

骨関節炎の発症過程におけるインディアンヘッジホッグシグナルと転写因子ネットワークの相互関係の解明

大阪大学大学院 歯学研究科 生化学教室
西村 理行

1. はじめに：緒言、目的、背景、序論

我が国では、骨関節炎を始めとする軟骨疾患の患者数は、約1000万人と増加の一途をたどっている。WHOは、21世紀初頭の10年間で「骨と関節の世紀」と位置づけており、軟骨疾患に対して、“科学的に有効な対策を講じる必要性”を提唱している。

骨関節炎に対する有効な治療法を開発するためには、軟骨分化の制御メカニズムに対する理解が必須である。内軟骨性骨形成は、未分化間葉系細胞の凝集に始まり、軟骨細胞の増殖、分化、肥大化、アポトーシスを経て、軟骨組織への血管侵入ならびに骨組織への置換にて完結する。この内軟骨性骨形成過程は、連続的に移行する複雑かつユニークな生物学現象である。一方、関節軟骨は、肥大化およびアポトーシスを来たさずに、生涯、永久軟骨細胞として存在する。したがって、軟骨細胞の肥大化とアポトーシスを伴う骨関節炎の治療法を開発するためには、軟骨細胞の肥大化を抑制することが不可欠である。

軟骨形成の初期過程においては、転写因子Sox9が必須的役割を果たしている。一方Sox9は、軟骨の肥大化および石灰化に対しては、抑制的に機能していると示唆されている。さらに軟骨の肥大化には転写因子Runx2およびRunx3が必要不可欠であることが示されている。すなわち、Sox9およびRunx2/3の発現あるいは機能制御が、軟骨の肥大化および石灰化に深く関わっていると考えられる。

近年、申請者らは、軟骨分化の分子制御機構の解明に精力的に取り組み、軟骨細胞の肥大化におけるインディアンヘッジホッグ (Ihh) シグナルと軟骨特異的転写因子群の機能バランスの重要性を明らかにしてきた。そこで本研究計画では、これらの研究成果を基盤にして、骨関節炎におけるIhhシグナルとIhhシグナルにより活性化されるSox9およびRunx2との役割を明らかにし、骨関節炎に対する有効な治療法の開発への貢献を目指した。

2. 方法

1) 軟骨の肥大化・石灰化に対するSox9の役割の検討

マウス初代軟骨細胞培養系ならびにマウス中足骨器官培養系に、Sox9ならびにその下流因子であるSox5、Sox6をアデノウイルスにて過剰発現させ、その効果を判定した。アリザリンレッド染色による石灰化、10型コラーゲンの免疫染色を指標に評価した。尚、Sox9、Sox5、Sox6の過剰発現はアデノウイルスシステムを用いた。

2) PTHrPの発現に対するSox9の関与の検討

軟骨の肥大化および石灰化を抑制するサイトカインであるPTHrPの発現に対するSox9の関与をリアルタイムRT-PCRおよび抗PTHrP抗体を用いた免疫染色により検索した。

3) 抗PTHrP中和抗体の効果検討

抗PTHrP中和抗体をマウス中足骨器官培養系に作用させ、10型コラーゲンの免疫染色により、その役割を検討した。

4) PTHrP遺伝子プロモーターに対するSox9ファミリーの関与

PTHrP遺伝子プロモーター活性に対するSox9、Sox5、Sox6の関与をレポーターアッセイならびにDNA結合アッセイにより検討した。

5) IhhとSox9の相互関係の検討

Ihh阻害剤である、Cyclopamineを作用させ、PTHrPの発現をリアルタイムRT-PCRにより検索した。Ihhシグナル分子、Gli2とSox9の相互関係は、in vitro結合試験により検討した。

6) 軟骨細胞の肥大化に対するIhhとRunx2の相互関係

Runx2およびドミナントネガティブ変異体を過剰発現させ、10型コラーゲンの発現に対する効果を検索した。

7) Ihh、Sox9、Runx2の相互関係の検討

Ihh、Gli2、Sox9あるいはRunx2を過剰発現させ、軟骨細胞の後期分化のマーカー遺伝子である、

10型コラーゲン、MMP13、ALPの発現に対する効果をリアルタイムRT-PCRにより検討した。

3. 結果ならびに研究成果

1) 軟骨の肥大化・石灰化に対するSox9の役割の検討

Sox9、Sox5、Sox6をマウス初代軟骨細胞に過剰発現すると、軟骨細胞の石灰化はほぼ完全に阻害された。またマウス中足骨器官培養系にSox9、Sox5、Sox6アデノウイルスを導入すると、その石灰化が著明に抑制された。この際、2型コラーゲン陽性の軟骨細胞が増加したのに対し、10型コラーゲン陽性の軟骨細胞は、有意に減少した。

2) PTHrPの発現に対するSox9の関与の検討

マウス初代軟骨細胞にSox9、Sox5、Sox6を過剰発現すると、PTHrPの発現が著明に増加した。一方、Sox9のドミナントネガティブ変異体を過剰発現すると、PTHrPの発現が有意に減少した。また、マウス中足骨器官培養系にSox9、Sox5、Sox6アデノウイルスを感染させると、PTHrP陽性の軟骨細胞が、有意に増加した。

3) 抗PTHrP中和抗体の効果検討

抗PTHrP中和抗体をマウス中足骨器官培養系に作用させると、Sox9、Sox5、Sox6の過剰発現により減少した10型コラーゲン陽性領域が、コントロール群と同等まで回復した。

4) PTHrP遺伝子プロモーターに対するSox9ファミリーの関与

Sox9ファミリーは、PTHrP遺伝子プロモーターに直接結合し、PTHrPプロモーター活性を有意に増加させることが明らかとなった。

5) IhhとSox9の相互関係の検討

Cyclopamineの添加は、Sox9によるPTHrPの発現誘導効果を有意に抑制した。また、Gli2とSox9は相乗的にPTHrPの発現ならびにPTHrPプロモーター活性を促進し、両者は物理的に結合することが明らかとなった。さらにドミナントネガティブ変異型Gli2は、Sox9によるPTHrP誘導効果を有意に抑制した。

6) 軟骨細胞の肥大化に対するIhhとRunx2の相互関係

Runx2の過剰発現は、軟骨細胞の石灰化を著明に促進したが、このRunx2の効果は、Cyclopamineによりほぼ完全に阻害された。IhhとRunx2は協調して、10型コラーゲンの発現を促進した。一方、ドミナントネガティブ型Runx2は、Ihhによる10型コラーゲンの発現誘導効果を強く阻害した。

7) Ihh、Sox9、Runx2の相互関係の検討

Sox9は、IhhおよびGli2による10型コラーゲンならびにALPの発現誘導効果を著しく阻害した。一方、Runx2とIhh、Gli2は、協調的にALPの発現を促進した。さらにドミナントネガティブ型Runx2は、IhhとGli2によるALPとMMP13の誘導効果を強く抑制した。

4. 考察およびまとめ

従来まで、Ihhは、PTHrPの誘導を介して軟骨細胞の後期分化、すなわち肥大化ならびに石灰化を抑制すると考えられてきた。最近、私達は、IhhならびにGli2は、軟骨細胞の肥大化ならびに石灰化を促進することを報告した(1)。私たちの報告に一致して、Ihhは、PTHrP非依存的に軟骨の最終分化を促すことが示されている(2)。さらにRunx2は、Ihhと相加的に機能することが示唆されている(3、4)。したがって、Ihhは、PTHrP依存性経路とPTHrP非依存的経路の二つの機能を有していると考えられる。この仮説に一致して、本研究結果より、Ihh/Gli2シグナルは、Sox9と連携することにより、PTHrP産生を促し、軟骨細胞の肥大化および石灰化を抑制することが見出された(5)。

一方、Ihhは、Runx2と強調することにより、軟骨細胞の肥大化ならびに石灰化を促進することが示された。以上の結果を総合的に考察すると、Ihhは、軟骨細胞の肥大化・石灰化を促進ならびに抑制効果の双方を有すると考えられる。この相反するIhhの作用は、Sox9とRunx2により制御されていると推測される。すなわち、Sox9とRunx2の濃度勾配が、Ihhの作用の方向性を決定していると示唆された。

したがって、Sox9とRunx2の濃度勾配によるIhhの作用を制御することにより、骨関節炎の治療法の開発に寄与できることが期待される。

5. 発表論文、参考文献

1) MSX2 stimulates chondrocyte maturation by controlling Ihh expression. Amano K, Ichida F, Sugita A, Hata K, Wada M, Takigawa Y, Nakanishi M, Kogo M, Nishimura R, Yoneda T. J Biol Chem. 2008, 283:29513-21.

2) Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. Kobayashi T, Soegiarto DW, Yang Y, Lanske B, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM. J Clin Invest. 2005, 115:1734-42.

- 3) Ihh/Gli2 signaling promotes osteoblast differentiation by regulating Runx2 expression and function. Shimoyama A, Wada M, Ikeda F, Hata K, Matsubara T, Nifuji A, Noda M, Amano K, Yamaguchi A, Nishimura R, Yoneda T. *Mol Biol Cell*. 2007, 18:2411-8.
- 4) Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T. *Genes Dev*. 2004, 18:952-63.
- 5) Sox9 family members negatively regulate maturation and calcification of chondrocytes through up-regulation of parathyroid hormone-related protein. Amano K, Hata K, Sugita A, Takigawa Y, Ono K, Wakabayashi M, Kogo M, Nishimura R, Yoneda T. *Mol Biol Cell*. 2009, 20:4541-51.