

平成 30 年 8 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2017

課題番号：25861328

研究課題名(和文) 関節軟骨変性過程におけるC/EBPbetaを中心とした遺伝子発現解析

研究課題名(英文) Gene expression analysis in articular cartilage degeneration focused on the role of transcriptional factor C / EBP beta

研究代表者

林田 光正 (HAYASHIDA, MITSUMASA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40644787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：関節軟骨変性疾患における、転写因子C/EBPbetaの役割を明らかとする事を目的とした。先行研究においてin vitroではC/EBPbetaが軟骨分解酵素の発現を亢進する事で、軟骨変性過程を促進する事を明らかとした。他の因子との相互作用を解明し、治療標的因子としての可能性を明らかとするため、C/EBPbetaの強制発現ないし抑制実験を進めたが明らかな結果は得られなかった。軟骨細胞はその特異性のため効率的な遺伝子導入が困難であった事が原因であると考えられた。実験計画を修正し、C/EBPbetaの骨化作用に着目し、靭帯骨化の臨床研究を行い学会発表を行った。現在論文作成を行っている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reveal the role of C/EBP beta in a joint cartilage degenerative disease. In the previous study, we elucidated that C/EBP beta regulates the expression of cartilage degradative enzyme in vivo and vitro. We hypothesized that C/EBP beta plays a central role in the process of cartilage metabolism, especially in that of degradation. In this study, we examine that C/EBP beta mediates the interaction with the other transcriptional factors and suppresses the catabolic factors resulting in cartilage degeneration. The result obtained was not what we were hypothesized as mentioned above. The problem of this study is considered that the gene transportation to the chondrocyte is technically difficult. We converted an experimental design to the ossification process of the chondrocyte. We already have presented the result of this study at an academic conference and are planning to publish a paper to the scholarly article.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：軟骨代謝 転写因子 靭帯骨化

## 1. 研究開始当初の背景

C/EBP ファミリーに属する転写因子は脂肪分化、骨化、炎症の場で多くの機能を持つ有力な転写因子であることが知られている。その中でも、本研究代表者は軟骨の分化過程における C/EBP beta の働きに着目し、炎症性疾患における関節軟骨の変性過程における C/EBP beta の働きを解明してきた。

先行研究においてまず in vitro において、転写因子 C/EBP beta が軟骨分解酵素 MMP13 の発現を亢進し、MMP13 プロモーターの C/EBP beta 結合領域に C/EBP beta が結合していることを、Luciferase assay、ChIP assay を行って明らかとした。

MMP13 プロモーターの C/EBP beta 結合領域に変異を加え、C/EBP beta の結合を阻害する事ことで、MMP13 の発現が低下する事を明らかとした。

また軟骨変性疾患である変形性関節症、関節リウマチにおける関節軟骨において C/EBP beta と MMP13 が共発現していることを免疫染色で明らかとした。以上から関節軟骨において C/EBP beta は直接 MMP13 プロモーターに結合し発現を亢進していると考えられた。

さらに同様の研究を行い MMP3 の発現も調節していること、共同研究者の協力により、明らかとし、世界的に評価の高い科学雑誌に投稿した。

以上の結果から C/EBP beta は軟骨変性過程における強力な調節因子であることが証明された。

さらに軟骨変性過程だけではなく、コラーゲンなどの軟骨特異的基質タンパクの発現亢進を調節している可能性が示唆された。

以上の結果と考察から、転写因子 C/EBP beta は多くの機能を持つ有力な軟骨代謝調節因子であると考えられた。

## 2. 研究の目的

変形性関節症や関節リウマチのような関節軟骨変性疾患における、転写因子 C/EBP beta は更なる機能や役割有している可能性が高いと考えられ、その機能を明らかとする事で変形性関節症、関節リウマチにおける関節軟骨治療に有益な治療標的とすることを目的とした。

軟骨変性過程における C/EBP beta と他の

因子との相互作用を解明し、治療標的因子としての可能性高めることを最終的な目的とした。

## 3. 研究の方法

軟骨細胞である ATDC5、C28-I2 細胞を使用。ヒトから採取された関節軟骨細胞を使用。滑膜細胞を使用した。

Lipofection, Electroporation, Adeno virus によって、上記の各種細胞に C/EBP beta を強制発現させた。

同様に Lipofection, Electroporation, Adeno virus によって、上記の各種細胞に transfection し、転写活性化領域を持たない C/EBP beta dominant negative form (LIP) を強制発現させた。

上記の gene transportation を行った軟骨細胞、滑膜細胞を PCR、Western blotting により、発現亢進 or 減弱を検討した。

ターゲットとなる分子を関節軟骨で免疫染色した。

## 4. 研究成果

C/EBP beta は多くの機能を有するため、必要な細胞に必要なタイミングで必要な量だけ発現する実験計画を立てる必要があった。もっとも関心を寄せている領域は、関節軟骨細胞へ C/EBP beta を導入し治療に役立てる事である。注目している C/EBP beta の役割は、軟骨変性疾患における main regulator としての役割と、軟骨の分化、靭帯の骨化における役割である。

Lipofection, Electroporation, Adeno virus による gene transportation を軟骨細胞、滑膜細胞に行ったが、軟骨細胞への gene transport は困難を伴い、時間を費やした。

軟骨細胞は基質を産生するため Lipofection による遺伝子導入効率は低かった。

Electroporation を行ったが、導入効率は高くなるものの軟骨細胞が損傷を受け、細胞の活性が低下した。細胞を換え実験を継続したが C/EBP beta 導入後に細胞毒性が高く認められ、導入された細胞の活性が下がり、その後の細胞活動の低下や細胞の apoptosis が誘導された。

Adeno virus による gene transportation

をデザインした。

さらに C/EBPbeta には、転写活性化領域を有する 36kD の LAP と転写活性化領域を有しない 20kD LIP という異なる作用をもつ isoform が存在することに着目した。LIP は LAP に対して dominant negative form として作用すると考えられており、プロモーター上の C/EBP beta 結合領域を占拠することで、C/EBP beta の機能を抑制すると考えられている。

そこで LIP を発現する Adenovirus を作成し、培養軟骨細胞に対し LIP を over expression させ、C/EBP beta のシグナルを効果的に抑制出来るか検討を行った。

導入効率は高く、実験は成立していたが導入された LIP は dominant negative form として作用せず、シグナルの抑制が出来なかった。

他研究者から寄贈された LIP を発現する renti virus を用い実験を継続したが、同様な結果であり、頭書のような結果が得られなかった。

その後 C/EBP beta の dominant negative form を導入した Adenovirus による実験を、細胞を換えて継続した。軟骨細胞同様に C/EBP beta の dominant negative form を導入した Adeno virus を使用した gene transportation は、高確率に細胞に LIP を導入する事が出来た。しかし dominant negative form の導入では、C/EBP beta の働きを抑制する事は困難だった。むしろ MMP の発現がやや上昇しており、発現抑制には導けなかった。以上の結果は MMP ファミリー因子の補完による発現上昇であるかと結論づけた。

軟骨変性過程における C/EBP beta と他の因子との相互作用を さらに解明し、治療標的因子としての可能性を明らかにするため、C/EBP beta の強制発現ないし抑制実験を進め、免疫沈降によるその他因子の結合を確かめた。

しかしながら、思うような結果が得られず、実験計画の期限が迫ってきたため、頭書の実験計画を修正し、C/EBP beta の骨化作用に着目し、靭帯骨化の臨床研究を行った。

胸椎後縦靭帯骨化症の臨床成績を検討し、学会発表を行い、現在論文作成 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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

胸椎後縦靭帯骨化症に対する手術成績  
福岡脊椎外科グループによる多施設後ろ向き研究

林田 光正, 播広谷 勝三, 中島 康晴 第 86 回 西日本脊椎研究会 (2016/11/12)

胸椎後縦靭帯骨化症に対する手術例の検討  
福岡脊椎外科グループによる多施設後ろ向き研究

林田 光正, 播広谷 勝三, 岩本 幸英 日本整形外科学会学術集会 (2016/5/21)

"Clinical Results and Complications of Surgical Treatment for Thoracic Myelopathy Caused by Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament: A Multicenter Retrospective Study"

林田 光正, 播広谷 勝三, 岩本 幸英 EUROSPINE 2015 (2015/9/2)

胸椎後縦靭帯骨化症に対する治療成績 -多施設共同研究 (最終報告) -

林田 光正, 播広谷 勝三, 岩本 幸英 福岡脊椎外科フォーラム (2014/12/6)

軟骨の発生から老化まで 分子の関わりを紐解く 軟骨細胞肥大分化に関わる分子メカニズム

岡崎 賢, 牛島 貴宏, 津嶋 秀俊, 石原 康平, 林田 光正, 岩本 幸英 第 29 回 日本整形外科学会基礎学術集会 (2014/10/10)

〔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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者 林田光正  
(Mitsumasa Hayashida)  
九州大学整形外科 助教  
研究者番号：40644787

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
( )