

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究課題
「転写因子Cbfa1による
関節軟骨の再生」

研究期間：平成13年3月1日～平成15年3月31日

研究代表者
小守 壽文
大阪大学大学院医学系研究科 助手

1. 研究実施の概要

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った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の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- κ 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^{-/-})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^{-/-}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^{-/-}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。

2 . 研究構想

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 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する。そして、軟骨細胞分化、軟骨細胞における基質産生、破骨細胞分化、軟骨への血管侵入を検討する。また、破骨細胞に対する影響を調べるため、RANKLおよびOPG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する。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の軟骨細胞分化における働きを検討する。

Cbfbノックアウト(Cbfb^{-/-})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^{-/-}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する。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る。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、Cbfa1の変形性関節症における関与を明確にする。そして、変形性関節症に対するドミナントネガティブ型Cbfa1の効果を見る。

3. 研究内容

3. 1 軟骨への血管侵入におけるCbfa1の役割

(1) 実施の内容

軟骨への血管侵入は、軟骨が骨に置換する内軟骨性骨化に必須の機構である。軟骨細胞が成熟肥大化し、その基質が石灰化するとその部位に血管侵入が始まる。変形性関節症における骨棘の形成も永久軟骨である関節軟骨が成長軟骨化し、骨に置き換わったと考えられる。しかし、軟骨への血管侵入機構は未だ明らかになっていない。私は、Cbfa1ノックアウトマウスを用いて血管侵入機構を解明することを試みた。

Cbfa1ノックアウトマウスは軟骨細胞の分化障害が見られるが、一部の骨格(橈骨、尺骨、脛骨、腓骨)では、軟骨細胞は最終段階まで分化し、肥大軟骨細胞となり基質の石灰化も見られる。しかし、これらの部位においても血管侵入は全く見られない。血管侵入の阻害因子であるchondromodulin-1は正常に調節されており、肥大軟骨細胞において発現は低下している。また血管侵入促進因子であるVEGF(vascular endothelial growth factor)はノックアウトマウスの肥大軟骨細胞においても発現が見られる。しかし、MMP13、オステオポンチン、骨シアロ蛋白の肥大軟骨細胞での発現はほとんど見られない。そこで軟骨への血管侵入機構、特に骨髄からの影響とCbfa1の軟骨細胞に対する働きを検索するため、Cbfa1ノックアウトマウスの軟骨を脾臓に移植する実験を行った。

未熟な軟骨細胞よりなるノックアウトマウスの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(図1)。そして一部で血管の侵入が見られその最前線に破骨細胞が存在した。コントロールの軟骨を移植した場合、1週間後には骨髄が形成されるとともに成熟骨芽細胞および骨形成が見られたが、ノックアウトマウスの軟骨の移植では3週間後でも成熟骨芽細胞も骨形成も見られなかった。しかしノックアウトマウスの軟骨移植1週間後には肥大軟骨細胞には本来発現していなかったMMP13、オステオポンチン、骨シアロ蛋白が強く発現しており、血液細胞からの因子により発現誘導されていると考えられた(図2)。MMP13はII型コラーゲン分解により、オステオポンチン、骨シアロ蛋白は破骨細胞との接着により血管侵入を促進する。どのような因子がこれらの遺伝子の発現誘導に関わっているかを見るために、ノックアウトマウスの軟骨細胞をin vitroでTGF- β (transforming growth factor)、IGF-1(insulin-like growth factor 1)、PDGF(platelet-derived growth factor)、IL-1(interleukin-1)、IL6(interleukin 6)、T3(thyroid hormone)、PTH(parathyroid hormone)存在下で培養を行った。TGF- β 、PDGF、IL-1、T3はMMP13、オステオポンチン両者の発現を強く誘導した。

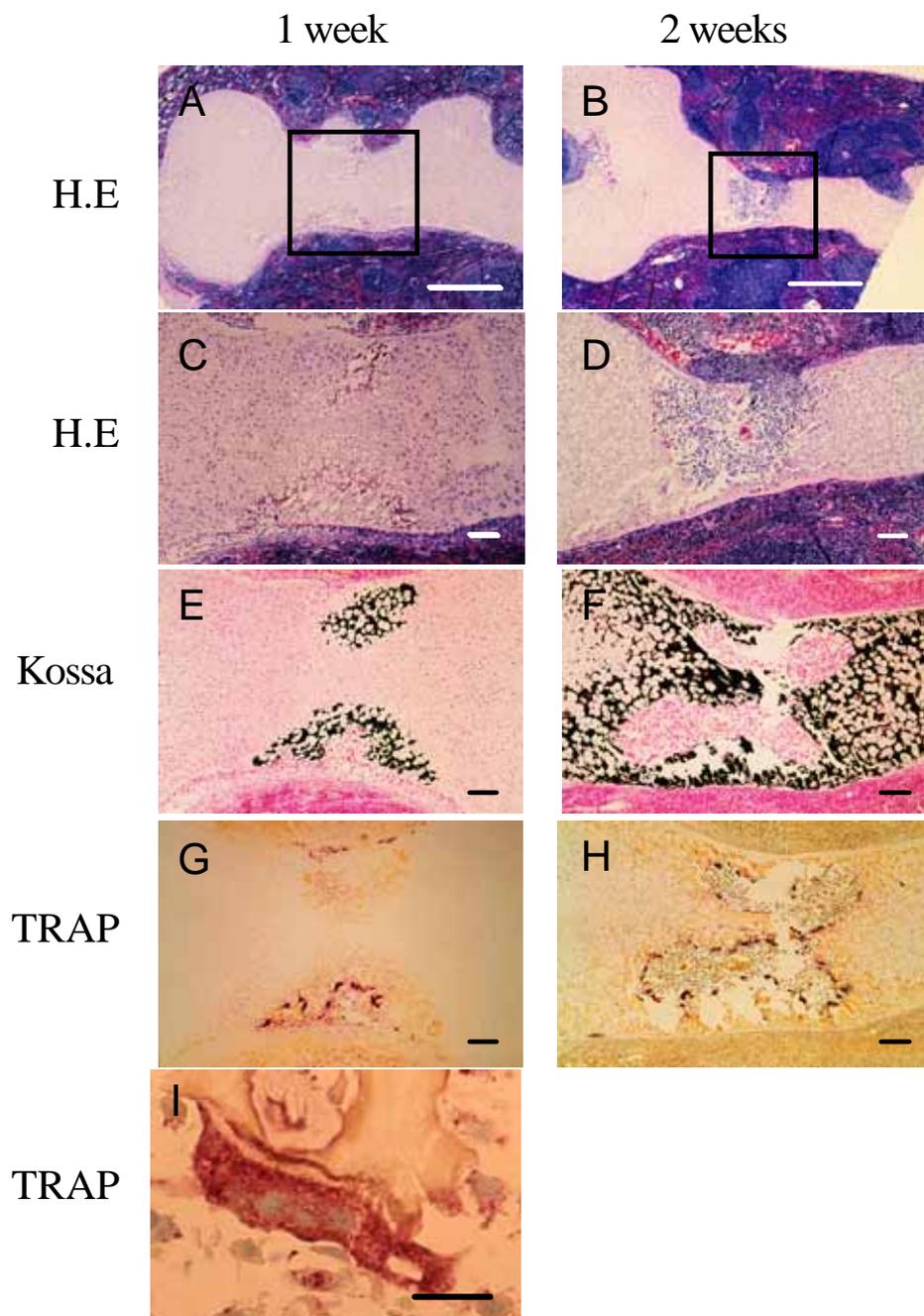


図 1

Cbfa1 ノックアウトマウスの大腿骨の脾臓への移植。移植後 1 週間 (A, C, E, G, I) と 2 週間 (B, D, F, H) のヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色 (A-D)、Kossa 染色 (E, F)、TRAP (tartrate resistant acid phosphatase、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ) 染色 (G-I)。C、D はそれぞれ A、B の四角の部分の拡大。移植 1 週間後、骨幹部で

軟骨細胞は肥大化（成熟）後（A, C）最終分化した軟骨細胞の基質は石灰化し（Kossa染色で黒く染まる）一部で血管侵入が見られる（E）。2週後では、石灰化軟骨の部分はさらに広がり、血管侵入も明確になる（B, D, F）。TRAP 陽性（赤く染まる）の破骨細胞が、血管侵入した部位に多数認められ、軟骨基質の融解を行っている（G, H, I）。（I）は（G）の破骨細胞の強拡大。（A, B）, bar=1mm; (C-H), bar=200 μm; (I), bar=10 μm.

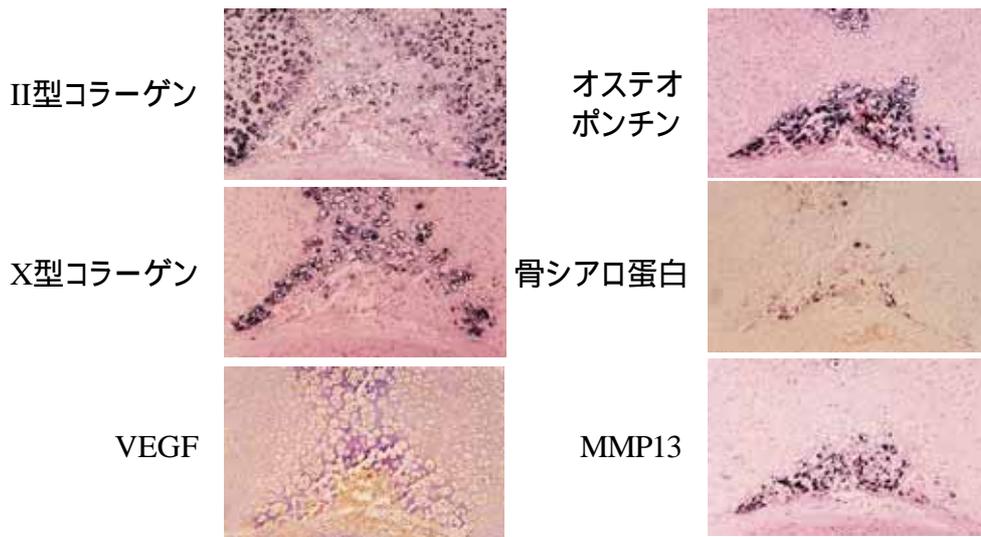


図 2

移植された Cbfa1 ノックアウトマウスの大腿骨における X 型コラーゲン、VEGF、オステオポンチン、骨シアロ蛋白、MMP13 の誘導。II 型コラーゲン、X 型コラーゲン、オステオポンチン、骨シアロ蛋白、MMP13 は in situ hybridization、VEGF は、VEGF 抗体を用いた免疫組織染色により検出した。骨幹部では、軟骨細胞の成熟が見られ、II 型コラーゲンの発現は低下、X 型コラーゲン、VEGF の発現が誘導されている。最終分化した石灰化軟骨部位では、Cbfa1 ノックアウトマウスの石灰化軟骨では発現が著減しているオステオポンチン、骨シアロ蛋白、MMP13 の誘導が見られる。

したがって造血細胞からの因子が、正常の骨髄形成過程において、骨髄に接する肥大軟骨細胞に MMP13、オステオポンチン等の発現を誘導し、血管侵入および骨髄形成を促進させていることが示唆された。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、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。

Cbfa1 ノックアウトマウスは M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) は発

現しているが、RANKLの発現がほとんど見られず、破骨細胞は存在しない。Cbfa1 ノックアウトマウスより樹立した間葉系細胞株にCbfa1を導入、RANKL、OPGの発現を検索した。Cbfa1はRANKLを誘導、OPGを抑制し、破骨細胞分化を誘導した(図3)。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 (Cbfa1^{-/-}tg マウス) を作製した。しかし、Cbfa1^{-/-}tg マウスの軟骨への破骨細胞の侵入は表層にとどまっていた(図4)。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。

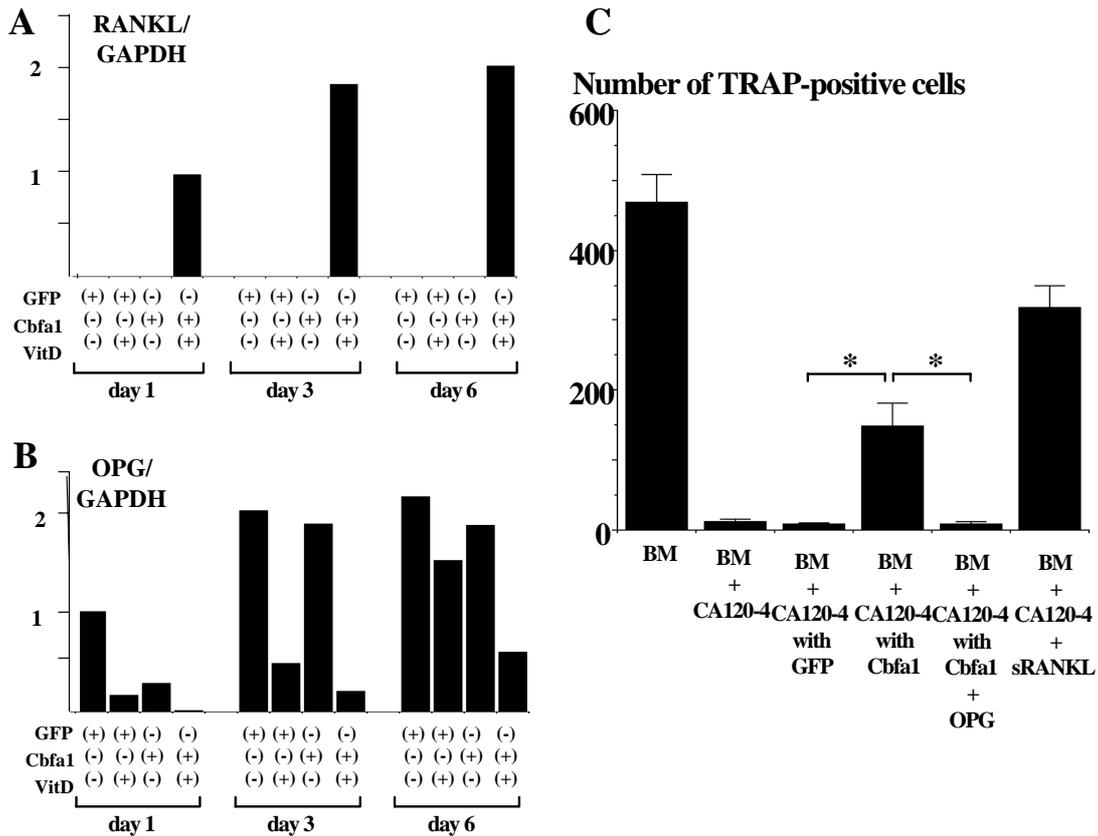


図 3

Cbfa1はRANKLの誘導、OPGの抑制により、破骨細胞分化を誘導する。(A, B): ビタミンD (VitD) 存在下あるいは非存在下で、Cbfa1欠損軟骨細胞にアデノウィルスを用いて、Cbfa1とGFP (Cbfa1) あるいはGFPのみ (GFP) を導入した。導入後1、3、6日後のRANKL (A)とOPG (B)の発現を示す。(C): Cbfa1欠損軟骨細胞株CA120-4にCbfa1とGFP (Cbfa1) あるいはGFPのみ (GFP) をアデノウィルスで導入し、骨髄細胞 (BM, bone marrow cells) との共培養を行った。CA120-4は、骨髄細胞からのTRAP陽性の破骨細胞の形成を強く抑制するが、Cbfa1の導入によりその抑制は解除された。また、OPGの添加はこのCbfa1の効果を消滅させた。RANKLの添加も、CA120-4による骨髄細胞からの破骨細胞の形成抑制を解除した。

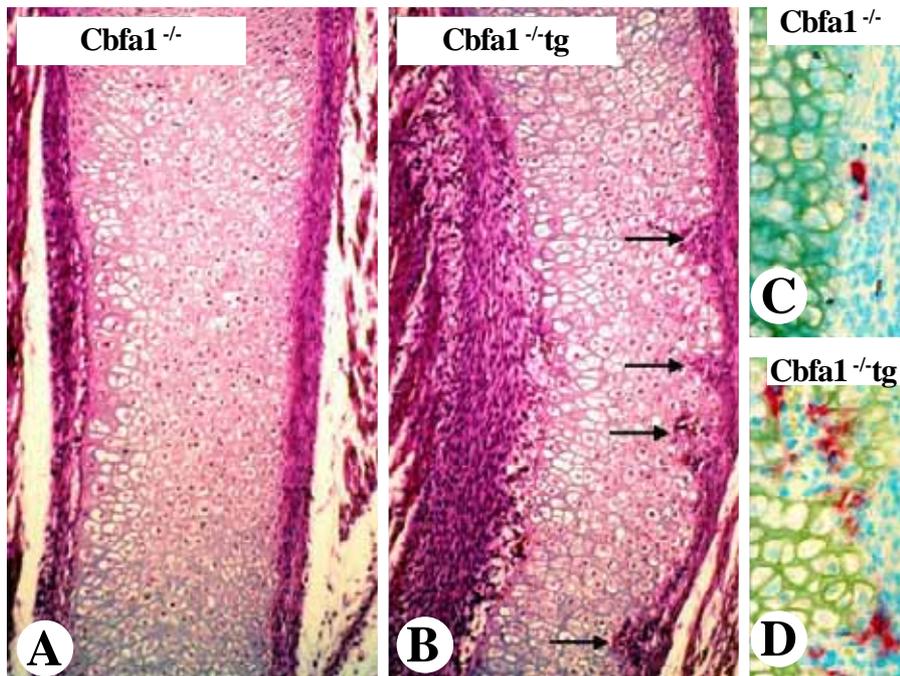


図 4

RANKLのCbfa1 ノックアウトマウスへの導入。Cbfa1 ヘテロ変異マウスとRANKLトランスジェニックマウスを交配することにより、最終的にCbfa1^{-/-}RANKLトランスジェニックマウス (Cbfa1^{-/-}tgマウス)を作製した。Cbfa1 ノックアウトマウス (Cbfa1^{-/-}, A, C) では、TRAP陽性細胞は単核で数も少なく、軟骨への侵入は全く見られない。一方、Cbfa1^{-/-}tgマウス (B, D) では、TRAP陽性細胞は多核で数も増加している。しかし、軟骨への侵入は表層にとどまっている。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

現在の所、VEGF が最も軟骨への血管侵入で重要と考えられている因子である。しかし、Cbfa1 ノックアウトマウスの軟骨ではVEGFは発現しているが、血管侵入は起こらない。また、M-CSF と RANKL があれば、in vitro では破骨細胞誘導できるが、in vivo ではこの2つの因子だけでは、破骨細胞分化が起こらない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 (図5)。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。

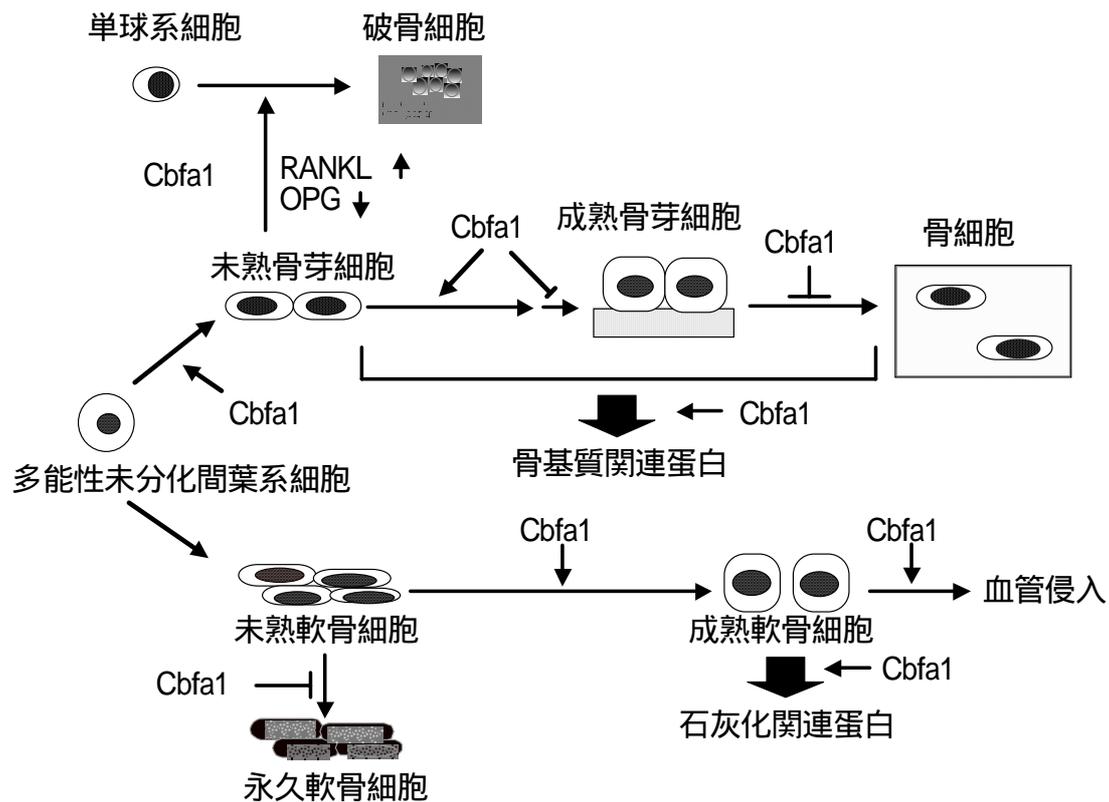


図 5

骨格形成における Cbfa1 の機能。Cbfa1 は、骨芽細胞、軟骨細胞、破骨細胞の 3 つの細胞系列で重要な働きをしている。骨芽細胞系列では、間葉系幹細胞から骨芽細胞系列へ分化決定し、その後の骨芽細胞の成熟を早期で促進、後期で抑制する。また、種々の骨基質関連蛋白の産生に関わる。軟骨細胞においては、その成熟を促進する。さらに、軟骨細胞が永久軟骨の形質を獲得することを阻害する。後期肥大軟骨細胞での基質産生、軟骨への血管侵入にも関わっている。破骨細胞に関しては、RANKL を誘導、OPG を抑制し、破骨細胞分化を促進する。

3. 2 軟骨細胞分化における Cbfb の役割

(1) 実施の内容

Cbfa1 は骨格形成、特に骨芽細胞分化と軟骨細胞の成熟に必須の因子である。一方、それ自身 DNA 結合能をもたない Cbfb は、Cbfa2 とヘテロダイマーを形成し、造血幹細胞の分化に必須な役割を果たす。しかし、Cbfb は Cbfa1 と結合しないことが報告されており、また Cbfb^{-/-} マウスが胎児肝臓での造血の欠如と中枢神経系での出血のため胎生中期で死亡することから、骨格形成における Cbfb の機能は明らかにされていない。そこで、赤芽球系に発現を誘導できる GATA1 プロモーターを用いた Cbfb トランスジェニックマウスを作製、Cbfb^{+/-} マウスと交配することにより、トランスジーンを Cbfb^{-/-} マウスに導入 (Cbfb^{-/-} tg マウス) し、赤血球系造血のレスキューを行った (図 6)。Cbfb^{-/-} tg マウスは出生時まで生存したが、出生直後に呼吸できずに死亡した (図 7)。

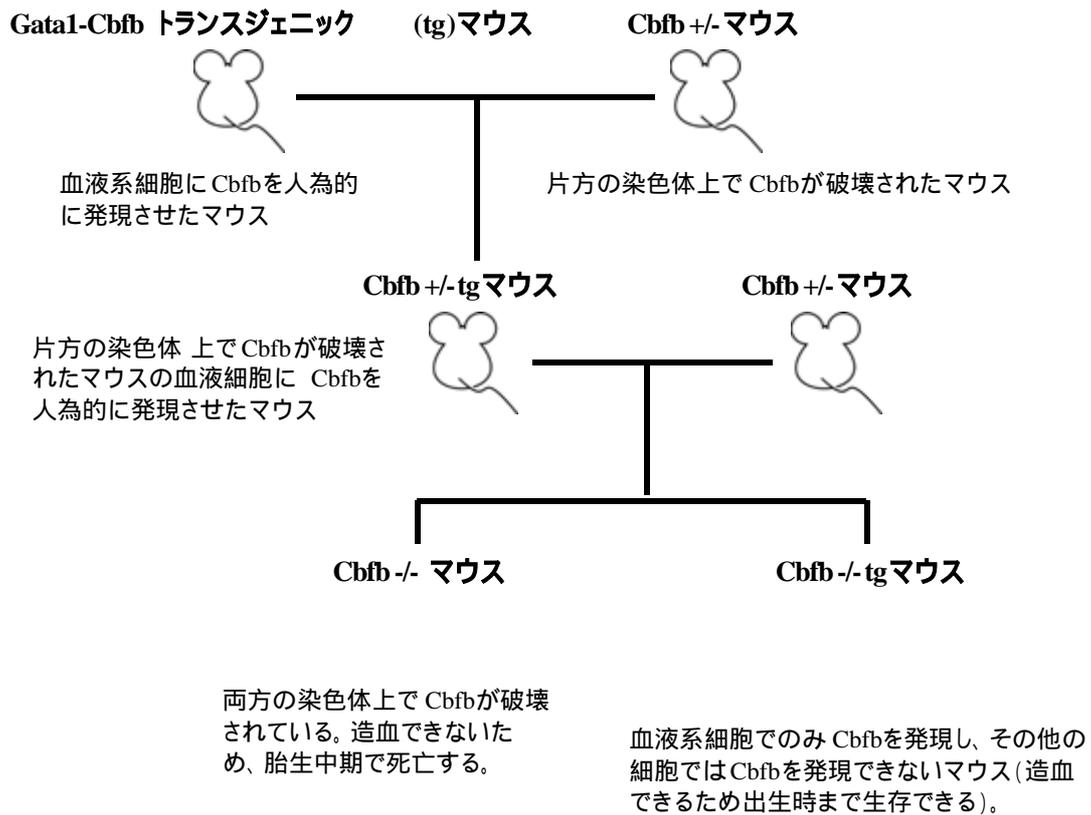


図 6

Cbfb ノックアウトマウスの造血のレスキュー。赤血球系と巨核球系に特異的に発現を誘導できる Gata1 プロモーターを用い、造血系に局限して Cbfb 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製した。次に、このマウスを Cbfb ヘテロ変異マウスと交配し、最終的に血液系細胞でのみ Cbfb を発現し、その他の細胞では Cbfb を発現しないマウス (Cbfb^{-/-} tg マウス) を作製した。



図 7

造血のレスキューされたCbfbノックアウトマウス。左：胎生期 12.5 日の野生型とCbfbノックアウトマウス(Cbfb^{-/-})の外観。Cbfb^{-/-}マウスでは胎児肝での造血が起こらないために肝臓の赤みが見えない。また中枢神経系を中心に出血が見られる。右：胎生期 18.5 日の野生型と造血のレスキューされたCbfbノックアウトマウス(Cbfb^{-/-}tg)の外観。Cbfb^{-/-}tgマウスは体が小さく四肢が短い。

Cbfb^{-/-}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I型コラーゲン陽性、オステオポンチン陽性、オステオカルシン陰性の幼若骨芽細胞からなっていた(図8)。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していた。頸骨では、骨幹部に限局してX型コラーゲン陽性さらにオステオポンチン陽性肥大軟骨細胞が見られ、一部で血管侵入が起きていた。bone collarの形成は見られたが、海面骨形成は全く観察されなかった(図9)。さらにCbfb^{-/-}tgマウスの頭蓋冠由来細胞のin vitroにおける骨芽細胞分化も著明に阻害されていた。また、Cbfa2 蛋白はCbfb非存在下ではユビキチン化され分解されると報告されているが、Cbfa1 蛋白は正常マウスと同程度に検出された。そしてin vitroで合成したCbfa1 とCbfbを用いたゲルシフトアッセイではCbfbがCbfa1 によるDNA結合を著明に促進することが明らかになった。

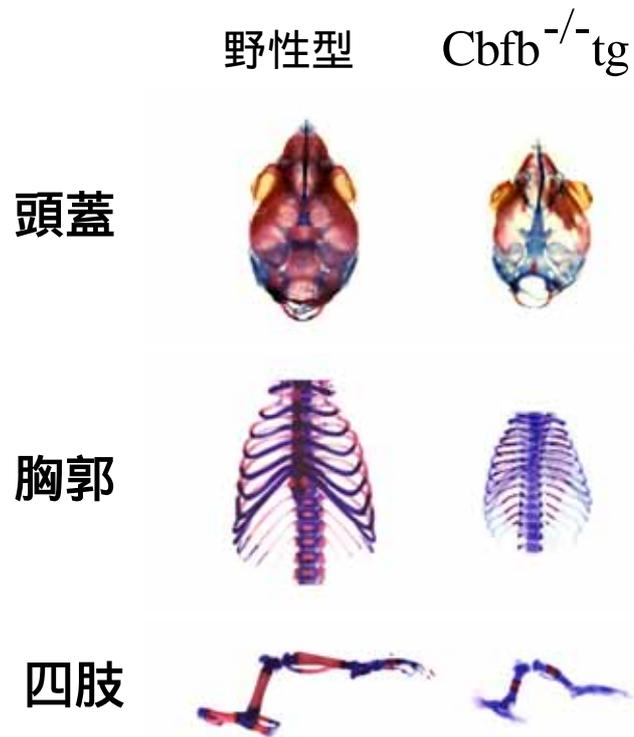


図 8

胎生期 18.5 日の野性型と $Cbfb^{-/-}tg$ マウスの骨格標本。アリザリンレッドで石灰化した部分が赤く、アルシアンブルーによって軟骨が青く染まる。 $Cbfb^{-/-}tg$ マウスでは、頭蓋の軽度の石灰化と、四肢・肋骨・脊椎骨の一部に石灰化軟骨によるアリザリンレッド染色が見られるが、骨はほとんどできていない。

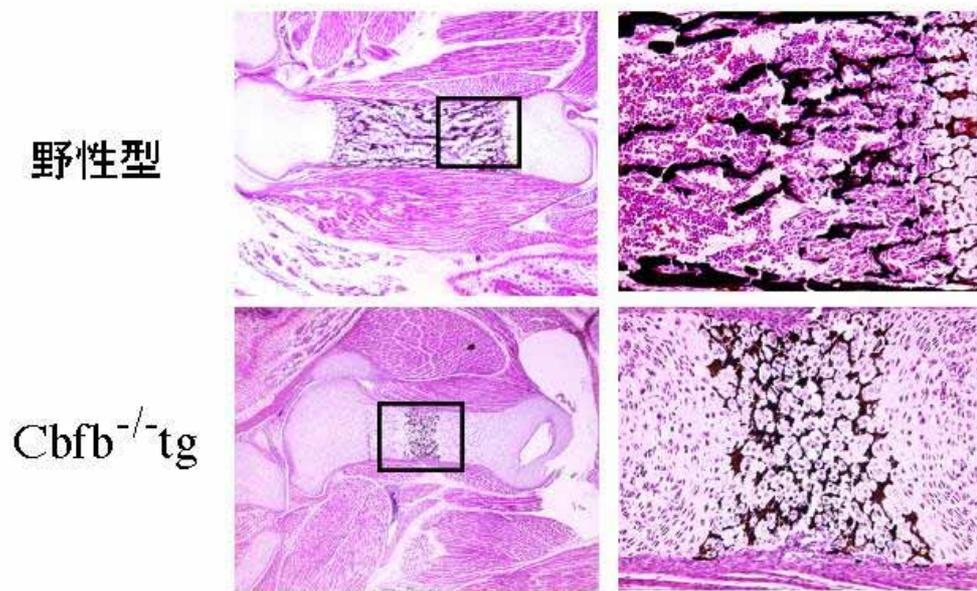


図9

Cbfb^{-/-}tgマウスにおける内軟骨性骨化。野性型（上）とCbfb^{-/-}tgマウス（下）の脛骨切片のKossaとH-Eの二重染色。右は左の四角の強拡大写真。野性型マウスの脛骨では、すでに大部分が骨に置き換わっている。Cbfb^{-/-}tgマウスの脛骨では、骨幹部中心が石灰化軟骨まで分化し、血管侵入が同部でまさに始まろうとしている。

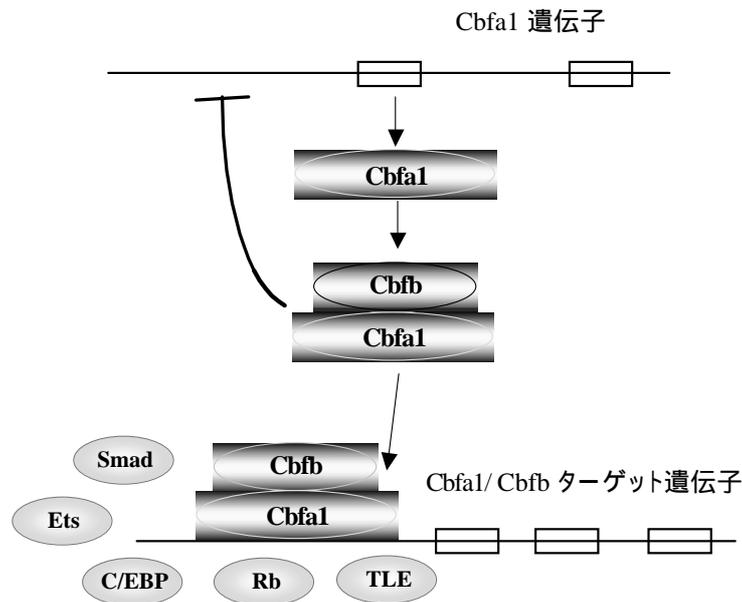


図 1 0

Cbfa1 は Cbfb とヘテロダイマーを形成し、ターゲット遺伝子のプロモーター領域に結合する。そして、他の様々な転写因子、コアクチベーター、リプレッサーとの相互作用により転写を制御する。また、Cbfa1・Cbfb ヘテロダイマーは Cbfa1 自身の転写活性を負に制御する。現在 Cbfa1 との相互作用が報告されている因子を示す。

これらの結果は、Cbfa1 は Cbfb 非存在下でも若干の機能を有するが、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（図 1 0）。

（ 2 ）得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

これまで、Cbfb は Cbfa1 の機能には必要ないと考えられてきた。しかし、今回の我々の結果により、Cbfb が Cbfa1 の機能、すなわち骨芽細胞・軟骨細胞分化に必要であることが、初めて明らかとなった。したがって、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。

3. 3 変形性関節症モデルマウス

（ 1 ）実施の内容

膝関節の膝蓋靭帯のみを切離したマウスを、1 ヶ月後にマイクロフォーカスによる X 線解析、および組織切片により解析すると、組織損傷は少なく、靭帯を含む関節周囲組織の異所性骨化は少なかった。したがって、関節軟骨の長期変化を見るのに適していると考えられた。さらに膝関節の膝蓋靭帯、前十字靭帯、後十字靭帯、内側側副靭帯、外側側副靭帯の切離および半月板除去を行った場合、靭帯を含む関節周囲組織の異所性骨化が強く起こり、関節の拘縮を起こしてしまうため、関節軟骨の早期変化を見ることは

できるが、長期観察には適していないことがわかった。

STR/ORT マウスは、月齢を重ねるとともに変形性関節症様の変化が起こる頻度および進行度が増してきた。すなわち、軟骨表面の亀裂、へこみ、浸食等がまず見られ、その後軟骨細胞の脱落が見られた。同時に骨棘の形成の進行が見られた。しかし、同じ月齢でも進行度にはかなりの個体差が見られた。In situ hybridization により Cbfa1 の発現を軟骨細胞分化マーカー（II 型コラーゲン、X 型コラーゲン）および軟骨の破壊に関与すると考えられているオステオポンチン、MMP13 とともに検索した。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 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。

（２）得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

Cbfa1 が変形性関節症の発症に関与しているという可能性は、我々が Cbfa1 の軟骨細胞における機能を解明していく過程で言及してきたが、今まで直接支持する結果は得られていなかった。しかし今回の実験で、その可能性が非常に強まったと言える。また、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 . 研究実施体制

(1)体制

研究場所は1ヶ所につき図表は省略。

(2)メンバー表

小守グループ(テーマ別)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
小守壽文	大阪大学医学系研究科分子病態内科学	助手	実験動物の解析	平成13年3月～平成15年3月
金谷直子	大阪大学医学系研究科分子病態内科学	研究補助員	実験動物の作製・維持	平成13年7月～平成15年3月

5 . 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

なし

(2)招聘した研究者等

なし

6 . 主な研究成果

(1)論文発表 (国内11件、海外5件)

- 1) H. Enomoto, S. Shiojiri, K. Hoshi, T. Furuichi, R. Fukuyama, C. Yoshida, N. Kanatani, R. Nakamura, A. Mizuno, A. Zanma, K. Yano, H. Yasuda, K. Higashio, K. Takada, and T. Komori. Induction of osteoclast differentiation by Runx2 through RANKL and OPG regulation and partial rescue of osteoclastogenesis in Runx2^{-/-} mice by RANKL transgene. J. Biol. Chem. in press.
- 2) T. Komori. Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. J. Bone Miner. Metab. 21: 193-197, 2003.
- 3) C. A. Yoshida, T. Furuichi, T. Fujita, R. Fukuyama, N. Kanatani, S. Kobayashi, M. Satake, K. Takada, and T. Komori. Core-binding factor interacts with Runx2

and is required for skeletal development. Nat. Genet. 32:633-638, 2002.

4) T. Komori. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. J. Cell. Biochem. 87: 1-8, 2002.

5) M. Himeno, H. Enomoto, W. Liu, K. Ishizeki, S. Nomura, Y. Kitamura, and T. Komori. Impaired vascular invasion of Cbfa1-deficient cartilage engrafted in spleen. J. Bone Miner. Res. 17: 1297-1305, 2002.

6) 小守壽文. Cbf 骨形成に必要な新遺伝子. 医学のあゆみ in press.

7) 小守壽文. 骨芽細胞分化と転写因子. 骨・関節疾患. 宮坂信之、野田政樹、西岡久寿樹編. (朝倉書店) in press.

8) 古市達也, 小守壽文. Cbfb と Runx2 の相互作用は骨格形成に必須である. 実験医学 21: 810-813, 2003.

9) 古市達也, 小守壽文. Runx2/Cbfa1. 骨粗鬆症治療 2: 58-60, 2003.

10) 古市達也, 小守壽文. 骨芽細胞分化のマスターレギュレーターRunx2 の機能には Cbfb が必須である. 遺伝子医学 7: 106-108, 2003.

11) 小守壽文. 骨芽細胞・軟骨細胞の分化因子 Runx2/Cbfa1 実験医学 20: 33-37, 2002.

12) 古市達也, 小守壽文. Runx2 による骨芽細胞、軟骨細胞分化制御 細胞工学 21: 1201-1202, 2002.

13) 小守壽文. 骨芽細胞の分化. 分子細胞治療. 1: 22-26, 2002.

14) 小守壽文. 軟骨細胞の分化・機能の制御. 骨・軟骨代謝と注目の骨疾患. 松本俊夫編. (羊土社) pp27-37, 2002.

15) 小守壽文. 骨芽細胞の分化誘導転写遺伝子. Cbfa1/Runx2 日本臨床 60: suppl 3, 91-97, 2002.

16) 小守壽文. 骨芽細胞分化と転写因子. 医学のあゆみ 198: 548-552, 2001.

(2) 口頭発表

招待講演 (国内 5 件、海外 5 件)

1) T. Komori, Role of Runx2 in chondrocyte differentiation. Gordon Conference: Cartilage Biology and Pathology. March 17, 2003, Ventura, California.

2) T. Komori, A requisite role of core binding factor in skeletal development. 1st Wittgenstein Conference: Genetics and Molecular Biology of Skeletal Development. October 14, 2002, Lucca, Italy

3) T. Komori, Osteoblast and chondrocyte differentiation controlled by

CBFA1/RUNX2. American Society for Bone and Mineral Research, October 13, 2001, Phoenix, Arizona.

4) T. Komori, Role of Cbfa1 in the process of endochondral ossification. 2001 KA0B International Symposium on Bone Metabolism. June 25, 2001, Seoul, Korea.

5) T. Komori, Involvement of Cbfa1 in chondrocyte maturation, endochondral ossification, and specification of cartilage phenotype. First International Conference on the Growth Plate. June 16, 2001, San Antonio, Texas.

6) 小守壽文 Cbfa1/Runx2 と骨格形成 日本口腔科学会第1回教育研修シンポジウム 2002年7月27日、東京

7) 小守壽文 Cbfa1/Runx2 による軟骨細胞分化調節 第24回日本分子生物学会 2001年12月10日、横浜

8) 小守壽文 Cbfa1/Runx2 による骨芽細胞分化・成熟 Bone Cell Biology (日本学術会議解剖学研究連絡会議主催) 2001年10月6日、松本

9) 小守壽文 Cbfa1 と骨・軟骨形成 第22回日本炎症・再生医学会、2001年7月2日、東京

10) 小守壽文 Cbfa1 の変異と Cleidocranial dysplasia. 第74回日本内分泌学会、2001年7月1日、横浜

プレス発表

小守壽文、骨形成に必須な遺伝子の発見、文部科学省、2002年11月14日

(3) 特許出願

なし

(4) 新聞報道等

新聞報道

日本経済新聞、骨形成に必要な新遺伝子を発見、2002年11月18日

日経産業新聞、骨形成促す遺伝子特定、2002年11月18日

化学工業日報、骨形成必須遺伝子を特定、2002年11月18日

受賞

日本骨代謝学会学術賞、2002年7月26日

(5) その他特記事項

なし

7 . 結び

Cbfa1およびCbfbの軟骨細胞における機能は、かなり明確にできた。そして変形性関節症モデルマウスの作製、解析により、変形性関節症におけるCbfa1の関与を強く示唆できた。ドミナントネガティブ型Cbfa1を用いた関節軟骨の再生の可否まで結論づけたかったが、これは、アデノウイルスの感染範囲と感染部位の評価がなかなか容易ではなく、今後の継続課題となった。今後は、成獣になってから遺伝子発現を起こさせる遺伝子改変マウスの作製等による変形性関節症のモデルマウスも作製していきたい。また、ドミナントネガティブ型Cbfa1を用いた遺伝子治療のみでなく、Cbfa1のターゲット遺伝子の探索の中で、関節軟骨の再生に適した液性因子、受容体、酵素等を見出し、変形性関節症に対する創薬につなげていきたい。

