

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462285

研究課題名(和文)変形性関節症への臨床応用を目指したTaceシグナルの網羅的機能解析

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of osteoarthritis regulation by Tace signaling

研究代表者

乾 洋 (INUI, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60583119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：TNF-alpha converting enzyme (Tace) は別称a disintegrin and metalloproteinase domain 17 (Adam17)としても知られ、膜貫通型酵素の一つであり、複数のシグナル経路の活性化に関与する。本研究では、Taceが変形性関節症の発症においてどのような作用を有するかを調べ、その阻害剤が変形性関節症の治療や予防に有用かを検討してきた。培養細胞レベルでも、生体レベルでも、Taceは軟骨細胞を変性させる作用があり、Taceをノックアウトしたマウスでは変形性関節症の進行が遅れ、阻害剤を用いても同様の結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：TNF-alpha converting enzyme (Tace), also known as a disintegrin and metalloproteinase domain 17 (Adam17), is a transmembrane enzyme which regulates various signaling pathways. Here, we have investigated how Tace regulates osteoarthritis development. Cell culture experiments and mouse experiments have revealed that Tace exerts catabolic effects on chondrocytes or cartilage.

研究分野：整形外科学

キーワード：整形外科学 関節病学

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口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。しかしながら、その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、および変性した軟骨の修復・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 (Osteoarthritis Cartilage 13:632,2005) とともに、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 54:2462,2006, Nat Med 12:665,2006, 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、変形性関節症の分子背景の解明に多大な業績を上げてきた (Nature Med 16:678,2010) 。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。近年 Notch シグナルが骨格形成において軟骨内骨化を強く制御していることが報告されており、我々はシグナルの中途に位置する転写共役分子である Rbpj の軟骨特異的ノックアウトマウスにおいてマウス変形性関節症モデルを作成し、その進行が著明に抑制される事を突き止めた (PNAS 110:1875, 2013) 。

我々は Notch シグナルの研究過程において重要な役割を果たしている酵素である Tace に着目した。Tace は Notch シグナルにおいては細胞表面の Notch 受容体の細胞外ドメインを切離し、活性化する。Tace は Notch シグナルの中間点においての役割の他、EGFR リガンドや pro TNF- α 、IL-6 受容体など様々な因子を切離して活性化する事が知られており、Notch のみならず複数のシグナル経路に関わっている。これらのシグナルはいずれも炎症発生や軟骨内骨化を進める方向のもので、変形性関節症発症に対して促進的に働く事が予想される。近年軟骨細胞特異的に Tace をノックアウトしたマウスを作成したところ、軟骨内骨化が強く抑制される事が相次いで二つの施設より報告された。また、我々の研究で軟骨細胞において Tace をノックアウトしたところ、軟骨変性の際に働くと考えられている分化マーカー

である Mmp13 の発現が低下した(データ未公表)。Tace の阻害は Notch シグナルのみならず複数の経路を介して変形性関節症の発症に対して抑制的な効果が期待できる。酵素であるため、その阻害は特異的な低分子化合物等により可能であり、転写因子等と異なり、その活性に介入する事は簡便であり、治療ターゲットとしても非常に魅力的な特徴を有する。よって Tace の軟骨分化、変性に対する機能解析はきわめて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、その標的分子およびシグナル経路を *in vitro*, *in vivo* で詳細に解析し、変形性関節症発症において Tace が果たす役割を明らかにするとともに、さらにそれを阻害しうるような低分子化合物や抗体を探索する事によって変形性関節症の新規治療薬や予防薬の開発につなげる事を目的とする。

3. 研究の方法

マウス、ヒトの正常・変形性関節症関節軟骨のサンプルの発現解析などにより、軟骨分化、および変形性関節症発症の際に Tace が主に作用している標的分子およびシグナル経路を探り出す。培養細胞系にてこれらの分子・シグナル経路の作用を実験的に検証し、軟骨変性に促進的に作用する Tace 依存性のシグナル経路を絞り込み、さらに flox マウスを作製して *in vivo* にて詳細な解析を行う。OA 進行に重要な役割を果たすことが証明されたシグナル経路については、*in vitro*, *in vivo* で得られたサンプルをマイクロアレイ解析・パスウェイ解析することにより、標的とした場合に起こる影響などを広く予想する。関節軟骨への悪影響が少ないことが予想されれば、Tace 阻害薬を中心としたターゲッティングを行い、マウス OA モデルを用いた治療実験までを行う。

4. 研究成果

Tace を軟骨系細胞株である ATDC5 に強制発現させたところ、Tace は軟骨基質の主成分 2 型コラーゲンの分解酵素である matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) など、軟骨異化作用を有する分子群の発現を強く誘導した。また Tace の抑制は、これらの異化分子の発現を抑制する傾向があった。タモキシフェン誘導性の軟骨細胞特異的 Cre マウスと Tace-flox マウスを交配させ、骨格成長後にタモキシフェンを投与して関節軟骨でのみ Tace をノックアウトさせ、内側半月板と内側側副靭帯を切除して変形性関節症を誘発したところ、Tace のノックアウトマウスでは有意に軟骨変性が抑制された。Tace のノックアウトによって MMP-13 などの軟骨異化分子の発現も抑制されていたが、当初下流シグナルと考えていた Notch シグナルの変動は少なく、これらの作用

はEGFシグナルやTNF-alphaを介して起きているのではないかと考え、現在も実験を続けている。またドラッグスクリーニングによって2種類の化合物がTace抑制作用を有することが分かり、野生型マウスの変形性関節症モデルの膝に定期的に注射する実験を行い、現在結果を解析しているが、パイロット実験の結果では有意に変形性関節症の進行を抑制しうることが示唆されており、将来の実用化も期待される。

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. Taniguchi Y, Kawata M, Chang SH, Mori D, Okada K, Kobayashi H, Sugita S, Hosaka Y, Inui H, Taketomi S, Yano F, Ikeda T, Akiyama H, Mills AA, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, and Saito T. Regulation of Chondrocyte Survival in Mouse Articular Cartilage by p63. *Arthritis Rheumatol*. 69:598-609, 2017. doi: 10.1002/art.39976.
2. Kobahashi H, Chang SH, Mori D, Itoh S, Hirata M, Hosaka Y, Taniguchi Y, Okada K, Mori Y, Yano F, Chung UI, Akiyama H, Kawaguchi K, Tanaka S, and Saito T. Biphasic regulation of chondrocytes by Rela through induction of anti-apoptotic and catabolic target genes. *Nat Commun*. 7:13336, 2016. doi: 10.1038/ncomms13336.
3. Aini H, Itaka K, Fujisawa A, Uchida H, Uchida S, Fukushima S, Kataoka K, Saito T, Chung UI, Ohba S. Messenger RNA delivery of a cartilage-anabolic transcription factor as a disease-modifying strategy for osteoarthritis treatment. *Sci Rep*. 6:18743, 2016. doi: 10.1038/srep18743.
4. Inui H, Taketomi S, Yamagami R, Sanada T, Tanaka S. Twice cutting method reduces tibial cutting error in unicompartmental knee arthroplasty *The Knee*. 2016; 13: 173-176
5. Inui H, Taketomi S, Yamagami R, Tahara K, Shirakawa N, Sanada T, Tanaka S. Impingement of the mobile bearing on the lateral wall of the tibial tray in unicompartmental knee arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2016; 31(7): 1459-1464.
6. Inui H, Taketomi S, Yamagami R, Tahara K, Tanaka S. Snapping pes syndrome after unicompartmental knee arthroplasty. *Knee Surgery and Related Research* 2016; 28(2):172-175
7. Chang SH, Yasui T, Taketomi S, Matsumoto T, Kim-Kaneyama J, Omiya T, Hosaka Y, Inui H, Omata Y, Yamagami R, Mori D, Yano F, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Comparison of mouse and human ankles and establishment of mouse ankle osteoarthritis models by surgically-induced instability. *Osteoarthritis Cartilage*. 24:688-97, 2016. doi: 10.1016/j.joca.2015.11.008.
8. Saito T, Yano F, Mori D, Kawata M, Hoshi K, Takato T, Masaki H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Chung UI, Tanaka S. Hyaline Cartilage Formation and Tumorigenesis of Implanted Tissues Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Biomed Res*. 36:179-86, 2015. doi: 10.2220/biomedres.36.179.
9. Sugita S, Hosaka Y, Okada K, Mori D, Yano F, Kobahashi H, Taniguchi Y, Mori Y, Okuma T, Chang SH, Kawata M, Taketomi S, Chikuda H, Akiyama H, Kageyama R, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, Ohba S, Saito T. Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112:3080-5, 2015. doi: 10.1073/pnas.1419699112.
10. Okuma T, Hirata M, Yano F, Mori D, Kawaguchi H, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Regulation of Mouse Chondrocyte Differentiation by CCAAT/Enhancer-binding Proteins. *Biomed Res*. 36:21-9, 2015. doi: 10.2220/biomedres.36.21.
11. Okada K, Fukai A, Mori D, Hosaka Y, Yano F, Chung UI, Kawaguchi H, Tanaka S, Ikeda T and Saito T. Identification of SCAN domain zinc-finger gene ZNF449 as a novel factor of chondrogenesis. *PLoS One*. 9:e115169, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0115169.
12. Fujiwara S, Hoshikawa S, Ueno T, Hirata M, Saito T, Ikeda T, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S, Ogata T. SOX10 Transactivates S100B to Suppress Schwann Cell Proliferation and to Promote Myelination. *PLoS One*. 9:e115400, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0115400.
13. Mori Y, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Determination of differential gene expression profiles in superficial and deeper zones of mature rat articular cartilage using RNA sequencing of laser microdissected tissue specimens. *Biomed Res*. 35:263-70, 2014.
14. Mori Y, Mori D, Chung UI, Tanaka S, Heierhorst J, Buchou T, Baudier J, Kawaguchi H, Saito T. S100A1 and S100B are dispensable for endochondral ossification during skeletal development. *Biomed Res*. 35:243-50, 2014.
15. Yano F, Ohba S, Hosaka Y, Saito T, Chung UI. Disease-modifying effects of TD-198946 on progressed osteoarthritis in a mouse model. *Ann Rheum Dis*. 73:2062-4, 2014. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205672.
16. Kanke K, Masaki H, Saito T, Komiyama Y, Hojo H, Nakauchi H, Lichtler AC, Takato T, Chung UI, Ohba S. Stepwise Differentiation

- of Pluripotent Stem Cells into Osteoblasts Using Four Small Molecules under Serum-free and Feeder-free Conditions. *Stem Cell Reports*. 2:751-60, 2014. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.04.016.
17. 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. doi: 10.1074/jbc.M113.524090.
全て査読あり

[学会発表](計 34件)

- 1) Soma K, et al. Roles Of R-spondin2; The Susceptibility Gene For Ossification Of Posterior Longitudinal Ligament. Annual meeting of the Orthopaedic Research Society. San Diego 2017.3.19 (採択済)
- 2) 矢野文子、他：Runx1による軟骨分化制御機構 第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡、2016.10.13
- 3) 相馬一仁、他：後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子RSPO2の検討 第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡、2016.10.13
- 4) 牧井勇磨、他：転写因子HIF-2 α は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡、2016.10.13
- 5) 張成虎、他：軟骨に対するメカニカルストレスの作用 第17回運動器科学研究会、大阪、2016.9.3
- 6) Kawata M, et al. Different regulation of limb development by p63 transcript variants. Australian and New Zealand Bone and Mineral Society. Gold Coast 2016.8.21
- 7) Makii Y, et al. Transcription factor HIF-2 α is expressed in superficial zone of articular cartilage, and contributes to joint homeostasis. Australian and New Zealand Bone and Mineral Society. Gold Coast. 2016.8.21
- 8) 矢野文子、他：Runx1による軟骨分化制御機構 第34回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2016.7.22
- 9) 尾市健、他：腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立、第34回日本骨代謝学会学術総会、大阪、2016.7.20-23 (ポスター)
- 10) 河田学、他：p63 transcript variantsによる四肢発生の多様な制御機構 第34回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2016.7.21
- 11) 牧井勇磨、他：転写因子HIF-2 α は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第34回日本骨代謝学会学術集会、大阪 2016.07.21
- 12) 牧井勇磨、他：転写因子HIF-2 α は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第2回日本骨免疫学会、沖縄、2016.7.8
- 13) 尾市健、他：腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立、第2回日本骨免疫学会、沖縄、2016.7.6 (ポスター)
- 14) 矢野文子、他：Runx1による軟骨分化制御機構 第2回骨免疫学会、沖縄、2016.7.6
- 15) Kawata M, et al. Different regulation of limb development by p63 transcript variants. Annual meeting of the Orthopaedic Research Society. Orlando 2016. 3. 8
- 16) 河田学、他：p63 transcript variantsによる四肢発生の多様な制御機構 第29回日本骨代謝学会、広島、2016.2.19
- 17) 尾市健、他：腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立 第29回日本骨代謝学会、広島、2016.2.19
- 18) 張成虎、他：マウス変形性足関節症モデルの確立 第30回日本整形外科学会基礎学術集会 富山 2015.10.22-23
- 19) Kawata M, et al. Different regulation of limb development by p63 transcript variants. Annual meeting of the American Society for bone and mineral research. Seattle 2015.10.9-12
- 20) Chang SH, et al. Identification of Grem1 as a catabolic factor induced by mechanical stress loading in articular chondrocyte. Annual meeting of Osteoarthritis Research Society International. Seattle 2015.4.30 (**Young Investigator Award 受賞**)
- 21) Makii Y, et al. Gait Analyses of Surgically Induced osteoarthritis model mice by motion capture system. Annual meeting of Osteoarthritis Research Society International. Seattle 2015.4.30
- 22) Chang SH, et al. Establishment of Surgical Destabilization Model of Mouse Ankle Osteoarthritis. Annual meeting of the Orthopaedic Research Society. Las vegas, 2015.3. 28-31
- 23) Chang SH, et al. Identification of Grem1 as a catabolic factor induced by mechanical stress loading in articular chondrocyte. Cold Spring Harbor Asia conferences. Suzhou, China 2014.11.5
- 24) 河田学、他：p63による四肢発生の制御機構 第29回日本整形外科学会基礎学術集会 鹿児島 2014.10.10
- 25) 張成虎、他：Gremlin1は力学的負荷により誘導され、関節軟骨にcatabolicに作用する 第29回日本整形外科学会基礎学術集会 鹿児島 2014.10.10
- 26) 岡田慶太、他：関節軟骨の形成・維持におけるHIF-1 α の機能解析 第29回日本整形外科学会基礎学術集会 鹿児島 2014.10.09
- 27) 大隈知威、他：軟骨細胞におけるCCAAT/エンハンサー結合タンパク質ファミリー

の発現と機能 第29回日本整形外科学会
基礎学術集会 鹿児島 2014.10.9

- 28) Chang SH, et al. Identification of Grem1 as a catabolic factor induced by mechanical stress loading in articular chondrocyte. Annual meeting of the American Society for bone and mineral research. Houston 2014.9.15 (**Young Investigator Award 受賞**)
- 29) Okada K, et al. HIF-1 α IS ESSENTIAL FOR ARTICULAR CARTILAGE HOMEOSTASIS THROUGH INDUCTION OF ANABOLIC FACTORS AND SUPPRESSION OF CATABOLIC FACTORS. Annual meeting of the American Society for bone and mineral research. Houston 2014.9.16
- 30) Okuma T, et al. Expression and function of CCAAT/enhancer-binding protein family in chondrocytes. Annual meeting of the American Society for bone and mineral research. Houston 2014.9.12
- 31) Okada K, et al. HIF-1 α REGULATES CONFIGURATION AND MAINTENANCE OF ARTICULAR CARTILAGE THROUGH INDUCTION OF ANABOLIC FACTORS AND SUPPRESSION OF CATABOLIC FACTORS. Annual meeting of Osteoarthritis Research Society International. Paris 2014.4.26
- 32) Chang SH, et al. Identification of Grem1 as a catabolic factor induced by mechanical stress loading in articular chondrocyte. Annual meeting of Osteoarthritis Research Society International. Paris 2014.4.25
- 33) Okuma T, et al. Expression and function of CCAAT/enhancer-binding protein family in chondrocytes. Annual meeting of Osteoarthritis Research Society International. Paris 2014.4.24
- 34) Sugita S, et al. Transcription factor hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with CaMKII. Annual meeting of Osteoarthritis Research Society International. Paris 2014.4.25

〔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：
取得年月日：
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
東京大学医学部整形外科
<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

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・講師
研究者番号：60583119

(2) 研究分担者

齋藤 琢 (SAITO Taku)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30456107

篠田 裕介 (SHINODA Yusuke)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80456110