

博士論文

過剰な力学的負荷による関節軟骨変性機序の解明

張 成虎

目次

要旨	5 頁
第 1 章 序論	6 頁
第 2 章 実験材料および方法	9 頁
2-1. 実験動物	
2-2. マウス遺伝子型の同定	
2-3. 細胞培養	
2-4. マウス初代軟骨細胞採取	
2-5. 力学的負荷装置	
2-5-1 細胞伸展装置	
2-5-2 周期的静水圧負荷装置	
2-6. リアルタイム RT-PCR	
2-7. Western ブロットニング	
2-8. マウス初代軟骨細胞、関節軟骨の組織学的検討	
2-8-1. 免疫組織化学染色	
2-8-2. アポトーシスの評価(TUNEL 染色)	
2-9. 実験的マウス変形性膝関節症モデルの作出	
2-10. タモキシフェン注射	
2-11. 放射線学的解析	
2-12. DMMB assay	

- 2-13. マイクロアレイ
- 2-14. 発現ベクターの作成
- 2-15. ルシフェラーゼレポーターアッセイ
- 2-16. 統計学的解析

第3章 結果

20 頁

- 3-1. 過剰な力学的負荷に伴う軟骨細胞の発現解析
 - 3-1-1. 過剰な伸展負荷によってもたらされるマウス初代軟骨細胞における *Mmp13* の発現解析
 - 3-1-2. 過剰な伸展負荷に伴うマウス初代軟骨細胞の網羅的遺伝子解析
 - 3-1-3. 力学的負荷に伴う *Grem1* の発現確認
 - 3-1-4. 周期的静水圧負荷における *Grem1* の発現
- 3-2. 変形性関節症における *Grem1* の発現確認
- 3-3. *Grem1* の軟骨に対する異化同化作用
 - 3-3-1. ATDC5 細胞におけるレンチウイルスによる *Grem1* の発現
 - 3-3-2. rhGREM1 投与下のマウス初代軟骨細胞における catabolic factor、anabolic factor の発現
 - 3-3-3. rhGREM1 投与下の DMMB assay
 - 3-3-4. rhGREM1 投与下のマウス大腿骨頭の mRNA 発現解析
 - 3-3-5. rhGREM1 投与下のマウス初代軟骨細胞における網羅的発現解析
- 小括 1
- 3-4. マウス変形性関節症モデルにおける *Grem1* の機能解析
 - 3-4-1. マウス膝変形性関節症モデル術後の rhGREM1 投与

- 3-4-2. マウス初代軟骨細胞を用いた **Grem1** 中和抗体の予備実験
- 3-4-3. マウス膝変形性関節症モデル術後の **Grem1** 中和抗体投与
- 3-4-4. *Col2a1-Cre^{ERT2} ; Grem1^{fl/fl}*マウスを用いた**Grem1** の変形性関節症における機能解析

小括 2

- 3-5. 軟骨細胞において **Grem1** により影響をうけるシグナルの解析
 - 3-5-1. luciferase assay を用いた **Grem1** の下流検索
 - 3-5-2. *Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウス大腿骨頭を用いたDMMB assay
 - 3-5-3. IKK-inhibitor を用いた DMMB assay

小括 3

第 4 章	考察	29 頁
第 5 章	結語	35 頁
第 6 章	謝辞	36 頁
第 7 章	参考文献	37 頁

要旨

過剰な力学的負荷に伴う関節軟骨変性の機序を解析した。過剰な伸展負荷を与えたマウス初代軟骨細胞の網羅的遺伝子解析から、過剰な力学的負荷により発現が上昇する分泌蛋白Grem1に着目した。Recombinant human GREM1 (rhGREM1)をマウス軟骨細胞や大腿骨頭に投与するとMmp13やAdamts5などのcatabolic factorの上昇が確認され、細胞内で過剰発現させても同様の結果が得られた。マウス変形性膝関節症モデルを用いた*in vivo*の実験でもGrem1はマウスの変形性関節症を進行させ、その中和抗体により抑制されることがわかった。NF- κ Bシグナルの転写因子であるRelaのノックアウトやNF- κ Bシグナルの阻害剤を用いるとGrem1のcatabolicな作用は抑制されることがわかりGrem1のcatabolicな作用はNF- κ Bシグナルを介していることが判明した。

序論

昨今の高齢社会において、要介護の主要な原因の一つであるロコモティブシンドロームは大きな社会問題であり、その中で最大の疾患である変形性関節症に対する新規治療法の開発は喫緊の課題となっている。変形性関節症は遺伝的要因、代謝疾患要因、環境的要因、そして力学的負荷など様々な要因からなる多因子疾患であるが、中でも過度の体重増加もしくは過度の運動などが高いリスクであることから、過剰な力学的負荷は変形性関節症の最大の誘因と考えられている[1]。しかしながら、力学的負荷による変形性関節症の発症・進行における病態生理、メカニズムは未だにごく部分的にしか解明されていない。さらには、どのように細胞が力学的負荷を感知してそれを生化学的なシグナルに変換するかについても多くは不明のままである[2]。適度な力学的負荷は関節軟骨の健康な状態の維持に必要不可欠であることは、*Col2a1*遺伝子のheterozygous mutantマウスにおいて自主的なwheel runningが軟骨保護的に働くことから実証されている[3,4]。しかし、過剰な膝関節への力学的負荷、malalignmentや体重過多は変形性関節症のrisk factorであることも報告されており[5]、過剰な慢性的な力学的負荷の蓄積は組織への微小なダメージを与え軟骨細胞を変性に導くことが示唆されている[6,7]。関節軟骨に過剰な力学的負荷が加わるとTGFβシグナル[8]、Wntシグナル[9]、MAPKシグナル[10]など様々なシグナルが活性化され軟骨の変性をすすめることが報告されているが、その中でもNF-κBシグナルは主要なシグナル経路であり、過剰な力学的負荷に伴うNF-κBシグナルの活性化により様々な炎症性サイトカインが誘導され軟骨変性が進む事が明らかとなっている[11]。

今回我々は力学的負荷に伴う軟骨の変性メカニズムの解明に取り組むべく細胞に過剰な伸展負荷を与える実験から開始した。軟骨系cell lineに伸展負荷を与える先行研究をもとに[12] 分子生物学的に汎用性の高いマウス初代軟骨細胞を用いて、過剰な伸展負荷後にcatabolic factorである*Mmp13*の上昇を再現する事に成功した。そして発現する分子をmicro arrayを用いて網羅的に解析し、軟骨に発現が多く変形性関節症関連分子でありながら[13,14]その機能の詳細は明らかではない*Gremlin1*(以下*Grem1*)に着目した。

*Grem1*はDAN familyに属する20.7kDa、184アミノ酸glycoproteinでcystein knot 分泌蛋白である。*Grem1*はもともと胎生期の四肢の発生においてBMPの antagonistとして知られている[15]。*Grem1*はBMP-2, BMP-4, BMP-7などと heterodimerを形成してBMPのligand-receptor signalingを阻害してBMPの働きを抑制する[16]。またBMPと結合する機能とは別に*Grem1*は直接細胞に働きかけるメカニズムもある。分泌された*Grem1*はがん細胞に直接結合し細胞増殖や浸潤を誘導するという報告[17]やslit proteinに直接結合して単球の遊走を抑制するという報告もあり[18]その多彩な機能と作用機序は十分には解明されていない。*Grem1*は近年緑内障、糖尿病性腎症、肺高血圧、心筋線維症など力学的負荷と関連のある疾患と深く関わっていることで注目されている[19,20,21,22]。変形性関節症においては変形性関節症の軟骨で健常人よりも発現が増えることはわかっているが[13]、*Grem1*の軟骨に対する分子生物学的な知見は我々が渉猟しえた限りではほとんど存在しない。

本研究で我々はまず細胞伸展装置を用いて過剰な力学的負荷に伴い発現する遺伝子の網羅的解析を行い、その中で*Grem1*を有力な候補遺伝子として着目した。より詳細な発現解析のために関節内に近い環境で圧縮力学的負荷を再現できる周期的静水圧負荷装置を作成し*Grem1*の過剰な力学的負荷後の発現を確認した。

*In vitro*で分泌蛋白Grem1の関節軟骨に対する作用を軟骨系細胞へのrhGREM1投与やGrem1の過剰発現を通じて解析した。*In vivo*ではrhGREM1やGrem1中和抗体の関節内注射やtamoxifen誘導性に軟骨特異的にGrem1をノックアウトできる *Col2a1-Cre^{ERT2}; Grem1^{fl/fl}*マウスを用いてマウス膝変形性関節症モデルを作成しGrem1の変形性関節症における働きを解析した。そして、luciferase assayやNF-κBシグナルの代表的転写因子Relaのノックアウトマウス、NF-κB阻害剤を用いた*in vitro*の実験でGrem1の作用機序がNF-κBシグナルを介して行われることを明らかにした。

本研究の目的はこれらの結果から、過剰な力学的負荷による軟骨変性機序を解明することである。

第2章 実験材料および方法

2-1. 実験動物

Col2a1-Cre マウスは米国 Jackson 研究所より購入した[23]。

Col2a1cre-^{ERT2} マウスはRochester UniversityのDi Chen博士より供与された[24]。

Grem1 のcoding sequenceを含むexon2 を loxP 配列で挟み込んだ *Grem1-floxed* マウスは Department of Research, Saint Francis Hospital and Medical Centerの Ernesto Canalis博士、京都大学腎臓内科 柳田素子博士より[25]、*Rela-floxed* マウスは Technical University of MunichのHana Algül博士、Roland M. Schmid博士より供与された[26]。

これらのマウスは C57BL/6 background で維持した。*Grem1* のジェネラルノックアウトマウスは生後致死であるためtamoxifen誘導性の*Col2a1-Cre^{ERT2}* マウスと*Grem1^{fl/fl}* マウスとを交配させることにより軟骨細胞特異的 *Grem1* ノックアウトマウスである*Col2a1-Cre^{ERT2} ; Grem1^{fl/fl}* マウスを作成した。軟骨特異的*Rela* ノックアウトマウスは*Rela^{fl/fl}* マウスと*Col2a1-cre* マウスと交配させることによって*Col2a1-cre ; Rela^{fl/fl}* マウスを作出した。哺乳 5 日齢と 3 週齢のWild typeマウスは三共ラボサービスより購入した。

2-2. マウス遺伝子型の同定

マウスの遺伝子型の同定は以下の通り行った。生後 10 日から離乳時期である 21 日までの間に、尾を約 0.5 cm 切断した。尾断片よりアルカリプレップ法を用いて、ゲノム DNA を抽出した。これを用いて遺伝子上の以下の配列を用いた

PCR により、DNA 断片の有無を電気泳動で確認した。

Grem1 flox primer 1: 5'- TGGCAGAAAGAATGATACCAG -3'
 primer 2: 5'- ACAGGTCACACAGTGAATTTGCC -3'
 WT : 333bp flox : 281bp

Cre primer 1: 5'- GCATTTCTGGGGATTGCTTA - 3'
 primer 2: 5'- CCCGGCAAACAGGTAGTTA -3'

RelA- flox primer 1: 5'- GAAGCTGGTCTGCCAAGAAC-3'
 primer 2: 5'- CATCAAAGTCAGCCAGGTCA-3'
 WT:139bp flox:174bp
 primer 3: 5'- GACCAGATCCTTCTAGACAG-3'
 primer 2: 5'- TGAAACATCAGCGGTCTCAG-3'
 WT:460bp flox:バンドなし

PCR 条件

1. 94°C (3 min)
2. 98°C (1 min) , 60°C (30 sec) , 68°C (30 sec) × 33 cycles
3. 68°C (5 min)

全ての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（総理府告示）」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って行った。

2-3. 細胞培養

マウス未分化軟骨細胞株 ATDC5 細胞（RIKEN Cell Bank）は 1%

Penicillin/streptomycin solution (P/S solution、Sigma-Aldrich) と 5% Fetal bovine serum (FBS、Sigma-Aldrich) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) /F-12 (1:1) (Wako) にて培養した。Recombinant human GREM1(120-42, PEPROTECH)、Grem1 中和抗体 (LS-C125371, LSbio)、IKK-inhibitor(BMS-345541, Sigma-Aldrich)は、PBS で培養細胞を洗浄後、無血清の DMEM にて 2 時間培養を行った後に、それぞれ 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 ng/mL 、5 μM の濃度で投与した。

2-4. 初代軟骨細胞採取

初代関節軟骨細胞は生後5-7日のマウスより大腿骨遠位、脛骨近位、大腿骨頭を取り出し、軟部組織を除去した後、0.3%コラゲナーゼD (Roche) を含んだ DMEM/F-12 (1:1) を加え、45分インキュベート後攪拌を2回繰り返した後、0.06% コラゲナーゼDを含んだDMEM/F-12 (1:1) を加えovernightでインキュベートし、攪拌・濾過・遠心して採取した[27]。初代軟骨細胞は、1% P/S solutionと10%FBS を含むDMEM/F-12 (1:1) にて培養した。上記の培養は全て37°Cの炭酸ガス培養器中 (5%CO₂) で行った。今回の初代軟骨細胞採取プロトコールは関節軟骨組織から表層、中間層、深層をすべて含めてコラゲナーゼ処理で採取したものと考えられ、近年報告された関節軟骨最表層 (Superficial zone) のみ採取する方法 [28]とは異なる

2-5 力学的負荷装置

2-5-1 細胞伸展装置

細胞伸展装置としてSTB-140(ストレックス) (図 1 A) を用いた。2×2cmのシリコンチャンバーにマウス初代軟骨細胞を 1.0×10^5 個撒き2日間 1%

Penicillin/streptomycin solution (P/S solution、Sigma-Aldrich) と5%Fetal bovine serum (FBS、Sigma-Aldrich) を添加したDMEMで培養し、24時間の無血清DMEMでの培養後10%, 0.5Hz, 30分の伸展負荷を与えた。その後経時的に細胞を回収し解析を行った。

2-5-2 周期的静水圧負荷装置

関節内の3次元的な圧力負荷を再現するために周期的静水圧をストレックス社でオーダーメイドした。半径3cm, 高さ1cmのチャンバーの膜は液体や細胞などは透過しないがガス交換を可能にした特殊な膜で構成されている(図4A)。このチャンバーを無血清DMEMで充満し、採取した3週のマウス大腿骨頭(10個/チャンバー)を24時間37°Cの炭酸ガス培養器中 (5%CO₂) で培養した。その後生理的な負荷として5MPa, 0.1Hz, 30分の負荷と、過剰な力学的な負荷として20MPa, 0.1Hz, 30分の周期的静水圧負荷を与え24時間後に大腿骨頭を採取した。こちらを破砕機で破砕しTrizolで回収してmRNAの発現解析を行った。採用した圧力は先行論文の条件を元に設定した。軽度から中等度の動作下で人間の膝が受ける接触圧力は1~6MPaであり、半月板切除に伴う接触圧力の上昇は2~3倍に増加することが知られている[29]。

2-6. リアルタイムRT-PCR

RNAはTrizol (Thermo Fisher Scientific) を用いて回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製した。0.5 µgのRNAをQuantiTect reverse transcription Kit

(Qiagen) により逆転写してsingle-stranded cDNAを得た。ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用した。QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen)、各種プライマーを用いてPCRを行った。Rodent total RNA (Applied Biosystems) でマウス*Gapdh*を測定し、内因性コントロールとした。これらによりそれぞれの遺伝子のmRNAコピー数の比を $\Delta\Delta CT$ 法を用いて測定した。各サンプルの測定値は、3 wellでの計測値の平均値とした。

用いたプライマーは以下のとおりである。

<i>Grem1</i>	forward primer: 5'- TGGAGAGGAGGTGCTTGAGT-3'
	reverse primer: 5'- AACTTCTTGGGCTTGCAGAA -3'
<i>Mmp13</i>	forward primer: 5'- AGGCCTTCAGAAAAGCCTTC -3'
	reverse primer: 5'- TCCTTGGAGTGATCCAGACC -3'
<i>Adamts5</i>	forward primer: 5'- GCTACTGCACAGGGAAGAGG-3'
	reverse primer: 5'- TGCATGTTTGGGAACCCATT -3'
<i>Col2a1</i>	forward primer: 5'- GCCAAGACCTGAACTCTGC -3'
	reverse primer: 5'- GCCATAGCTGAAGTGGAAGC -3'
<i>Acan</i>	forward primer: 5'- CCAAACCAGCCTGACAACTT -3'
	reverse primer: 5'- TCTAGCATGCTCCACCACTG -3'
<i>Sox9</i>	forward primer: 5'- CGACTACGCTGACCATCAGA -3'
	reverse primer: 5'- AGACTGGTTGTTCCCAGTGC -3'
<i>Gapdh</i>	forward primer: 5'- TGCACCACCAACTGCTTAGC -3'
	reverse primer: 5'- GGATGCAGGGATGATGTTCT -3'

2-7. Westernブロッティング

培養細胞を氷冷PBSで2回洗った後、M-PER Mammalian Protein Extraction

Reagent (Thermo Scientific) を用いて細胞から蛋白を回収した。細胞溶液は4°Cで2時間回転した後、15,000 gにて10分間遠心し、上清を実験に用いた。蛋白量は、Protein Assay Kit II (BIO RAD) を用いて定量した。7.5-15% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲル (D.R.C. Co., Ltd.) で電気泳動し、泳動終了後に蛋白をpolyvinylidene difluoride メンブレン (PVDF)

(BIO-RAD) に転写した。抗体の非特異的結合を防ぐため6%スキムミルクを加えた溶液でブロッキングした後、一次抗体 ; Grem1 (1:500, LS-C125371, LSbio) 、 β -actin (1:500, A2066, Sigma) と反応させた。二次抗体にはHRP標識抗体 (1:1000, A402B, Promega) を用い、ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham) により特異的なバンドを検出した。またバンドを検出した後のメンブレンを異なる抗体で再びブロットする場合には、50°CのStripping buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 100 mM 2-mercaptoethanol) 中で20分間振とうさせることにより抗体を解離させた。

2-8. マウス初代軟骨細胞、関節軟骨の組織学的検討

細胞サンプルはマウス初代軟骨細胞を用いた。細胞をシリコンチャンバー上で培養し4% paraformaldehyde/PBSで室温10分固定、その後PBSで洗浄し0.1% Triton X/PBSで室温10分反応させたあと以下の手順で細胞染色を行なった。

組織切片には16週マウス膝関節を用いた。4% paraformaldehyde/PBSにて4°Cで一晩固定した後にパラフィン包埋し、切片を4 μ m厚で作成した。切片は脱パラフィン後に、Hematoxylin-Eosin(HE)染色、サフラニン染色に加え、以下の手順で組

織染色を行った。

2-8-1. 免疫細胞、組織化学染色

細胞サンプルはPBSで洗浄後1%BSA/PBST(0.05%)でブロッキングを室温で60分行い1次抗体 ; Grem1(1:200; LS-C125371, LSbio) を室温で60分反応させた。翌日にPBSTで3分×2回洗浄後、2次抗体;Alexa Flour488 goat anti-mouse IgG (1:500;A11001,Invitrogen)を室温で60分反応させPBSTで3分×2回洗浄を行なった。封入の際には、VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI(H-1200)を用いて核染色を行った。

組織切片はキシレンにて脱パラフィン後エタノール置換した後に10分間水道水で親水化し10mMクエン酸ナトリウム緩衝液pH6.0で15分100℃で賦活化、その後はCSA II (DAKO) に従い免疫組織染色を行った。具体的には、peroxidase blockを5分間行った後に、TBSTにて3分×2回洗浄し、その後protein blockを30分行い、そのまま一次抗体 ; Grem1(1:200; LS-C125371, LSbio)、Mmp13(1:200 MAB13424,Chemicon)、Adamts5(1:200;ab41037, abcam) 、 RelA(1:500; #8242, cell signaling)と4℃で一晩反応させた。抗体の希釈には、付属のAntibody diluent(Dako)を用いた。Grem1、Mmp13、Adamts5の免疫染色の際にはperoxidase blockの後、37℃で30分間ヒアルロニダーゼ処理 (Sigma-Aldrich H3506 1:40) を行った後にblockingを行った。翌日にTBSTで3分×3回洗浄後、付属の2次抗体にて60分反応させた後にTBSTにて3分×3回洗浄を行い、amplificaton reagentで10分反応させ、TBSTにて3分×3回洗浄を行った。封入の際には、VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI(H-1200)を用いて核染色を行った。

2-8-2. アポトーシスの評価 (TUNEL染色)

2-8-1と同様に、組織切片を脱パラフィン後、エタノール処置、親水化した後に10 µg/mL Protein K(Invitrogen)にて室温、15分前処置を行い、PBSで洗浄後、In Situ cell Death Detection Kit(Roche)のTUNEL Reaction Mixture 50 µlにて37°Cで60分反応させてTUNEL染色を行った。

2-9. 実験的マウス変形性膝関節症モデルの作出

8週齢の雄マウスに対し、アバーチン麻酔下に右膝関節を展開して内側側副靭帯および内側半月板を切除し、人為的な不安定性を誘導して変形性膝関節症を誘発した[30]。術後8週にてマウスを安楽死させ、固定液（リン酸緩衝液4%パラホルムアルデヒド、pH 7.4）で灌流固定の後、膝関節を摘出、10%EDTA (pH7.4)、4°Cで3週間ほど脱灰を行い、パラフィン包埋した。その後4 µm スライスの組織切片を作成した。切片はHE染色の他、Safranin O と Fast green の二重染色を行った。変形性関節症の組織学的評価にはOARSI (Osteoarthritis Research Society International) の定める grading system を用いて評価した[31]。

2-10. タモキシフェン注射

7週齢の雄の同胞*Grem1^{fl/fl}*マウスと*Col2a1-Cre^{ERT};Grem1^{fl/fl}*マウスに対し、コーンオイルに溶解したタモキシフェン (Sigma) を100 µg/g body weight/dayにて5日間連続で腹腔内注射した[32]。

2-11. 放射線学的解析

全身の X 線撮影には各週齢のマウスにアバーチン（体重 1gあたり 25 μ l）を腹腔内投与して麻酔をかけ、X線撮影装置 CMB-2（ソフテックス株式会社）を使用した。撮影条件は電圧 35 kV、電流 3.5 mA、時間 90 秒、撮影距離 65 cm として工業用フィルム IX FR(Fuji Film)を使用した。

2-12. DMMB アッセイ

術後 3 週のマウスの大腿骨頭をプロトコールに沿って[33] 取り出した。Recombinant human GREM1(120-42, PEPROTECH)、Grem1 中和抗体 (LS-C125371, LSbio)、IKK-inhibitor(BMS-345541, Sigma-Aldrich)を、無血清のDMEMにて大腿骨頭を 2 時間培養を行った後に、それぞれ 1-10 μ g/mL、10 ng/mL、5 μ Mの濃度で投与し 37°Cの炭酸ガス培養器中（5%CO₂）で 72 時間培養した。培養後上清を 40 μ lずつ採取し上清中のアグリカン濃度をSulfated GAG Quantitation Kit（SEIKAGAKU BIOBUSINESS CORPORATION 280560）と吸光度計 MICROPLATE READER SH-8000（CORONA）を用いてを測定した。

2-13. マイクロアレイ

RNAをTrizol（Thermo Fisher Scientific）を用いて回収し、RNeasy Mini Kit（QIAGEN）を用いて精製した。RNAの純度の確認、データ解析は、Agilent Array 発現解析（Takara bio）に依頼した。アレイは、SurePrint G3 Mouse Gene Expression 8x60Kを用いて 1 色法にて行った。シグナル強度に問題なく転写産物が検出された遺伝子を解析の対象とした。

2-14. 発現ベクターの作成

解析を行った分子の発現ベクターの作成は、以下のような手順で行った。まず目的遺伝子のcDNA全長の塩基配列をヒトcDNAライブラリーを鋳型としてKOD-plusポリメラーゼ (Takara bio) を用いたPCR法によって増幅した。PCR条件は目的遺伝子塩基配列長・デザインしたプライマーの特性に基づいてそれぞれ調節した。次いでこれをサブクローニングした後、PCMV-HAベクター (Clontech) にそれぞれ適切な制限酵素サイトを用いて組み込んだ。得られたクローンの塩基配列はサイクルシーケンス法を用いて確認し、正しく増幅されているものを発現ベクターとしてアッセイに使用した。

Grem1の Gene BankへのアクセスナンバーはNM_013372である。

2-15. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼレポーターベクターとして、PGL4 (Promega) を用いた。NF- κ B (pGL4.32[luc2P/NF- κ B-RE/Hygro]) は NF- κ B consensus 配列を複数のコピーを含む NF- κ B 応答ベクターであり、TGF- β (pGL4.48[luc2P/SBE/Hygro]) は 3 つの Smad-binding element(SBE)を含む応答ベクターである。また、Wnt (pGL4.49[lucP/TCF-LEF RE/Hygro]) は 8 つの TCF-LEF 応答エレメントを含む応答ベクターである。pGL4.32、pGL4.48、pGL4.49 の Response Element はいずれも特定の遺伝子プロモーター由来の配列ではなく、Genomatix 社が提供するデータベースより抽出したコンセンサス配列をもとに合成された、人工配列を使用している。

遺伝子導入においてはATDC5細胞を48-well プレートに播種し、24時間後に Fugene-6 (Roche) を用いて50 ngのpGL4レポーターベクターと50 ngの発現ベクターを遺伝子導入した。また、内在性コントロールとして4 ngのpRL-TK (Promega) を合わせて導入した。細胞は導入後48時間にて回収した。ルシフェラーゼアッセイは、PicaGene Dual SeaPansy Luminescence Kit (東洋インキ) と GloMax96 Microplate Luminometer (Promega) を用いて行った。Firefly luciferase 活性はRenilla luciferase活性で標準化した。

2-16. 統計学的解析

各実験から得られた結果は、平均±標準偏差として表記した。群間比較検討には one-way ANOVA 解析と Tukey-Kramer HSD 検定を用いて有意水準 0.01 と 0.05 で検定した。解析ソフトは JMP pro 11 を用いた。

第3章 結果

3-1 過剰な力学的負荷に伴う軟骨細胞の発現解析

3-1-1 過剰な伸展負荷に伴うマウス初代軟骨細胞の*Mmp13*の発現

Human chondrosarcoma cell lineであるSW1353に過剰な伸展負荷（10%伸展率、0.5 Hz, 30分）を与えて24時間後にcatabolic factorである*MMP13*が上昇する系に着目し[12]、こちらをより汎用性のあるマウス初代軟骨細胞で実施したところ24時間をピークに*Mmp13*が上昇する系を再現することができた（図1B）。

3-1-2. 過剰な伸展負荷に伴うマウス初代軟骨細胞の網羅的遺伝子解析

過剰な力学的負荷を与える前のマウス初代軟骨細胞と与えたあと*Mmp13*の発現がピークを迎える24時間後のマウス初代軟骨細胞をそれぞれ回収しDNAマイクロアレイを用いて網羅的な発現遺伝子解析を実施した。得られた結果からストレス前と比較してストレス後に2倍以上（ $\log_2 \text{ratio} > 1$ ）のシグナル強度の上昇を示す遺伝子を絞り込み、尚且つ、ストレス前のマウス初代軟骨細胞でのシグナル強度が最も強い上位10遺伝子を絞り込んだ（図2）。その中で変形性関節症関連分子ではあるが関節軟骨でその機能が解明されていない*Grem1*に着目した。

3-1-3. 力学的負荷に伴う*Grem1*の発現確認

マウス初代軟骨細胞に10%, 0.5Hz, 30分の過剰な伸展負荷を与えて12、24時間で細胞を回収しReal-time RT-PCRでmRNAの発現を確認したところ経時的に*Grem1*の発現が上昇することが確認された（図3A）。また、蛋白レベルでの発

現を確認するために同様に過剰な伸展負荷を与えたマウス初代軟骨細胞に細胞免疫染色を行いGrem1の発現を確認したところ、伸展負荷前に比べて負荷後で明らかにGrem1の発現が上昇していることが確認された（図3B）。

3-1-4. 周期的静水圧負荷におけるGrem1の発現

伸展負荷装置で再現できない関節内の3次元圧縮負荷を再現するために周期的静水圧負荷装置を用いてGrem1の発現の解析を行った。3週齢のマウス大腿骨頭を採取しそれぞれ生理的な圧縮負荷である5MPa, 0.1Hz, 30分と過剰な圧縮負荷である20MPa, 0.1Hz, 30分の負荷を与え24時間後のGrem1の発現を比較検討したところ生理的な負荷ではGrem1の発現は上昇しなかったが、過剰な負荷で発現が上昇することが確認された（図4 B）。

以上よりGrem1は軟骨細胞で伸展負荷でも3次元圧縮負荷でも過剰な力学的負荷で上昇することが確認された。

3-2. 変形性関節症における Grem1 の発現解析

ヒトではGREM1が変性した軟骨で上昇するという報告があるが[13]マウスでの変形性関節症でのGrem1の発現の解析をすべく8週のwild typeマウス変形性関節症モデルの作出を行い2,4,6,8週と経時的に変性が進む関節軟骨においてのGrem1の発現を免疫組織学的染色を用いて解析した。結果、マウス変形性関節症モデルにおいて軟骨変性が進むに連れてGrem1の発現が上昇することが確認された（図5）。

3-3. *In vitro*のGrem1の軟骨における作用

次に、Grem1の軟骨における作用を解析した。現在までの実験でGrem1が過剰な力学的負荷で細胞内で発現が上昇することやGrem1が分泌蛋白であることなどを考慮してGrem1の軟骨細胞に対する働きを細胞内、細胞外からの両側面で評価した。

3-3-1. ATDC細胞におけるレンチウイルスによるGrem1の過剰発現

ATDC5細胞においてレンチウイルスにより*Grem1*を過剰発現しmRNAをReal-time RT-PCRで解析したところ*Grem1*を過剰発現した細胞ではcatabolic factorである*Mmp13*や*Adamts5*の発現が上昇することがわかった(図6)。

3-3-2. rhGREM1投与下のマウス初代軟骨細胞におけるcatabolic factor, anabolic factorの発現

マウス初代軟骨細胞にrhGREM1 10 μ g/mLを投与したところレンチウイルスによる過剰発現同様catabolic factorである*Mmp13*, *Adamts5*が上昇しanabolic factorである*Col2a1*, *Acan*, *Sox9*の発現が低下していた (図7)。

3-3-3. rhGREM1投与下のDMMB assay

軟骨細胞にGrem1がcatabolicに作用することが明らかとなったが、軟骨組織に対するGrem1の作用を明らかなるために3週齢マウスの大腿骨頭にrhGREM1を投与して上清中のAggrecanの量を測定するDymethyl-methylene blue

dye-binding (DMMB) assayを実施した。結果、rhGREM1の容量依存性に上清中のAggrecanの量が上昇することが確認された（図8）。

3-3-4. rhGREM1投与下のマウス大腿骨頭のmRNA発現解析

上記で利用したマウス大腿骨頭を回収し破砕しmRNAの発現を解析した。細胞培養の結果同様、*Mmp13*, *Adamts5*などのcatabolic factorの上昇と*Col2a1*, *Acan*, *Sox9*などのanabolic factorの低下が確認された(図9)。

3-3-5. rhGREM1投与下のマウス初代軟骨細胞における網羅的発現解析

軟骨においてGrem1によって誘導される遺伝子を網羅的に解析するためにrhGREM1 10 μ g/mLをマウス初代軟骨細胞に投与して48時間後に細胞を回収しマイクロアレイによって網羅的発現解析を行った。結果、*Mmp13*や*Adamts5*以外にも*Mmp3*, *Il1b*, *Il6*などのcatabolic factorの上昇を確認した（図10）。

小括1

Grem1は過剰な力学的負荷によって誘導されマウス変形性関節症で上昇することが判明した。また、*Grem1*を細胞内で過剰発現しても細胞外から投与しても*Mmp13*, *Adamts5*などのcatabolic factorを上昇させ*Col2a1*, *Acan*, *Sox9*などのanabolic factorを低下させることがわかった。

3-4. 変形性関節症におけるGrem1の機能解析

*In vitro*でGrem1が軟骨細胞にcatabolicに作用することが確認されたため、次に

*in vivo*での変形性関節症におけるGrem1の作用の解析を実施した。まずWild typeマウスに変形性関節症モデルの手術を行い膝関節の変性を誘導し、週に2回rhGREM1 2 μ gを膝関節内投与を8週間実施した。次に、Grem1中和抗体を同様に変形性関節症モデルのマウスの膝に週に2回 2 μ g膝関節内投与を8週間実施した。また、内因性のGrem1を欠失させた状態での評価をするためにGrem1-floxedマウスを用いた[25]。Grem1は四肢の形成で重要な役割を担うため[34,35]、発生、成長の段階から軟骨特異的にGrem1を欠損させることは骨格形成に障害を及ぼす可能性が考慮されたため、時間的にCreの発現を操作できるタモキシフェン誘導性のCol2a1-Cre^{ERT2}マウス[36]を用いてadultマウスで軟骨特異的Grem1欠損マウスを作成し検討することとした。Col2a1-Cre^{ERT2}マウスとGrem1^{fl/fl}マウスを交配し、得られたCol2a1-Cre^{ERT2};Grem1^{fl/+}マウスをGrem1^{fl/fl}マウスと交配し、最終的に得られたCol2a1-Cre^{ERT2};Grem1^{fl/fl}マウスを用いた。

3-4-1. マウス膝変形性関節症モデル術後の rhGREM 1 投与

8週齢のマウスに膝変形性関節症モデルの手術を実施して1週間後から8週間PBS又は、rhGREM 1 2 μ gを週に2回関節内注射実施した。Safranin-OとFast Green染色の二重染色を行ってみるとrhGREM 1投与群でSafranin-Oで染まる軟骨層の染色性の低下や消失が進んでおりOARSIスコアにおいても有意差を持ってrhGREM 1投与群で変形性関節症が進行していた(図11A, B)。

3-4-2. マウス初代軟骨細胞を用いた Grem1 中和抗体の予備実験

次にGrem1の中和抗体でその働きを抑制して*in vivo*で評価するために予備実験としてマウス初代軟骨細胞にrhGREM1 10 μ g/mLとGrem1中和抗体 10ng/mLを共に投与して培養し24時間後に回収しmRNAの発現を解析したところ、Grem1中和抗体によりrhGREM1のMmp13やAdamts5の上昇が抑制されていた(図12)。

3-4-3. マウス膝変形性関節症モデル術後の Grem1 中和抗体投与

8週齢のマウスに膝変形性関節症モデルの手術を実施して1週間後から8週間PBS又は、Grem1中和抗体 2 μ gを週に2回関節内注射実施した。Safranin-OとFast Green染色の二重染色を行ってみるとGrem1中和抗体投与群でSafranin-Oで染まる軟骨層の染色性の低下や消失が抑制されておりOARSIスコアにおいても有意差を持ってGrem1中和抗体投与群で変形性関節症の進行が抑制されていた(図13A,B)。

3-4-4. Col2a1-Cre^{ERT2};Grem1^{fl/fl}マウスを用いたGrem1の変形性関節症における機能解析

Col2a1-Cre^{ERT2}マウスとGrem1^{fl/fl}マウスを交配し、得られたCol2a1-Cre^{ERT2};Grem1^{fl/+}マウスを用いて、7週齢のマウスにtamoxifenを投与しCreを作動させた後、8週齢で変形性関節症モデルを作成し[30]、術後8週(16週齢)でsacrificeして組織学的な検討を行った(図15A)。16週の時点で、Grem1^{fl/fl}マウスとCol2a1-Cre^{ERT2};Grem1^{fl/fl}マウスの骨格をX線で比較すると、両者の体長に差はな

かった(図14)。

Safranin-OとFast Greenの二重染色を行い脛骨内側関節面を観察すると、*Col2a1-Cre^{ERT2};Grem1^{fl/fl}*マウスでは*Grem1^{fl/fl}*マウスに比べてSafranin-Oの染色性が保たれており、軟骨の変性の進行が抑制されていた。OARSIスコアにおいても有意差をもって変形性関節症の進行が抑制されていた(図15A, B)。軟骨基質分解酵素のうちGrem1により誘導されたMmp13, Adamts5の発現を免疫組織化学染色で検討したところ、*Col2a1-Cre^{ERT2};Grem1^{fl/fl}*マウスでは、Mmp13、Adamts5ともに発現は低下していた(図16)。一方で、軟骨細胞のアポトーシスを検討するためにTUNEL染色を行ったところ、両者間に差は見られなかった(図16)。

小括2

*In vivo*でのGrem1の変形性関節症における機能解析を行った。Wild typeのマウス膝変形性関節症モデルにおいて、術後rhGREM 1投与群では変性が進み、一方術後Grem1中和抗体投与群では変性の進行が抑制された。また、内因性Grem1の作用を検討するための軟骨特異的*Col2a1-Cre^{ERT2};Grem1^{fl/fl}*マウスでは術後の変性の進行が抑えられた。*Col2a1-Cre^{ERT2};Grem1^{fl/fl}*マウスではMmp13、Adamts5などのcatabolic factorの低下が免疫組織学的染色で確認された。

3-5. 軟骨細胞におけるGrem1の下流のシグナル経路の検索

ここまでの結果から、Grem1は過剰な力学的負荷によって誘導され関節軟骨にcatabolicに作用することが*in vitro*、*in vivo*で示されたが、この軟骨への作用がどのようなシグナル経路によって及ぼされるかを検討した。先行論文ではGrem1

がNF-κBシグナルを活性化し血管新生を促す[37]と言われており、また軟骨への過剰な力学的負荷はNF-κBシグナルを介してcatabolicに作用すると言われていたため[38]、Grem1のcatabolicな作用がNF-κBシグナルを介して行われるかを検証した。

3-5-1. luciferase assayを用いたGrem1の下流検索

NF-κBシグナルの他にTGFβシグナルやWntシグナルなどの代表的シグナル応答エレメントを含むレポーターコンストラクトを用いたluciferase assayによるGrem1のシグナル経路の検索を行った。細胞内の過剰発現と細胞外からのrhGREM1投与下で解析を行なった。結果、細胞内の過剰発現でも細胞外からのrhGREM1の投与下でもNF-κBシグナルが有意に活性化することが示された(図17)。

3-5-2. Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}マウス大腿骨頭を用いたDMMB assay

次にNF-κBシグナルの代表的な転写因子であるRela^{fl/fl}マウスとCol2a1-Creマウスを交配させてCol2a1-Cre;Rela^{fl/+}マウスを作成し、Col2a1-Cre;Rela^{fl/+}マウスとRela^{fl/fl}マウスを交配させ軟骨特異的にRelaを欠損させたCol2a1-Cre;Rela^{fl/fl}マウスを作成した。3週齢のRela^{fl/fl}マウスとCol2a1-Cre;Rela^{fl/fl}マウスの大腿骨頭を採取しrhGREM 1 10μg/mLを投与して上清中のAggrecanの放出量をDMMB assayで解析した。結果、Rela^{fl/fl}マウスと比較してCol2a1-Cre;Rela^{fl/fl}マウスの大腿骨頭からのAggrecanの放出量は有意に抑制されていた(図18)。

また、これら的大腿骨頭を破砕してmRNAを抽出してReal-time RT-PCRを行な

ったところ、rhGREM1による*Mmp13*や*Adamts5*などのcatabolic factorの上昇も*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの大腿骨頭では有意に抑制されていた(図19)。

3-5-3 IKK-inhibitorを用いたDMMB assay

最後にNF- κ Bシグナルの代表的な阻害剤であるIKK-inhibitor(BMS-345541)を用いてDMMB assayを行なった。3週齢のwild typeの大腿骨頭を採取しrhGREM1 10 μ g/mLとIKK-inhibitor 5 μ Mを同時に投与して上清中のAggrecan放出を解析したところ、rhGREM1の投与で上昇するAggrecan放出がIKK-inhibitorで抑制されることが確認された(図20)。

以上よりGrem1の軟骨へのcatabolicな採用はNF- κ Bシグナルを介していることが示唆された。

小括 3

luciferase assayにてGrem1を過剰発現してもrhGREM1を投与してもNF- κ Bシグナルが活性化されることがわかり、DMMB assayにてNF- κ Bシグナルの代表的な転写因子であるRelaのコンディショナル ノックアウトマウスや阻害剤であるIKK-inhibitorを用いるとrhGREM1によるAggrecan放出が抑制されることからGrem1の軟骨へのcatabolicな作用はNF- κ Bシグナルを介して行われることが判明した。

第4章 考察

本研究によって、軟骨への過剰な力学的負荷によってGrem1が誘導され、これがNF- κ Bシグナルを介してMmp13やAdamts5などのcatabolic factorを誘導し関節軟骨の変性を促進することが示された。

過剰な力学的負荷は変形性関節症の主要な原因であることが知られている。序章でも述べたとおり過剰な関節軟骨への力学的負荷、malalignmentや体重過多は変形性関節症のrisk factorであることは明らかであるが[5]、その分子生物学的なメカニズムの多くは解明されていない。今回我々は過剰な力学的負荷と軟骨変性の機能解明に挑むべく先行論文[12]を参考にし細胞伸展装置を用いて過剰な力学的負荷後にcatabolic factor Mmp13が上昇する系をマウス初代軟骨細胞で再現することに成功した。過剰な力学的負荷前とMmp13がピークを示す負荷後24時間後のサンプルを用いてマイクロアレイを実施し無数の変動する遺伝子の中で関節軟骨に多く発現し変形性関節症関連遺伝子のGrem1に着目した。

Grem1はもともと胎生期の四肢の発生においてBMPのantagonistとして代表的な分泌蛋白であり[15] 近年緑内障、糖尿病性腎症、肺高血圧、心筋線維症など力学的負荷に関連する疾患で重要な役割を果たしていることが明らかになってきた[19, 20, 21, 22]。現在までGrem1は眼球の小柱網や腎臓の糸球体足細胞でTGF β シグナルを活性化させるという報告[39, 40]や癌細胞でcell cycle inhibitorであるp21^{Cip1}を転写レベルで制御して癌抑制遺伝子として働くという報告[41]、腎炎でVEGFR2を介してNF- κ Bシグナルを活性化し血管新生や炎症反応を促すという報告[42]、糸球体で高血糖や力学的負荷によって誘発されるという報告[43]

などがあるが、ヒトの関節軟骨でのGrem1の機能に関する報告は我々が渉猟しえた限りではほとんど存在しない。

変形性関節症は過剰な力学的負荷による関節軟骨細胞の損傷が病態であると考えられている。関節軟骨にかかる力学的負荷が閾値を超えると、細胞表面に存在するイオンチャンネルやインテグリンなどのメカノレセプターを介してシグナルの活性化が生じ、プロスタグランディンやケモカイン、サイトカインなどが誘導され[44,45]、線維化や軟骨基質の消失が始まる[46]。Grem1は多彩な作用をもっているが、その中でも血管新生や線維化[37]を促す作用を有しており、我々は変形性関節症の成立の過程で硝子軟骨が線維軟骨に変性してゆく原因の一つを担っている有力な分子ではないかと考えている。

NF-κBシグナルは軟骨への過剰な力学的負荷で活性化されることが知られている。NF-κBシグナルは軟骨細胞にとってpro-inflammatoryにも働くが、細胞の分化維持にも必要である[11]。Grem1の血管新生もNF-κBシグナルを介して行われることが知られていることから[37] 我々はGrem1の軟骨へのcatabolicな作用はNF-κBシグナルを介して行われるのではないかという予想を立て、luciferase assay、Rela コンディショナルノックアウトマウスやNF-κBシグナル阻害剤を用いたDMMB assay、mRNA発現解析などでGrem1がNF-κBシグナルを介して関節軟骨にcatabolicに作用することを明らかにした。変形性関節症ではNF-κBシグナルが有意に活性化されていることが知られており[47]、NF-κBシグナルは炎症性サイトカインの下流シグナルとして、MMP、NOS、IL-1,6、TNFα、COX2、ELF3/ESE-1を誘導し、細胞外基質の変性破壊を促進させることが報告されている[48-53]。我々は、catabolic factorのAdamts5をRelaが直接転写誘導すること、そ

してRelaを軟骨特異的にノックアウトすると炎症性サイトカインによる軟骨基質分解を抑制する事を報告している[54]。以上よりNF- κ Bシグナルは変形性関節症における軟骨変性において中心的役割を果たしていると考えられる。本研究によって現在まで明らかではなかった過剰な力学的負荷とNF- κ Bシグナル活性化のシグナル伝達の一部の機序が明らかとなったが、物理的な力学的負荷が分泌蛋白を介して個々の細胞に生化学的なシグナルを伝達するという機序は非常に興味深い。さらに、面白いことにGrem1はNuclear Localization Signal (NLS)の配列を有していることが知られており[16]、免疫染色でも核内のGrem1を確認できることからGrem1は核内にも移行する可能性もあると我々は考えている。本研究でGrem1は細胞に過剰発現させてもrhGREM1を細胞外から投与してもcatabolic factorを誘導するが、Grem1がどのような経路を辿って細胞外から細胞内、そして核へシグナルを伝達しNF- κ Bシグナルを活性化するのかを解明することは今後の課題である。腎炎でVEGFR2を介してNF- κ Bシグナルが血管新生や炎症反応を促すという報告[37]もあるが、我々が軟骨細胞でVEGFR2阻害薬を用いた予備実験ではGrem1のcatabolic factorの誘導とVEGFR2の相関は明らかではなかった。組織特異的なシグナル伝達の機序も考慮して今後の解析も進めてゆきたいと思う。

また、本研究によって、過剰な力学的負荷に伴ってGrem1が軟骨に作用するとCo2a1, Acan, Sox9などのanabolic factorが抑制されるという知見も得ることができた。この作用のメカニズムは未だに明らかではないがひとつの機序としてはGrem1のBMP antagonistとしての作用によるものを仮定している。Grem1が結合することが知られているBMP-2, BMP-4, BMP-7の中でBMP-7は関節軟骨の

catabolicな作用に拮抗しanabolic factorを誘導することにより関節軟骨に対して保護作用があることが知られており[55-58]、この作用をGrem1が阻害することによりanabolic factorが抑制されることが予想されるが今後さらなる検討が必要である。

Grem1はあらゆる種間で広く保存されている分子で関節軟骨に多く存在している。四肢の発生の段階でlimb budと指の形成に重要でありGrem1のノックアウトマウスは四肢の発生異常が生じることが知られている[59, 60]。また、最近Grem1はosteoblast, chondrocyteの前駆細胞であるOCR (osteochondroreticular) stem cellを規定する分子であると報告された[61]。Grem1はMesenchymal stem cellがchondrocyteへ分化する過程で必要であることから軟骨のhomeostasisにも必要であると考えられる。Grem1の関節軟骨の機能維持、増殖に関わる作用についての文献は数少ないが、腎細胞、癌細胞の増殖に関する文献は散見され[42, 62]、関節軟骨でも多く発現していることから、関節軟骨のメンテナンスに関わる作用を担っている可能性があるが、本研究ではその作用に踏み込むことができなかった。cKOマウスで長期経過を観察することでその手がかりが得られる可能性があり、現在飼育中である。Grem1の関節軟骨での作用の多くは不明であるが、以前我々が報告しているように関節軟骨の深層にGrem1が多く存在し、一方最表層にBMP-7が多く存在することから軟骨に対する相反する作用を有するGrem1とBMP-7は互いにバランスを取り合いながら健全な軟骨の層構造を維持している可能性も考えられる[63]。

本研究によってGrem1のpro inflammatoryな作用が軟骨変性を誘導し変形性関節症を促進することが示されたが、治療へのさらなる検討としてはGrem1の局在

や蛋白修飾の状態などを考慮し、どのような状態のGrem1を治療のターゲットとするかが重要になる可能性がある。Grem1のpost-translationalな修飾としてはN-glycosylationとリン酸化があり、さらに分泌型と膜結合型の2つのformが知られている[16, 64]。Grem1はglycosylation依存性にslit1と結合し単球の遊走を抑えるという報告[18]もありGrem1のpost-translationalな修飾の状態によって関節軟骨に対しての作用が異なってくる可能性もある。本研究ではマウス変形性関節症モデルの術後の膝にGrem1中和抗体を投与して変形性関節症の進行が抑えられたことやin vitroの実験で中和抗体によってrhGREM1が誘導するMmp13やAdamts5などのcatabolic factorが抑制されたことから分泌型Grem1の作用を抑制する手法によって少なくとも短期的な過剰な力学的負荷に伴う軟骨変性を抑えることが可能だと予想されるが、これが長期的な関節軟骨のhomeostasisに及ぼす影響に関してはさらなる検討が必要だと考える。

我々はマウス変形性関節症モデル術後マウスで変形性関節症の進行に伴いGrem1の発現が上昇することを示した。しかし、変形性関節症モデル術後どの時点からGrem1の分泌が始まり軟骨破壊に寄与するかは明らかになっていない。組織の免疫染色では変形性関節症術後6週目付近から発現しているように見えるが、細胞伸展負荷の細胞免疫染色では力学的負荷後24時間で発現の上昇を確認できることから、初期から分泌されて変性進行に関わっている可能性があり、今後より詳細な検討が必要である。

また、Grem1は過剰な力学的ストレスで誘導されることが明らかとなったが、どの程度の力学的負荷を境界として発現が誘導されるかの検討はまだ不十分である。今後のさらなる研究を通じてGrem1の機能解析が進めば変形性関節症の治

療の有力なターゲットとしての可能性はもちろんのこと、生体への過剰な力学的負荷のマーカーとしての応用も期待される。

本研究では過剰な力学的負荷で誘導される**Grem1**を同定し、**Grem1**による軟骨変性機序を検討した。本研究で得られた知見が今後の変形性関節症の病態解明、治療の一助になることを切に願う。

第5章 結語

過剰な力学的負荷に伴い誘導されるGrem1を同定した。Grem1はMmp13やAdamts5などのcatabolic factorを誘導し、Col2a1, Acan, Sox9などのanabolic factorを抑制し軟骨変性を促進することが示唆された。Grem1のcatabolicな作用はNF- κ Bシグナルを介していることが示された(図21)。

第6章 謝辞

本研究は、主に東京大学大学院医学系研究科 感覚・運動機能医学講座 整形外科学分野（整形外科学教室）にて行いました。

基礎研究に従事する貴重な機会を与えて下さり、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜った整形外科学教室 田中栄教授に謹んで感謝致します。

そして、基礎研究の初歩から学会発表、論文作成に至るまで終始にわたり御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜った東京大学医学部附属病院 齋藤琢講師に謹んで感謝致します。

さらに、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜った整形外科学教室 川口浩前准教授、日々支えて下さった同門の先輩、同期、後輩の先生方に謹んで感謝致します。

最後に、いつも支えてくれた両親、妻に感謝の言葉を贈りたいと思います。

第7章 参考文献

- 1) Moyer RF, Ratneswaran A, Beier F, Birmingham TB, Osteoarthritis year in review 2014:mechanics—basic and clinical studies in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 22(12):1989-2002, 2014
- 2) D.E. Jaalouk, J. Lammerding, Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 (1) , pp. 63–73, 2009
- 3) D.L. Bader, D.M. Salter, T.T. Chowdhury, Biomechanical influence of cartilage homeostasis in health and disease. *Arthritis*. 2011
- 4) T. Lapvetelainen, M. Hyttinen, J. Lindblom, T.K. Langsjo, R. Sironen, S.W. Li, , M.Arita, DJ.Prockop,K. Puustjärvi K, HJ.Helminen. More knee joint osteoarthritis (OA) in mice after inactivation of one allele of type II procollagen gene but less OA after lifelong voluntary wheel running exercise. *Osteoarthritis Cartilage*, 9 (2) , pp. 152–160, 2001
- 5) M. Gardner-Morse, G. Badger, B. Beynon, M. Roemhildt. Changes in in vitro compressive contact stress in the rat tibiofemoral joint with varus loading. *J Biomech*, 46 (6) , pp. 1216–12, 2013
- 6) K.M. Clements, Z.C. Bee, G.V. Crossingham, M.A. Adams, M. Sharif. How severe must repetitive loading be to kill chondrocytes in articular cartilage? *Osteoarthritis Cartilage*, 9 (5) , pp. 499–507, 2001
- 7) M. Horisberger, R. Fortuna, V. Valderrabano, W. Herzog. Long-term repetitive mechanical loading of the knee joint by in vivo muscle stimulation accelerates cartilage degeneration and increases chondrocyte death in a rabbit model. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 28 (5) , pp. 536–543, 2013
- 8) Buckwalter JA, Anderson DD, Brown TD, Tochigi Y, Martin JA. The Roles

- of Mechanical Stresses in the Pathogenesis of Osteoarthritis: Implications for Treatment of Joint Injuries. *Cartilage*. 1;4(4):286-294, 2013
- 9) Dell'Accio F, De Bari C, El Tawil NM, Barone F, Mitsiadis TA, O'Dowd J, Pitzalis C. Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury. *Arthritis Res Ther*.8(5):R139, 2006
 - 10) Saito T, Nishida K, Furumatsu T, Yoshida A, Ozawa M, Ozaki T. Histone deacetylase inhibitors suppress mechanical stress-induced expression of RUNX-2 and ADAMTS-5 through the inhibition of the MAPK signaling pathway in cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 21(1):165-74, 2013
 - 11) Marcu KB, Otero M, Olivotto E, Borzi RM, Goldring MB. NF-kappaB signaling : multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets*. 11(5):599-613. Review. 2010
 - 12) Tetsunaga T, Nishida K, Furumatsu T, Naruse K, Hirohata S, Yoshida A, Saito T, Ozaki T. Regulation of mechanical stress-induced MMP-13 and ADAMTS-5 expression by RUNX-2 transcriptional factor in SW1353 chondrocyte-like cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 19(2):222-32. 2011
 - 13) Tardif G, Hum D, Pelletier JP, Boileau C, Ranger P, Martel-Pelletier J. Differential gene expression and regulation of the bone morphogenetic protein antagonists follistatin and gremlin in normal and osteoarthritic human chondrocytes and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 50(8):2521-30, 2004
 - 14) Leijten JC, Bos SD, Landman EB, Georgi N, Jahr H, Meulenbelt I, Post JN, van Blitterswijk CA, Karperien M. GREM1, FRZB and DKK1 mRNA levels correlate with osteoarthritis and are regulated by osteoarthritis-associated factors. *Arthritis Res Ther*. 19;15(5):R126, 2013

- 15) Zeller R, López-Ríos J, Zuniga A. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nat Rev Genet.* 10(12):845-58, 2009
- 16) Wordinger RJ, Zode G, Clark AF. Focus on molecules: gremlin. *Exp Eye Res.* 87(2):78-9, 2008
- 17) Kim M, Yoon S, Lee S, Ha SA, Kim HK, Kim JW, Chung J. Gremlin-1 induces BMP-independent tumor cell proliferation, migration, and invasion. *PLoS One.* 2012;7(4):e35100.
- 18) Chen B, Blair DG, Plisov S, Vasiliev G, Perantoni AO, Chen Q, Athanasiou M, Wu JY, Oppenheim JJ, Yang D. Cutting edge: bone morphogenetic protein antagonists Drm/Gremlin and Dan interact with Slits and act as negative regulators of monocyte chemotaxis. *J Immunol.* 173(10):5914-7. 2004
- 19) Wordinger RJ, Fleenor DL, Hellberg PE, Pang IH, Tovar TO, Zode GS, Fuller JA, Clark AF. Effects of TGF-beta2, BMP-4, and gremlin in the trabecular meshwork: implications for glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48(3):1191-200, 2007
- 20) Marchant V, Droguett A, Valderrama G, Burgos ME, Carpio D, Kerr B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Mezzano S. Tubular overexpression of Gremlin in transgenic mice aggravates renal damage in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 309(6):F559-68, 2015
- 21) Ciucan L, Sheppard K, Dong L, Sutton D, Duggan N, Hussey M, Simmons J, Morrell NW, Jarai G, Edwards M, Dubois G, Thomas M, Van Heeke G, England K. Treatment with anti-gremlin 1 antibody ameliorates chronic

- hypoxia/SU5416-induced pulmonary arterial hypertension in mice. *Am J Pathol.* 183(5):1461-73, 2013
- 22) Ciuculan L, Sheppard K, Dong L, Sutton D, Duggan N, Hussey M, Simmons J, Morrell NW, Jarai G, Edwards M, Dubois G, Thomas M, Van Heeke G, England K. Gremlin-1 identifies fibrosis and predicts adverse outcome in patients with heart failure undergoing endomyocardial biopsy. *Am J Pathol.* 183(5):1461-73, 2013
- 23) Ovchinnikov DA, Deng JM, Ogunrinu G, Behringer RR. Col2a1-directed expression of Cre recombinase in differentiating chondrocytes in transgenic mice. *Genesis.* 26(2):145-6. 2000
- 24) Chen M, Lichtler AC, Sheu TJ, Xie C, Zhang X, O'Keefe RJ, Chen D. Generation of a transgenic mouse model with chondrocyte-specific and tamoxifen-inducible expression of Cre recombinase. *Genesis.* 45(1):44-50. 2007
- 25) Gazzero E, Smerdel-Ramoya A, Zanotti S, Stadmeier L, Durant D, Economides AN, Canalis E. J Biol Chem. Conditional deletion of gremlin causes a transient increase in bone formation and bone mass. 282(43):31549-57. 2007
- 26) Algül H, Treiber M, Lesina M, Nakhai H, Saur D, Geisler F, Pfeifer A, Paxian S, Schmid RM. Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis. *J Clin Invest.* 117(6):1490-501. 2007
- 27) Gosset M, Berenbaum F, Thirion S, Jacques C. Primary culture and Phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc.*3(8):1253-60. 2008
- 28) Yasuhara R, Ohta Y, Yuasa T, Kondo N, Hoang T, Addya S, Fortina P, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Roles of β -catenin signaling in phenotypic

- expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells. *Lab Invest.* 91(12):1739-52. 2011
- 29) Madej W, van Caam A, Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, Buma P. Physiological and excessive mechanical compression of articular cartilage activates Smad2/3P signaling. *Osteoarthritis Cartilage.* 22(7):1018-25. 2014
- 30) Kamekura S., K. Hoshi, T. Shimoaka, U. Chung, H. Chikuda, T. Yamada, M. Uchida, N. Ogata, A. Seichi, K. Nakamura, and H. Kawaguchi, Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage*, 13(7): 632-41, 2005
- 31) Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, Little CB. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage.* 18 Suppl 3:S17-23, 2010
- 32) Hilton M.J., X. Tu, and F. Long, Tamoxifen-inducible gene deletion reveals a distinct cell type associated with trabecular bone, and direct regulation of PTHrP expression and chondrocyte morphology by *Ihh* in growth region cartilage. *Dev Biol.* 308(1): 93-105, 2007
- 33) Stanton H, Golub SB, Rogerson FM, Little CB, Fosang AJ. Investigating ADAMTS-mediated aggrecanolytic activity in mouse cartilage. *Nat Protoc.* 6(3):388-404, 2011
- 34) Khokha MK, Hsu D, Brunet LJ, Dionne MS, Harland RM. Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of *Shh* and *Fgf* signals during limb patterning. *Nat Genet.* 34(3):303-7, 2003
- 35) Michos O, Panman L, Vintersten K, Beier K, Zeller R, Zuniga A. Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback

- signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development*. 131(14):3401-10, 2004
- 36) Zhu M, Chen Mlichtler AC, O'Keefe RJ, Chen D. Tamoxifen-inducible Cre-recombination in articular chondrocytes of adult Col2a1-CreER^{T2} transgenic mice. *Osteoarthritis Cartilage*. 16:129–130, 2008
- 37) Mitola S, Moroni E, Ravelli C, Andres G, Belleri M, Presta M. Angiopoietin-1 mediates the proangiogenic activity of the bone morphogenic protein antagonist Dm. *Blood*. 112(4):1154-7, 2008
- 38) Nam J, Aguda BD, Rath B, Agarwal S. Biomechanical thresholds regulate inflammation through the NF-kappaB pathway: experiments and modeling. *PLoS One*. 2009;4(4):e5262
- 39) Sethi A, Jain A, Zode GS, Wordinger RJ, Clark AF. Role of TGFbeta/Smad signaling in gremlin induction of human trabecular meshwork extracellular matrix proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 52(8):5251-9, 2011
- 40) Li G, Li Y, Liu S, Shi Y, Chi Y, Liu G, Shan T. Gremlin aggravates hyperglycemia-induced podocyte injury by a TGFβ/smad dependent signaling pathway. *J Cell Biochem*. 114(9):2101-13, 2013
- 41) Chen B, Athanasiou M, Gu Q, Blair DG. Dm/Gremlin transcriptionally activates p21(Cip1) via a novel mechanism and inhibits neoplastic transformation. *Biochem Biophys Res Commun*. 295(5):1135-41, 2002
- 42) Lavozy C, Alique M, Rodrigues-Diez R, Pato J, Keri G, Mezzano S, Egido J, Ruiz-Ortega M. Gremlin regulates renal inflammation via the vascular endothelial growth factor receptor 2 pathway. *J Pathol*. 236(4):407-20, 2015
- 43) McMahon R, Murphy M, Clarkson M, Taal M, Mackenzie HS, Godson C,

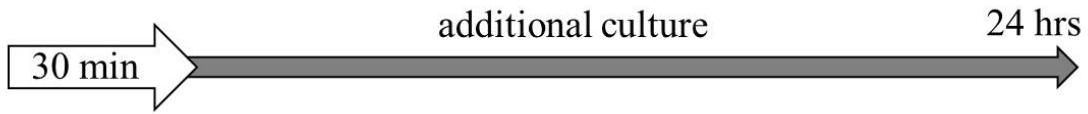
- Martin F, Brady HR. IHG-2, a mesangial cell gene induced by high glucose, is human gremlin. Regulation by extracellular glucose concentration, cyclic mechanical strain, and transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem.* 275(14):9901-4, 2000
- 44) Guilak F., Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 25(6): 815-23, 2011
- 45) Issa R.I. and T.M. Griffin, Pathobiology of obesity and osteoarthritis: integrating biomechanics and inflammation. *Pathobiol Aging Age Relat Dis.* 2(2012), 2012
- 46) Chan DD, Xiao WF, Li J, de la Motte CA, Sandy JD, Plaas A. Deficiency of hyaluronan synthase 1 (Has1) results in chronic joint inflammation and widespread intra-articular fibrosis in a murine model of knee joint cartilage damage. *Osteoarthritis Cartilage.* (11):1879-89, 2015
- 47) Berenbaum F., Signaling transduction: target in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 16(5): 616-22, 2004
- 48) Goldring M., Marcu K., Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapy* 11:224–39, 2009
- 49) Roman-Blas J.A., Jimenez S.A., NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14:839–48, 2006
- 50) Saklatvala J., Inflammatory signaling in cartilage: MAPK and NF-kappaB pathways in chondrocytes and the use of inhibitors for research into pathogenesis and therapy of osteoarthritis. *Curr Drug Targets* 8:305–13, 2007
- 51) Scanzello C.R., Plaas A., Crow M.K., Innate immune system activation in osteoarthritis: is osteoarthritis a chronic wound? *Curr Opin Rheumatol* 20:565–72, 2008

- 52) Berenbaum F., Signaling transduction: target in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 16:616–22, 2004
- 53) Grall F., Gu X., Tan L., Cho J.Y., Inan M.S., Pettit A.R., Thamrongsak U., Choy B.K., Manning C., Akbarali Y., Zerbini L., Rudders S., Goldring S.R., Gravallesse E.M., Oettgen P., Goldring M.B., Libermann T.A., Responses to the proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in cells derived from rheumatoid synovium and other joint tissues involve nuclear factor kappaB-mediated induction of the Ets transcription factor ESE-1. *Arthritis Rheum* 48:1249–60, 2003
- 54) Kobayashi H., Hirata M., Saito T., Itoh S., Chung U.I., Kawaguchi H., Transcriptional induction of ADAMTS5 by an NF-κB family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. *J Biol Chem.* Aug 20., 2013
- 55) Huch K, Wilbrink B, Flechtenmacher J, Koepp HE, Aydelotte MB, Sampath TK, Kuettner KE, Mollenhauer J, Thonar EJ. Effects of recombinant human osteogenic protein 1 on the production of proteoglycan, prostaglandin E2, and interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes cultured in the presence of interleukin-1beta. *Arthritis Rheum.* 40(12):2157-61, 1997
- 56) Koepp HE, Sampath KT, Kuettner KE, Homandberg GA. Osteogenic protein-1 (OP-1) blocks cartilage damage caused by fibronectin fragments and promotes repair by enhancing proteoglycan synthesis. *Inflamm Res.* 48(4):199-204, 1999
- 57) Im HJ, Pacione C, Chubinskaya S, Van Wijnen AJ, Sun Y, Loeser RF. Inhibitory effects of insulin-like growth factor-1 and osteogenic protein-1 on fibronectin fragment- and interleukin-1beta-stimulated matrix

- metalloproteinase-13 expression in human chondrocytes. *J Biol Chem.* 278(28):25386-94, 2003
- 58) Nishida Y, Knudson CB, Kuettner KE, Knudson W. Osteogenic protein-1 promotes the synthesis and retention of extracellular matrix within bovine articular cartilage and chondrocyte cultures. *Osteoarthritis Cartilage.* 8(2):127-36, 2000
- 59) Zuniga A, Michos O, Spitz F, Haramis AP, Panman L, Galli A, Vintersten K, Klasen C, Mansfield W, Kuc S, Duboule D, Dono R, Zeller R. Mouse limb deformity mutations disrupt a global control region within the large regulatory landscape required for Gremlin expression. *Genes Dev.* 18(13):1553-64, 2004
- 60) Canalis E, Parker K, Zanotti S. Gremlin1 is required for skeletal development and postnatal skeletal homeostasis. *J Cell Physiol.* 227(1):269-77, 2012
- 61) Worthley DL, Churchill M, Compton JT, Tailor Y, Rao M, Si Y, Levin D, Schwartz MG, Uygur A, Hayakawa Y, Gross S, Renz BW, Setlik W, Martinez AN, Chen X, Nizami S, Lee HG, Kang HP, Caldwell JM, Asfaha S, Westphalen CB, Graham T, Jin G, Nagar K, Wang H, Kheirbek MA, Kolhe A, Carpenter J, Glaire M, Nair A, Renders S, Manieri N, Muthupalani S, Fox JG, Reichert M, Giraud AS, Schwabe RF, Pradere JP, Walton K, Prakash A, Gumucio D, Rustgi AK, Stappenbeck TS, Friedman RA, Gershon MD, Sims P, Grikscheit T, Lee FY, Karsenty G, Mukherjee S, Wang TC. Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *Cell.* 2015160(1-2):269-84. 2014.
- 62) Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R,

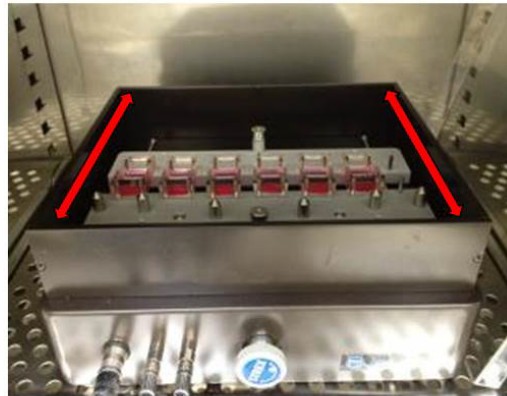
- Gladstone H, Chang HY, Morganroth GS, Oro AE, Brown PO. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(40):14842-7,2006
- 63) Mori Y, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Determination 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(4):263-70, 2014
- 64) Topol LZ, Bardot B, Zhang Q, Resau J, Huillard E, Marx M, Calothy G, Blair DG. Biosynthesis, post-translation modification, and functional characterization of Drm/Gremlin. *J Biol Chem.* 275(12):8785-93, 2000

stress (0.5 Hz, 10% stretch)



A

細胞伸展装置



B

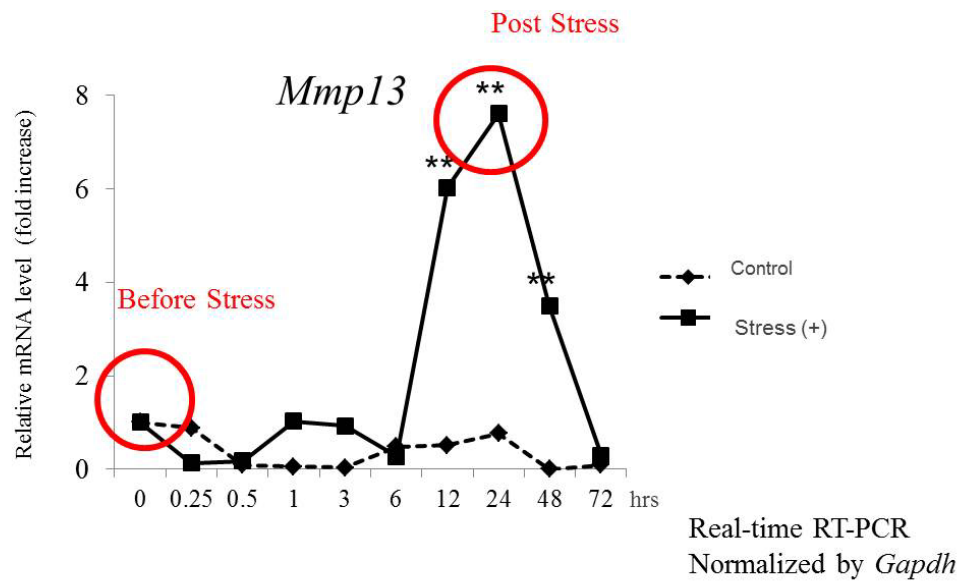


図1. 伸展負荷装置

A) 細胞伸展装置STB-140(Strex)

シリコンチャンバーに細胞を撒き、一定の伸展率と周囲で伸展負荷を与えることができる。

B) マウス初代軟骨細胞に0.5 Hz, 伸展率10%の過剰な負荷を30分与えたあとの経時的Mmp13の推移

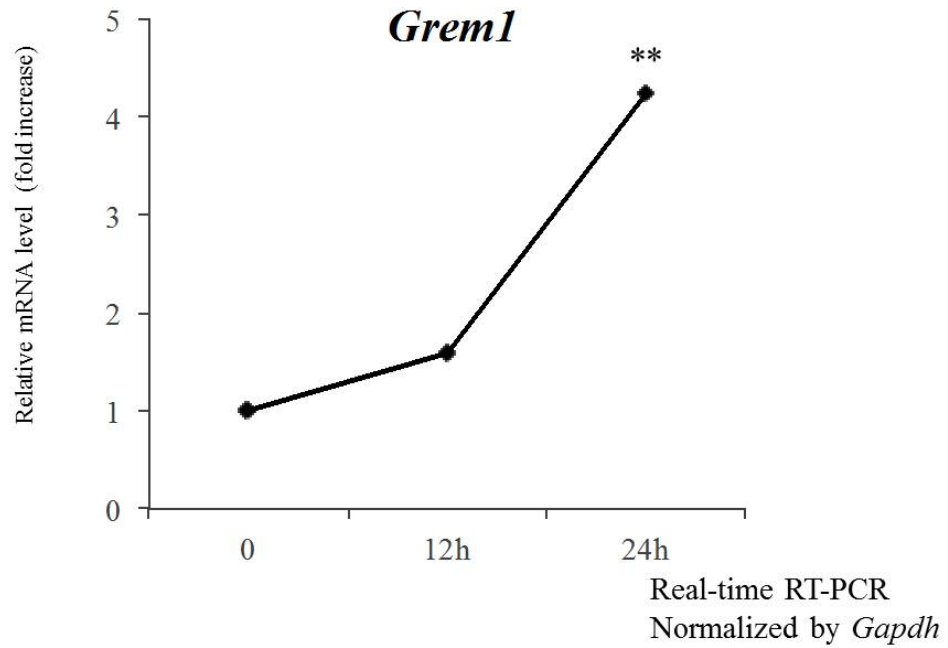
** $P < 0.01$ stressなし群とあり群の同じ時間に採取したサンプル間で比較した。

Gene Symbol	Log2 ratio
<i>Capn11</i>	2.52
<i>Msmg</i>	2.39
<i>940052-R</i>	1.88
<i>Grem1</i>	1.56
<i>Efemp1</i>	1.29
<i>Frzb</i>	1.15
<i>Tubb2b</i>	1.13
<i>Ogn</i>	1.06
<i>Lgals3bp</i>	1.04
<i>22964126-F</i>	1.02

図2 伸展ストレスを与えたマウス初代軟骨細胞のマイクロアレイ結果
マウス初代軟骨細胞に過剰な伸展ストレスを与える前と比較して与えた後2倍以上発現が
上昇した遺伝子の中かから軟骨での発現が多い上位10遺伝子

Real-time RT-PCR

A



B

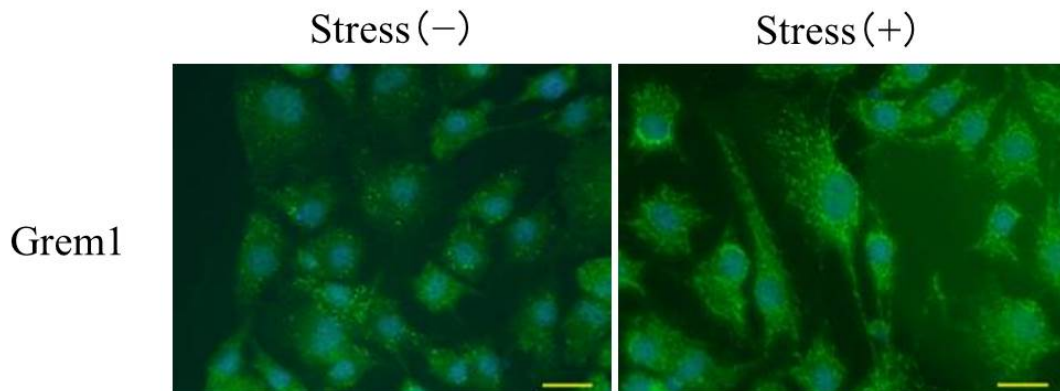


図3 A、B 過剰な伸展ストレス後の*Grem1*発現確認

A) 力学的負荷をかけた後のリアルタイムRT-PCRによる*Grem1*の推移 $**P < 0.01$
0時間、12時間後と24時間後を比較した。

B) 力学的負荷後の*Grem1*蛋白発現 スケールバー 50 μm

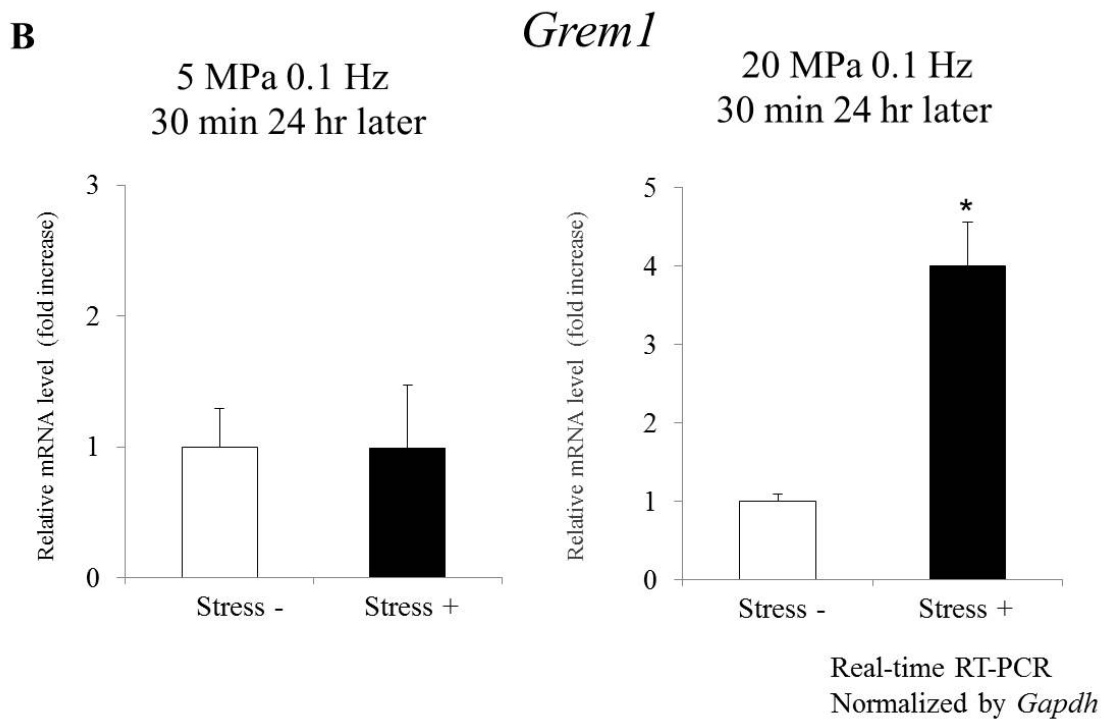
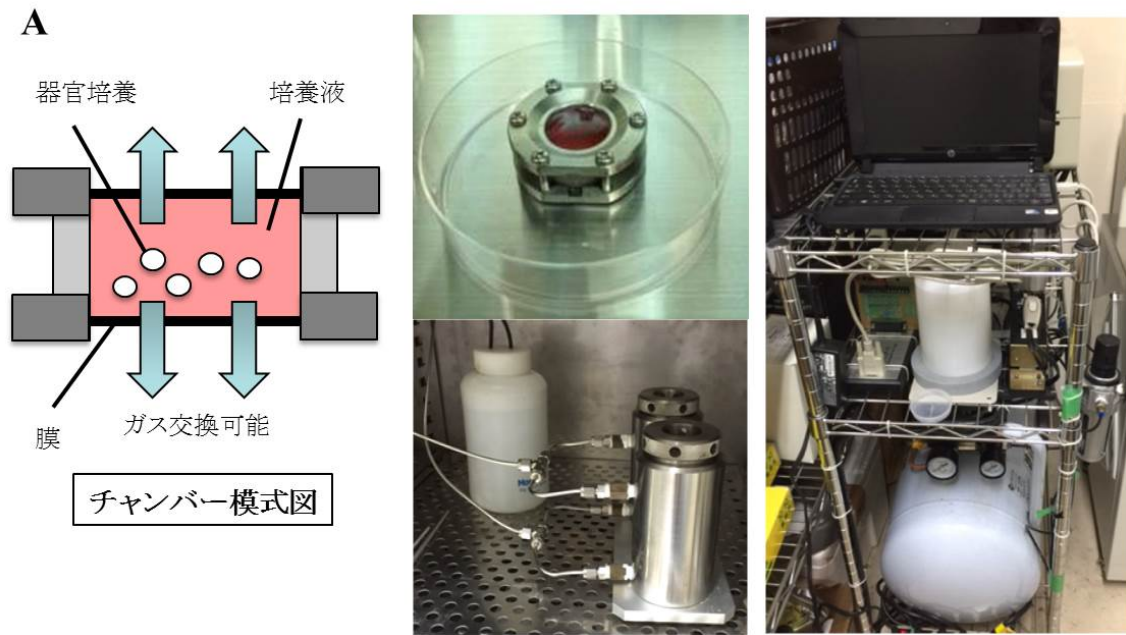


図4. 周期的静水圧負荷装置

A) 左、中央上：メディウムを密閉できるチャンバー。ガス交換可能な膜で構成されている。
中央下：周期的静水圧負荷装置。この中にチャンバーをいれ最大20MPa、0.1 Hzで3次元的に器官培養組織に静水圧を負荷できる。

右：圧力をかけるポンプと制御装置

B) マウス大腿骨頭への静水圧負荷後の*Grem1*の発現。

* $P < 0.05$

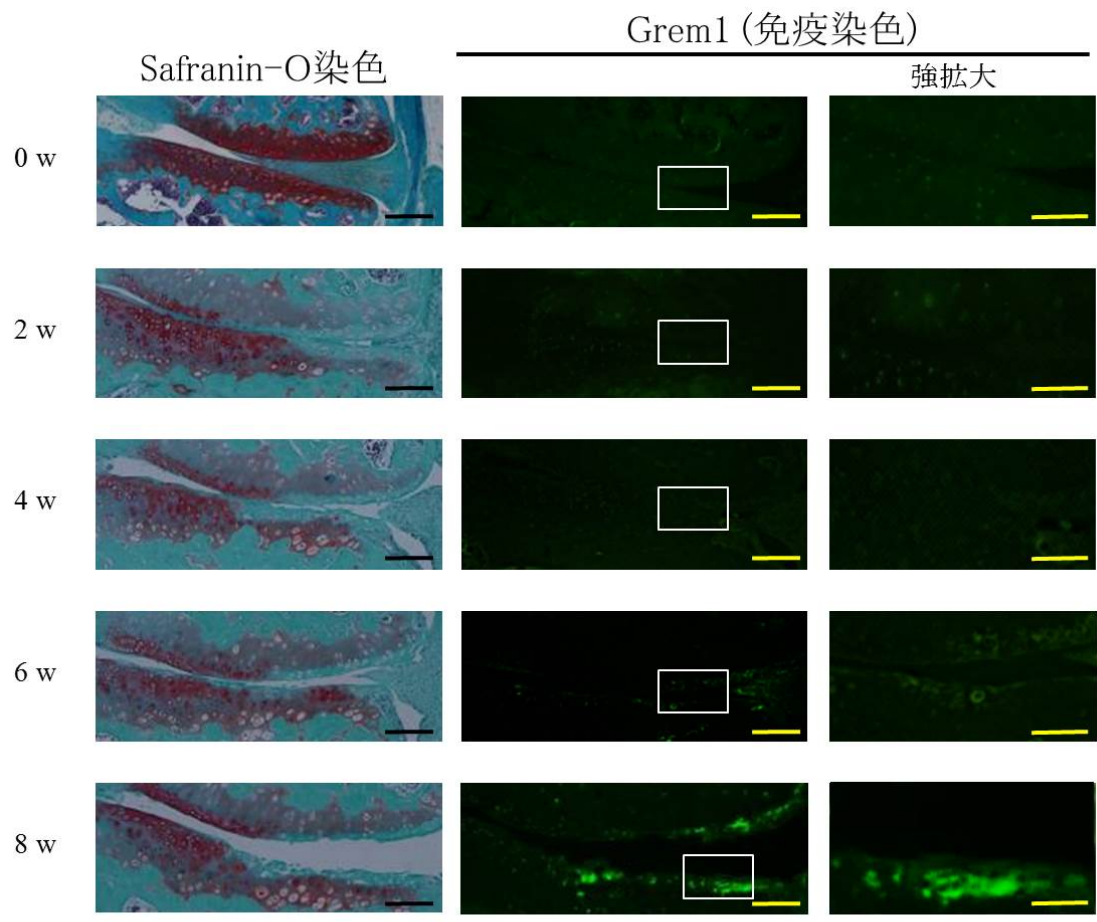


図5 マウス膝OAモデルにおける経時的なGrem1の発現
 8齢マウスに膝OAモデルを実施しOAを誘導した。
 スケールバー100 μm:弱拡大、50 μm:強拡大

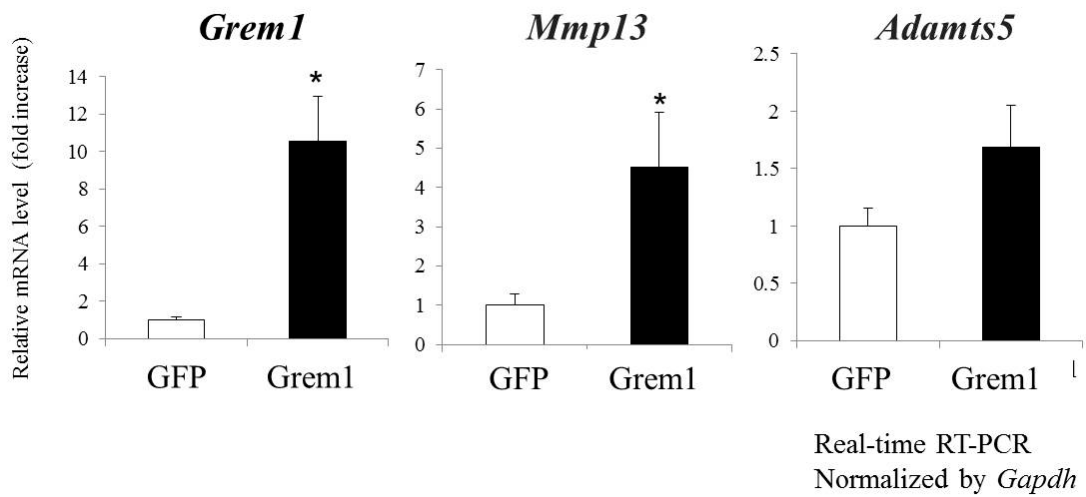


図6 ATDC5細胞におけるレンチウイルスによるGrem1の過剰発現
* P < 0.05

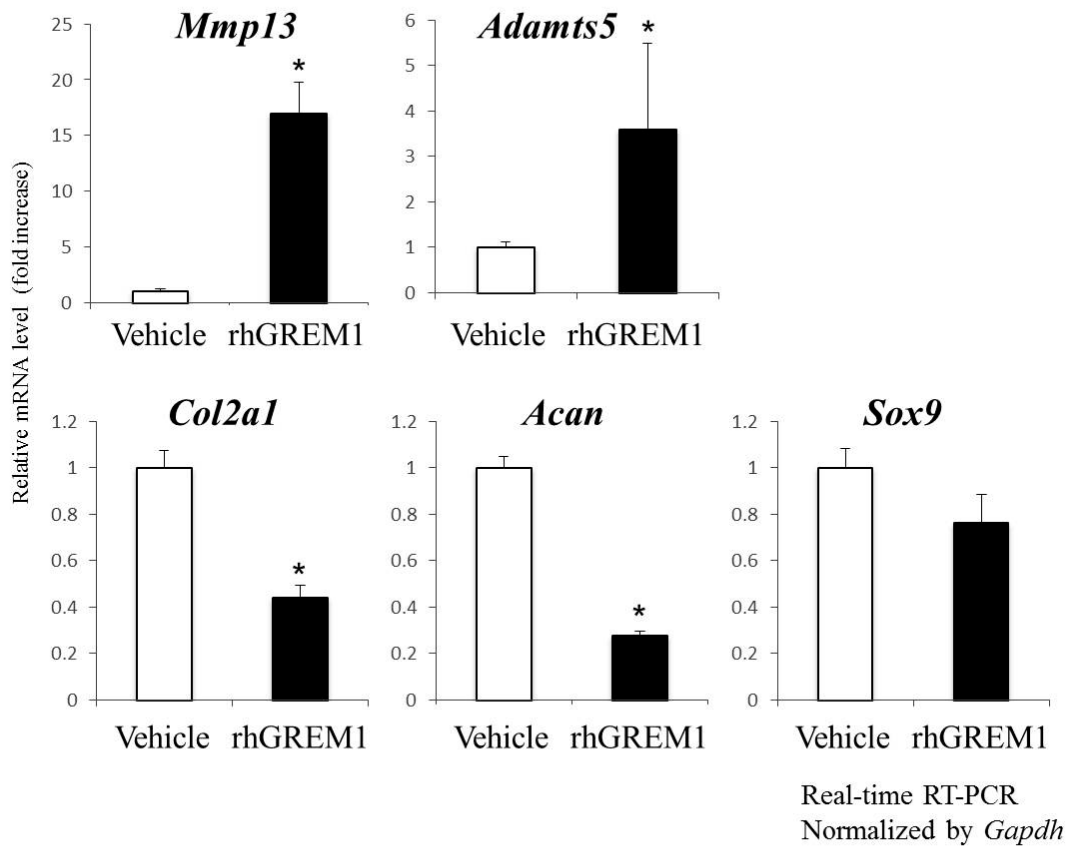


図7 rhGREM1投与下のマウス初代軟骨細胞におけるcatabolic facotor、anabolic facotorの発現
* P < 0.05、rhGREM1: 10 µg/mL

DMMB assay

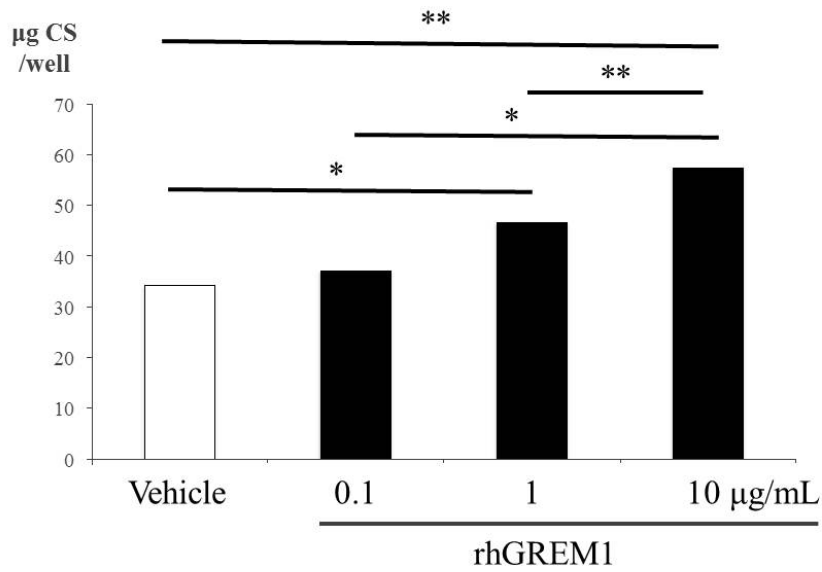


図8 Dymethyl-methylene blue dye-binding (DMMB) assay

3週齢のマウス大腿骨頭にrhGREM1を投与し培養液中のAggrecanの放出を測定した。* $P < 0.05$
** $P < 0.01$

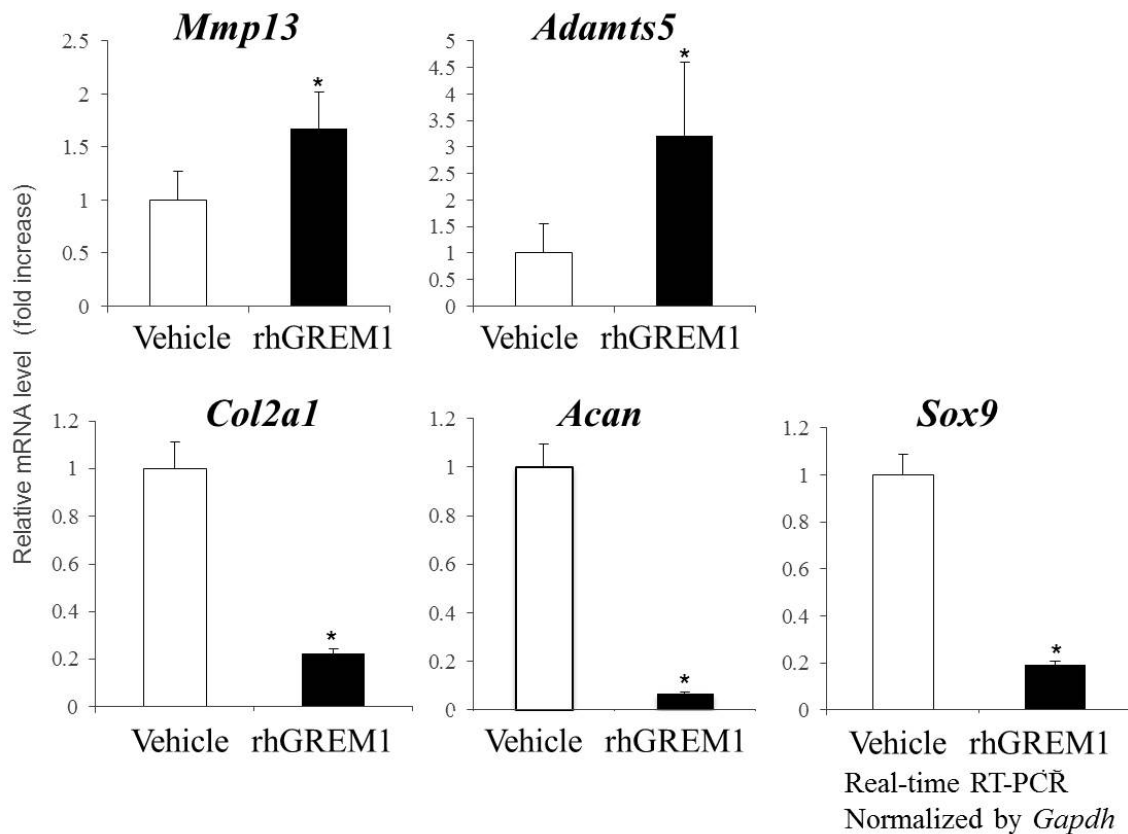


図9 rhGREM1投与下の大腿骨頭におけるcatabolic factorとanabolic factorの発現

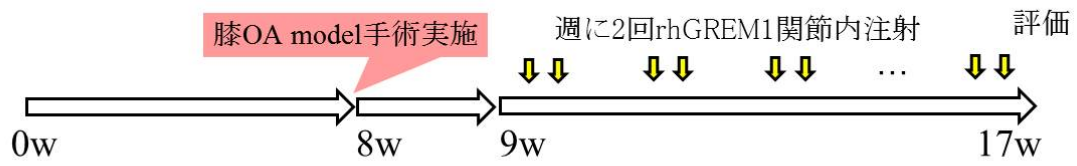
* $P < 0.05$ rhGREM1:10 µg/mL

Gene Symbol	Log2 ratio
<i>Saa3</i>	10.79
<i>Mmp3</i>	10.54
<i>Saa2</i>	9.09
<i>Cxcl3</i>	8.08
<i>F13a1</i>	7.62
<i>Il1b</i>	7.33
<i>Il6</i>	7.22
<i>Cfb</i>	7.12
<i>Ctsw</i>	6.97
<i>Cxcl5</i>	6.85

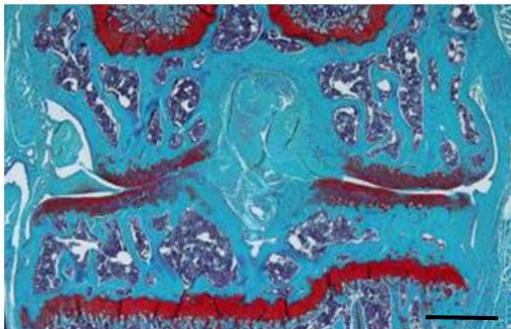
図10 rhGREM1を与えたマウス初代軟骨細胞のマイクロアレイ結果
マウス初代軟骨細胞にrhGREM1を与えてないものと比較して2倍以上発現が上昇した遺伝子の中から軟骨での発現が多い上位10遺伝子。rhGREM1 10 µg/mL

A

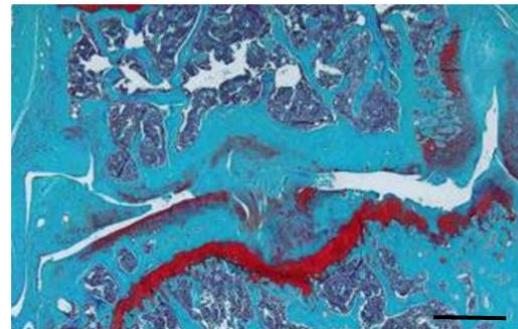
Protocol



Safranin-O 染色



PBS関節内注射



rhGREM1関節内注射

B

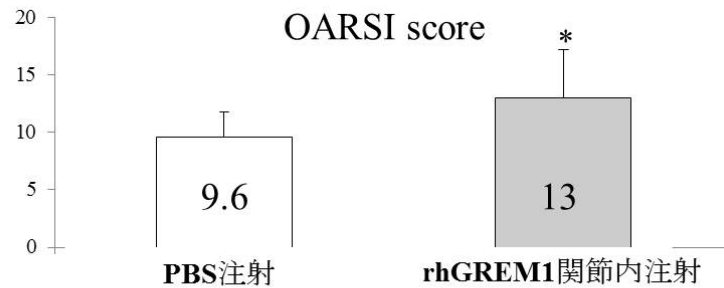


図 11 マウス膝OAモデル術後のrhGREM1関節内注射の結果

8週齢のマウスに膝OAモデルの手術を実施して1週間後から8週間PBS又は、rhGREM1 2 μ gを週に2回関節内注射実施した。PBS群:N=8 rhGREM群:N=8

A) マウス膝切片Safranin-O染色。左:PBS関節内注射、右:rhGREM1関節内注射。

B) OARSI score。* $P<0.05$ スケールバー 500 μ m

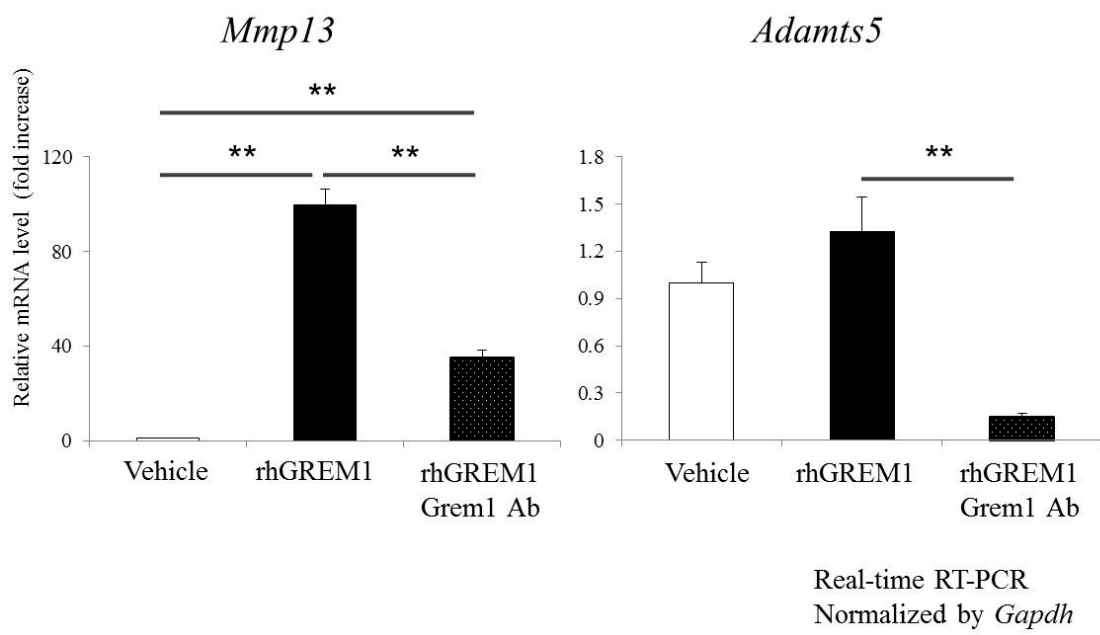
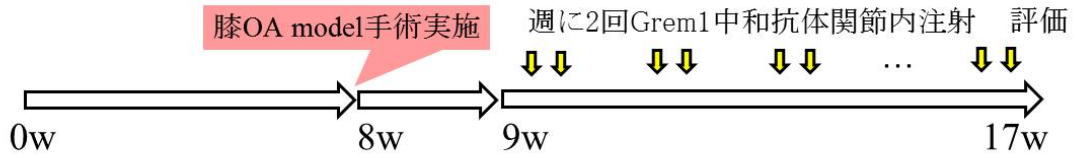


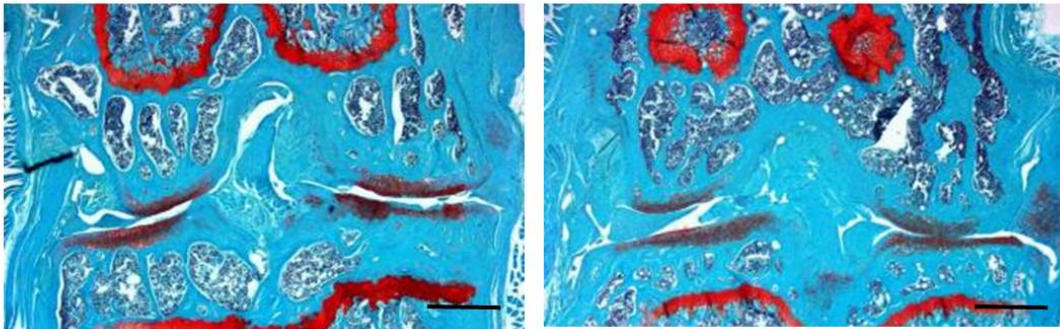
図 12 rhGREM1とGrem1中和抗体投与下のcatabolic factorの変化
** $P < 0.01$ rhGrem1 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Grem1中和抗体 10 ng/mL

A

Protocol



Safranin-O 染色



PBS関節内注射

Grem1中和抗体関節内注射

B

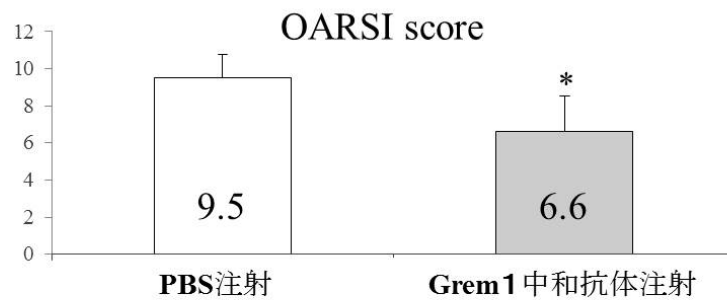
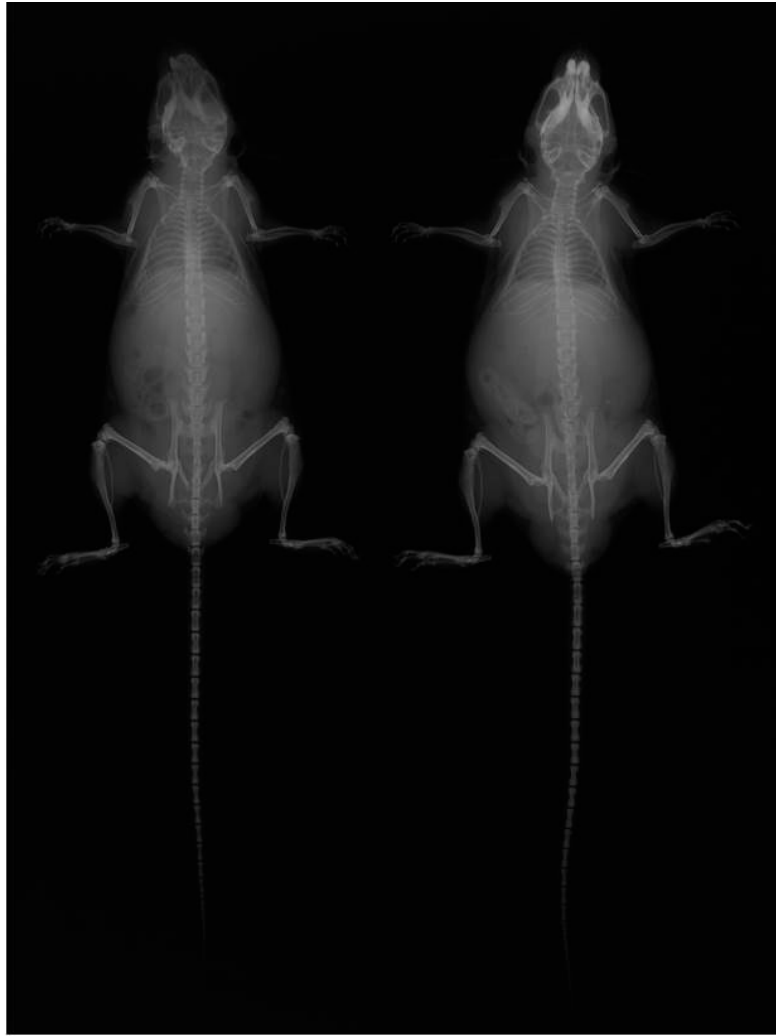


図 13 マウス膝OAモデル術後のGrem1中和抗体関節内注射の結果

8週齢のマウスに膝OAモデルの手術を実施して1週間後から8週間PBS又は、Grem1中和抗体2 μ gを週に2回関節内注射実施した。PBS群: N=8 Grem中和抗体群: N=10

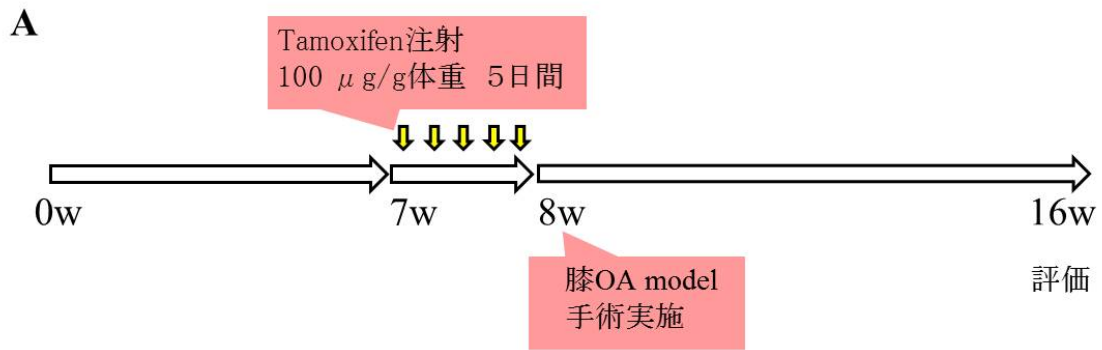
A) マウス膝切片Safranin-O染色。左: PBS関節内注射、右: Grem1中和抗体関節内注射。

B) OARSI score。* $P < 0.05$ スケールバー 500 μ m

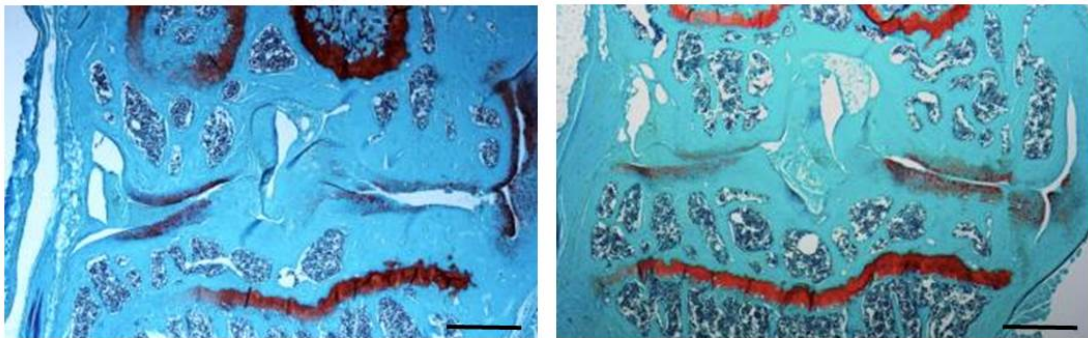


Grem1^{fl/fl} *Col2a1-Cre^{ERT2}; Grem1^{fl/fl}*

図 14 16週の *Col2a1-Cre^{ERT2};Grem1^{fl/fl}*-マウスのレントゲン写真
Col2a1-Cre^{ERT2};Grem1^{fl/fl}-マウスは *Grem1^{fl/fl}*-マウスと比較して体格差はなかった。



Safranin-O 染色



Grem1^{fl/fl}

Col2a1-Cre^{ERT2}; Grem1^{fl/fl}

B

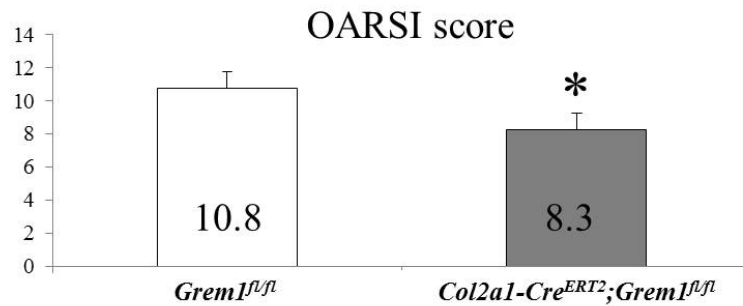


図 15 *Col2a1-Cre^{ERT2}; Grem1^{fl/fl}*のOAモデル結果

7週齢のマウスにTamoxifen 100 μ g/g体重を投与し8週齢でOAモデル手術を実施。術後8週で評価した。*Grem1^{fl/fl}*:N=9 *Col2a1-Cre^{ERT2}; Grem1^{fl/fl}*:N=9

A) マウス膝切片Safranin-O染色。左:*Grem1^{fl/fl}*、右:*Col2a1-Cre^{ERT2}; Grem1^{fl/fl}*

B) OARSI score。* $P < 0.05$ スケールバー 500 μ m

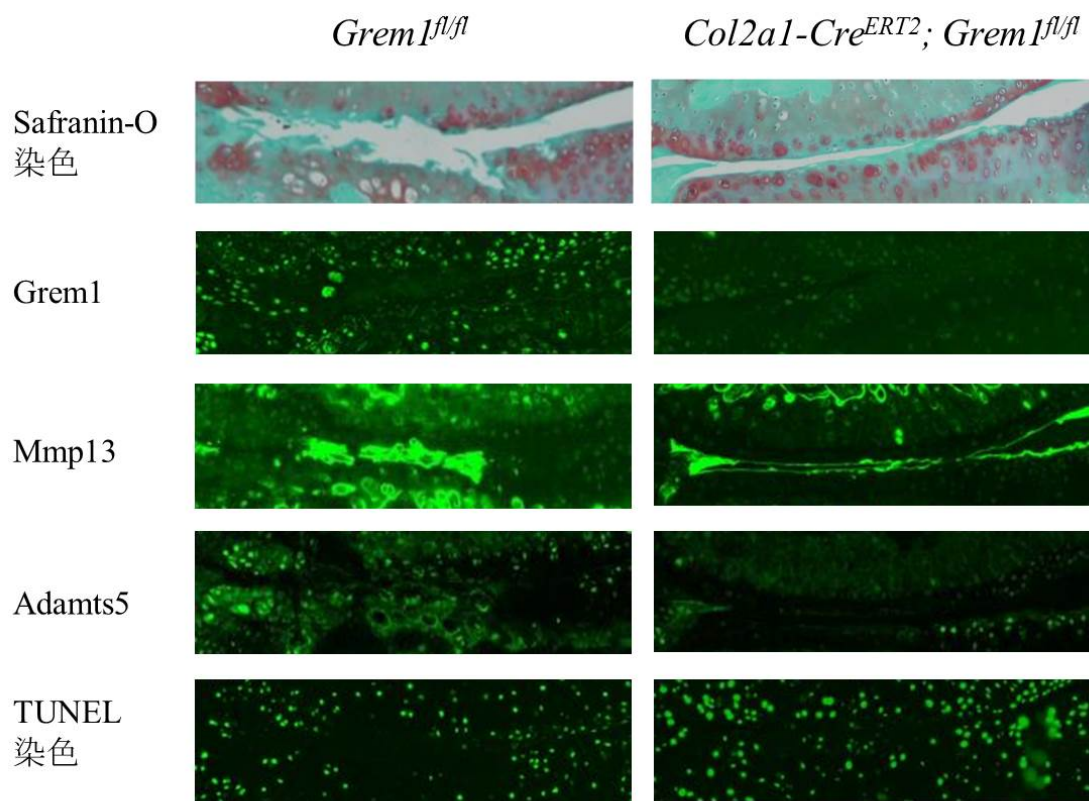
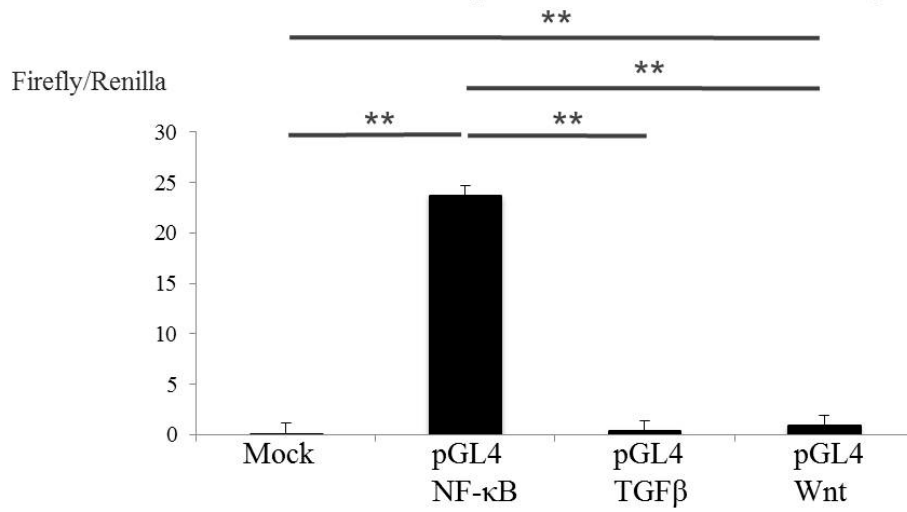


図 16 Safranin-O染色による軟骨変性評価とMmp13,Adamts5免疫染色、TUNEL染色

Grem1 over expression luciferase assay



rhGREM1 luciferase assay

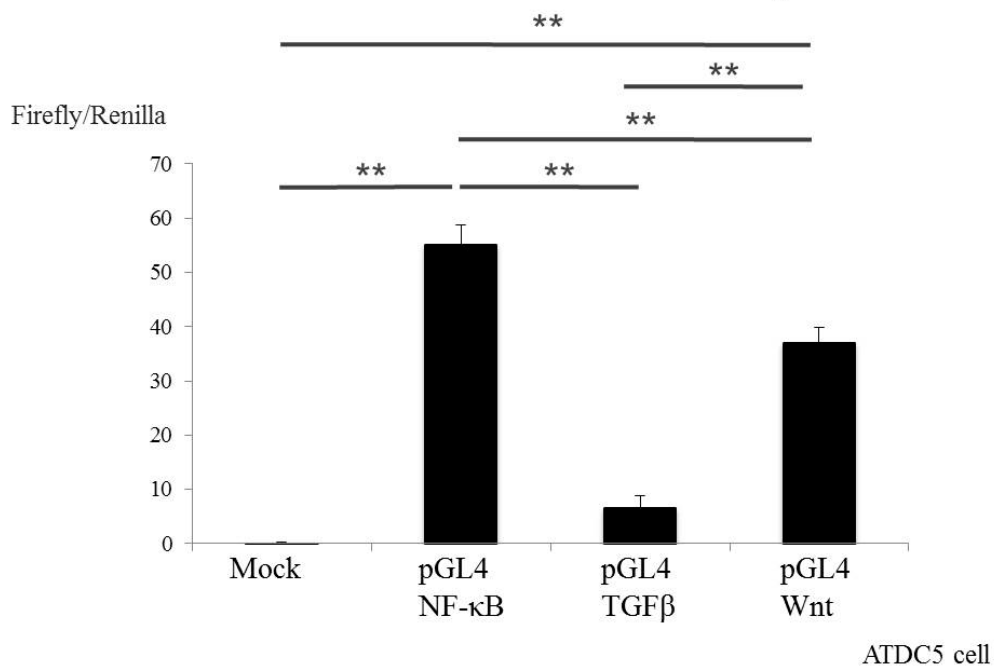


図 17 rhGREM1投与下、又はGrem1強制発現における代表的シグナルのluciferase assay
 ATDC5細胞に代表的シグナル応答エレメントを含むレポーターコンストラクトを用いてGrem1発現ベクターによる過剰発現、又はrhGREM1投与下で各シグナルの活性化を解析した。** $P < 0.01$

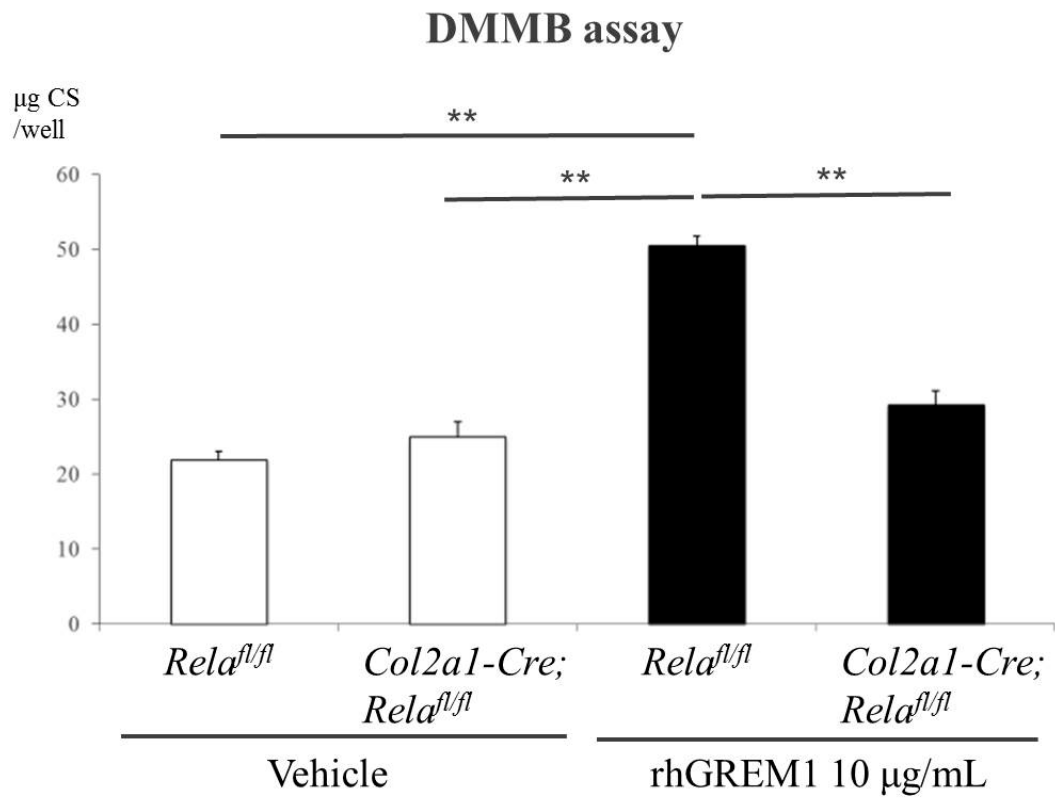


図18 dymethyl-methylene blue dye-binding (DMMB) assay
 3週齢の*Relα^{fl/fl}*マウス*Col2a1-Cre; Relα^{fl/fl}*マウス大腿骨頭にrhGREM1を投与して培養液中のAggrecanの放出を測定した。** $P < 0.01$ rhGREM1 10 µg/mL

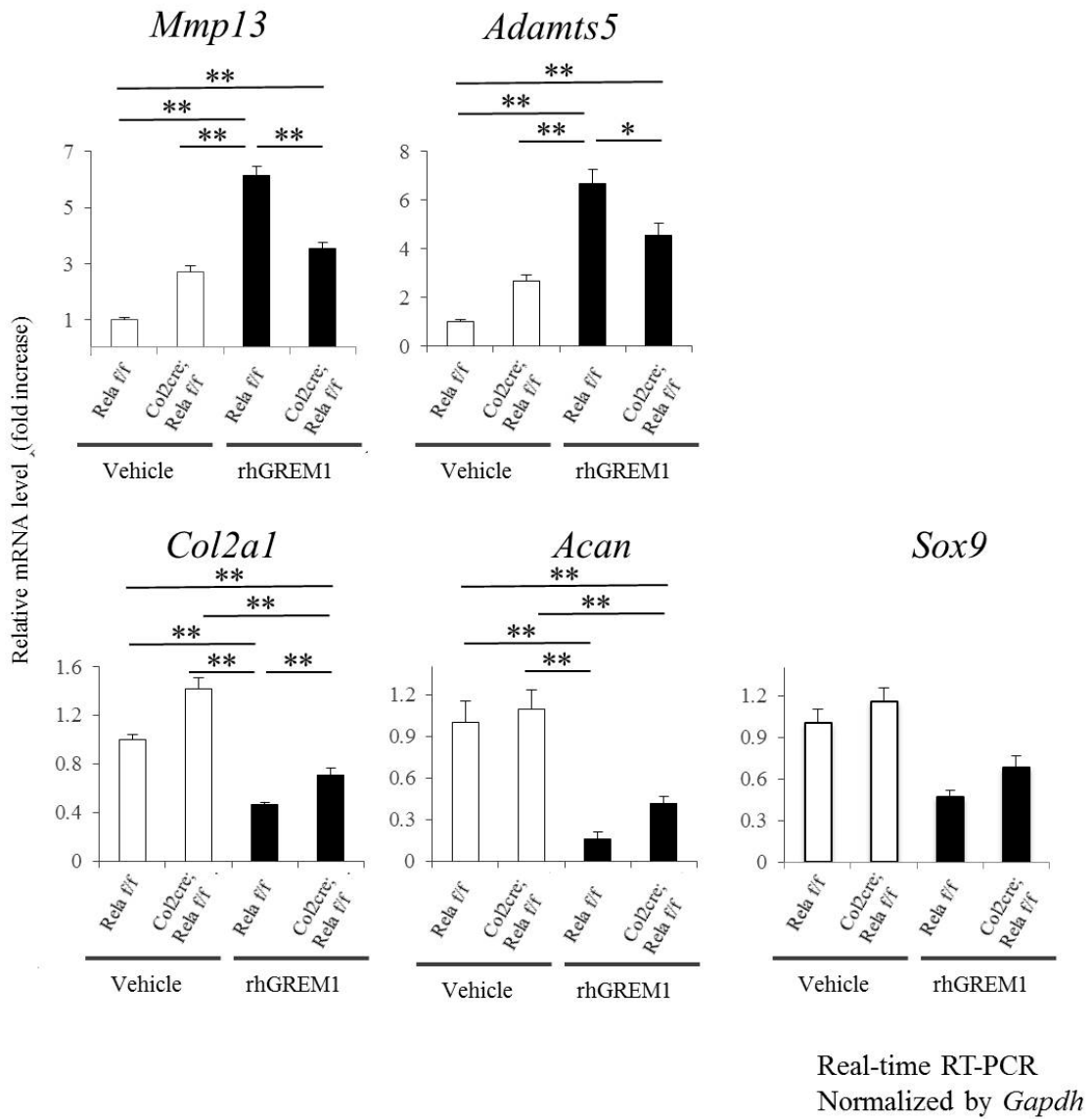


図19 3週齢の*Rela^{f/f}*マウス、*Col2a1-Cre:Rela^{f/f}*マウス大腿骨頭にrhGREM1を投与して軟骨においてのcatabolic factor, anabolic factor*の発現
 $P < 0.05$ rhGREM1 10 $\mu\text{g/mL}$ * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ rhGREM1 10 $\mu\text{g/ml}$

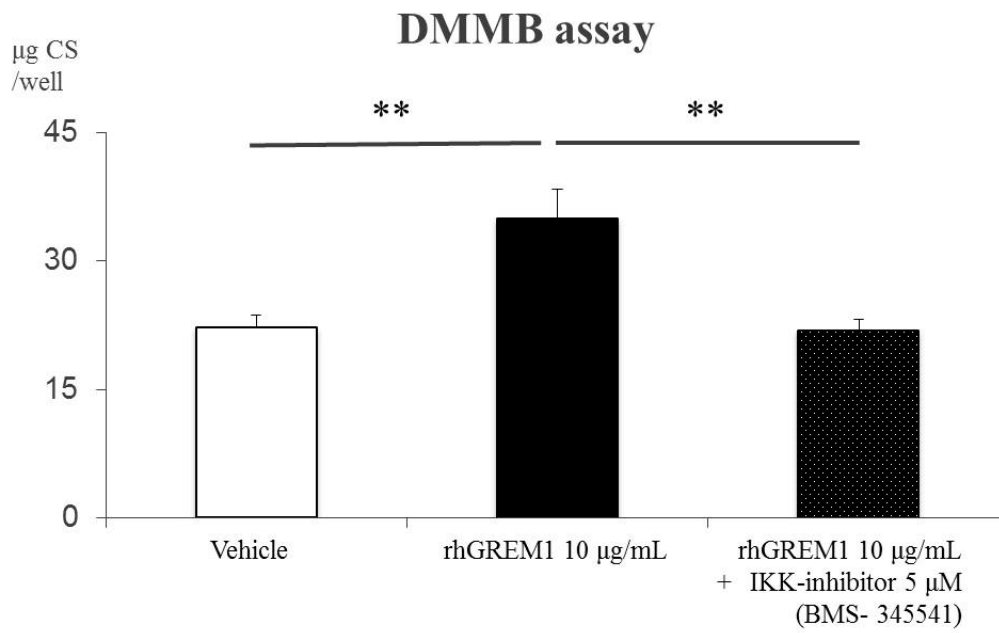


図20 dymethyl-methylene blue dye-binding (DMMB) assay

rhGREM1、NF- κ BシグナルのinhibitorであるIKK-inhibitor(BMS-345541)投与下での3週齢のマウス大腿骨頭Medium中のAggrecan放出の測定。**** $P < 0.01$**

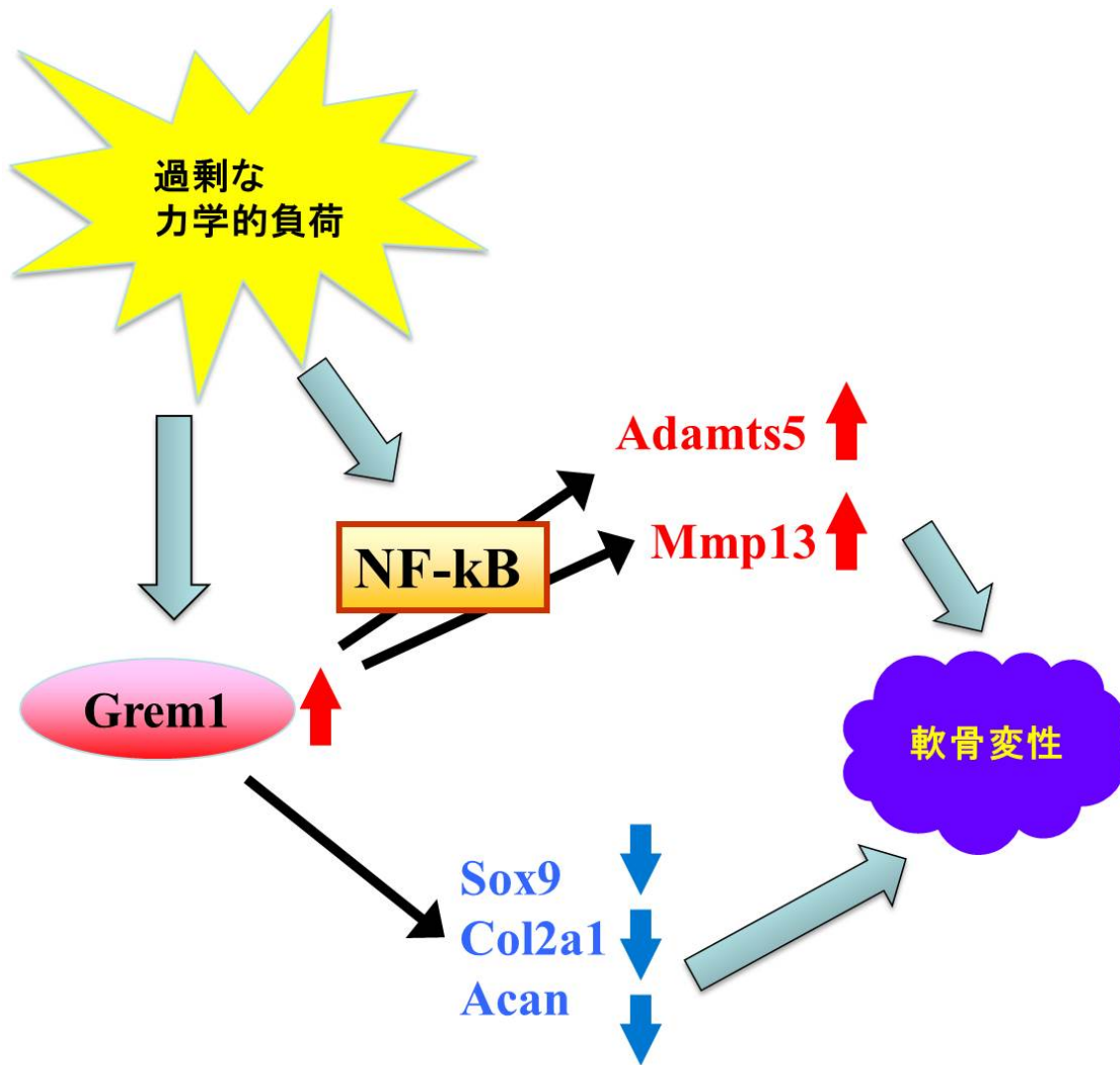


図 21 Grem1のシグナル経路模式図

過剰なメカニカルストレスによってGrem1は誘導されNF-κBシグナルを介してCatabolic factorを上昇させる。また、一方でanabolic factorを低下させる。