

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：転写因子Cbfa1による関節軟骨の再生

2. 研究代表者：小守 壽文

(大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学 助手)

3. 研究内容及び成果：

変形性関節症は、関節の疼痛と運動制限をきたし、関節の変形や破壊へといたる罹患率の高い生活習慣病の一つである。変形性関節症に見られる病的変化は、永久軟骨である関節軟骨の成長軟骨化が病因の一つと考えられる。高齢化社会を迎え、欧米、日本ともに変形性関節症の罹患者が中高齢者で著増し、痛みと運動制限を伴い中高齢年者の生活の質を著しく低下させ、寝たきり老人の増加にもつながっている。現在は鎮痛消炎剤の投与や、進行例での外科的手術がその治療法となっている。

Cbfa1 (core binding factor 1)は軟骨が、成熟し最終的には骨に置き変わる成長軟骨と、軟骨の性状を一生維持する関節軟骨等の永久軟骨のどちらの形質を獲得するかを決定する重要な働きをしていることを私は明らかにした。すなわち、Cbfa1は本来永久軟骨になるべき軟骨をも成長軟骨化してしまう。逆にドミナントネガティブ型 Cbfa1 で正常の Cbfa1 の機能を阻害すると、本来の成長軟骨でも永久軟骨の形質を保持する。さらに軟骨細胞において Cbfa1 の発現を抑制すると細胞増殖が促進される。これらの結果は、Cbfa1 の機能を抑制することにより永久軟骨を再生できる可能性を示唆している。そこで、関節軟骨の再生を目指し、軟骨細胞におけるCbfa1の機能をさらに解明すること、そして変形性関節症におけるCbfa1の関与を明確にすることにした。

転写因子Cbfa1の軟骨細胞分化および軟骨への血管侵入における働きを詳細に検討するために、Cbfa1ノックアウトマウスの軟骨を脾臓に移植した。未熟な軟骨細胞よりなるノックアウトマウス的大腿骨を脾臓に移植すると、1週間後には軟骨細胞は肥大化し、基質の石灰化も始まった。そして一部で血管の侵入が見られた。しかし、Cbfa1ノックアウトマウスの軟骨は、脾臓移植後でも正常軟骨に比べて血管侵入が非常に遅延しており、正常では、造血細胞からの因子とCbfa1により肥大軟骨細胞に誘導される蛋白が協調して、血管侵入を誘導していると考えられた。また、破骨細胞に対する影響を調べるため、RANKL (receptor

activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand) および OPG (osteoprotegerin) の発現調節における Cbfa1 の役割を調べるとともに、Cbfa1 ノックアウトマウスに RANKL を強発現させ、破骨細胞誘導による軟骨への血管侵入が起こるか検討した。Cbfa1 は RANKL を誘導、OPG を抑制し、破骨細胞分化を誘導した。RANKL トランスジェニックマウスを Cbfa1 ノックアウトマウスと交配し、RANKL を強発現する Cbfa1 ノックアウトマウスを作製した。しかし、Cbfa1 ノックアウトマウスの軟骨への破骨細胞の侵入は表面にとどまっていた。すなわち、M-CSF、RANKL の発現だけでは、破骨細胞分化には充分ではなく、Cbfa1 が軟骨細胞に発現誘導している基質蛋白が、破骨細胞分化に重要であることが明らかとなった。これらの結果は Cbfa1 が誘導する蛋白で、血管侵入に重要な因子および破骨細胞分化に重要な因子がそれぞれ存在していることを示している。今後これらの因子を特定できれば、それらの因子を阻害することにより、腫瘍細胞の増殖の抑制や、腫瘍細胞の骨転移の抑制等の応用が期待できる。もちろん、破骨細胞分化抑制による骨量の維持にも応用が期待できる。

次に、Cbfa1 の属するラントファミリーの DNA 結合能を上げると考えられている Cbfb (core binding factor ) の軟骨細胞分化における働きを検討した。Cbfb ノックアウト (Cbfb<sup>-/-</sup>) マウスは造血できずに胎生中期で死亡するため、骨格形成における機能を解明できない。そこで、Cbfb<sup>-/-</sup>マウスの造血をレスキューすることにより、Cbfb の骨格形成における機能を解析した。Cbfb<sup>-/-</sup>tg マウスは、軟骨による骨格形成は起きていたが、頭蓋扁平骨や上顎骨、下顎骨等の膜性骨化領域では部分的な石灰化にとどまり、骨芽細胞は幼若骨芽細胞からなっていた。肋骨、椎骨、四肢骨等の内軟骨性骨化領域での石灰化はさらに限局しており、軟骨細胞の成熟も著しく遅延、海面骨形成は全く観察されなかった。これらの結果は、Cbfb は Cbfa1 依存性の骨格形成、特に、骨芽細胞分化、軟骨細胞の成熟に必要であることを示している。今後 Cbfa1 による軟骨細胞分化制御を試みる場合、Cbfb の発現レベルを考慮に入れなければならない。また、Cbfb の発現を抑制することによっても、軟骨細胞分化の抑制および軟骨の再生を計ることが期待できる。

最後にマウスの膝関節の種々の靭帯切離により変形性関節症モデルマウスの作製を試みた。また、STR/ORT マウスに発症する変形性関節症で、各種軟骨細胞マーカーと Cbfa1 の発現パターンを比較検討した。Cbfa1 は、軟骨表面の亀裂や脱落のある部位に一致して発現が見られ、X 型コラーゲン、オステオポンチン、MMP13 の発現と一致した。また、骨棘の形成過程にある軟骨細胞で Cbfa1 の強い発現を認めた。これは、Cbfa1 の発現がそのターゲット遺伝子であるオステオポ

ンチン、MMP13 (matrix metalloproteinase 13) を誘導し、変形性関節症における軟骨破壊に関与していることを示唆している。また、骨棘形成において、Cbfa1 が重要な役割を果たしていることを示唆している。これらの変形性関節症モデルマウスは、現在行っているドミナントネガティブ型 Cbfa1 の変形性関節症に対する効果を見るために有用であるとともに、Cbfa1 の軟骨細胞における下流遺伝子の、変形性関節症における関与を探索する上でも有用と考える。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果

Cbfa1は軟骨が成長軟骨になるか永久軟骨になるかを決定する転写因子である。この機能を阻害すると本来の成長軟骨が永久軟骨化し、また、軟骨細胞の増殖が促進される。このことから、Cbfa1の機能を制御することにより永久軟骨を再生できる可能性が考えられる。本研究は、このような背景から、関節軟骨の再生を目指して、軟骨細胞におけるCbfa1の機能を解明すること及び変形性関節症にこの転写因子が関与していないか検討した。この目的に沿って研究は展開されかなりの成果を挙げることができた。しかし、再生に関するデータがない。

Cbfa1のノックアウトマウスの解析等から、Cbfa1が誘導する蛋白が血管の軟骨への侵入や破骨細胞分化に関与していることを示すことができたがそれらを同定するには至っていない。Cbfbが、Cbfa1と協同的に骨格形成に関与していることを示すことができた。さらに、変形性関節症モデルマウスの作製を行い、このモデルを用いて、Cbfa1が軟骨の亀裂化や脱落、また、骨棘の形成に関与している可能性を示唆するデータを得ることができた。変形性関節症でのCbfa1の機能関与を示すという点では、満足できる成果であったと考えられる。しかし、課題名にある「関節軟骨の再生」と具体的に結びつく技術には至っていない。研究規模と研究期間の制約があるので、この点は、仕方が無いと思われる。

適切なサイズの研究グループで着実な研究成果を挙げることができた。しかし、軟骨再生に関する研究体制は不十分であった。研究費の使い方については、必要な経費に必要額を使用していると思われる。研究発表成果と研究期間さらに研究グループの規模を勘案するならば、妥当と言わざるを得ない。

学術論文は適切に発表されている。基礎的研究データを質の高い論文として発表した。研究期間が2年間であり、グループの規模からすれば、妥当だと判断される。

本研究課題に掲げられている「関節軟骨の再生」という目標から、軟骨再生に資する直接の知的所有権の取得が期待される。しかし、提案されている実験計画の内容からは、本研究が軟骨細胞の分化と組織成熟に関する基礎生物学的な解析が主体となって

いる。知的所有案件があるに越したことはないとしても、提案内容からすれば、現時点で、特許出願が「なし」であっても問題は少ないと考える。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

小守グループは、Cbfa1が骨形成に必須であることを発見したグループの一つとして、確固たる実験基盤を持っている。今回の研究成果は、この基盤研究に裏打ちされたものであり、軟骨形成の研究分野においても容易に追従を許さない。軟骨分化におけるCbfa1の機能に関する研究は研究代表者の独壇場と言っても良くその研究成果は国内外のレベルと比較して高い。関節軟骨の再生修復過程におけるCbfa1及びCbfbの機能解析は不可欠な課題である。Cbfa1の機能制御による軟骨の再生を現実化するには至らなかったが、その可能性もあり、今後の発展を期待したい。

Cbfa1の軟骨の細胞分化に関して得られた研究成果は世界的に見ても独自性がありインパクト度の高い学術雑誌に発表している。軟骨形成と分化研究における科学的インパクトは高いと評価される。

研究代表者は明確な問題意識で、着実に研究を発展させており、今後の展開が期待される。軟骨再生の技術として発展するには、いくつかの基盤的な問題が解決されなければならぬ。しかし、研究の更なる展開が期待できることは間違いない。

#### 4-3. 総合的評価および特記事項

研究代表はCbfa1の機能制御による軟骨再生を目指して着実な研究を展開し、かなりの成果を収めることができた。軟骨疾患は今後社会的にも大きな問題になる。最終ゴールである軟骨の再生を実現するべく更なる挑戦を続けて欲しい。

近い将来に罹患者が急増すると予測されている変形性関節症を、永久軟骨である関節軟骨の「成長軟骨化」という切り口から解析を試みるというアプローチは、独創的である。この「成長軟骨化」という概念は、今後一層の精密化と定式化を必要とするが、Cbfa1の機能解析という明瞭な実験基盤の上に進められた点が評価される。しかし、このアプローチが関節軟骨の「再生」にまでつながる技術として発展するかどうかは、現時点では判断できない。