

機関番号：17701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～ 2010

課題番号：20591787

研究課題名（和文）変形性関節症の病態解明-Gadd45 ベータトランスジェニックマウスの解析

研究課題名（英文）Molecular mechanism of osteoarthritis-analysis of Gadd45beta transgenic mice-

研究代表者

井尻 幸成 (IJIRI KOSEI)

鹿児島大学大学院・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：00315417

研究成果の概要（和文）：変形性関節症(Osteoarthritis:OA)の病因は未だ不明である。ストレス反応性分子 Gadd45 β が初期 OA に特徴的に発現していることから、この分子が OA の病態に関与していると仮説し、その遺伝子改変動物（Gadd45 ベータトランスジェニックマウス）作成を計画した。また、Gadd45 β の下流で標的遺伝子を活性化させる C/EBP β のトランスジェニックマウスも作成した。Gadd45 β 、C/EBP β 両分子を、軟骨特異的分子である COMP (cartilage oligomeric matrix protein) promoter を Tet-off system で誘導して発現調節できる double transgenic mice として作成した。両マウスの遺伝子発現を確認した。

研究成果の概要（英文）：Pathology of the osteoarthritis (OA) is uncovered. Gadd45 β (growth arrest and DNA damaged inducible 45 beta) is a small protein (18kD) which is involved in cell cycle, apoptosis, stress, and hypertrophy. Since Gadd45 β is characteristically expressed in clusters of early stage of OA, we hypothesized that Gadd45 β is one of the key molecules in the process of OA. This study was designed to establish the conditional transgenic mice. The promoter of COMP was used in Tet-off system. DT mice was produced and the expression of Gadd45 β was confirmed. C/EBP β , the downstream of Gadd45 β , DT mice was also produced and the gene expression was confirmed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
21 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
22 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目（関節症学）：外科系臨床医学・

キーワード：関節病学

1. 研究開始当初の背景

加速する高齢化社会において変形性関節症 (Osteoarthritis:OA) はいわゆる Common disease として最も頻度の高い運動器疾患である。本疾患は著しく日常生活機能を低下させ、社会的にも医療費増加の一因であり、病

態解明は極めて重要である。しかし、これまでにその詳細な発生機序や決定的な治療法は明らかにされていない。我々は、先行研究において、Gadd45 β (growth arrest and DNA damaged inducible 45 beta)が初期の OA 軟骨の cluster 細胞に特徴的に発現し、

COL10A1 遺伝子や MMP-13 遺伝子を正に調節すること、細胞の肥大化に關与することを明らかにしてきた。軟骨終末分化細胞である肥大軟骨細胞の表現系は X 型コラーゲン遺伝子発現で決定づけられる。Gadd45β は X 型コラーゲン遺伝子の発現を調節するが、さらに、その分子メカニズムを解明した。Gadd45β は MTK1/MKK3/6/p38axis を正に制御し、C/EBPβ の TAD4 をターゲットとして転写活性化能を促進させることにより X 型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性を増強させる (図 1)。

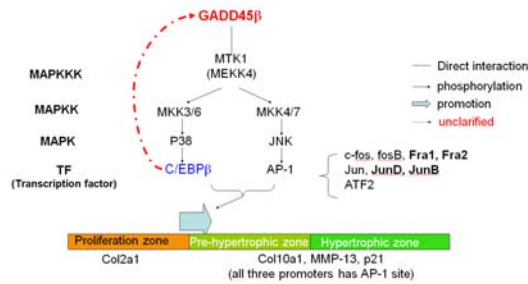


図 1. Gadd45β と C/EBPβ による X 型コラーゲン遺伝子発現調節機構

そこで、Gadd45β およびその関連分子が変形性関節症の軟骨変性に関与していると仮説し、そのトランスジェニックマウスを作成し、変形性関節症の発症に関与するか否かを検討することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は Gadd45β および C/EBPβ のトランスジェニックマウスを作成することにある。

3. 研究の方法

COMP (Cartilage oligomeric matrix protein) は軟骨特異的に発現する glycoprotein として報告された分子であるが、腱や靭帯と同様に発生の段階で成長軟骨や関節軟骨に発現することが知られている。そこで、この COMP の時間特異的軟骨特異的に発現調節するために Tet-off vector と COMP promoter を用いて mCOMP^{Tg}/pcDNA3.1 mice を作成し、Gadd45β および C/EBPβ の発現 vector を injection した pTR-Tight/Gadd45β mice および pTR-Tight/ C/EBPβ mice と交配させ、Conditional Gadd45β transgenic mice および Conditional C/EBPβ transgenic mice を作成することとした。

まず、Tet transactivator element (tTA) を mCOMP promoter の制御下で発現する transactivator transgenic mice を作成した。PminCMV (birectional minimal cytomegalovirus) responsive promoter で DsRed gene と Gadd45β gene および C/EBPβ gene の双方を発現する Reporter line を作成した。図 2 には mCOMP pr

omoter と C/EBPβ の Construction を示す。また、図 3 には pTR-Tight/ C/EBPβ mice の Engineering system を示す。

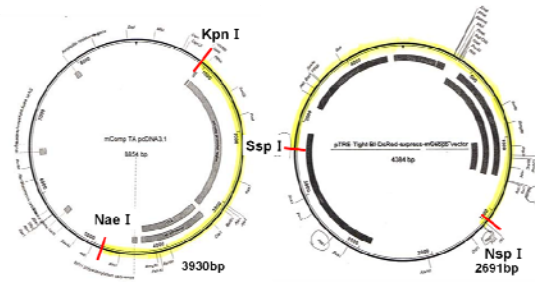


図 2. Construction of plasmid of mCOMP and C/EBPβ

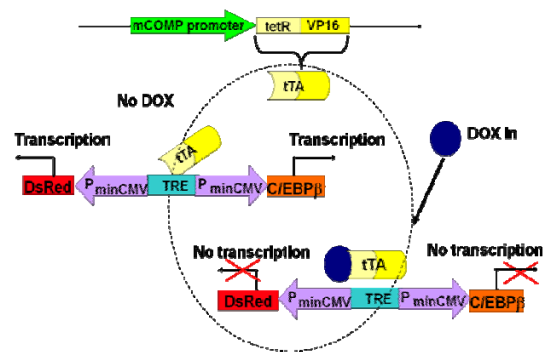


図 3. Engineering an *in vivo* system for conditional overexpression of genes in the chondrocytes

COMP-Tg mice line の確立を確認する目的で、tTA の PCR を施行した。COMP-Tg mice 由来の Primary chondrocyte に pTRE-Luc vector と pTRE-Tight-BL-DsRed-express/mGadd45β および C/EBPβ vector を導入し、tTA と DsRed の発現を Luciferase assay と Fluorescent microscope で組織学的に検討した。Doxycycline (DOX)-dependent transgene overexpression は DOX ありなしの細胞培養にて確認した。

4. 研究成果

受精とともに Gadd45β を強制発現させた成長軟骨では軟骨細胞の増殖期からの早期の肥大化が引き起こされた。組織学的に軟骨細胞層の増殖が定量的に証明できた。さらに、免疫染色を行い、増殖した肥大軟骨細胞での Gadd45β 発現を確認した。内軟骨性骨化が早期に起きることにより長管骨の短縮変形が生じた。

Conditional C/EBPβ transgenic mice もほぼ同様の四肢短縮を認めた。Conditional C/EBPβ transgenic mice では、さらに鼻骨部から軟骨細胞を採取し、DOX 刺激の有無にて C/EBPβ の遺伝子発現、蛋白発現を確認し、動物作成

の正当性を証明した。さらに、DOX を投与し C/EBP β を矯正発現させた細胞の Gadd45 β 発現量を real time PCR, Western blotting にて検討した。その結果、C/EBP β の発現亢進により、その下流に Gadd45 β が発現亢進することが分かった。

今後、これらの動物を交配した Conditional Gadd45 β /C/EBP β double transgenic mice および、その靭帯切断 OA モデルを作成する予定である。

また脊柱靭帯切離による変形性脊椎症モデルや、膝靭帯切除による変形性関節症モデルを作成し、軟骨変性の状態を確認する。さらに、Adenovirus を用いて shRNA Gadd45 β および shRNA C/EBP β を deliver し、両分子の治療標的分子としての可能性を検討していきたいと考えている。

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 4 件)

1. Shimada H, Sakakima H, Tsuchimochi K, Matsuda F, Komiyama S, Goldring MB, Ijiri K. Senescence of chondrocytes in aging articular cartilage: GADD45 β mediates p21 expression in association with C/EBP β in senescence-accelerated mice. *Pathol Res Pract*. 207(4):225-231, 2011 (査読: 有)

2. M Zenmyo, A Tanimoto, H Sakakima, M Yokouchi, S Nagano, T Yamamoto, Y Ishido, S Komiyama, K Ijiri. Gadd45beta expression in chondrosarcoma: A pilot study for diagnostic and biological implications in histological grading. *Diagnostic Pathology* 5(1):69, 2010 (査読: 有)

3. Tsuchimochi K, Otero M, Dragomir CL, Plumb DA, Zerbini LF, Libermann TA, Marcu KB, Komiyama S, Ijiri K, Goldring MB. GADD45beta enhances Col10a1 transcription via the MTK1/MKK3/6/p38 axis and activation of C/EBPbeta-TAD4 in terminally differentiating chondrocytes. *J Biol Chem*. 285(11):8395-8407, 2010 (査読: 有)

4. Izumi T, Fujii R, Izumi T, Nakazawa M, Yagishita N, Tsuchimochi K, Yamano Y, Sato T, Fujita H, Aratani S, Araya N, Azakami K, Hasegawa D, Kasaoka S, Tsuruta R, Yokouti M, Ijiri K, Beppu M, Maruyama I, Nishioka K, Maekawa T, Komiyama S, Nakajima T. Activation of synovial promoter in rheumatoid synovial cells by a no-

vel transcription complex of interleukin enhancer binding factor 3 and GA binding protein alpha. *Arthritis Rheum*. 60(1):63-72, 2009 (査読: 有)

[学会発表] (計 10 件)

1. 土持兼之, 嶋田博文, 井尻幸成, 小宮節郎, Miguel Otero, Mary Goldring 軟骨終末分化における Gadd45 β による C/EBP β 活性化分子メカニズム 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会 2010 年 10 月 14 日~15 日 京都市

2. 土持兼之, 嶋田博文, 井尻幸成, 小宮節郎, Otero Miguel, Mary B. Goldring 軟骨終末分化において Gadd45 β は MTK1/MKK3/6/p38 と C/EBP β の活性化を介して Col10a1 転写を促進する 第 23 回日本軟骨代謝学会 2010 年 4 月 2 日~3 日 鹿児島市

3. 嶋田博文, 井尻幸成, 小宮節郎, 榊間春利, 松田史代, 土持兼之, Mary B Goldring SA M 関節軟骨の GADD45 β と C/EBP β の局在~免疫組織学的 第 22 回日本軟骨代謝学会 2009 年 3 月 6 日~7 日 名古屋市

4. Shimada H, Ijiri K, Komiyama S, Sakakima H, Matsuda F, Tsuchimochi K, M.B. Goldring GADD45 β and C/EBP β distribution in aging articular cartilage of senescence-accelerated mice 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, February 22-25, 2009 Las Vegas, USA

5. 井尻幸成, 土持兼之, 嶋田博文, 小宮節郎, Mary B. Goldring, Aigner Thomas 関節軟骨における GADD45beta の遺伝子発現-OA の進行とその発現量変化- 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 2008 年 10 月 23 日~24 日 京都市

6. 土持兼之, 井尻幸成, 嶋田博文, 小宮節郎, Mary Goldring 軟骨細胞終末分化における Gadd45 β の下流ターゲット因子としての C/EBP β の同定 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 2008 年 10 月 23 日~24 日 京都市

7. 嶋田博文, 井尻幸成, 土持兼之, 小宮節郎, Mary B. Goldring, 榊間春利, 松田史代, 米和徳 マウス関節軟骨における GADD45beta の発現-ICR マウスと SAMP マウスを用いて- 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 2008 年 10 月 23 日~24 日 京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井尻幸成 (KOSEI IJIRI)

研究者番号 : 00315417