抗炎症といった細胞保護作用に働くことが知られており、多くの疾患モデルに対してその有用性が報告されている。しかし、OA におけるその役割は明らかになっていない。この抗酸化作用に重要な役割がある HO-1 の転写抑制因子である BTB and CNC homology 1 (Bach1) のノックアウトマウスは、恒常的に HO-1 が高発現していることから、このマウスを用いて、OA の病態における HO-1 の役割について解析できると考えた。

### 2. 研究の目的

ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) は、抗酸化など細胞保護作用を有し、炎症性疾患などの動物モデルでその有用性が報告されている。この HO-1 の転写抑制因子である Bach1 ノックアウトマウス (=HO-1 が高発現) が加齢による変形性関節症 (OA) を抑制するという予備データより、「Bach1KO により誘導される HO-1 および microRNA (miRNA) は、細胞保護作用などを介して健全な関節環境を維持する OA 予防分子およびシグナルである」と考えた。本研究では、

(1) Bach1 KO マウスの関節保護機能のメカニズムの一端を miRNA に着目して明らかにする  
(2) 亜鉛フィンガープロテイン (ZFP) を利用した Bach1 転写阻害による新たな HO-1 や miRNA 誘導法により OA 予防・治療法の開発を目的とする。

本研究は、OA メカニズムの解明だけでなく、様々な疾患にも効果のある新たなタンパク治療法の開発に繋がると期待する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 加齢に伴う膝関節における HO-1 の発現

① 野生型マウス (WT) と Bach1 KO 軟骨細胞より RNA を精製し、mRNA の網羅的発現解析を 3D-Gene mRNA チップを用いて解析した。また同時、Bach1 KO および HO-1 誘導剤により発現を変化させる miRNA の発現解析も miRNA マイクロアレーを用いて解析した。

② 酸化ストレスは、加齢あるいは OA の進行とともに増加する事が知られている。そこで、HO-1 が、加齢に伴いその発現様式を変化させるのか解析するために、幼齢 3 ヶ月齢マウスから 22 ヶ月齢の加齢マウスの膝関節を採取した。膝関節は、4%パラホルムアルデヒドで固定し、脱灰後パラフィン封埋したブロックより組織スライドを作製し、抗 HO-1 抗体を用いて免疫染色により観察した。

③ Bach1 KO マウスの関節軟骨細胞で HO-1 の発現が亢進しているのかを確認するために、マウス関節軟骨より軟骨細胞を単離、培養後にリアルタイム PCR およびウェスタンブロットにより確認すると共に、軟骨基質である *Col2a1*, *Aggrecan*, 軟骨基質分解酵素である *Adamts5*, *Mmp13* の発現を解析した。

#### (2) Bach1 KO マウスにおける膝関節評価

3 つの OA モデルにより、Bach1 KO マウスが OA 発症に対してどのような表現系を示すのかを明らかにする。

① 自然経過による加齢モデル (1、3、6、12、22 ヶ月齢) の評価。

② 外傷による 2 次性 OA として靭帯切除による OA 誘導モデルの評価。

③ アジュバンドとメチル化ウシ血清アルブミン (mBSA) により一過性の炎症を誘導した AIA (antigen induced arthritis) モデル  
上記の 3 種類の OA モデルを用いて膝関節組織をサフラニン O ファストグリーン染色、HE 染色を行い、関節組織の病理組織学的評価を軟骨および滑膜、半月板、軟骨下骨、骨棘のスコア化により OA 発症・進行の程度を評価した。

#### (3) Bach1 KO マウスにおける抗炎症作用

各サンプル回収時点に末梢血より血清を採取し、炎症性サイトカイン濃度を BioPlex システムにより測定することにより、Bach1 KO マウスにおける OA 誘導時の抗炎症作用を評価した。

#### (4) マウス関節組織におけるオートファジーの活性化や抗酸化マーカーの発現

OA 抑制に関与が報告されているオートファジーの活性化や抗酸化能を関節軟骨で観察するために、オートファジーのマーカーである microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)、抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ 2 (SOD2) などの発現を免疫組織染色により評価した。

#### (5) 軟骨細胞における HO-1 ノックダウンによる影響

Bach1 KO マウスで見られた効果が HO-1 によるものなのかを調べるために、関節軟骨細胞への siRNA 導入による HO-1 ノックダウン実験を行なった。

① 軟骨細胞における H0-1 によるオートファジー活性と SOD2 発現制御への関与をウェスタンブロット法により解析した。

② 軟骨分解酵素関連遺伝子である *Mmp13* や *Adams5* 遺伝子の発現制御への関与をリアルタイム PCR により解析した。

③ 酸化ストレスによるアポトーシス誘導に対する影響をカスパーゼ 3/7 を指標に解析した。

(6) 抗 Bach1-ZFP の作製と *in vitro* におけるその効果の検討

① ZFP は転写因子のモチーフとして見いだされた後、ZFP のアミノ酸配列と対応する DNA 結合配列の関連性が明らかとなり、現在では、目的 DNA 配列に結合する ZFP を設計できるようになってきた。Bach1 の遺伝子上流領域の配列に結合する ZFP を設計し、組換えタンパク質を調整する。産業応用に対応できるように、ZFP は大腸菌発現系 (pET/BL21 (DE3)) と His<sub>6</sub> タグによるシステムを用いて、タンパク質の発現および精製を行った。

② 作製した Bach1 に対する ZFP を培養軟骨細胞へ添加し、Bach1 遺伝子の発現が抑制されていることや H0-1 の発現が増加していることをリアルタイム PCR により確認した。

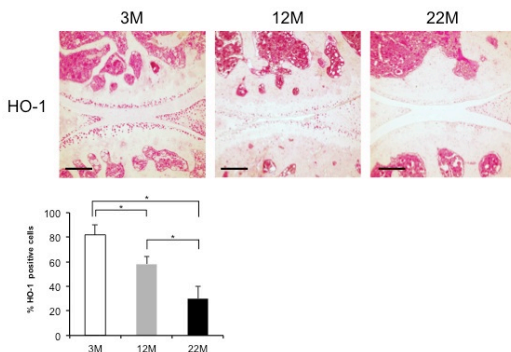
#### 4. 研究成果

(1) 膝関節軟骨における H0-1 の発現

① マイクロアレーの結果、1 ヶ月齢の Bach1 KO マウスの関節軟骨細胞では、野生型マウスに比べて H0-1 の発現が 3.6 倍増加しており、Bach1 KO マウスで増加している遺伝子群の上位 10 位に含まれ、その中で最も高い発現量であった。Bach-1 KO および H0-1 誘導剤により発現を変化させる miRNA を同定した。

② 野生型マウスにおいて H0-1 は、加齢とともに軟骨や半月板においてその発現が減少しており、12 ヶ月齢から 22 ヶ月齢にかけてその発現はほとんど消失していた (図 1)。

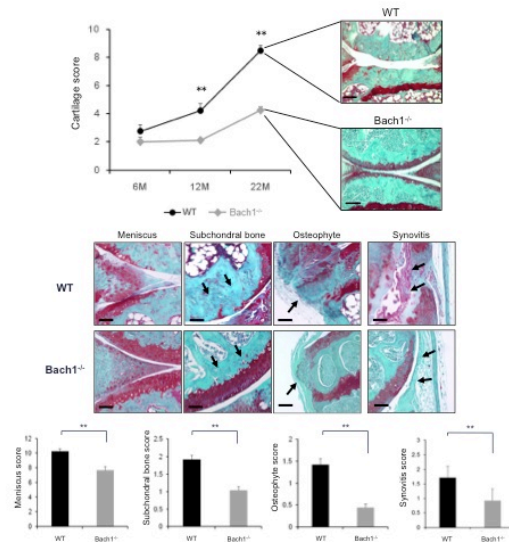
図1. マウス膝関節における加齢に伴うH0-1の発現変化



(2) Bach1 KO マウスにおける膝関節評価

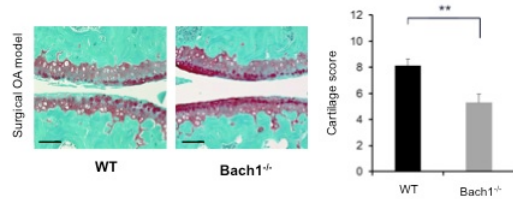
① 22 ヶ月齢の老齢マウスにおいて、Bach1 KO マウスは野生型マウスに比べて H0-1 の発現を保ち、加齢による体重増加も抑制していた。膝関節組織の OA 病態評価は、自然加齢マウスでは、12 ヶ月齢で野生型マウスに比べて Bach1 KO マウスで有意に軟骨破壊・変性、半月板の変性、滑膜増生、軟骨下骨の変性などを抑制し、22 ヶ月齢でも同様に Bach1 KO マウスでは OA 様の変化を抑制していた (図 2)。

図2. マウス膝関節における加齢に伴うOA様変化



② 靭帯切除による OA 誘導モデルも同様に靭帯切除 8 週後において野生型マウスに比べて Bach1 KO マウスでは OA の進行を有意に抑制した (図 3)。

図3. 靭帯切除によるOA誘導モデル

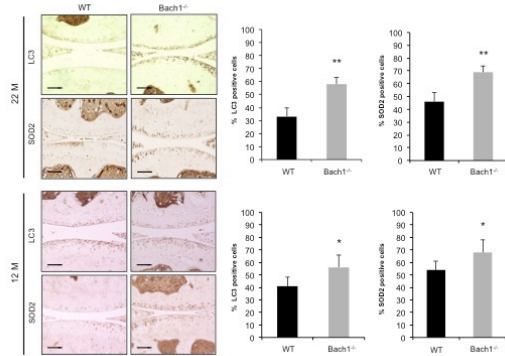


③ 一過性の炎症を誘導した AIA モデルにおいて Bach1 KO マウスは、軟骨変性や滑膜増生を有意に抑制しなかった。

(3) Bach1 KO マウスにおける抗炎症作用  
これまで H0-1 による抗炎症作用が報告されている。野生型マウスにおける炎症性サイトカインの濃度は加齢により増加していたが、Bach1 KO マウスでは加齢による炎症性サイトカインの増加はみられなかった。しかし、OA 誘導モデルや AIA モデルにおける炎症性サイトカインは、野生型および Bach1 KO マウスで増加しており、Bach1 KO による強力な抗炎症作用はみられなかった。

(4) 加齢モデル (12、22 ヶ月齢) と OA 誘導モデルでは、野生型に比べて Bach1 KO マウスの関節軟骨でオートファジーマーカーの一つである LC3 や抗酸化酵素である SOD2 の発現が有意に増加していた (図 4)。近年、SOD2 やオートファジー活性は、加齢や OA により低下していること、また、ラパマイシンによるオートファジー活性の誘導は、OA 誘導モデルにおける OA 様変化を抑制することが報告されていることから SOD2 やオートファジー活性の維持が軟骨保護に重要であると考えられる。

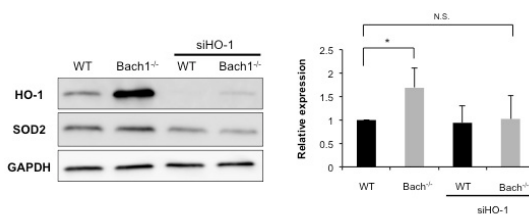
図4. Bach1 KOマウスはオートファジーやSOD2の発現を維持している



(5) 軟骨細胞における HO-1 ノックダウンによる影響

① Bach1 KO による SOD2 の発現増加は、siRNA による HO-1 ノックダウンにより HO-1 が SOD2 の発現を直接制御している事が明らかになった (図 5)。しかし、HO-1 はオートファジーマーカーである LC3 を直接的に制御していなかった。

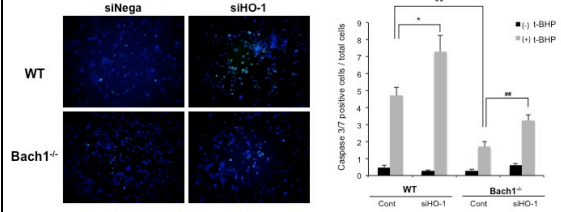
図5. 軟骨細胞においてHO-1はSOD2の発現を制御している



② 野生型軟骨細胞において炎症性サイトカインである IL-1β により発現を増加させた *Mmp13* や *Adams5* 遺伝子は、Bach1 KO 軟骨でその発現を減少させたが、それは HO-1 依存的ではなかった。

③ 酸化ストレスによりアポトーシスを誘導した軟骨細胞は、野生型に比べ有意に Bach1 KO でアポトーシスを抑制し、それは HO-1 依存的であった (図 6)。

図6. Bach1 KO 軟骨細胞は HO-1 依存的に酸化ストレスによるアポトーシスを抑制する



以上の結果より、Bach1 KO マウスでは、加齢に伴い低下する HO-1 や SOD2 の発現を維持することで抗酸化作用など関節軟骨細胞における保護機能を維持し、OA の進行を抑制する事が明らかになった。

(6) 抗 Bach1-ZFP の作製と *in vitro* におけるその効果の検討

① Bach1 の遺伝子上流領域の配列に結合する ZFP を設計し、目的の組換えタンパク質を得た。

② 作製した Bach1 に対する ZFP を培養軟骨細胞へ添加し、Bach1 遺伝子の発現が抑制されていることおよび HO-1 の発現が増加していることをリアルタイム PCR により確認したが、その程度が非常に低いことから更なる改良を行っている。それゆえ、マウスへの投与など治療への応用にはまだ至っていない。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

1. 高田 剛志, Bach1 欠損マウスは HO-1 やアナボリック microRNA の誘導により変形性関節症を軽減する 第 28 回日本軟骨代謝学会 2015 年 3 月 6 日・7 日、東京医科歯科大学 (東京・文京区)

2. 高田 剛志, Bach1 ノックアウトマウスは加齢性および実験的変形性関節症の症状を軽減する 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014 年 10 月 9 日・10 日、城山観光ホテル (鹿児島・鹿児島市)

3. T. Takada, Bach1 deficient mice reduce severity of age-related and experimental osteoarthritis Osteoarthritis Research Society International (OARSI), April 25- 27, 2014, France (Paris)

4. T. Takada, Bach1 deficient mice reduce severity of age-related osteoarthritis through the maintenance of autophagy and SOD2 Orthopaedic Research Society (ORS), March

15-18, 2014, USA (New Orleans)

5. 高田 剛志, Bach1 ノックアウトマウスは H0-1 の発現により変形性膝関節症の進行を予防する 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17 日・18 日、幕張メッセ国際会議場 (千葉・千葉市)

6. T. Takada, Bach1 deficient mice reduces severity of age-related osteoarthritis  
Osteoarthritis Research Society International (OARSI), April 18-21, 2013, USA (Philadelphia)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

味八木 茂 (Miyaki Shigeru)  
広島大学・病院・講師  
研究者番号：10392490

(2) 研究分担者

中佐 智幸 (Nakasa Tomoyuki)  
広島大学・病院・病院助教  
研究者番号：60467769

加藤 義雄 (Kato, Yoshio)  
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオ  
メディカル研究部門・研究員  
研究者番号：20415657