

博士論文

軟骨細胞における **NF- κ B** ファミリーメンバー**RelA** の
機能解析に関する研究

小林 寛

目次

要旨	5 頁
第 1 章 序論	6 頁
第 2 章 材料および方法	9 頁
2-1. 実験動物	
2-2. 細胞培養	
2-3. 初代軟骨細胞採取	
2-4. マウスの遺伝子型の同定	
2-5. リアルタイム RT-PCR	
2-6. Western プロット	
2-7. マウスの骨格二重染色	
2-8. マウス成長板軟骨の組織学的検討	
2-8-1. 免疫組織化学染色	
2-8-2. 細胞増殖能の評価 (BrdU labelling)	
2-8-3. アポトーシスの評価 (TUNEL 染色)	
2-9. 細胞増殖率の評価 (CCK-8 assay)	
2-10. 実験的マウス変形性膝関節症モデルの作出	
2-11. タモキシフェン注射	
2-12. Cre 発現部位の確認	
2-13. 放射線学的解析	
2-14. マイクロアレイ	

- 2-15. 発現ベクターの作成
- 2-16. ルシフェラーゼレポーターアッセイ
- 2-17. クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法)
- 2-18. 統計学的解析

第3章 結果

18 頁

- 3-1. マウス成長板軟骨細胞における RelA の発現
- 3-2. マウス四肢発生過程における段階的 RelA 欠損マウスの作成
- 3-3. 遺伝子欠損マウスの RelA 欠損効率の検討
- 3-4. マウス四肢発生過程における段階的 RelA 欠損マウスの骨格

および組織学的検討

- 3-4-1. *Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの骨格および組織
- 3-4-2. *Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの骨格および組織
- 3-4-3. *Col10a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの骨格および組織

小括 1

- 3-5. RelA の軟骨初期分化における作用の検討
 - 3-5-1. 軟骨基質合成能の解析
 - 3-5-2. 軟骨細胞の増殖能の解析

小括 2

- 3-6. 変形性膝関節症における RelA の機能の解析
- 3-7. 変形性膝関節症モデルを用いた RelA の変形性関節症における機能の解析
- 3-8. 自然経過モデルを用いた RelA の変形性関節症における機能の

解析

3-9. RelA による軟骨細胞調節作用のメカニズムの解析

3-10. RelA によって制御される下流因子の網羅的解析

小括 3

3-11. RelA による PI3K-Akt シグナルの制御

3-12. RelA による Pik3r1 の転写制御

3-13. RelA による Prkar1a を介したアポトーシス制御

3-14. c-Iap1、c-Iap2、Traf2、Pik3r1 の変形性関節症モデルにおける発現

第 4 章 考察 31 頁

謝辞 40 頁

引用文献 41 頁

要旨

本研究では軟骨細胞におけるNF- κ Bシグナルの軟骨内骨化および変形性膝関節症への関与について*in vitro*・*in vivo*の両面から検討した。転写因子RelAのコンディショナルノックアウトマウスを用いた骨格成長、変形性膝関節症の解析、初代軟骨細胞および各種細胞株を用いた機能解析を行った。その結果、NF- κ Bシグナルは軟骨において抗アポトーシス作用によって骨格形成を維持し、変形性膝関節症の進行を抑制していることが示された。

序論

近年の日本では少子高齢化が急速に進んでおり、高齢者の要支援・要介護者数は、平成12年には220万人であったのに対し、平成18年には440万人と倍増、平成22年には500万人を超え、増加の一途をたどっている。それに伴い後期高齢者医療費は、平成12年には11.2兆円であったのに対して、平成22年には12.7兆円と増加し、高齢者医療費の増大は社会問題となっている。要支援・要介護状態に陥る原因として、運動器疾患は全体の約2割を占め、中でも変形性関節症に代表される軟骨変性を基盤とした関節変性疾患は上位に位置している。東京大学22世紀医療センターの調査結果によると、変形性膝関節症は2530万人、変形性腰椎症は3790万人が罹患していると推計され(1)、関節変性疾患に対する新規の予防・治療法開発は整形外科に課せられた急務と言える。しかしながら、軟骨の分化・再生のメカニズムについての知見は極めて乏しいのが現状である。軟骨再生による治療法の実現には、軟骨細胞の発生・分化に関与するシグナルネットワーク群を解明し、それを応用する手法が有用であると考えられる。

脊椎動物の四肢の発生においては軟骨内骨化が重要な役割を果たしている(図1)。軟骨内骨化は膜性骨化とならび骨形成様式の一つとして知られるが、骨格形成のみならず(2)、変形性関節症における軟骨の変性と病的骨化においてもその関与が指摘されている(3, 4)。軟骨内骨化の過程においては未分化間葉系細胞が凝集し、その後軟骨前駆細胞、軟骨細胞へと分化して2型コラーゲン(COL2A1)、アグリカンに代表される軟骨特異的な細胞外基質を産生する。この過程には sex-determining region Y-type high mobility group box (SOX) ファミリー分子が深く関与しており、その中のSOX9は軟骨形成のマスター分子として機能し、軟骨細胞の

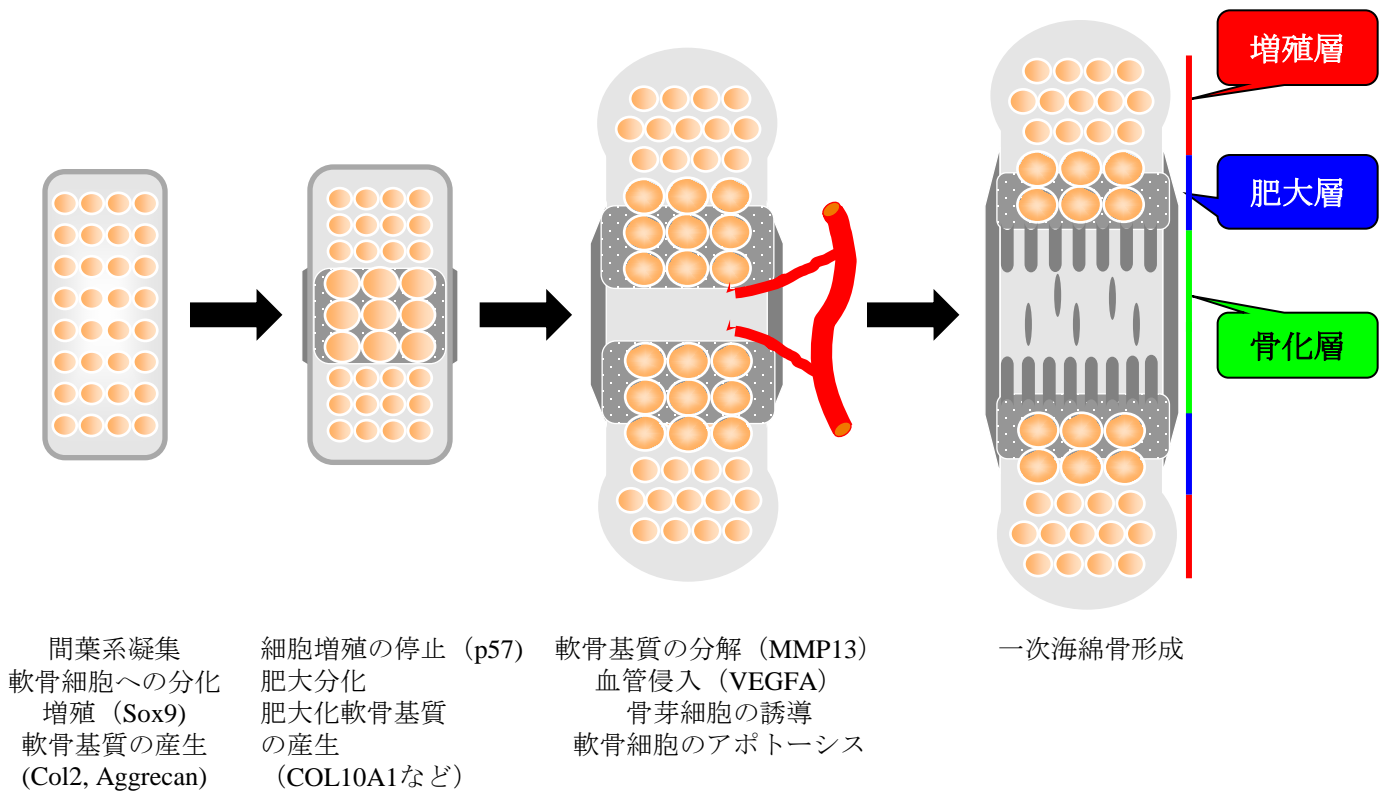


図1. 軟骨内骨化の分化過程

軟骨細胞はまず増殖を停止し、COL10A1などの肥大軟骨細胞固有の基質を産生する。その一方でMMP13を中心とした基質分解酵素により基質を分解し、VEGFAなどのサイトカインを分泌することにより血管侵入を促す。軟骨細胞はアポトーシスにより、消失し、軟骨から骨への置換が起こる。

発生・分化を制御している。軟骨細胞は増殖しながら中心部に向かって成熟し、10型コラーゲン (COL10A1) を分泌する肥大軟骨細胞を含む軟骨成長板を形成する。肥大軟骨細胞の一部は石灰化し、軟骨内への血管侵入とともにアポトーシスに至り、骨への置換が起こる (2, 3)。

NF- κ Bシグナルは、免疫反応、炎症、細胞増殖、細胞分化、アポトーシスなど生体内の様々な現象に関わっている (5, 6, 7) (図2)。NF- κ Bシグナルの転写因子は、RelA、RelB、c-Rel、p105/p50、p100/p52からなるが、これらは、Relホモロジドメインを有し、この構造がDNAとの結合や二量体の形成に寄与している。NF- κ Bシグナルの古典的経路は、ストレスや炎症性サイトカインなどの外的な刺激によりI κ B α のセリン残基をリン酸化する酵素複合体であるI κ Bキナーゼ (IKK) が活性化されるとI κ B α はタンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームにより分解を受ける。IKK複合体はIKK α 、 β および γ (NEMO) の各サブユニットから構成されている。これにより細胞質内でI κ B α により保持されていたNF- κ B複合体 (RelA-p50) は単離し、核内に移行する。その後、NF- κ BはDNA上の κ Bモチーフ (GGGACTTCC) と呼ばれる配列に結合し、さまざまな目的遺伝子の転写活性化を行う (8, 9)。また、非古典的経路では、NF- κ B2 p100/RelB複合体は細胞質内で不活化されているが、LT β R、CD40などを含む受容体のサブセットを介するシグナルは、NIK、IKK α 複合体を活性化し、NF- κ B2 p100 がリン酸化されると、ユビキチン化されプロテアソームプロセッシングによりNF- κ B2p52を生じ、それが、核へと移行し標的遺伝子を転写誘導する。

骨代謝の分野では特に破骨細胞分化において NF- κ B シグナルが必須であることが知られており、特にその上流リガンドである RANKL は破骨細胞研究の中心

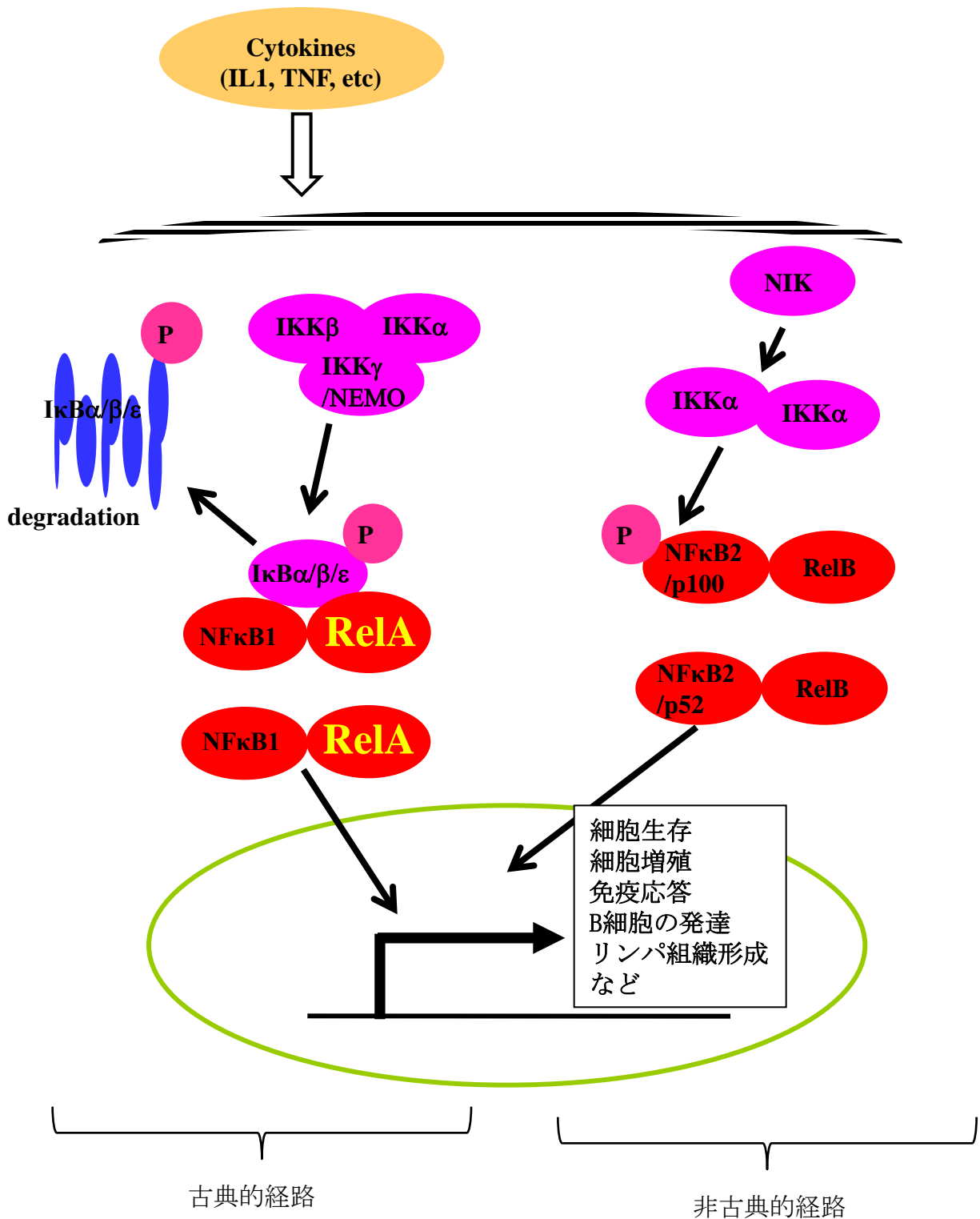


図2. NF-κBシグナル

NF-κBシグナルの古典的経路では、外的ストレスにより、IκBキナーゼが活性化し、IκBαをリン酸化すると、IκBαはユビキチン化され、分解する。IκBαによって細胞内に保持されていたRelAは遊離し、核内に移行、各種標的遺伝子を転写誘導する。非古典的経路では、NF-κB2 p100/RelB 複合体は細胞質内で不活化されているが、LTβR、CD40などを含む受容体のサブセットを介するシグナルは、NIK、IKK α複合体を活性化し、NF-κB2 p100 がリン酸化されると、ユビキチン化されプロテアソームプロセッシングによりNF-κB2p52 を生じ、それが、核へと移行し標的遺伝子を転写誘導する。

的役割を果たしている (10)。四肢発生におけるNF- κ B シグナルの作用に関しては、IKK α ノックアウトマウスは、肢芽発生が著しく抑制されることが知られている (11)。我々のグループでは、NF- κ B シグナルの主要転写因子 RelAがGSK3による活性制御を受けて、軟骨発生のマスターレギュレーターである Sox9 の転写を活性化していることを報告した (12, 13)。よって、NF- κ B シグナルは、軟骨の初期分化において重要な役割を担っている可能性が考えられている。一方で、我々は、軟骨内骨化の後期分化や軟骨の変性に関わるHIF-2 α や、軟骨基質分解酵素であるADAMTS5をRelAが直接転写活性化することを報告している (14, 15)。さらに、RelAは、軟骨内骨化の初期および後期分化だけでなく、Nkx3.2によりリガンド非依存性に活性化され、軟骨細胞の生存に寄与していることが近年報告されている (16)。以上のことから、RelAは、anabolicな作用とcatabolicな作用を通じて、骨格形成や変形性膝関節症に関わっている可能性が考えられる。

本研究においては、軟骨内骨化および変形性関節症におけるNF- κ Bシグナルの関与について検討を行った。まずマウス成長板におけるRelAの発現解析を*in vivo*で行った。次に四肢発生過程で段階的にRelA遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作成し、表現型および組織学的解析から骨格形成におけるNF- κ Bシグナルの関与を検討した。さらに軟骨特異的RelAノックアウトマウスを用いて変形性関節症モデルを作出し、変形性関節症におけるNF- κ Bシグナルの関与を検討した。次に、RelAの軟骨細胞における作用メカニズムの機能解析を行い、RelAの下流因子について網羅的に解析し、抗アポトーシス作用をもつTraf2、c-Iap1,2、Pi3kr1を同定した。最後にこれらの因子の変形性膝関節症への関与を*in vivo*で検討した。

第2章 実験材料および方法

2-1. 実験動物

*Col2a1-Cre*マウス、*Prx-Cre1*マウスは米国Jackson研究所より購入した。

*Col2a1-Cre^{ERT}*マウスはWashington UniversityのFanxin Long博士より、*Col10a1-Cre*マウスは京都大学の秋山治彦博士より供与された。*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。これらのマウスはC57BL/6 backgroundで維持した。

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。

2-2. 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。ヒト軟骨肉腫細胞株 OUMS-27 細胞（RIKEN Cell Bank）は、1% P/S solution と 10%FBS を添加した DMEM (WAKO) にて培養した。Tumor necrosis factor- α (Sigma-Aldrich)は、PBS で培養細胞を洗浄後、無血清の DMEM にて6時間培養を行った後に、1, 10 ng/ml の濃度で投与した。

2-3. 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(17)。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。

2-4. マウスの遺伝子型の同定

胎生18.5日のマウス皮膚または生後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。

RelA forward primer: 5' - TCCTTCTAGCGATAATAACTTCG-3'

reverse primer: 5' - TGCAATCCATCAAAGTCAGC -3'

WT : 139bp RelA-flox : 174bp

Cre forward primer: 5' - GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC -3'

reverse primer: 5' - GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT -3'

Cre : 100bp

PCR条件

1. 94°C (3 min)

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

3. 68°C (5 min)

2-5. リアルタイムRT-PCR

RNAはISOGEN (Wako) を用いて回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製した。0.5 μ g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。スタンダードプラスミドはTOPO TA cloning kit (Invitrogen) を用いて合成し、希釈系列を調整し、各種のスタンダードカーブを得た。Rodent total RNA (Applied Biosystems) でマウスActin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コピー数を測定した。各サンプルの測定値は、3 wellでの計測値の平均値とした。

2-6. Westernブロット

培養細胞を氷冷PBSで2回洗った後、M-PER (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 ; RelA (#8242, Cell signaling)、

CCP3 (#9661, Cell signaling)、CCP8 (#9496, Cell signaling)、CCP9 (#9509, Cell signaling)、Akt (#4685, Cell signaling)、p-Akt (#40460, cell signaling)、 β -actin (Sigma) と反応させた。二次抗体にはHRP標識抗体 (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。Image Jを用いて検出されたバンドの半定量を行った。

2-7. マウスの骨格二重染色

胎生18.5日における各遺伝子型のマウス胎仔を帝王切開にて取り出し、皮膚・内臓・その他軟部組織を可及的に取り除き、その骨格全体を100%エタノールで1週間固定した。これをまず0.3%アルシアンブルー8GX (Sigma) 溶液に浸し、37°Cで2日間振盪した。エタノールリンスを2日間行った後、次に0.1%アリザリンレッドS (Sigma) 溶液に浸し、遮光・室温で12時間振盪した。その後はグリセリン/1%水酸化カリウム溶液に浸して振盪させ、残存した軟部組織を溶解させた。保存のため、グリセリン濃度は段階的に50%、80%、100%と上げていった。

2-8. マウス成長板軟骨および関節軟骨の組織学的検討

胎生18.5日マウスの上腕骨または脛骨近位成長板および16週または1年齢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5 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. 免疫組織化学染色

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、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分を行い、そのまま一次抗体にて4℃で、一次抗体 ; RelA (1:500; #8242, cell signaling)、Traf2 (1:500; ab26578, abcam)、c-Iap1 (1:500; ab25939, abcam)、c-Iap2 (1:500; sc7944, Santacruz)、Pi3kr1(1:500; sc423, Santacruz)、Col10a1 (1:500; LSL) 、Adamts5 (1:200;ab41037, abcam)と一晚反応させた。抗体の希釈には、付属のAntibody diluent (Dako)を用いた。Col10a1、Mmp13、Traf2、c-Iap1、c-Iap2、Pi3kr1、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30分間反応させた後にTBSTにて3分×3回洗浄を行い、amplificaton reagentで15分間反応させ、TBSTにて3分×3回洗浄を行った。蛍光の場合は、ここでHoechst (1:500)にて核染色を行い、染色を終了した。DAB染色の際には、TBSTにて洗浄後、anti-fluorescein-HRPにて15分間反応させ、TBSTにて3分×3回洗浄した後に、付属のDABにて1分間染色を行った。DAB染色時には対比染色としてメチルグリーン染色を行った。

2-8-2. 細胞増殖能の評価 (BrdU)

軟骨細胞の増殖率を評価するために、胎生18.5日の母体マウスにBrdU (Sigma) を100 µg/BW(g)で腹腔内投与し、2時間後に胎児を摘出した。上述のごとく組織切片

を作成し、上腕骨の切片で抗BrdU抗体 (Abcam)を用いた免疫染色を行った。

2-8-3. 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分間前処置を行い、PBSで洗浄後、In Situ cell Death Detection Kit (Roche)またはIn situ Apoptosis Detection Kit (Takara)のTUNEL Reaction Mixture 50 µlにて37°Cで1時間反応させてTUNEL染色を行った。前者の場合は、Hoechst (1:500; Eugene)にて核染色を行った。

2-9. 細胞増殖率の評価 (CCK-8 assay)

時間経過における軟骨細胞の増殖率を評価するために、96-well plateに 10^3 cells/wellで播き、Cell Counting Kit 8 (Dojindo) を用いて、経時的に生細胞数を測定した。

2-10. 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(18)。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5 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(19)。

2-11. タモキシフェン注射

7週齢の雄の同胞 *Rela^{fl/fl}* マウスと *Col2a1-Cre^{ERT};Rela^{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(20)。

2-12. Cre 発現部位の確認

Col2a1-Cre^{ERT} マウスと Rosa26 レポーターマウス (*R26R^{fl/+}*) を交配し、得られた7週齢の *Col2a1-Cre^{ERT};R26R^{fl/+}* マウスと *R26R^{fl/+}* マウスにタモキシフェンを投与し、16週齢で sacrifice した。膝関節を摘出後、固定液：0.2% glutalaldehyde、2% formalin、0.1 M phosphate buffer (pH 7.3)、5 mM EGTA ((pH 8.0) DOJINDO)、2 mM MgCl₂ (Wako) で30分固定後、Wash Buffer：0.1M phosphate buffer (pH 7.3)、0.1% sodium deoxycholate (Wako)、0.2% NP40 (ICN Biomedicals)、2 mM MgCl₂ で洗浄し、X-gal 溶液 (0.1 M phosphate buffer (pH 7.3)、1.3 mM MgCl₂、3 mM potassium ferricyanide (Wako)、3 mM potassium ferrocyanide (Wako)、X-gal 1 mg/ml (Wako)) で室温にて72時間染色した。0.1 M phosphate buffer (pH 7.3) にて洗浄後パラフィンブロックを作成し、5 µm スライス of 組織切片を作成した。対比染色として Hematoxylin 染色を行った。

2-13. 放射線学的解析

全身のX線撮影にはマウスにアバーチン (体重1 gあたり25 µl) 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。

2-14. マイクロアレイ

RNAをISOGEN (Wako) 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。

2-15. 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。

RelAの Gene BankへのアクセスナンバーはNM_021975である。

2-16. 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。このベクターにPI3KR1 (転写開始点より-1,585bp~+76bp) の遺伝子について、プロモ

ーター領域をヒトゲノムDNAを鋳型としてPCRにて増幅し組み込んだ。プロモーターのNF- κ B結合領域配列を段階的に欠失または変異を導入したコンストラクトはPCR法を応用して作成した。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。

2-17. クロマチン免疫沈降法 (ChIP法)

ChIPアッセイは、Oneday ChIP kit (Diagenode)を用いて行った。OUMS細胞をPBSで洗浄、TNF α を10 ng/ml投与した24時間後にホルマリン固定を行った。コントロールとして同量のPBSを投与した。ソニケーションは、BIORUPTOR (コスモバイオ)を用いた。免疫沈降 (IP) には抗RelA抗体 (Cell signaling) とウサギIgG抗体を用いた。PCRのプライマーは、-546/539 bpおよび-227/219 bpのNF- κ Bモチーフを含むように、それぞれ転写開始点から上流-593bpから-408bp、上流-285bpから-77bpの間を増幅するセットと、陰性コントロールとして、+55bpから+289bpを増幅するセットを用いた。PCR試薬には、KOD Fx plus (Takara bio)を用いた。

2-18. 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。2群間の比較には、t検定を用いて有意水準0.05で検定した。

第3章 結果

3-1. マウス成長板軟骨細胞におけるRelAの発現

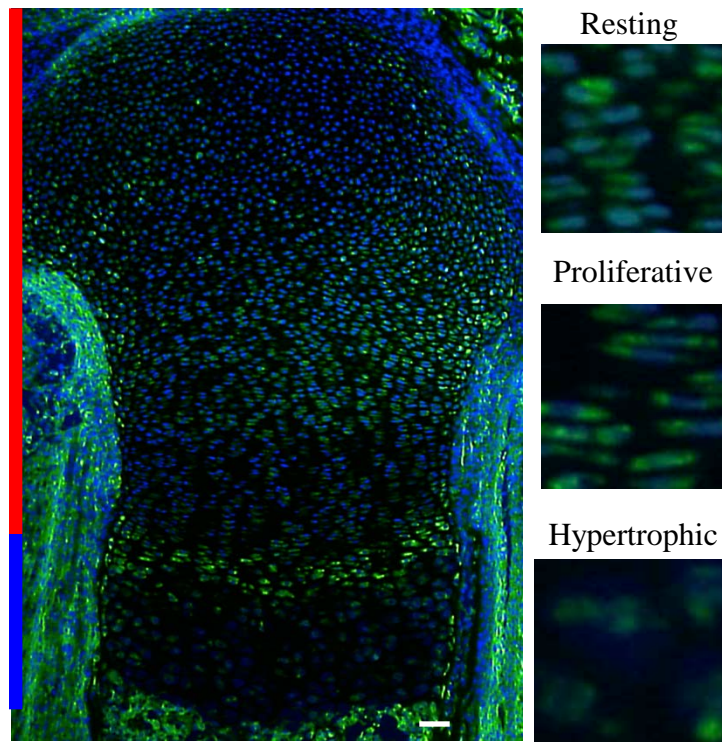
まず、*in vivo*で胎生18.5日のマウス胎仔上腕骨の切片を用いて免疫組織染色法にてRelAの発現パターンの解析を行った。RelAは静止細胞層・増殖細胞層・肥大細胞層いずれにおいても発現が確認された(図3)。

3-2. マウス四肢発生過程における段階的RelA欠損マウスの作成

骨格成長におけるRelAの生理的な作用を知るために、遺伝子欠損マウスの解析を行った。RelAを欠損させた軟骨組織の解析を可能とするため、Technical University of Munich よりRelA-floxedマウス(21)を供与して頂き、四肢間葉系細胞特異的遺伝子欠損するpaired-related homeobox gene 1(Prx1)プロモーター作動性Creマウス(*Prx1-Cre*)、軟骨細胞特異的遺伝子欠損するCol2a1プロモーター作動性Creマウス(*Col2a1-Cre*)、肥大軟骨特異的遺伝子欠損するCol10a1プロモーター作動性Creマウス(*Col10a1-Cre*)とRelA^{fl/fl}マウスと交配させ、それぞれ組織特異的遺伝子欠損マウス(*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*、*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*、*Col10a1-Cre;Rela^{fl/fl}*)を作成し、その仔を解析した(図4)。

The expression of RelA
in growth plate

Anti-RelA



IHC, mouse E18.5 humerus

図3. RelA の成長板における発現

胎生18.5日のマウス胎仔上腕骨切片を用いて免疫染色法によりRelAの発現解析を行った。上の赤棒は静止細胞層および増殖軟骨細胞層、青棒は肥大軟骨細胞層を示す。Relaは、各分化段階においてもユビキタスに発現している。

Scale bar = 100 μ m

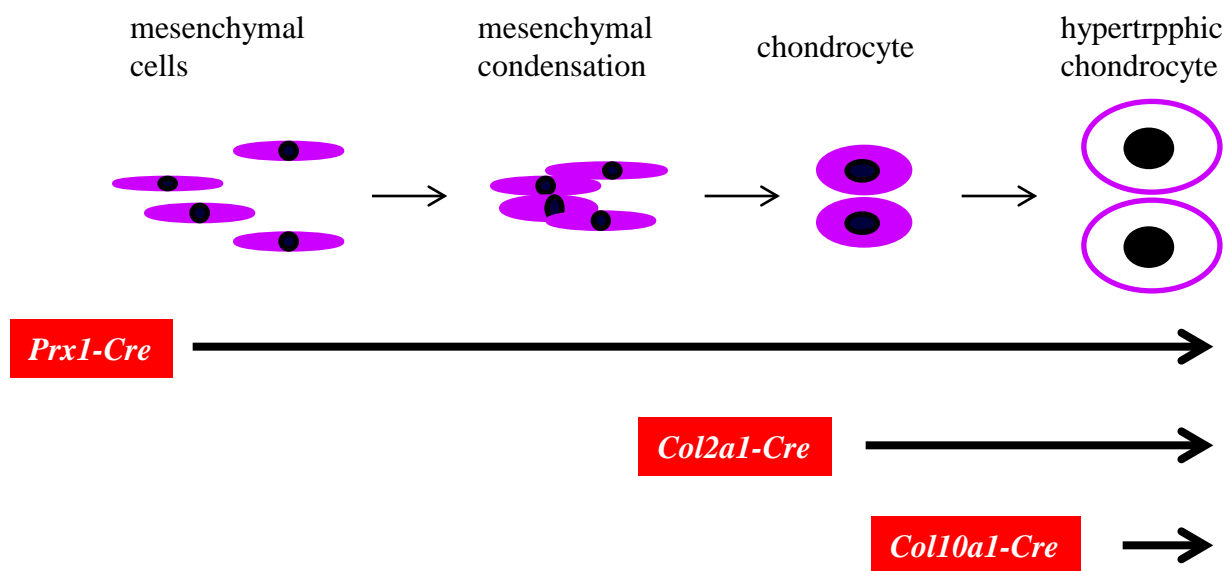


図4. 四肢発生および軟骨内骨化における段階的コンディショナルノックアウトマウスの作成

四肢発生および軟骨内骨化の分化過程においてRelaを段階的にノックアウトするために、四肢間葉系細胞特異的な*Prx1-Cre*マウス、軟骨細胞特異的な*Col2a1-Cre*マウス、肥大軟骨細胞特異的な*Col10a1-Cre*マウスを使用し、*Rela^{fl/fl}*と交配し、ホモノックアウトマウスを作製した。

3-3. 遺伝子欠損マウスのRelA欠損効率の検討

次に、遺伝子欠損マウスにおける軟骨細胞でのRelA欠損効率を検討するために *Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}* マウスとそのコントロールマウスから初代軟骨細胞を採取して、リアルタイムRT-PCRとウェスタンブロッティングで遺伝子欠損効率を検討した (図5)。コンディショナルノックアウトマウス由来軟骨細胞では、RelAのmRNA発現量が有意に低下していた。また、ウェスタンブロッティングでは、不完全なRelA蛋白が見られており、コンディショナルノックアウトマウス由来軟骨細胞でRelAの遺伝子欠損を確認した。また、*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}* および *Col10a1-Cre;Rela^{fl/fl}* マウスにおいても、胎生18.5日のマウスの胎仔上腕骨切片を用いてRelAの免疫染色を行い、*Rela^{fl/fl}* マウスと比較して *Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}* では、静止細胞層～肥大細胞層全域で、*Col10a1-Cre;Rela^{fl/fl}* マウスでは、肥大細胞層でRelaの発現が低下していることを確認した (図6)。

3-4. マウス四肢発生過程における段階的RelA欠損マウスの骨格および組織学的検討

生理的な軟骨内骨化過程におけるRelAの役割を詳細に解析するために胎生18.5日の検体を用いて、骨格二重染色を行った。また、胎生18.5日のマウス胎仔において、上腕骨または脛骨全長をHE染色し、遺伝子型間で比較した。

3-4-1. *Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}* マウスの骨格および組織

胎生期の骨格成長に関して検討した。時系列ごとに胎仔を取り出してnaso-anal lengthを測定すると、*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}* マウスは *Rela^{fl/fl}* マウスと比較して成長に差は

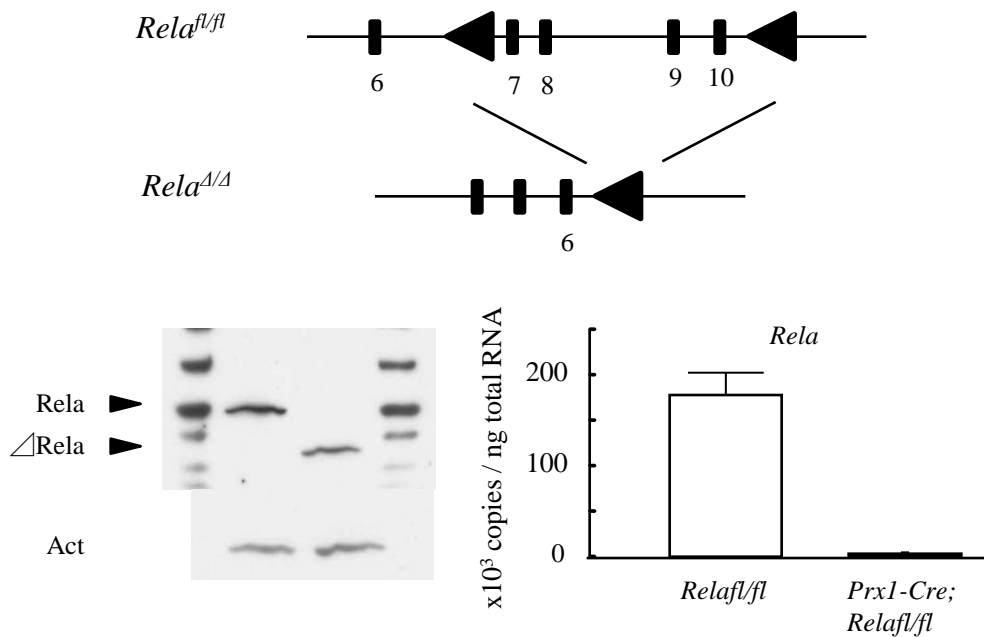


図5. *Rela*コンディショナルノックアウトマウス軟骨細胞における*RelA*ノックアウト効率

マウス関節軟骨を採取し、平面培養の後に蛋白、mRNAを採取し、ウェスタンブロッティング、リアルタイムRT-PCRでノックアウト効率を確認した。

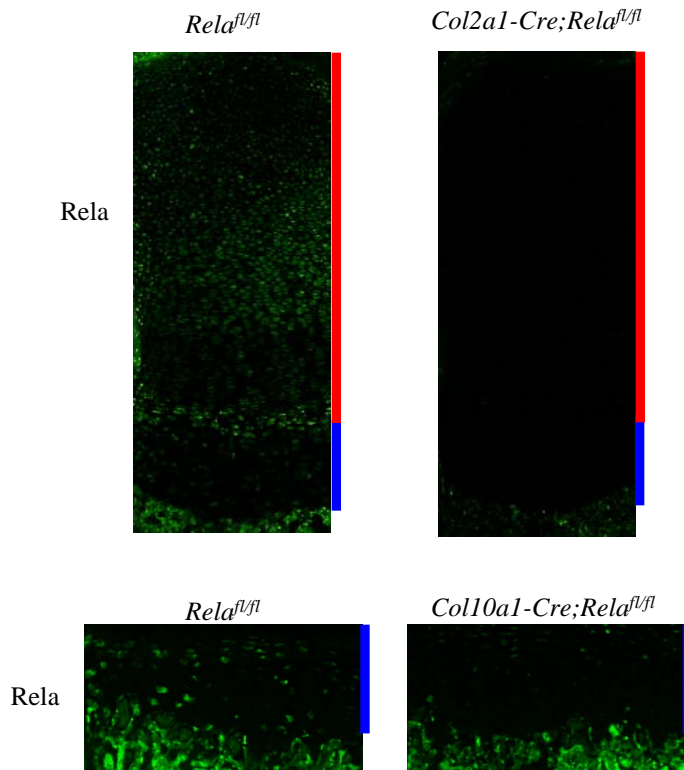


図6. *Col2a1-Cre;Rela*^{fl/fl} および *Col10a1-Cre;Rela*^{fl/fl} マウスの成長板における*Rela*ノックアウト効率

胎生18.5日の*Rela*^{fl/fl}マウスと*Col2a1-Cre;Rela*^{fl/fl}および*Col10a1-Cre;Rela*^{fl/fl}マウスの胎仔上腕骨切片で*RelA*の免疫染色を行い、コンディショナルノックアウトマウスで*RelA*の発現が、それぞれ軟骨細胞、肥大軟骨細胞で低下していることを確認した。

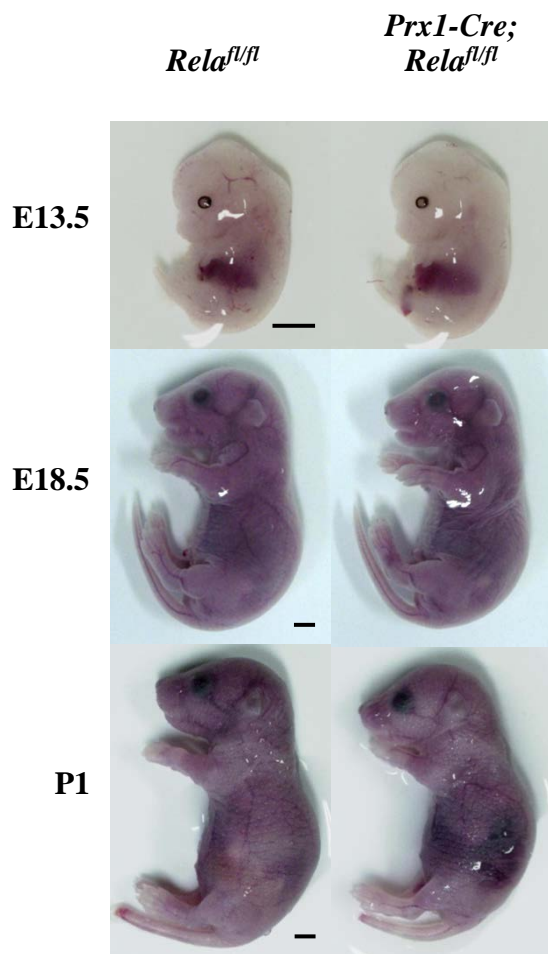


図7. *Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの実体写真

*Rela^{fl/fl}*マウスと*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスについて、胎生13.5日、18.5日、出生後1日において検討した。*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスは*Rela^{fl/fl}*マウスと比較して体長に差は見られなかった。

Scale bar = 1mm

見られなかった(図7)。胎生18.5日の検体を用いて骨格二重染色を行うとやはり体長に差はなかったが、長管骨では*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスで成長障害がみられた(図8, 9)。これは*Prx1*が肢芽特異的に発現し、脊椎骨には発現していないことによるものと考えられた(22)。脛骨全長によるHE染色では、*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスでは、*Rela^{fl/fl}*と比較して、脛骨長の短縮がみられた(図10)。

3-4-2. *Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの骨格および組織

胎生期の骨格成長に関して検討した。時系列ごとに胎仔を取り出してnaso-anal lengthを測定すると、*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスは*Rela^{fl/fl}*マウスと比較して成長障害を呈した(図11)。胎生18.5日の検体を用いて骨格二重染色を行うと*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスで長管骨・脊椎骨ともに成長障害がみられた(図12, 13)。上腕骨全長によるHE染色では、*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスでは、*Rela^{fl/fl}*と比較して、上腕骨長の短縮がみられた(図14)。

3-4-3. *Coll10a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの骨格

胎生18.5日の検体を用いて骨格二重染色を行うと*Coll10a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスで長管骨・脊椎骨ともに成長障害はみられなかった(図15, 16)。上腕骨全長によるHE染色では、両遺伝子型間で上腕骨長の差はみられなかった(図17)。

小括 1

*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスは長管骨の成長障害を呈し、*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスは全身性の成長障害を示した。一方で、*Coll10a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスは成長障害を呈さ

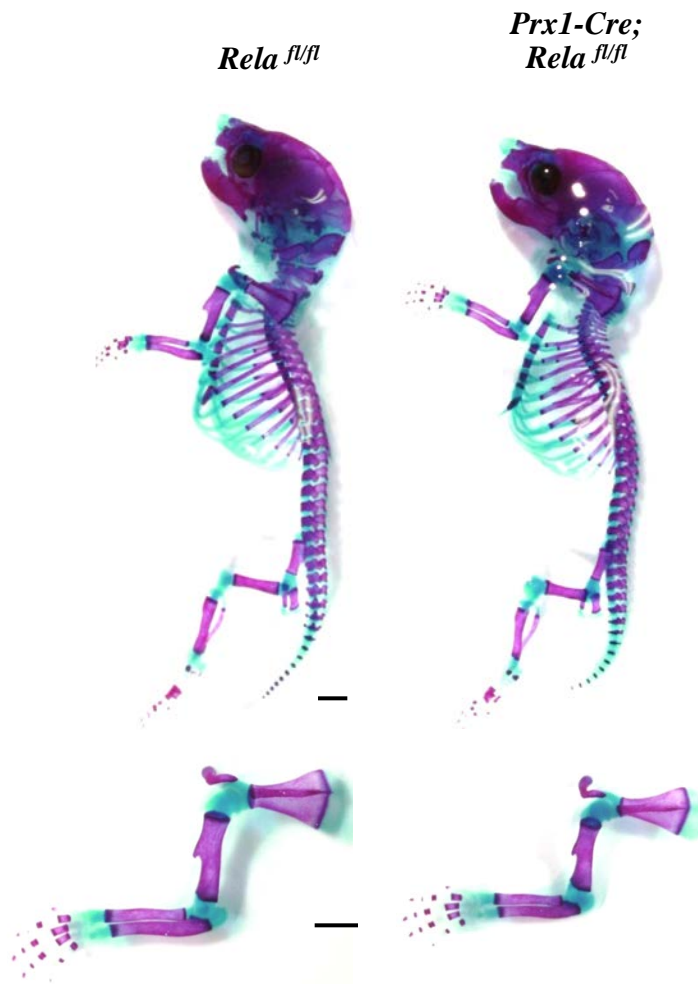


図8. *Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの骨格

*Rela^{fl/fl}*マウスと*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスについて、二重染色法を用いて胎生18.5日の骨格を比較した。体長に差はなかったが、長管骨では*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスで成長障害がみられた。

Scale bar = 1mm

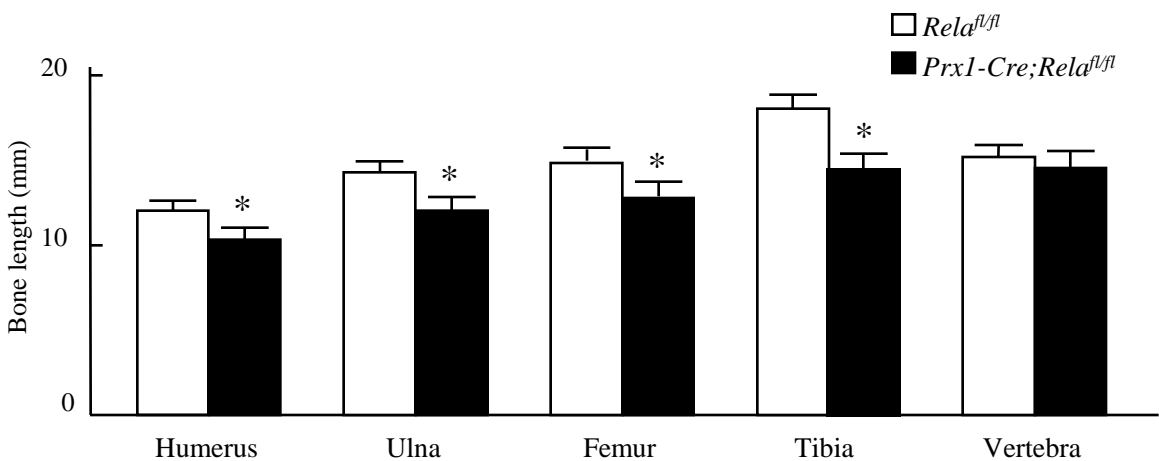


図9. *Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの四肢・脊椎の骨長計測

胎生18.5日齢において骨格標本を作成し、四肢長管骨、脊椎の骨長を实体顕微鏡下に計測した。*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスは、脊椎骨長は正常であったが、長管骨で軽度の短縮を認めた。

データは平均値 (bars) ±s.d. (error bars)、n=6/group、*P<0.05 vs *Rela^{fl/fl}*

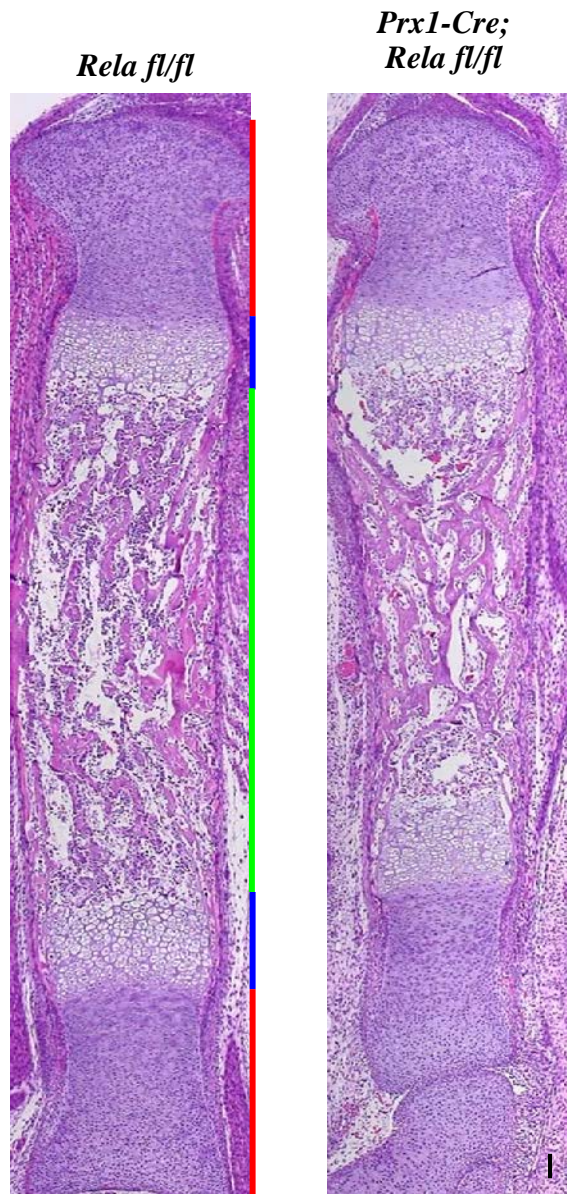


図10. *Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの組織

*Rela^{fl/fl}*マウスと*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスについて、HE染色を用いて胎生18.5日の脛骨全長を比較した。*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスでは、*Rela^{fl/fl}*マウスと比較して脛骨長の短縮がみられた。

Scale bar = 100 μ m

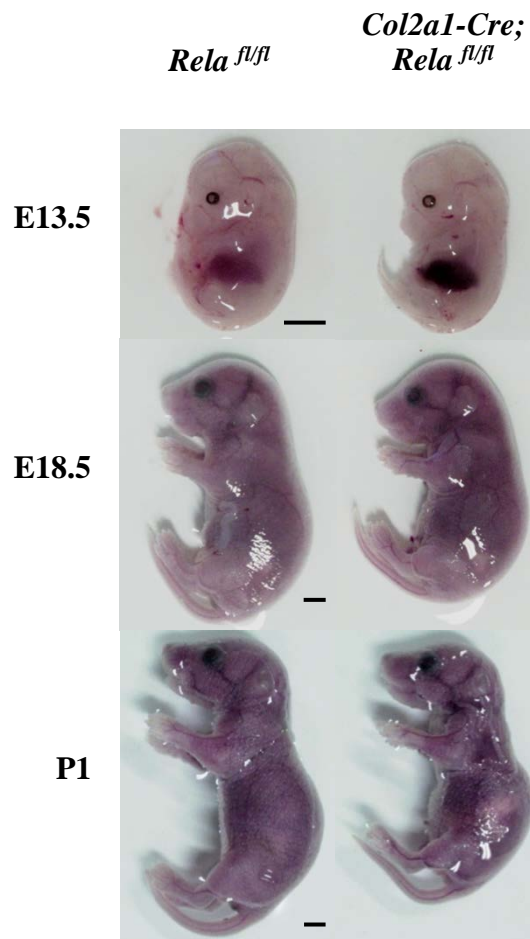


図11. *Col2a1-Cre;Relα^{fl/fl}*マウスの実体写真

*Relα^{fl/fl}*マウスと*Col2a1-Cre;Relα^{fl/fl}*マウスについて、胎生13.5日、18.5日、出生後1日において検討した。*Col2a1-Cre;Relα^{fl/fl}*マウスは*Relα^{fl/fl}*マウスと比較して胎生期より成長障害が見られた。

Scale bar = 1mm



図12. *Col2a1-Cre;Rela^{f/f}*マウスの骨格

*Rela^{f/f}*マウスと*Col2a1-Cre;Rela^{f/f}*マウスについて、二重染色法を用いて胎生18.5日の骨格を比較した。*Col2a1-Cre;Rela^{f/f}*マウスでは長管骨・脊椎骨ともに成長障害がみられた。

Scale bar = 1mm

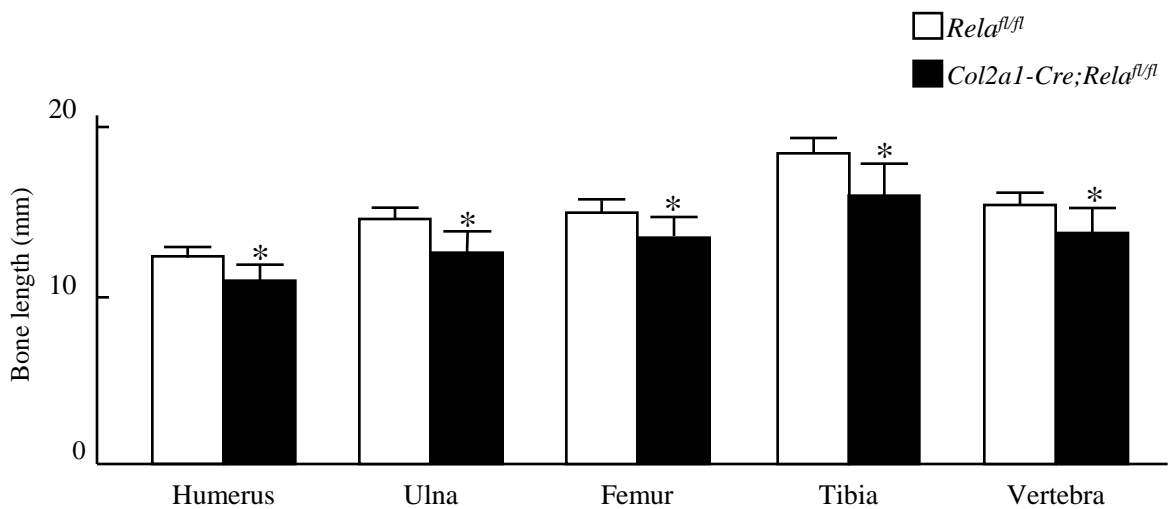


図13. *Col2a1-Cre;Rela^{f/f}*マウスの四肢・脊椎の骨長計測

胎生18.5日齢において骨格標本を作成し、四肢長管骨、脊椎の骨長を实体顕微鏡下に計測した。*Col2a1-Cre;Rela^{f/f}*マウスは長管骨および脊椎骨長の軽度の短縮を認めた。データは平均値 (bars) \pm s.d. (error bars)、n=6/group、*P<0.05 vs *Rela^{f/f}*

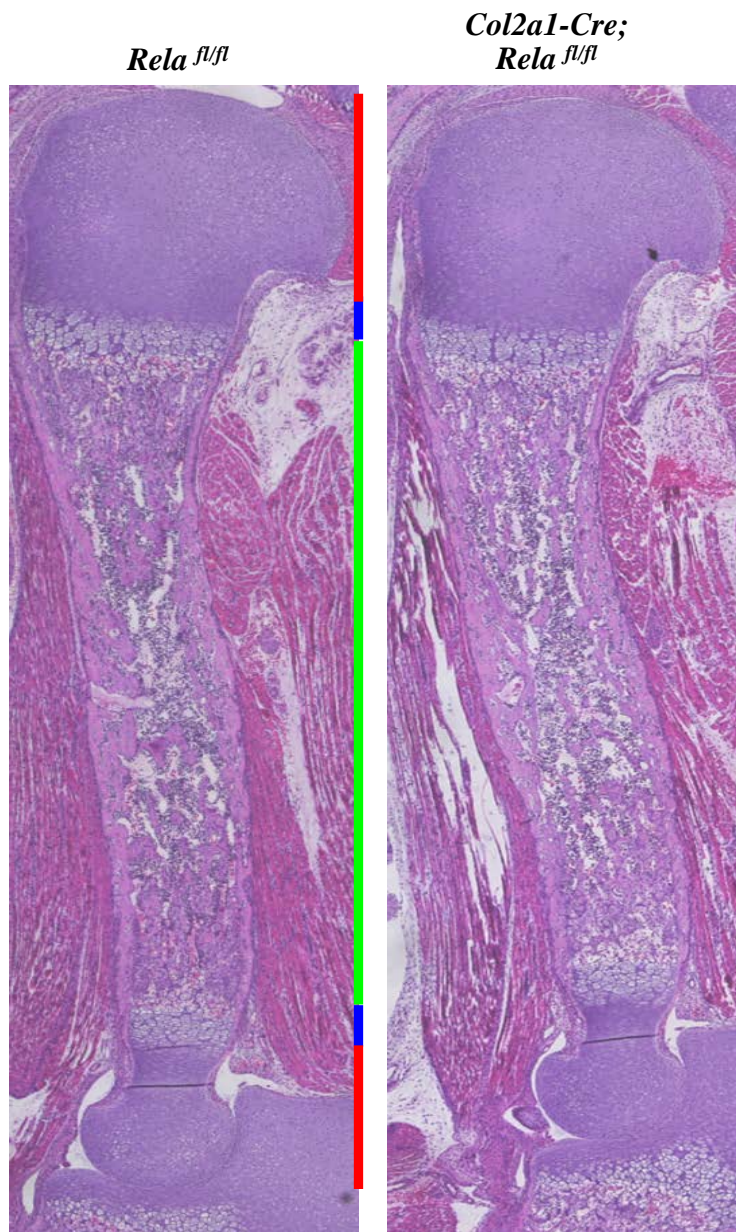


図14. *Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの組織

*Rela^{fl/fl}*マウスと*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスについて、HE染色を用いて胎生18.5日の上腕骨全長を比較した。*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスでは、*Rela^{fl/fl}*マウスと比較して上腕骨長の短縮がみられた。

Scale bar = 100 μ m

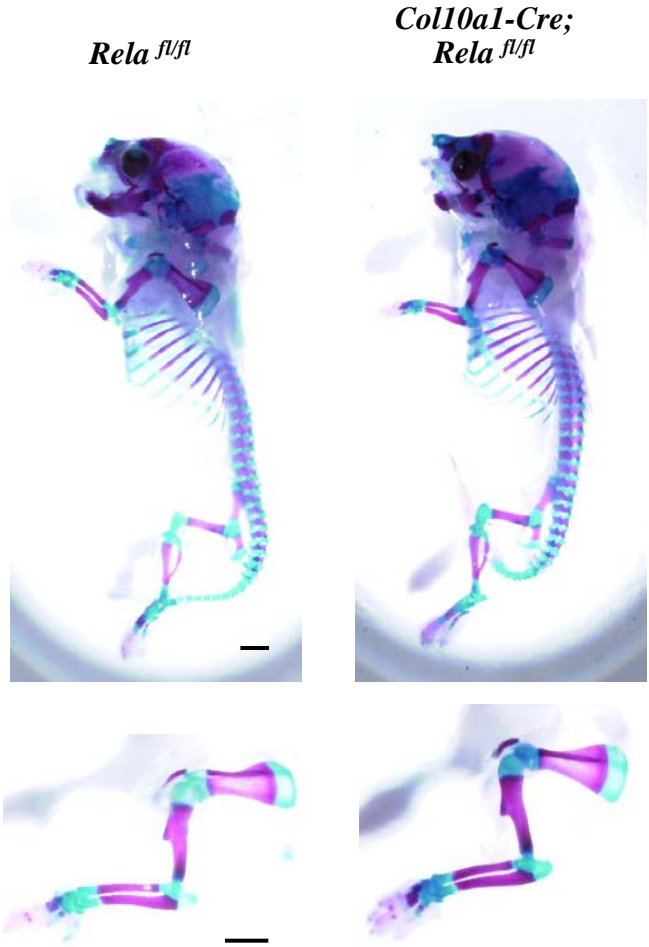


図15. *Col10a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの骨格
*Rela^{fl/fl}*マウスと*Col10a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスについて、二重染色法を用いて胎生18.5日の骨格を比較した。*Col10a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスでは長管骨・脊椎骨ともに成長障害がみられなかった。 Scale bar = 1mm

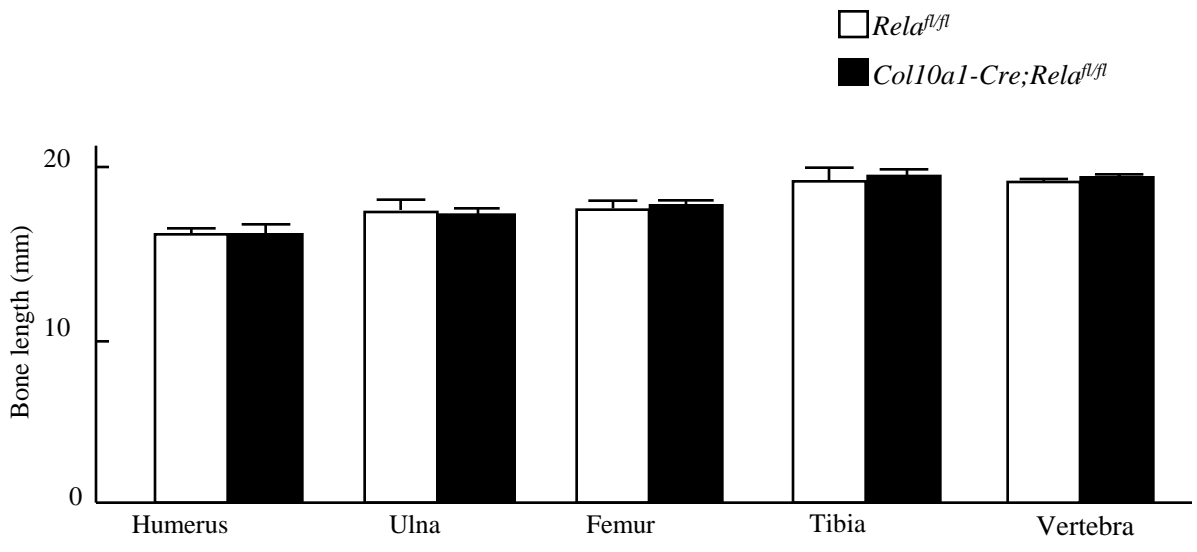


図16. *Col10a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの四肢・脊椎の骨長計測
 胎生18.5日齢において骨格標本を作成し、四肢長管骨、脊椎の骨長を実体顕微鏡下に計測した。*Col10a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスは成長障害がみられなかった。
 データは平均値 (bars) ±s.d. (error bars) 、n=6/group、*P<0.05 vs *Rela^{fl/fl}*

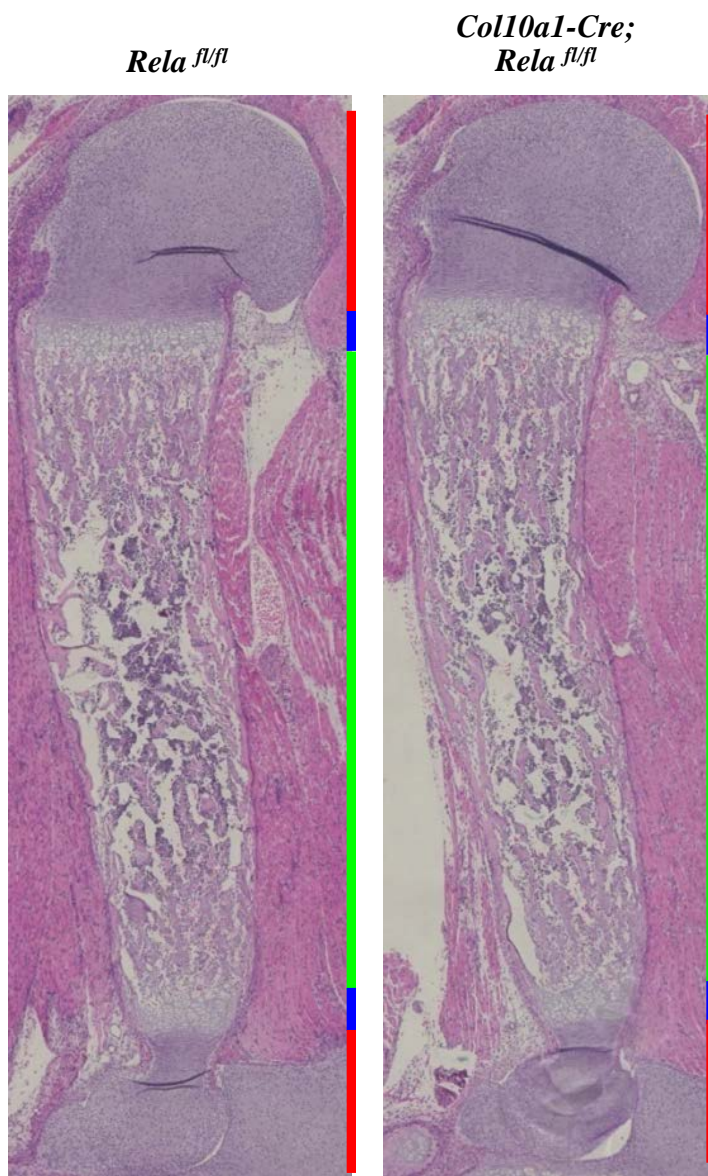


図17. *Col10a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの組織

*Rela^{fl/fl}*マウスと*Col10a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスについて、HE染色を用いて胎生18.5日の上腕骨全長を比較した。*Col10a1-Cre;Rela^{fl/fl}*と*Rela^{fl/fl}*マウスの上腕骨長の差はみられなかった。

Scale bar = 100 μ m

なかった。以上のことから、四肢成長において、RelAは、肥大軟骨分化以降では生理的な作用を有さず、軟骨分化初期において重要な作用を持つことが示唆された。

3-5. RelAの軟骨初期分化における作用の検討

3-5の結果からRelAは、軟骨初期分化に重要な働きを有することが示唆された。*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスと*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスは同程度の四肢の成長障害を呈していたため、*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスを用いて軟骨初期分化について解析を行った。初期分化において重要な軟骨基質合成能と軟骨細胞の増殖能について検討した。

3-5-1. 軟骨基質合成能の解析

軟骨基質合成能をみるSafranin-O染色を行ったところ、両遺伝子型間で染色性に差はなかった（図18）。両遺伝子型マウスの初代軟骨細胞を採取し、平面培養の後にmRNAを採取し、リアルタイムRT-PCRで、軟骨初期分化マーカー（Sox9, Col2, Aggrecan）を比較したところ、両遺伝子型間に発現量の差はなかった（図19）。

3-5-2. 軟骨細胞の増殖能の解析

次に、軟骨初期分化に重要な軟骨細胞の増殖能について検討した。両遺伝子型マウスから初代軟骨細胞を採取し、CCK8アッセイによって時間経過における細胞の増殖率について検討した。RelAノックアウトによって、時間経過における細胞の増殖率の低下がみられた（図20）。この時間経過における細胞の増殖率の低下

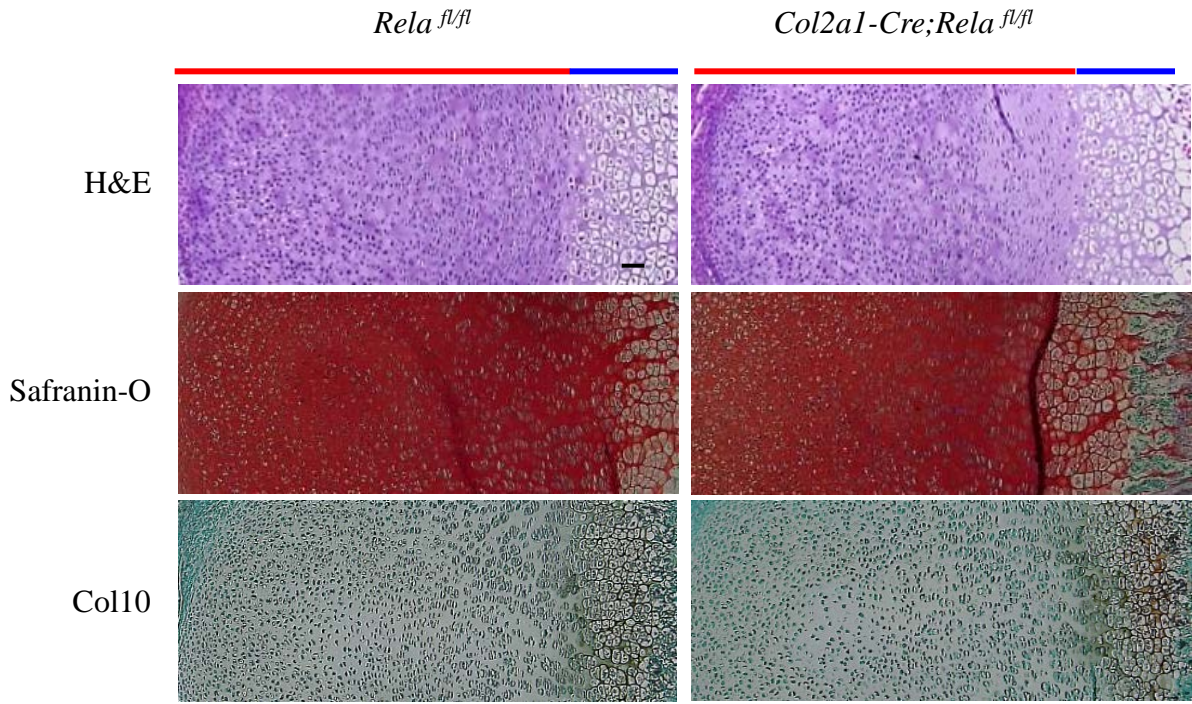


図18. *Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの上腕骨切片（免疫染色）

胎生18.5日の*Rela^{fl/fl}*マウスと*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの胎仔上腕骨切片をSafranin-O染色およびCol10の免疫染色を行い、比較検討した。

*Rela^{fl/fl}*マウスと*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスでは軟骨基質産生を示すサフランO染色、肥大化マーカーであるCol10の染色性に差はなかった。

Scale bar = 100 μ m

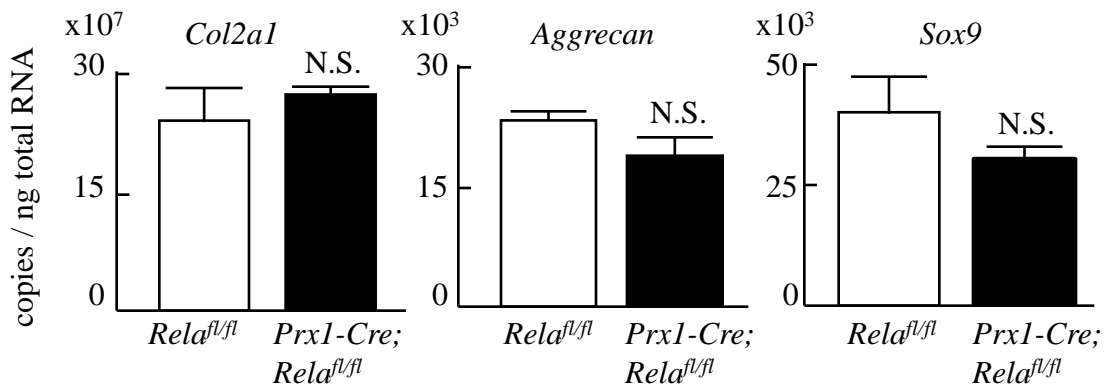


図19. 初代培養軟骨細胞における軟骨初期分化マーカーの遺伝子発現

生後5日の軟骨細胞を採取し、平面培養の後にmRNAを回収し、リアルタイムRT-PCRにより遺伝子発現を比較した。*Rela^{fl/fl}*マウスと*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスでは、初期分化マーカーである*Col2a1*, *Aggreacan*, *Sox9*の発現量に差はなかった。

データは平均値 (bars) \pm s.d. (error bars) $p < 0.05$ vs *Rela^{fl/fl}*

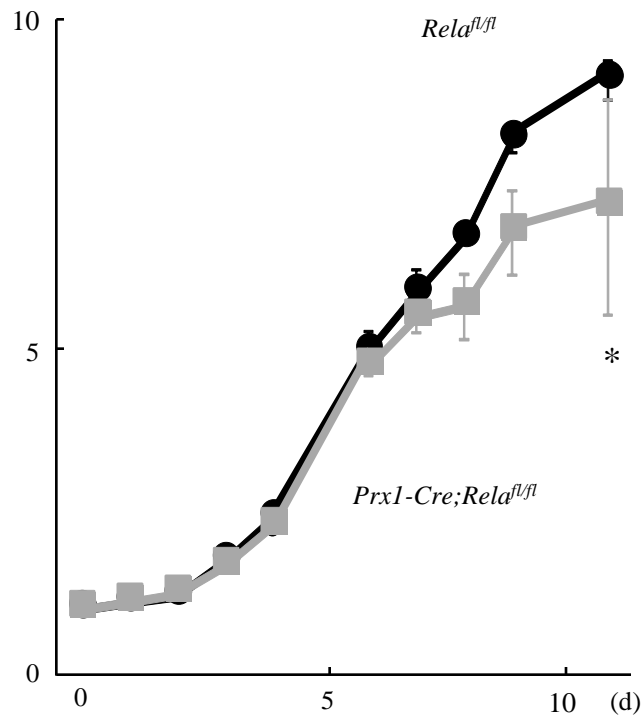


図20. RelA遺伝子欠損軟骨細胞の時間経過における増殖率

生後5日の軟骨細胞を採取し、Cell counting kit-8により、時間経過における細胞の増殖率を測定した。*Prx1-Cre;RelA^{fl/fl}*マウスでは、*RelA^{fl/fl}*マウスと比較して測定後6日以降で増殖率の低下がみられた。* $P < 0.05$ vs. *RelA^{fl/fl}*

が、細胞増殖能の低下もしくはアポトーシスの亢進に由来するのかを検討した。

まず、細胞増殖能を検討した。両遺伝子型マウス胎生18.5日にマウス仔体を帝王切開で取り出す2時間前にBrdU(5-bromo-2'-deoxyuridine)を腹腔内投与し、成長軟骨細胞におけるBrdUの取り込み率により細胞増殖能を解析した。両遺伝子型マウスの上腕骨成長板において、静止細胞層～増殖層におけるBrdUの取り込み率に差はなかった(図21)。また、両遺伝子型マウスから採取した初代軟骨細胞を平面培養し、BrdUを培養液中に投与し、その取り込み率を調べたところ、両遺伝子型間で差はなかった(図21)。

次に軟骨細胞のアポトーシスを調べるために、胎生18.5日の上腕骨の組織切片を用いてTUNEL染色を行った。RelA遺伝子欠損マウスの成長板では、増殖層から前肥大軟骨層で有意に異所性のアポトーシスの亢進がみられた(図22)。

さらに、静止細胞層から前肥大層まで単位面積あたりの細胞数を計測したところ、RelAノックアウトによって、細胞数が減少する傾向がみられた(図23)。このことから、RelAノックアウトによって軟骨細胞のアポトーシスが生じ、肥大化するまでの軟骨細胞数が減少することで成長障害が生じていると考えられた。

小括2

以上の結果から、*Prx1-Cre ;Rela^{fl/fl}*マウスと*Col2a1-Cre ;Rela^{fl/fl}*マウスの四肢成長障害の原因として、軟骨細胞の異所性のアポトーシスが原因であることが示唆された。RelAは、軟骨基質合成、分化ではなく、軟骨細胞のアポトーシスを抑制することで、成長板の形成に関与していることがわかった。

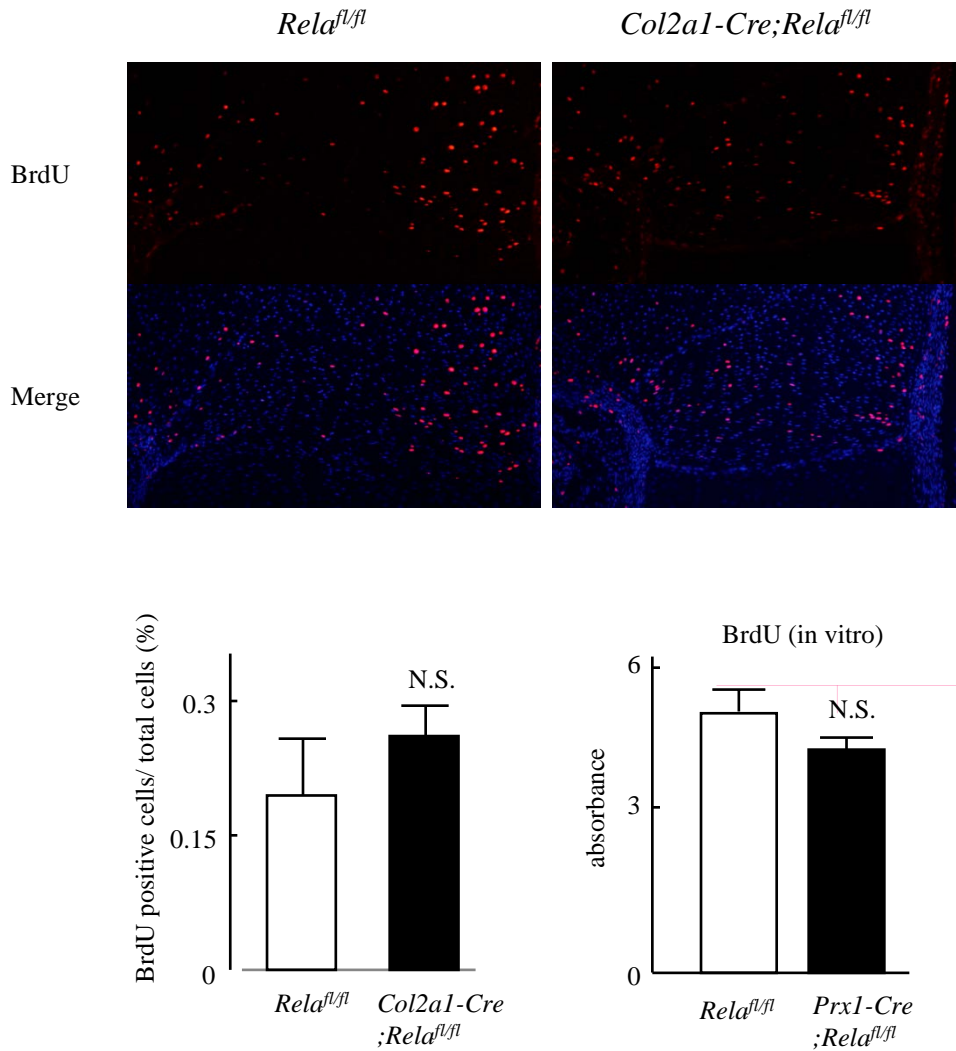


図21. *Rela*ノックアウトによるin vivoおよびin vitroにおける軟骨細胞の増殖能
胎生18.5日の母体マウスにBrdUを腹腔内投与し、2時間後に胎児を摘出し、上腕骨の切片でBrdUの免疫染色を行った。In vivoにおいて*Rela^{fl/fl}*マウスと*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの軟骨細胞では、BrdUの取り込み率に差はなかった。また、in vitroにおいて*Rela^{fl/fl}*マウスと*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの軟骨細胞におけるBrdUの取り込み率に差はなかった。
データは平均値 (bars) ±s.d. (error bars) p<0.05 vs *Rela^{fl/fl}*

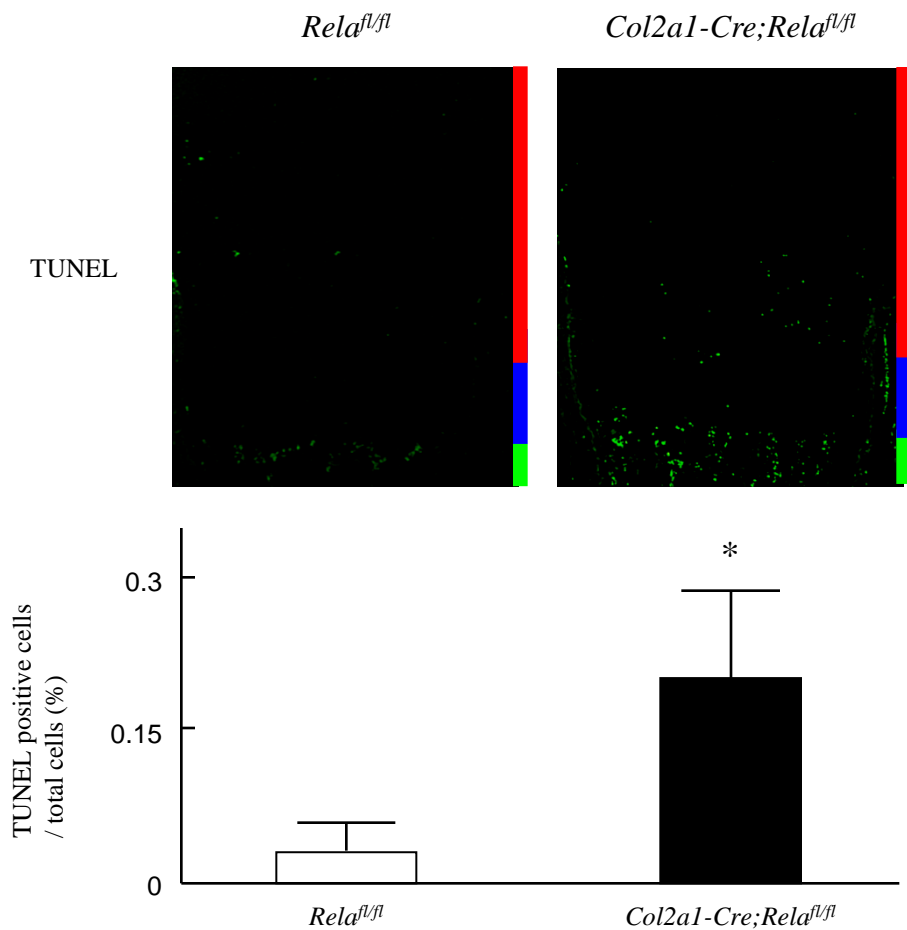


図22. RelAノックアウトによる軟骨細胞のアポトーシス

胎生18.5日の*Rela^{fl/fl}*マウスと*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの胎仔上腕骨切片をTUNEL染色し、比較検討した。*Rela^{fl/fl}*マウスと比較して、*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスでは、増殖層から前肥大層に異所性のアポトーシスの亢進がみられた。増殖層から前肥大層における全細胞あたりのTUNEL陽性細胞数の割合は、*Rela^{fl/fl}*マウスと比較して、*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスでは有意に高かった。データは平均値 (bars) ±s.d. (error bars) *P<0.05 vs *Rela^{fl/fl}*

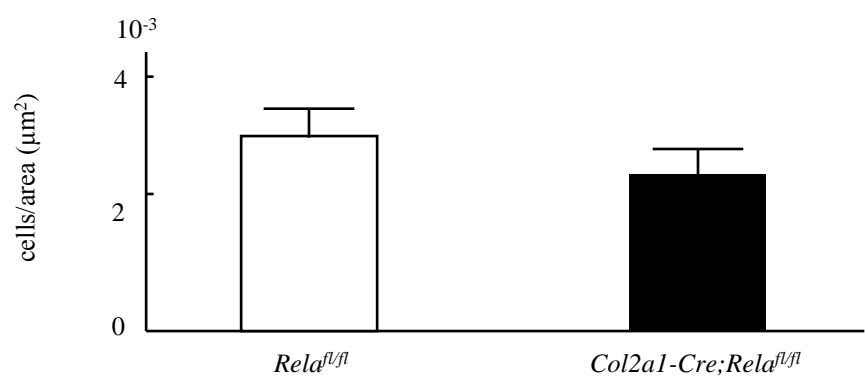


図23. RelAノックアウトによる軟骨細胞数の減少

胎生18.5日の*Rela^{fl/fl}*マウスと*Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスの胎仔上腕骨切片の静止細胞層から前肥大層の単位面積あたりの軟骨細胞数を計測し、比較検討した。*Rela^{fl/fl}*マウスと比較して、*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスでは、細胞数の減少がみられた。データは平均値 (bars) ±s.d. (error bars) P=0.07 vs *Rela^{fl/fl}*

3-6. 変形性膝関節症におけるRelAの機能の解析

RelAは、古典的NF- κ Bシグナルの中心的メディエーターであり、免疫応答、炎症反応に関与している。我々は、以前、RelAが軟骨基質分解酵素であるADAMTS5を直接転写誘導し、軟骨変性に関わっていることを報告した。一方で、マウス成長板の解析から、RelAは生理的には軟骨細胞において抗アポトーシス作用を持ち、軟骨のホメオスターシスに関わっていることが明らかとなった。以上のようにRelAは軟骨細胞において両面的な作用を持つが、病的条件下でのRelAの軟骨における作用を解析するために、変形性関節症へのRelAの関与を検討した。軟骨特異的RelA欠損マウスは成長障害が見られるため、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^{ERT}*マウス(19)を用いて検討を行うこととした。

*Col2a1-Cre^{ERT}*マウスと*Rela^{fl/fl}*マウスを交配し、得られた*Col2a1-Cre^{ERT};Rela^{fl/fl}*マウスを*Rela^{fl/+}*マウスと交配し、得られた*Col2a1-Cre^{ERT};Rela^{fl/fl}*マウスを用いた。

3-7. 変形性膝関節症モデルを用いたRelAの変形性関節症における機能の解析

タモキシフェン注射により、Creが組織特異的に作動し相同組み換えが起こっているかを確認するため、*Col2a1-Cre^{ERT}*マウスとRosa26レポーターマウス (*R26R^{fl/+}*)を交配し、得られた*Col2a1-Cre^{ERT};R26R^{fl/+}*マウスと*R26R^{fl/+}*マウスでLacZ染色を行った。7週齢のマウスにタモキシフェンを5日間連続で腹腔内注射し、16週齢でsacrificeしてLacZ染色を行ったところ、関節軟骨特異的にCreが作動していることが確認された (図24)

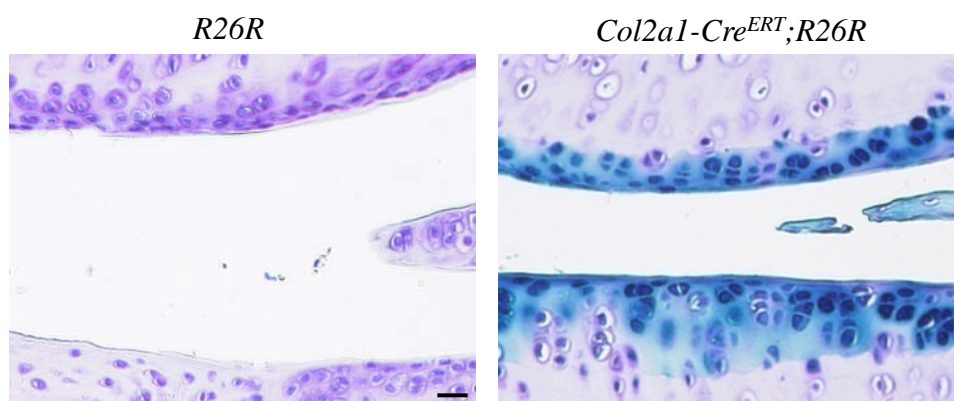


図24.タモキシフェン誘導性*Col2a1-Cre*マウスによるCre発現部位の確認
*Col2a1-Cre^{ERT}*マウスとRosa26レポーターマウスを交配し、生後7週齢でタモキシフェンを腹腔内注射しCreを作動させ、生後16週齢で膝関節をBeta-galactosidase (LacZ)染色した。*Col2a1-Cre^{ERT};R26R^{+/+}*マウスでは関節軟骨にLacZの染色性がみられ、*Col2a1*発現部位で相同組み換えが起きていることを確認した。 Scale bars=100 μ m

*Col2a1-Cre^{ERT}*マウスと*Rela^{fl/fl}*マウスを交配し、得られた*Col2a1-Cre^{ERT};Rela^{fl/fl}*マウスを用いて、7週齢のマウスにタモキシフェンを投与し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(18)、術後8週（16週齢）でsacrificeして組織学的な検討を行った(図25)。16週の時点で、*Rela^{fl/fl}*マウスと*Col2a1-Cre^{ERT};Rela^{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26)。

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^{ERT};Rela^{fl/fl}*マウスでは*Rela^{fl/fl}*マウスに比べてSafranin-Oの染色性が低下しており、軟骨の変性が進行していた（図27）。軟骨基質分解酵素のうちRelAにより直接転写制御をうける*Adamts5*の発現を免疫組織化学染色で検討したところ、*Col2a1-Cre^{ERT};Rela^{fl/fl}*マウスでは、*Adamts5*の発現は低下していた（図27）。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、軟骨変性が進行する周囲において、*Col2a1-Cre^{ERT};Rela^{fl/fl}*マウスでは軟骨細胞のアポトーシスの亢進がみられた。*Col2a1-Cre^{ERT};Rela^{fl/fl}*マウスでは、OARSIスコアにおいても有意差をもって変形性関節症が進行していた（図28）。

3-8. 自然経過モデルを用いたRelAの変形性関節症における機能の解析

実験的変形性膝関節モデルは、外傷後に発生する変形性関節症を見ている要素が大きいため、軟骨特異的RelA欠損が自然経過における変形性膝関節症の発症に与える影響について検討した。3-7と同様に*Col2a1-Cre^{ERT};Rela^{fl/fl}*マウスを用いて、7週齢のマウスにタモキシフェンを投与しCreを作動させた後、術後1年でsacrificeして組織学的な検討を行った（図29）。

タモキシフェン注射により、Creが軟骨特異的に作動した軟骨細胞が1年後も関

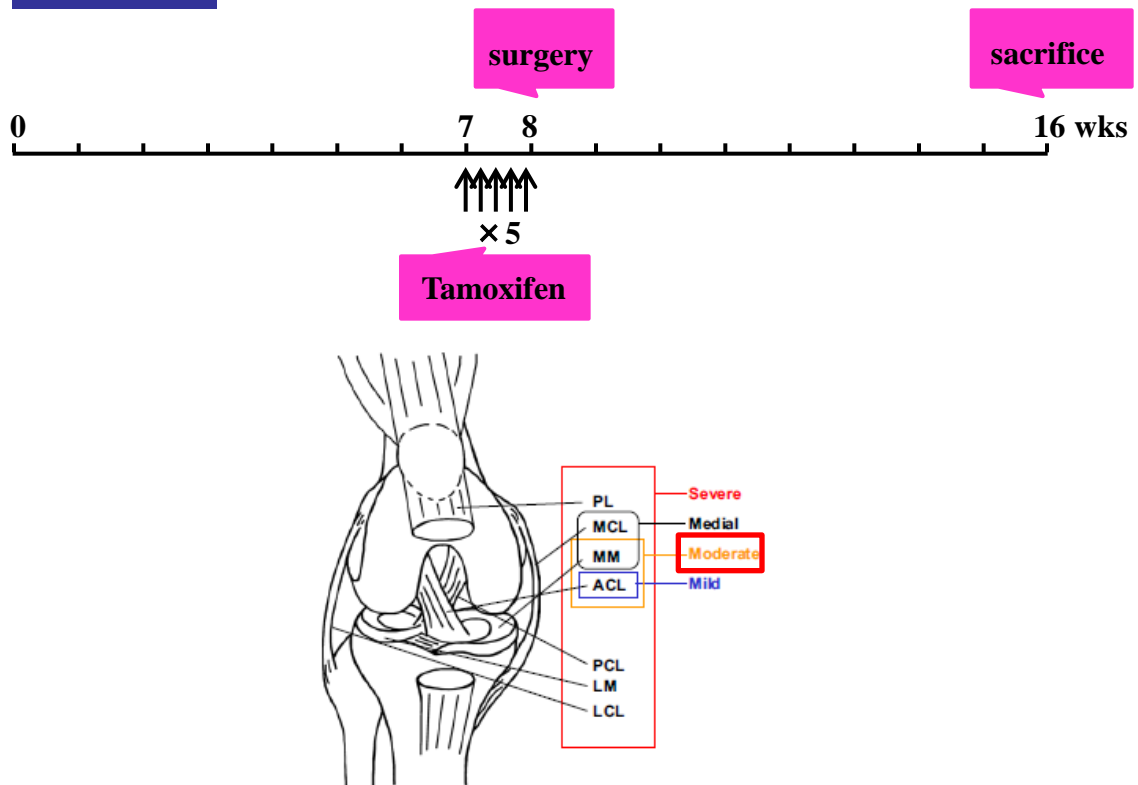


図25.タモキシフェン誘導性軟骨特異的RelAノックアウトマウスを用いた変形性関節症モデルの解析

生後7週に5日間タモキシフェンを $10\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{g}$ を腹腔内投与し、8週で変形性膝関節モデルの手術を行い、その8週後に関節軟骨の解析を行った。変形性膝関節症モデルは、内側側副靭帯と内側半月板を切除し、膝関節に不安定性を与えた。

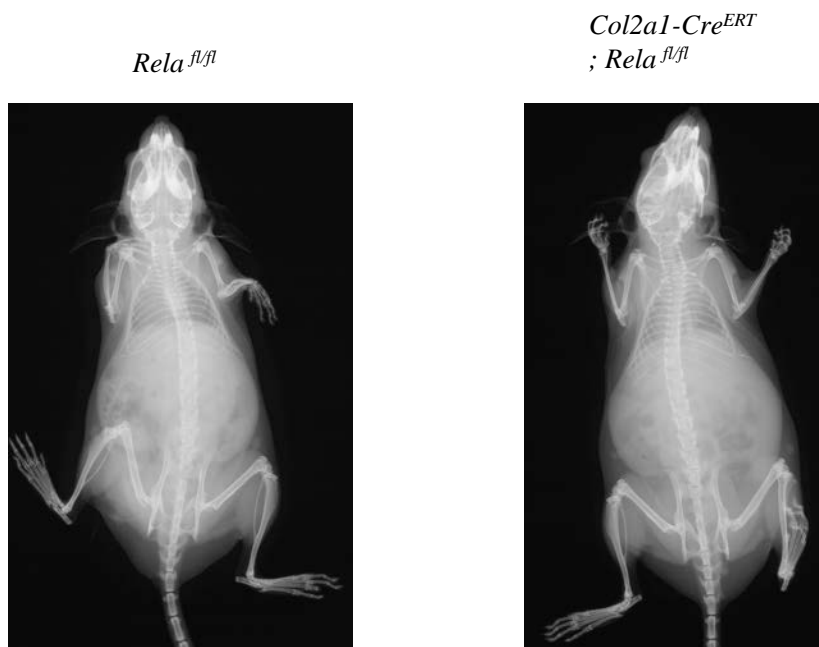


図26.タモキシフェン誘導性軟骨特異的RelAノックアウトマウスのX線による骨格の解析

生後16週（タモキシフェンを注射後9週）の時点で、*Col2a1-Cre^{ERT};Rela^{fl/fl}*は、*Rela^{fl/fl}*と比較して骨格に差はなかった。

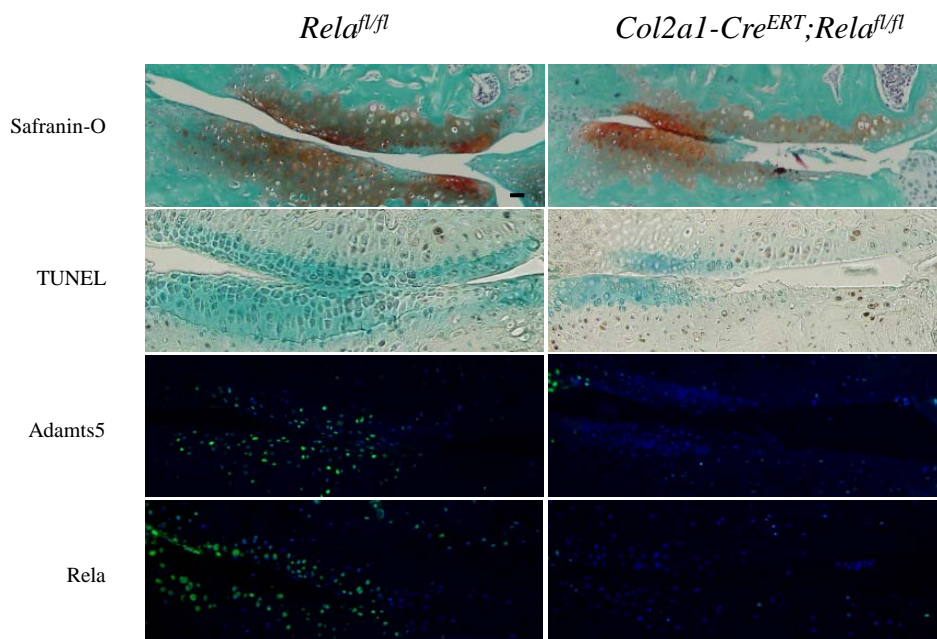


図27. タモキシフェン誘導性軟骨特異的RelAノックアウトマウスにおける変形性関節症モデルの組織学的解析

膝関節組織切片におけるSafranin-O染色で、*Col2a1-CreERT;Rela^{fl/fl}*は、*Rela^{fl/fl}*と比較して関節軟骨の変性が進行していた。TUNEL染色でみると、*Col2a1-CreERT;Rela^{fl/fl}*では、*Rela^{fl/fl}*と比較して変性する軟骨細胞周囲で軟骨細胞のアポトーシスの亢進がみられた。また、*Col2a1-CreERT;Rela^{fl/fl}*では、*Rela^{fl/fl}*と比較してRelAの標的遺伝子であるAdamts5の発現も低下していた。Scale bars=100μm

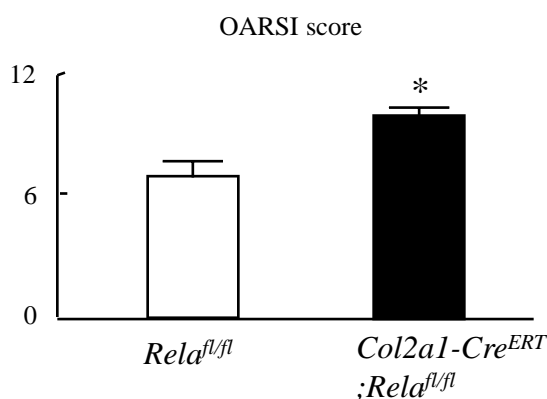


図28. タモキシフェン誘導性軟骨特異的RelAノックアウトマウスにおける変形性関節症モデルのスコアリング

*Col2a1-CreERT;Rela^{fl/fl}*では、*Rela^{fl/fl}*と比較してOARSIスコアが有意に高かった。

データは平均値 (bars) ±s.d. (error bars)、n=7, 10/group、*P<0.05 vs *Rela^{fl/fl}*

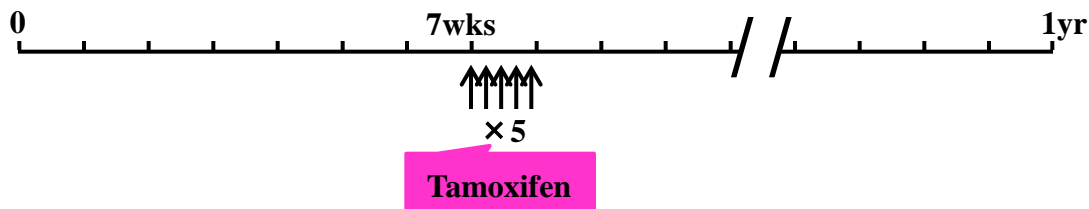


図29. タモキシフェン誘導性軟骨特異的RelAノックアウトマウスを用いた自然経過における変形性関節症の解析
 生後7週に5日間タモキシフェンを10 μ g/ μ l/gを腹腔内投与し、生後1年で関節軟骨の解析を行った。

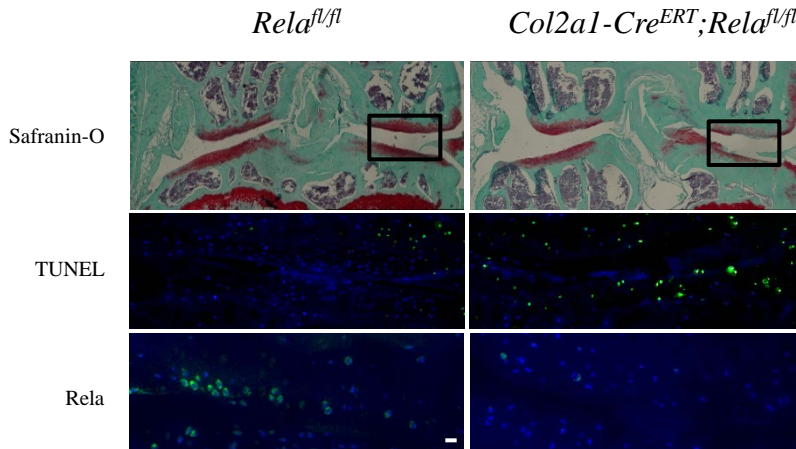


図30. タモキシフェン誘導性軟骨特異的RelAノックアウトマウスにおける自然発症変形性関節症モデルの組織学的解析
 膝関節組織切片におけるサフラニンO染色では、*Col2a1-CreERT;Rela^{fl/fl}*では、*Rela^{fl/fl}*と比較して関節軟骨の変性が進行していた。TUNEL染色でみると、*Col2a1-CreERT;Rela^{fl/fl}*では、*Rela^{fl/fl}*と比較して変性する軟骨細胞周囲で軟骨細胞のアポトーシスの亢進がみられた。また、*Col2a1-CreERT;Rela^{fl/fl}*では、*Rela^{fl/fl}*と比較して1年後においてもRelAの発現は消失していた。
 Scale bars=100 μ m

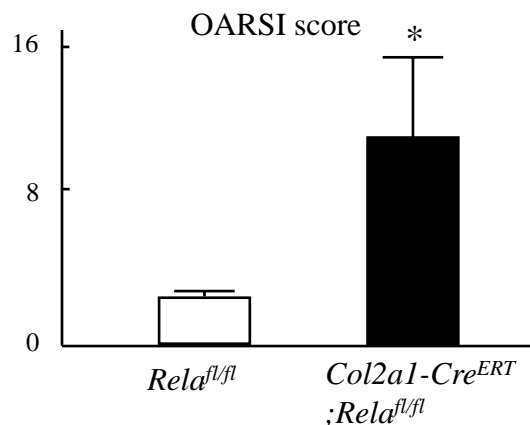


図31. タモキシフェン誘導性軟骨特異的RelAノックアウトマウスにおける自然発症変形性関節症モデルのスコアリング

*Col2a1-CreERT;Rela^{fl/fl}*では、*Rela^{fl/fl}*と比較してOARSIスコアが有意に高かった。

データは平均値 (bars) \pm s.d. (error bars)、n=3,4/group、*P<0.05 vs *Rela^{fl/fl}*

節軟骨に存在し、RelAの欠損が保たれているかを検討するために、免疫組織化学染色を行った。*Col2a1-Cre^{ERT};Rela^{fl/fl}*マウスでは、1年後も関節軟骨においてRelAの発現は低下していた(図30)。変形性膝関節症モデルと同様に、*Col2a1-Cre^{ERT};Rela^{fl/fl}*マウスでは、*Rela^{fl/fl}*と比較して、関節軟骨の変性が進行していた(図30)。軟骨変性が進行する周囲において、アポトーシスの亢進がみられた(図30)。

*Col2a1-Cre^{ERT};Rela^{fl/fl}*マウスでは、OARSIスコアにおいても有意差をもって変形性関節症が進行していた(図31)。

3-9. RelAによる軟骨細胞調節作用のメカニズムの解析

*Col2a1-Cre^{ERT}*マウスを用いた検討で、軟骨特異的にRelAをノックアウトしたマウスでは、軟骨細胞のアポトーシス亢進を伴い、変形性関節症の進行が促進する傾向がみられたため、RelAによる軟骨細胞調節作用について機能解析を行った。

まず、RelAコンディショナルノックアウトマウスから採取した初代軟骨培養細胞に、変形性膝関節症の関節内でも検出されるアポトーシス誘導因子であるTNF α を投与した。1日後にタンパク質を回収し、ウェスタンブロッティングでアポトーシス関連因子であるCleaved caspase3, 8, 9の発現を検討した。*Rela^{fl/fl}*由来軟骨細胞では、TNF α 10ng/ml投与によってCleaved caspase3, 8, 9の発現が見られなかったのに対して、*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*由来軟骨細胞では、TNF α 1 ng/ml投与によってもCleaved caspase3, 8の発現上昇がみられた(図32)。これにより、in vivoにおいて見られたように、in vitroにおいても、RelA欠損による軟骨細胞のアポトーシスの亢進が確認できた。

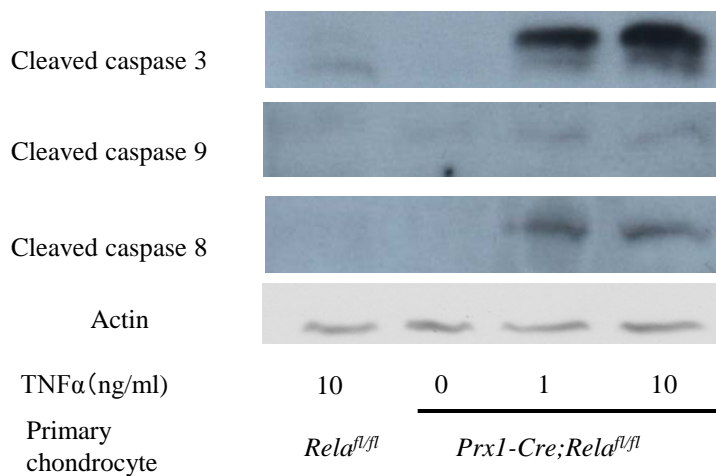


図32. TNFα投与による、軟骨細胞のアポトーシス誘導

生後5日齢のマウス関節軟骨を採取し、平面培養を行い、TNFαを投与後24時間で蛋白を回収し、ウェスタンブロッティングを行った。*Prx1-Cre;Relα^{fl/fl}*では、TNFαを10ng/ml投与してもアポトーシスは生じなかったが、*Relα^{fl/fl}*マウスでは、TNFα 1ng/mlでもアポトーシスが誘導された。

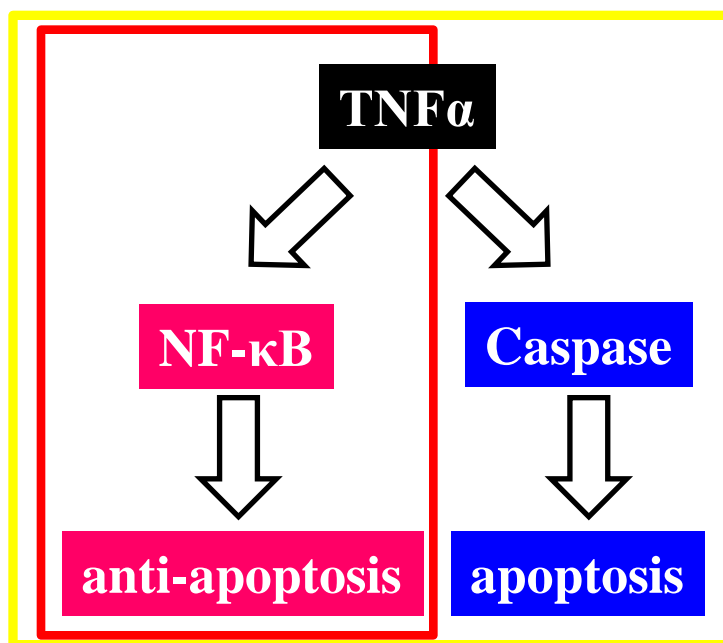


図33. TNFαのアポトーシス関連下流シグナル

TNFαは、カスパーゼを活性化し、アポトーシスを促進する一方で、NF-κBを介して抗アポトーシス作用を持つことが知られている。

3-10. RelAによって制御される下流因子の網羅的解析

TNF α は、Caspase活性化によるアポトーシス誘導を促すとともに、その一方でNF- κ Bシグナルを介して抗アポトーシス作用をもつ因子を誘導することが知られている（図33）（23）。3-9の結果から、RelA欠損によってTNF α 投与によるアポトーシス亢進が見られたことから、RelAの下流で抗アポトーシス作用を持つ因子の誘導が阻害されている可能性を考え、マイクロアレイを用いた網羅的解析を行った。

Rela^{fl/fl}由来軟骨細胞と*Prx1-Cre;Rela*^{fl/fl}由来軟骨細胞に対して、TNF α 10 ng/ml投与する群とコントロールとしてPBSを投与する群の4群で、24時間後にmRNAを回収し、タカラドラゴンジェノミクスに委託し、マイクロアレイによる解析を行った。TNF α 投与によって、PBS投与群と比較して発現上昇が見られる遺伝子は2581個あり、その中で、RelA欠損によって発現が抑制される遺伝子は1551個あった。これらの中でアポトーシス経路に関わる遺伝子は70個あった。これら70個の遺伝子について、Pubmedに掲載されている論文で抗アポトーシス作用を持つと考えられるものを抽出し、10個の候補遺伝子を挙げた（図34）。

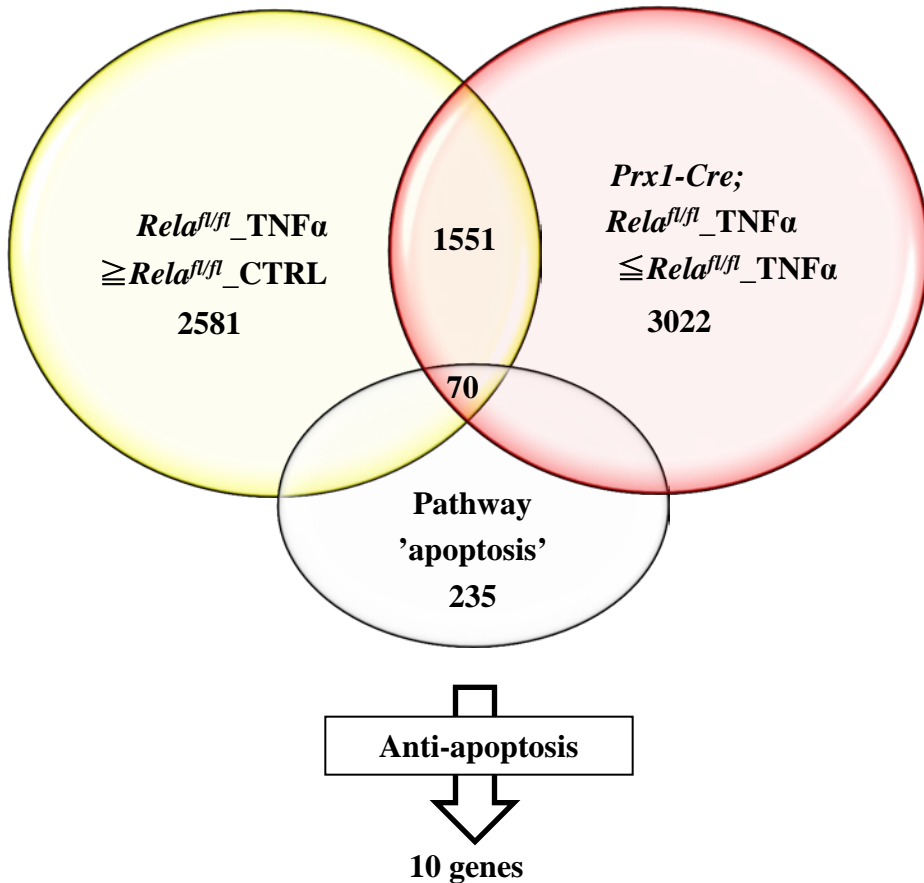
これら10個の候補遺伝子のmRNA発現量をリアルタイムRT-PCRを用いて解析した。Traf2、c-Iap1,2、Pik3r1、Prkar1aはTNF α 投与によって発現誘導されるが、RelA欠損によってその発現誘導は阻害されていた（図35）。

小括 3

軟骨特異的RelAコンディショナルノックアウトマウスを用いた実験的変形性膝関節症モデルおよび自然経過における変形性膝関節症モデルの解析結果から、



Microarray analysis



**Traf2, c-Iap1, c-Iap2, Prkar1a, Ppp3cc,
Pik3ca, Pik3r1, Cflar, Ikbkg, Map3k14**

図34. マイクロアレイによる抗アポトーシス作用を持つ因子の探索

$Rela^{fl/fl}$ マウスと $Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}$ マウスから関節軟骨を採取し、平面培養を行い、PBS（コントロール）とTNF α 10ng/mlを投与後24時間でmRNAを回収し、マイクロアレイによる網羅的解析を行った。 $Rela^{fl/fl}$ マウスにおいてTNF α 投与によって誘導されるものは2581遺伝子あり、そのなかで $Rela$ ノックアウトによって誘導が阻害されるものは、1551遺伝子あった。これらの中で、アポトーシス経路に関与する遺伝子は70個あった。70遺伝子のうち、抗アポトーシス作用を有すると報告されている遺伝子は10個あった。

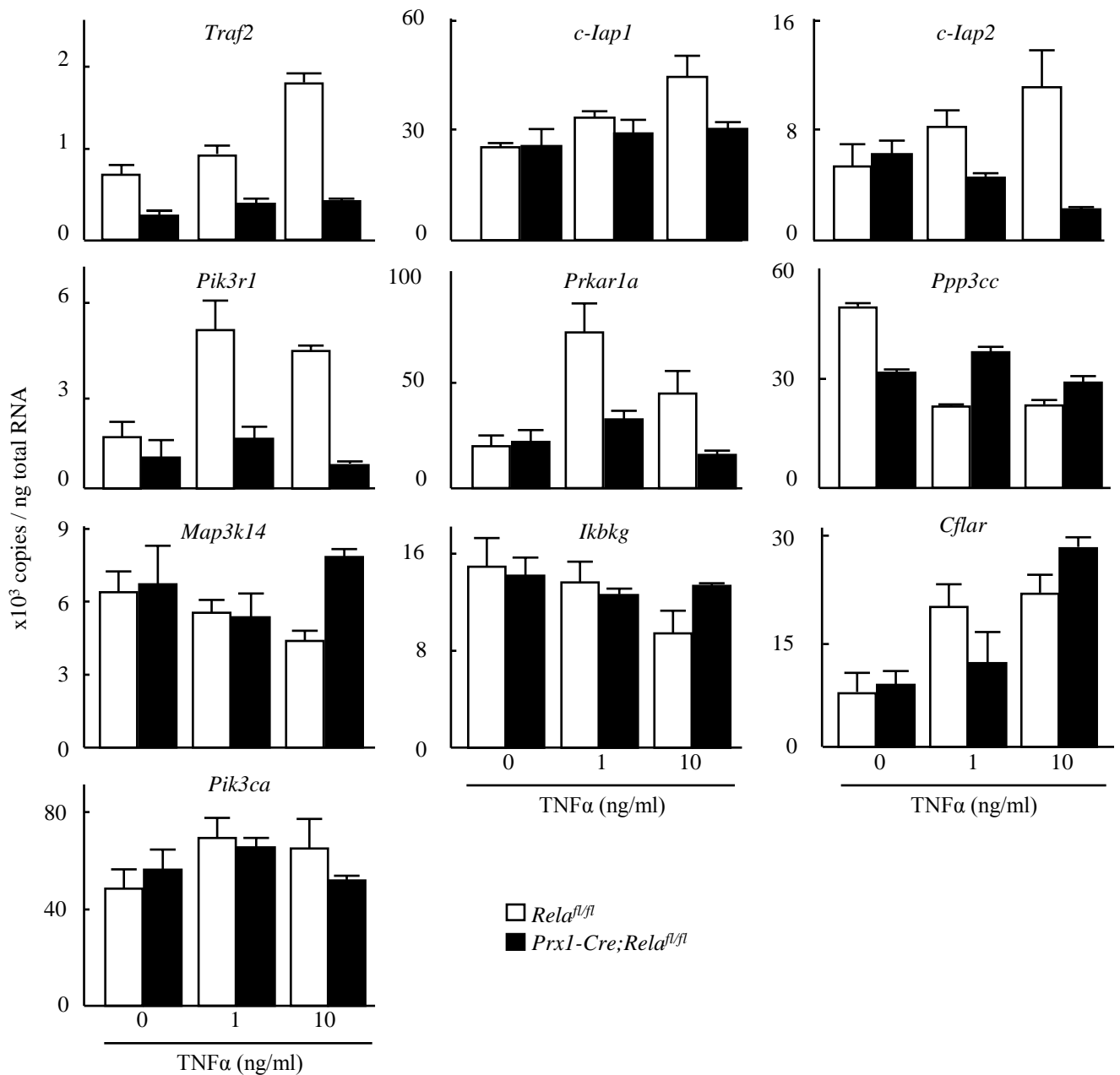


図35. マイクロアレイにより抽出された候補遺伝子の発現解析

*Relα^{fl/fl}*マウスと*Prx1-Cre; Relα^{fl/fl}*マウスから関節軟骨を採取し、平面培養を行い、TNFαを0, 1, 10ng/ml投与後24時間でmRNAを回収し、リアルタイムRT-PCRで遺伝子発現を解析した。*Traf2*、*c-Iap1*、*c-Iap2*、*p85α*、*Parkar1a*は、TNFα投与により発現誘導され、*Relα*ノックアウトによってその発現は抑制された。データは平均値 (bars) ±s.d. (error bars)

RelAは、関節軟骨において抗アポトーシス作用により関節軟骨に対して保護的な作用を有していることがわかった。また、網羅的な解析結果から、RelAにより制御される下流因子としてTraf2、c-Iap1,2、Pik3r1、Prkar1aが候補に挙げられた。

3-11. RelAによるPI3K-Aktシグナルの制御

3-10によって候補に挙げられた遺伝子の中でPI3K-Aktシグナルに関与するPik3r1に着目した。PI3K-Aktシグナルは、各種ホルモンやインシュリン刺激によって、PI3Kが活性化し、Aktをリン酸化する。リン酸化されたAktは、細胞増殖、生存に関わる下流因子を誘導する。Pik3r1は、PI3Kのregulatory subunitを担っており、PI3Kの触媒サブユニットであるPi3kcaの活性を制御する（図36）。そこで、RelAノックアウトによるPik3r1の発現誘導の阻害がPI3K-Aktシグナルに与える影響を調べることにした。

まず、PI3Kによってリン酸化されるAktをウェスタンブロッティングで調べたところ、RelA^{fl/fl}由来軟骨細胞では、TNF α 投与によって、Aktのリン酸化が誘導されるのに対して、Prx1-Cre;RelA^{fl/fl}由来軟骨細胞では、その誘導は抑制されていた（図37）。

ところで、PI3K-Aktシグナルは、TNF α の下流において活性化し、NF- κ Bシグナルを活性化することが知られている（図38）。さらに、PI3Kに対して抑制的に働くPTENをRelAは遺伝子発現レベルで抑制しているという報告がある（24）。そこで、リアルタイムRT-PCRによりPTENの発現を確認すると、軟骨細胞においてPTENのTNF α による発現誘導およびRelAによる発現制御は見られなかった（図39）。以上のことから、軟骨細胞においては、RelAはPik3r1の発現調節を介して、PI3K-Akt

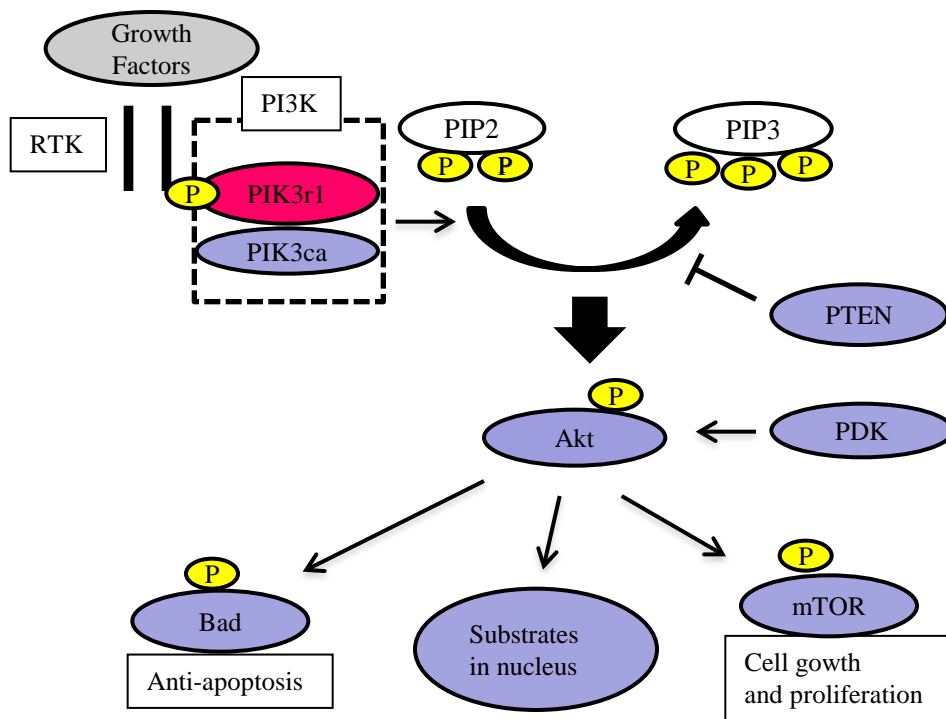
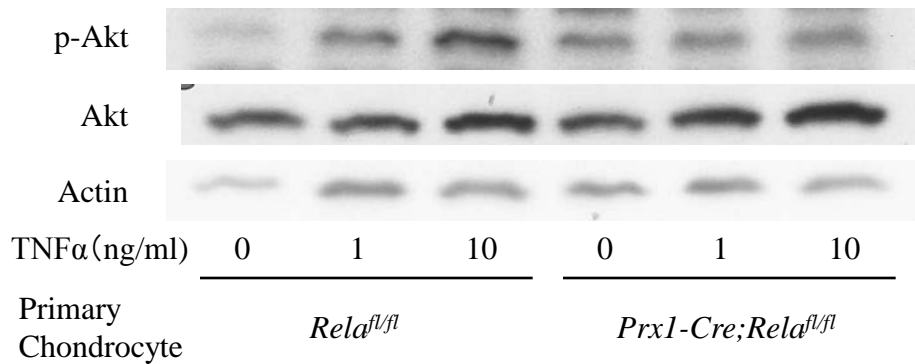


図36. PI3K-Aktシグナル

ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（PI3K）は、細胞膜の構成成分であるイノシトールリン脂質をリン酸化する酵素で、産生したPI3,4,5-三リン酸

（PIP3）がAktをリン酸化する。PIK3r1は、PI3Kの調節サブユニットで、リガンドの結合により受容体型チロシンキナーゼが2量体化し、受容体の活性化に伴って、受容体自身、あるいはアダプター分子がリン酸化されると、そこにPIK3r1のSH2ドメインを介して結合し、PI3Kは活性化する。Aktの活性化は、生存促進作用があり、成長・増殖・糖代謝・血管新生・抗アポトーシス作用などさまざまな作用が報告されている



primary chondrocyte	<i>Relα^{fl/fl}</i>			<i>Prx1-Cre;Relα^{fl/fl}</i>		
	TNFα (ng/ml) 0	1	10	0	1	10
p-Akt	1.36±0.035	1.37±0.055	2.046±0.065	1.39±0.032	1.13±0.046	1.63±0.064
Akt	2.42±0.096	1.74±0.11	2.25±0.099	1.85±0.132	1.85±0.10	1.71±0.17

図37. 軟骨細胞におけるTNFα投与によるPI3K-Aktシグナルの誘導

生後5日齢のマウス関節軟骨を採取し、平面培養を行い、TNFαを投与後24時間で蛋白を回収し、ウェスタンブロッティングを行った。各バンドの濃度を半定量化し、Actinによって補正し、データは平均値±s.d.で示した。*Relα^{fl/fl}*マウスでは、TNFα投与によってAktのリン酸化が誘導されたが、*Prx1-Cre;Relα^{fl/fl}*では、Aktのリン酸化の誘導は抑制されていた。Aktの発現量はTNFα投与およびRelαノックアウトの影響を受けなかった。

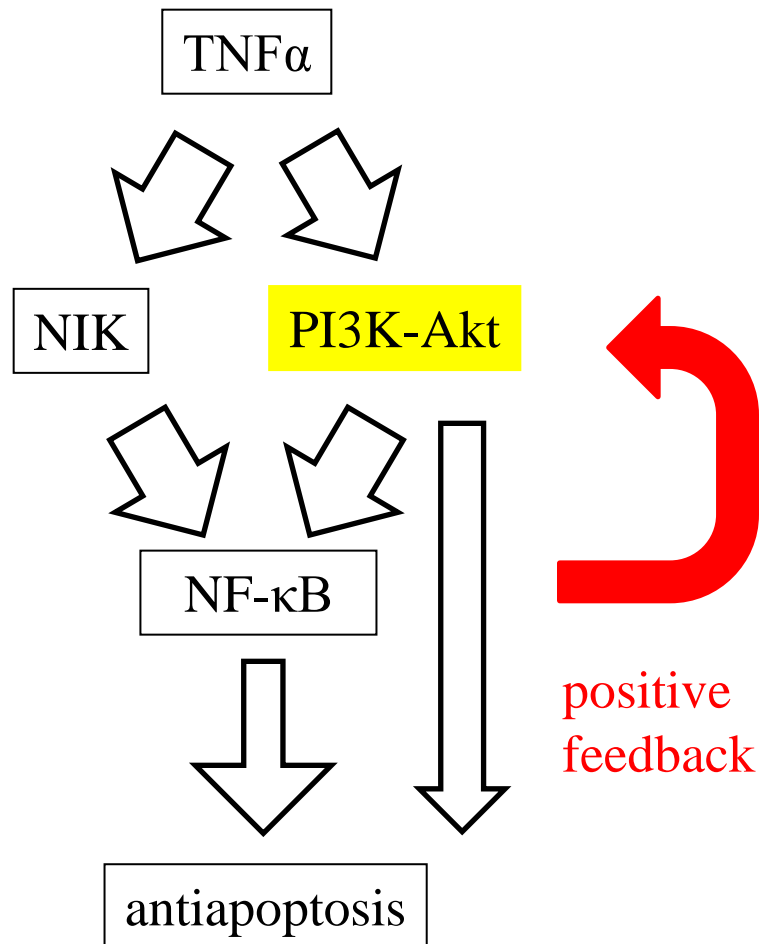


図38. TNF α の下流におけるNF- κ BとPI3K-Aktシグナルの関係

TNF α の下流において、PI3K-AktシグナルはNF- κ Bシグナルの上流でNF- κ Bシグナルを活性化するほか、PI3K-Aktシグナル自体が抗アポトーシス作用を持つことが知られている。RelAノックアウトによってPI3K-Aktの活性化が抑制されたことは、NF- κ BによるPI3K-Aktシグナルに対するpositive feedback作用があることを示唆する。

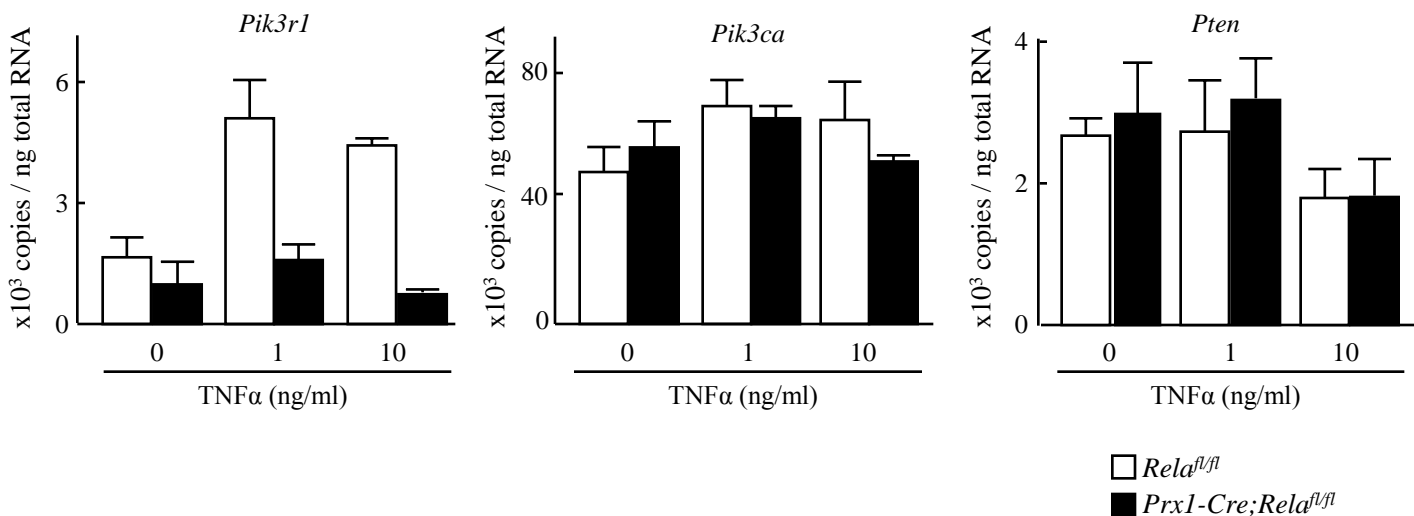


図39. リアルタイムRT-PCRによるPI3K活性化関連遺伝子発現の解析

RelA^{fl/fl}マウスとPrx1-Cre;RelA^{fl/fl}マウスから関節軟骨を採取し、平面培養を行い、TNFαを0, 1, 10ng/ml投与後24時間でmRNAを回収し、リアルタイムRT-PCRで遺伝子発現を解析した。Pik3caとPtenはTNFα投与およびRelAノックアウトの影響を受けなかった。

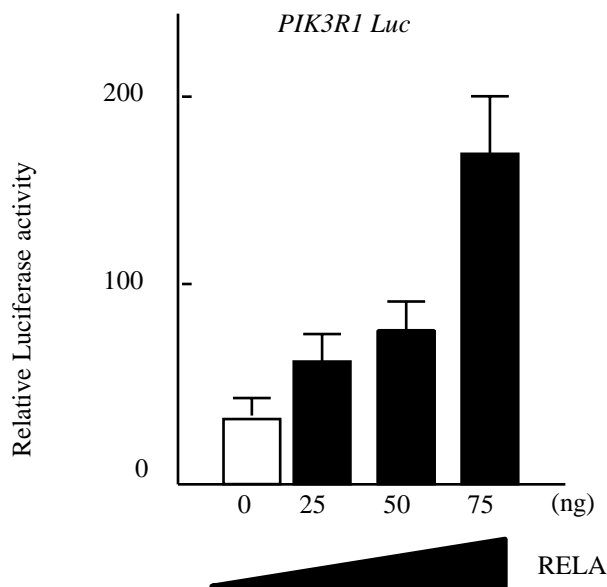


図40. Pik3r1プロモーターのRELAに対する反応

PIK3R1プロモーターをヒトとマウスで比較したところ、転写開始点上流1,600bpが保存されていた。この領域をルシフェラーゼを含むPGL4ベクターに組み込みレポーターベクターを作成し、RelAの発現ベクターとともに未分化軟骨細胞株であるATDC5細胞にリポフェクションし、72時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。PIK3R1のプロモーター活性は、RelAの量依存的に上昇した。

シグナルに対してpositive feedbackな経路を有し、細胞の生存を促している可能性が示唆された(図38)。

3-12. RelAによるPik3r1の転写制御

そこで、RelAがPik3r1を直接発現制御しているか否かを検討することとした。まず、ヒト、マウスのPik3r1の転写開始点から上流4,000bpを比較したところ、転写開始点から上流約1,600bpが保存されていた。この領域をルシフェラーゼを含むPGL4ベクターに挿入し、レポーターベクターを作成した。これをRelAの発現ベクターとともにATDC5細胞にリポフェクションし、48時間後に転写活性を解析したところ、RelAの濃度依存的にPik3r1の転写活性は上昇した(図40)。Pik3r1の転写開始点から上流1,600bpの領域には、-546/539bpと-227/219bpの2つのNF- κ Bの結合領域があった。この領域を段階的に欠損する、Pik3r1のレポーターベクターを作成し、RelAの発現ベクターとともに共発現させ、転写活性を解析したところ、2つのNF- κ Bの結合領域のいずれの欠損によっても、RelAによるPik3r1の転写活性の低下がみられた(図41)。2つのNF- κ Bの結合領域に対するRelAの結合の特異性を調べるために、結合モチーフに変異を作成したレポーターベクターを作成し、RelAの発現ベクターとともに共発現させ、転写活性を解析したところ、いずれの結合モチーフにおいても変異導入によるPik3r1の転写活性の低下が見られた(図42)。最後にin vivoにおけるRelAの2つの結合モチーフに対する結合を調べるために、クロマチン免疫沈降を行った。ヒト軟骨肉腫細胞株であるOUMS-27にTNF α を投与したところ、-546/539bpの結合モチーフではRelAとの結合が見られなかったのに対して、-227/219bpの結合モチーフでは、RelAとの結合が見られた(図43)。

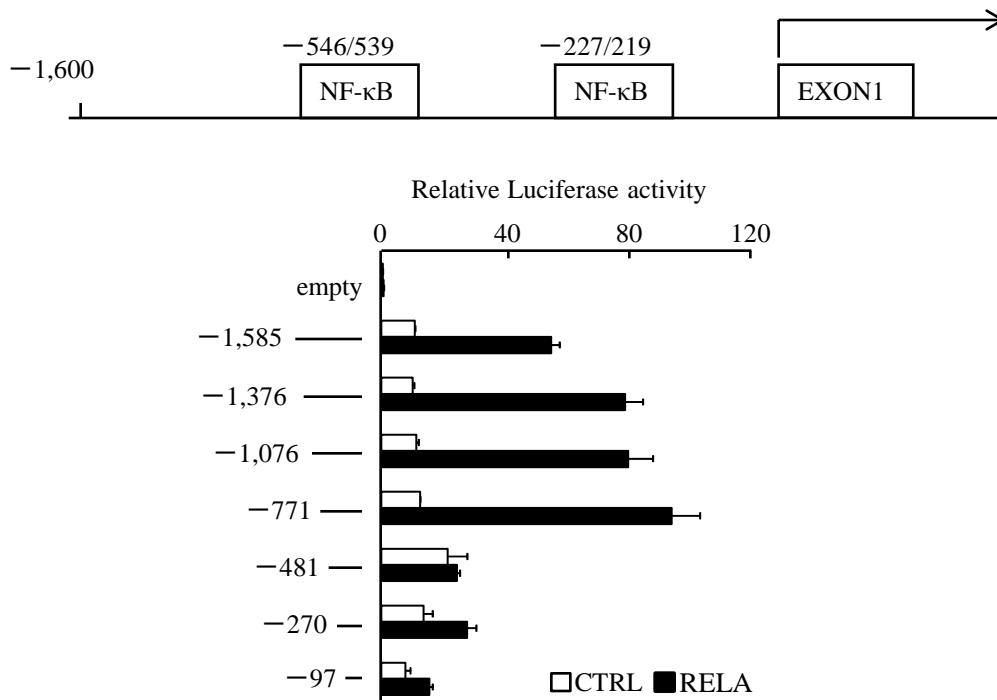


図41. PIK3R1プロモーターの段階的欠失によるRELAに対する反応

PIK3R1プロモーター転写開始点上流約1,600bpには2か所のNF-κB結合モチーフが存在していた。これらを段階的に欠失するレポーターベクターを作成し、RelAの発現ベクターとともに未分化軟骨細胞株であるATDC5細胞にリポフェクションし、72時間後にルシフェラーゼ活性を測定した-546/539、-227/219のいずれの結合モチーフの欠失によってもルシフェラーゼ活性の低下がみられた。

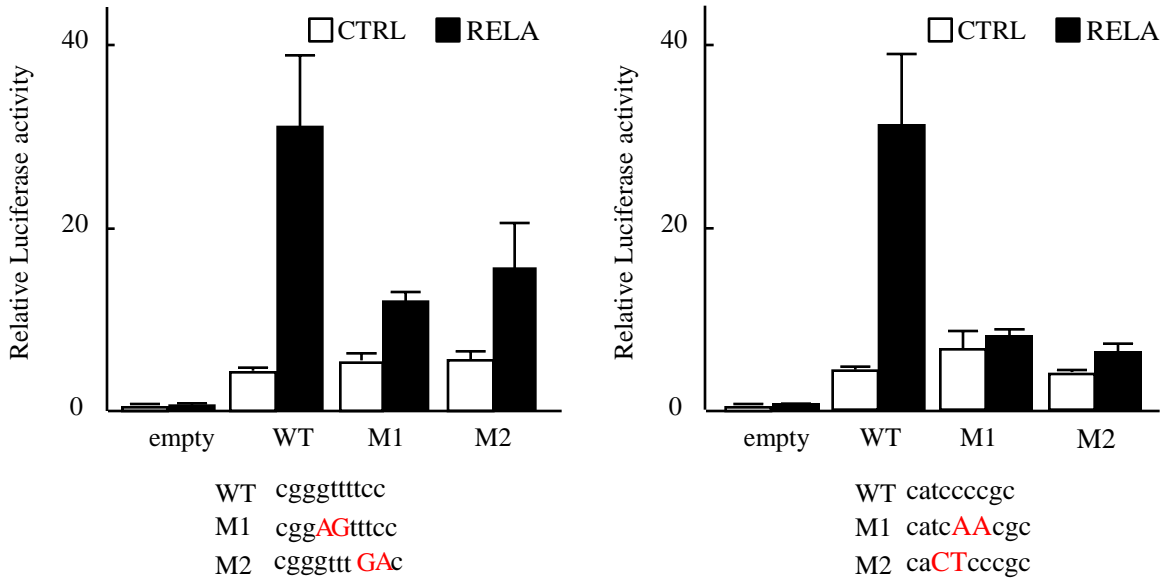


図42. PIK3R1プロモーターのNF- κ B結合モチーフの変異作成によるRelAに対する反応段階的の欠失によって転写活性の低下がみられた-546/539、-227/219の2か所の結合モチーフそれぞれに変異を作成し、RELAの発現ベクターとともに未分化軟骨細胞株であるATDC5細胞にリポフェクションし、72時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。-546/539、-227/219のいずれの結合モチーフ内の変異作成によっても転写活性の低下がみられた。

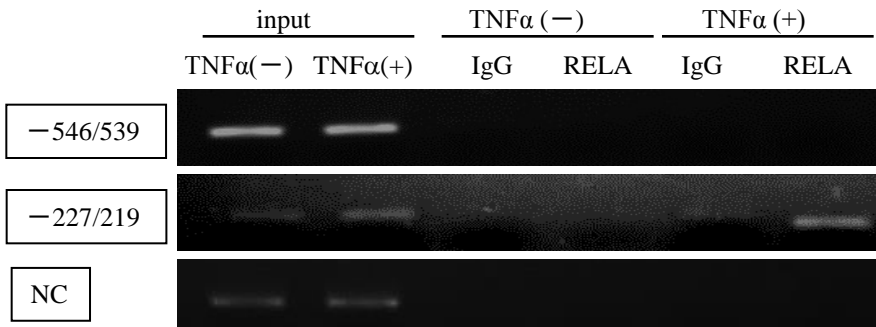


図43. クロマチン免疫沈降によるPIK3R1プロモーターにおけるRelAの結合 ヒト軟骨肉腫細胞株であるOUMS-27細胞に対し、PBSとTNF α 10ng/mlをそれぞれ投与し、24時間後にクロスリンクを行った後に、DNAを回収し、ソニケーターによるDNAの断片化を行った。抗RelA抗体による免疫沈降の後に、-546/539、-227/219のNF- κ B結合モチーフを含む領域と結合モチーフを含まない領域(NC)を増幅するプライマーを用いてPCRを行った。-227/219の結合モチーフを含む領域と、RelAとの結合がみられた。

3-13. RelAによるPrkar1aを介したアポトーシス制御

続いて、3-10によって候補に挙げられた遺伝子の中でPrkar1aについて解析を行った。Prkar1aは、PKAの調節サブユニットであり、非活性化状態では、触媒サブユニットに結合しその活性を抑制している。一方で、活性化状態では、cAMPが調節サブユニットに結合すると、触媒サブユニットが遊離し、PKAは活性化する。そのため、Prkar1aの発現誘導の阻害は、PKAの活性化つながる。PKAは、Bimをリン酸化して安定化させることでアポトーシスに関与していることが知られている

(25)。そこで、Bimの発現をウェスタンブロッティングで調べたところ、*Rela^{fl/fl}*由来軟骨細胞および*Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}*由来軟骨細胞いずれにおいても、TNF α 投与によるBimの発現量に変化はなかった(図44)。

3-14. c-Iap1、c-Iap2、Traf2、Pik3r1の変形性関節症モデルにおける発現

以上の結果から、軟骨細胞において抗アポトーシス作用をもつRelAの標的遺伝子としてc-Iap1、c-Iap2、Traf2、Pik3r1が候補に挙げられた。これらの分子が、変形性関節症の発症過程での時空間的な発現パターンを確認するために、WTマウス変形性膝関節症モデルにおいてc-Iap1、c-Iap2、Traf2、Pik3r1の免疫組織化学染色を行った。いずれも変形性関節症の発症初期である2、3週に、軟骨細胞に強く発現しており、その後変形性関節症の進行とともに発現の低下がみられた(図45)。続いて、タモキシフェン誘導性軟骨特異的RelAノックアウトマウス変形性膝関節症モデルにおいて発現を調べた。すると、c-Iap1、c-Iap2、Traf2、Pik3r1は、いずれも*Rela^{fl/fl}*マウスでは、発現が見られるのに対して、*Col2a1-Cre^{ERT};Rela^{fl/fl}*マウスでは、発現が抑制されていた(図45)。以上のことから、in vivoにおいても、RelA

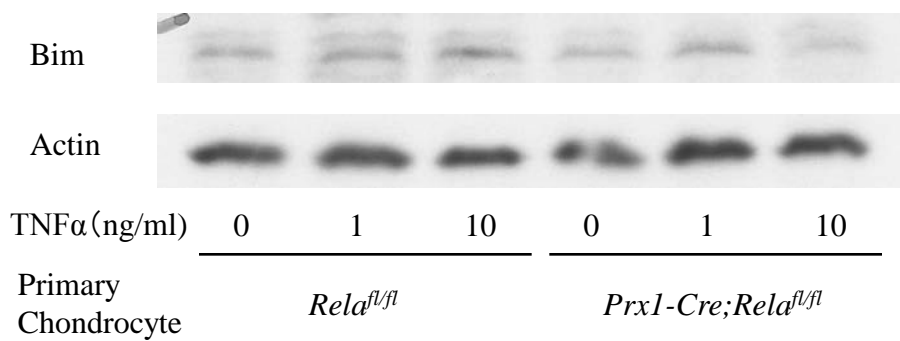


図44. TNFα投与によるPrkar1aを介したアポトーシス制御

生後5日齢のマウス関節軟骨を採取し、平面培養を行い、TNFαを投与後24時間で蛋白を回収し、ウェスタンブロッティングを行った。Bimの発現量は、*Relα^{fl/fl}*、*Prx1-Cre;Relα^{fl/fl}*マウスいずれにおいても TNFα投与によっての変化はなかった。

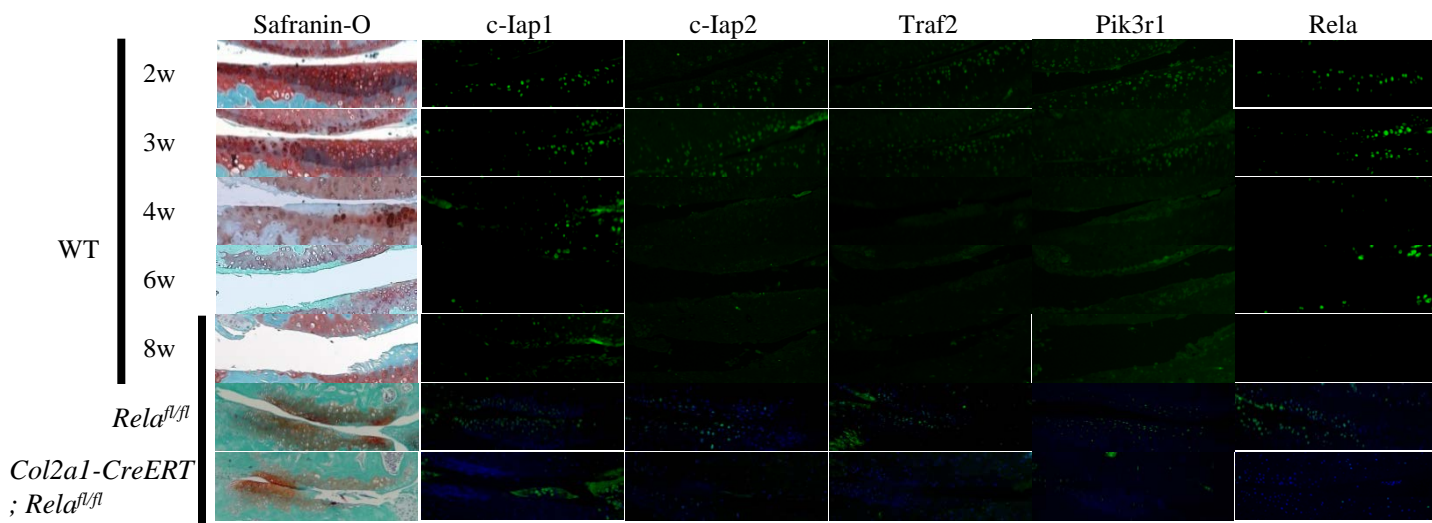


図45. c-Iap1, c-Iap2, Pik3r1, Traf2のWTマウス変形性膝関節症モデルにおける経時的発現変化とタモキシフェン誘導性軟骨特異的RelAノックアウトマウス変形性膝関節症モデルにおける組織学的解析

WTマウスの変形性関節症モデルの関節軟骨では、2、3週でc-Iap1, c-Iap2, Pik3r1, Traf2の発現がみられ、その後発現は低下した。*Col2a1-CreERT;Relα^{fl/fl}*では、*Relα^{fl/fl}*と比較して、関節軟骨におけるc-Iap1, c-Iap2, Pik3r1, Traf2の発現は低下していた。

ノックアウトによって、c-Iap1、c-Iap2、Traf2、Pik3r1の発現が抑制されていることが確認できた。

第5章 考察

本研究において、軟骨細胞におけるNF- κ Bシグナルは、四肢発生および変形性膝関節症の発症過程において抗アポトーシス作用により軟骨細胞の恒常性の維持に重要な役割を担っていることを示した。

四肢発生におけるNF- κ Bシグナルの機能については、これまで多く報告されている。軟骨内骨化の初期分化の過程において、NF- κ Bシグナルの強力な誘導因子であるIL-1 β は、FGFR-3、p21を抑制することで、軟骨細胞増殖を促進すること(26)、さらに、以前、我々は、RelAがGSK3によるリン酸化を受けることで活性化し、軟骨分化の主要因子であるSOX9を直接転写制御することを報告している(12, 13)。一方で、RelAは、軟骨内骨化の後期分化を促進する作用も知られている。NF- κ Bシグナルは、軟骨細胞外基質の破壊など微小環境の破壊に伴う刺激によって活性化し、IL-8/CXCL8の産生を促し軟骨を肥大化させる(27-29)という報告や、SOX9を抑制、BMP-2やGADD45 β の発現を促進することで、肥大化を促進するという報告がある(30-35)。また、我々は、MMP13やVEGFの発現誘導を介して軟骨後期分化を誘導するHif2 α をRelAが直接転写制御することを報告した(14)。

以上のようにNF- κ Bシグナルは、軟骨内骨化の分化段階において多彩で一見相反する作用を有していると考えられていたため、本研究では、各種コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析を行った。その結果から、RelAは肥大軟骨以降においては軟骨内骨化における作用を有さないこと、初期分化においては軟骨基質産生には関与せず、抗アポトーシス作用により軟骨細胞の恒常性を維持することで、軟骨内骨化に関与していることを明らかにした。先述したようにin vitroにおいてRelAがSox9を直接転写制御し、軟骨分化に強く関わっている可能性が考

えられたが、Sox9のノックアウトマウスは四肢発生の著しい障害が見られるのに対して、RelAのノックアウトマウスでは、四肢成長障害は軽度であったことから、四肢発生におけるSox9の発現にはRelA以外の制御因子がより重要であると考えられ、今後の検討が必要であると考えられる。また、これまで報告されてきたNF-κBシグナルの軟骨分化における作用は、本研究では見られなかったが、NF-κBシグナルを司るRelA以外の転写因子の関与がある可能性やNF-κBシグナル以外のシグナルによる発現調節がより重要である可能性があり、さらなる検討が必要である。

ところで、アポトーシスはプログラムされた細胞死であり、成長板を含む様々な組織の発生には必須のメカニズムである。成長板におけるアポトーシスの詳細なメカニズムは不明であるが、最終分化軟骨細胞において生じると考えられている。最終分化軟骨細胞は、血管を誘導し、さらにアポトーシスによってマトリックスの石灰化、骨化の足場を作り、一次骨化中心の形成に寄与している (36)。この最終分化軟骨細胞のアポトーシスを誘導する細胞外因子としてリンとFGF2が関与していることが知られているが、これらの異常は成長障害をきたし、それぞれ低リン血症はくる病(37, 38)を、FGF2-FGF3Rの異常は軟骨無形成症を呈する (39)。

*Col2a1-Cre; RelA^{fl/fl}*の解析の結果、成長障害を呈し、成長板においてアポトーシスの亢進がみられたが、上述の最終分化軟骨細胞のアポトーシスではなく、増殖層から前肥大層にかけて異所性のアポトーシスがみられた。これまで、異所性のアポトーシスに関しては、軟骨内骨化において重要な因子であるPTHrPを生後に軟骨特異的にノックアウトすると増殖層においてアポトーシスがみられ、成長障害を呈するということや (40)、抗アポトーシス作用を有するBcl-2のノックアウト

マウスでは、増殖層の短縮による成長障害を呈すると報告されている(41)。RelAは、Nkx3.2により活性化され抗アポトーシス効果を有するとされているが、PTHrPは、Nkx3.2を活性化することが知られている(42)。これらのことから、RelAはPTHrPの下流における抗アポトーシス作用の一端を担っている可能性があると考えられる。ただし、PTHrPノックアウトマウスは高度な成長障害を呈するのに対して、RelAノックアウトマウスの成長障害は軽度であり、両者の表現型には解離がある。これは、PTHrPの下流では、Baxの発現上昇、リン酸化Badの上昇がみられ(40)、本研究で同定されたRelAの下流因子以外のアポトーシス関連因子が働いているからと考えられる。また、変形性関節症の関節内において、IL1やTNF α が上昇していることが知られているため(43)、in vitroにおいて、NF- κ Bの誘導因子としてTNF α を使用した。IL1投与によるアポトーシス誘導作用に関しては今後の検討が必要であるが、変形性関節症では少なくともTNF α が軟骨細胞に作用することでRelaノックアウトにより関節軟骨のアポトーシスが亢進した可能性が考えられる。一方で、軟骨内骨化の過程においては、TNF α のノックアウトマウスおよびRela/TNF α のダブルノックアウトマウスでは、成長障害を呈さないことから(44, 45)、本研究において軟骨内骨化の過程でみられた異所性のアポトーシスを誘導する上流因子は、TNF α ではなく、先述のとおりPTHrPなど他の因子が作用している可能性が考えられ、今後の検討が必要である。また、破骨細胞は、軟骨基質を破壊することで軟骨内骨化の最終分化過程を促進しており、骨芽細胞および肥大軟骨細胞のRANKL発現を介して誘導されている(46)。Prx1-Cre;Rela^{fl/fl}マウスでは、骨芽細胞のRANKLの発現制御を介して破骨細胞の誘導に関与している可能性が考えられるが、本研究では、Col2a1-Cre;Rela^{fl/fl}マウスとPrx1-Cre;Rela^{fl/fl}マウスの四肢の成長障害は同程

度であったこと、両者に肥大軟骨細胞層の長さに明らかな差はなかったこと、さらに*Coll10a1-Cre;Rela^{fl/fl}*マウスでは、肥大軟骨細胞のRANKL発現を介した破骨細胞誘導に起因すると考えられる成長障害を呈さなかったことから、*Rela*の破骨細胞誘導を介した軟骨内骨化への作用は少ないと考えられた。

変形性関節症はメカニカルストレス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。また、1990年代の分子生物学研究の発展により、炎症性サイトカインなどのsoluble mediatorが軟骨細胞における基質分解酵素の産生を促進することで変形性関節症を発症するという、炎症が変形性関節症の第一段階であるという意見もある。関節軟骨にかかるメカニカルストレスが閾値を超えると、細胞表面に存在するイオンチャ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、プロスタグランジンやケモカイン、サイトカインなどが誘導され(47, 48)、変形性関節症では、NF- κ BやMAPKシグナルが有意に活性化されている(49)。NF- κ B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、TNF α 、COX2、ELF3/ESE-1を誘導し、細胞外基質の変性破壊を通じて関節軟骨変性の中心的な役割を果たしていると報告されている

(50-55)。また、炎症性サイトカインだけでなく、破壊された細胞外基質の断片そのものが、TLR2, 4を活性化し、NF- κ Bシグナルを介してMMP1, 3, 13の発現亢進に関わっていることも報告されている(56-58)。さらに、変形性関節症は、軟骨細胞の老化が関与しているが(59)、老化した軟骨細胞は、エピジェネティックな修飾を受け、IL-1に対するNF- κ Bシグナルの活性化、MMP、ADAMTSの産生が亢進しており(60-62)、また、AGE,RAGEの発現増加によるNF- κ Bの活性化を介してMMP、PGE2、NO、Col10の発現が上昇していると報告されている(63-66)。

我々は、軟骨基質分解酵素の主要因子であるADAMTS5をRelAが直接転写誘導すること、また、*ex vivo*において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しうることを報告している(15)。さらに、*in vivo*において、RelA特異的なsiRNAをアデノウィルスを用いてマウス膝関節内投与したところ、早期の変形性関節症の進行が抑制できたという報告もある(67)。これらのことから、NF- κ Bシグナルの活性化は、軟骨基質分解を介して変形性関節症に関与している可能性が考えられたため、本研究では、軟骨特異的にRelAをノックアウトしたマウスを用いて、変形性関節症の解析を行った。変形性関節症モデルおよび自然経過における変形性関節症の解析のいずれにおいてもRelAノックアウトマウスでは、ADAMTS5の発現は抑制されていたものの、予想に反して変形性関節症は進行しており、変性する軟骨周囲の軟骨細胞のアポトーシスの亢進がみられた。RelAをノックアウトした軟骨細胞では、変形性関節症発症のメディエーターであるTNF α の投与により、コントロールと比較して、僅かな量でもアポトーシスがみられた。これらのことから、RelAノックアウトマウスにおける変形性関節症の進行は、成長板における成長障害と同様に関節軟骨細胞におけるアポトーシスの亢進が原因であると考えられた。

変形性関節症の進行過程において、変性する関節軟骨では軟骨細胞のアポトーシスが生じていることは、これまで多く報告されている。しかし、その因果関係に関しては、多くの議論があり、解決されていない。今回、RelAノックアウトによってADAMTS5の発現を抑制しえたのにもかかわらず、変形性関節症が進行した原因として、上記の如く軟骨細胞のアポトーシスの亢進があげられるが、これは、軟骨細胞のアポトーシスは変形性関節症の原因となりうること、軟骨細胞は関節

軟骨の恒常性維持に必須であることを示唆している。他組織においても、RelAとアポトーシスに関しては多く報告されている。RelAの全身性のノックアウトマウスは、胎生期に肝臓がアポトーシスをおこし、胎生致死となるという報告が1995年に報告されて以降、神経、皮膚、腸管など様々な組織においてアポトーシスとの関連が言われている(68, 69)。今回、軟骨細胞におけるRelAの抗アポトーシス作用を担う標的遺伝子をマイクロアレイを用いて網羅的に解析したところ、Traf2、c-IAP1,2、Pik3r1、Parkar1aが候補としてあげられた。この中で、Traf2、c-IAP1,2は、TNF α の下流において、caspase3, 8の活性を阻害することで抗アポトーシス作用を有しており、RelAが転写誘導することが知られている(70)。また、これまでの報告では、Bcl-2やBcl-xLも他組織においてはRelAにより直接転写制御されると報告されているが(71, 72)、本研究では、TNF α およびRelAノックアウトによるこれらの発現変化は見られず、組織ごとにRelAの標的遺伝子が異なる可能性が考えられた。

PI3K-Aktシグナルは、糖代謝や骨形成など様々な生理作用に関与しており、その活性化は、細胞増殖、分化、生存に関わっている。Pik3r1は、PI3K-Aktシグナルにおいて、PI3キナーゼの調節サブユニットを構成する分子であり、触媒サブユニットを安定化させ、PI3キナーゼを活性化する機能を持ち、その結果、Aktをリン酸化することで、PI3K-Aktシグナルを活性化させる。PI3キナーゼの活性化は、主に受容体型チロシンキナーゼの活性化によるリン酸化を介して制御されているが、Pik3r1活性型変異は、Aktの活性化を介して膠芽腫などの腫瘍原生に関与しており、その遺伝子発現抑制により腫瘍の増殖能や浸潤能の抑制が可能であることから、Pik3r1の遺伝子発現調節により、PI3キナーゼの活性制御が可能である可能

性が示唆されている (73)。また、NF- κ Bシグナルは、PI3K-Aktシグナルにより活性化されることが知られているが、RelaがPI3キナーゼに対し抑制的に作用するPTENを直接転写抑制することによってネガティブフィードバックの作用を有するという報告がある (24)。今回、軟骨細胞においては、PTEN のTNF α による遺伝子発現誘導、RelAノックアウトによるその阻害作用見られず、Pik3r1のみにみられたこと、さらにその発現とAktのリン酸化の誘導が同期していたことから、NF- κ Bシグナルは、Pik3r1を直接転写誘導することで、PI3K-Aktシグナルに対して、positive feedbackな作用を有するということが新たに明らかとなった。ただし、先述の通り、Aktのリン酸化、PI3キナーゼの活性化には、種々のホルモン、サイトカイン、キナーゼが関与しているため、RelAノックアウトによるAktのリン酸化の抑制はPik3r1の発現抑制だけでなく、これらの作用を介している可能性もあり、さらなる検討が必要である。また、PIK3R1のプロモーターの転写開始点上流約1600bpの領域には、2つのNF- κ Bの結合モチーフがあり、これらを段階的に欠失およびそれぞれの結合モチーフ内での変異導入によりRelAによる転写活性の低下が見られたのに対して、ChIPアッセイでは、2つの結合モチーフのうち、-546/539bpではなく、-227/219bpのみにRelAとの結合がみられた。これは、ルシフェラーゼアッセイでは、in vivoで遺伝子発現制御のためにみられるようなクロマチン構造の変化などエピジェネティックな制御の影響を受けないためである可能性が考えられ、軟骨細胞におけるPik3r1の発現には、-227/219bpの結合モチーフがより重要であると考えられた。

マイクロアレイと遺伝子発現解析の結果からRelAの標的遺伝子として、Prkar1aも候補に挙げられた。Prkar1aは、PKAの調節サブユニットであり、非活性化状態

では、触媒サブユニットに結合しその活性を抑制している。一方で、活性化状態では、cAMPが調節サブユニットに結合すると、触媒サブユニットが遊離し、PKAは活性化する。PKAは、Bimをリン酸化して安定化させることでアポトーシスに関与していることが知られているが(25)、本研究では、軟骨細胞において、Prkar1aの発現変化に伴うBimの発現は変わらなかったことから、少なくともこの経路を介したアポトーシスへの関与は否定的であった。しかし、Prkar1aは、他のメカニズムを介してアポトーシスに関与している可能性もあるため、今後の検討が必要である。

以上のことからNF- κ Bシグナルの主要な転写因子であるRelAは、Traf2、c-Iap1,2、Pik3r1を転写誘導することによってアポトーシスを抑制し、軟骨内骨化を維持し、変形性関節症の進行を抑制することが明らかとなった(図46)。これまで、NF- κ Bシグナルの軟骨変性への関与が多く報告されており、NF- κ Bシグナルの抑制は変形性関節症の治療ターゲットになりうると考えられていたが、本研究の結果、RelAを抑制することは、軟骨細胞のアポトーシスの亢進のため変形性関節症の進行につながり、予想とは相反する結果となった。他組織においては、腸炎誘発モデルの解析で、腸管上皮でNF- κ Bシグナルをノックアウトすると、変形性関節症モデルの解析で見られたように腸管上皮のアポトーシスが誘発されたという報告があるが(74)、一方で、NF- κ Bの阻害剤を用いた解析では、腸管上皮のアポトーシスを惹起せずに、炎症のみを抑制可能であったという報告がある(75)。これは、NF- κ Bシグナルの量的な下流遺伝子の発現制御の可能性を示唆しており、‘適度な’NF- κ Bシグナルの抑制により、変形性関節症の進行を抑制できる可能性がある。NF- κ Bシグナルは細胞老化とも関係していると考えられているが、早老症を呈するマウ

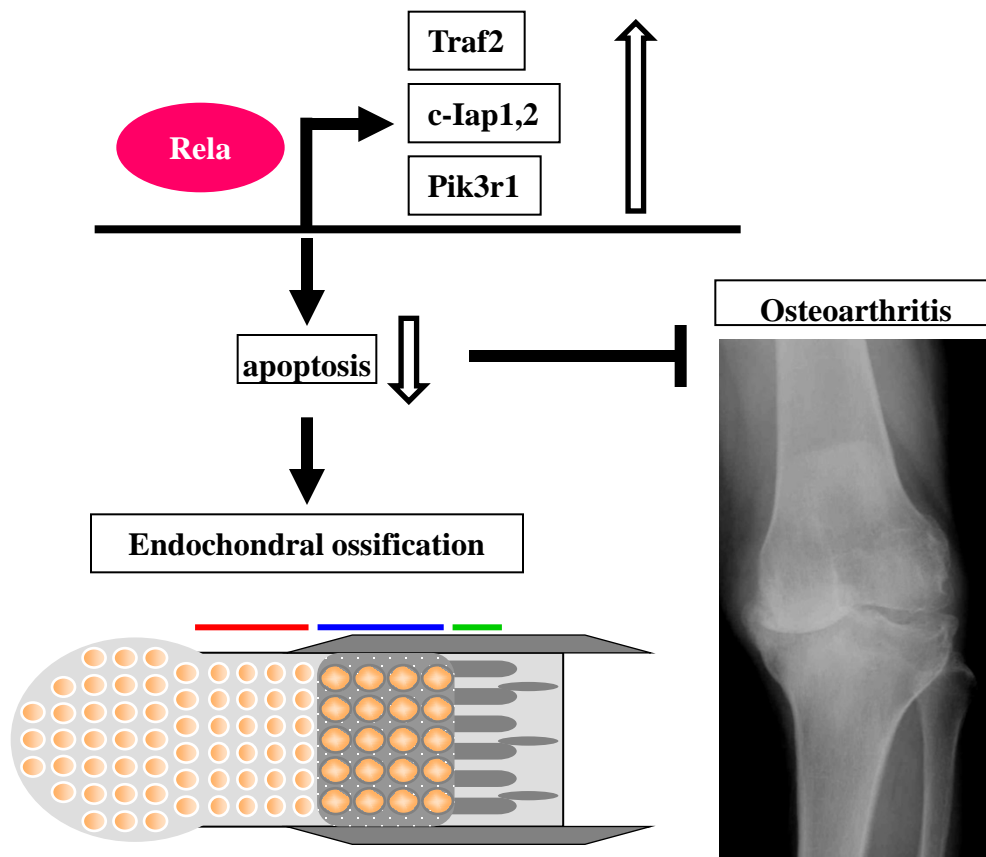


図46. RelAの軟骨における作用

RelAは、Traf2、c-Iap1,2、Pik3r1を転写誘導することによってアポトーシスを抑制し、軟骨内骨化を維持し、変形性関節症の進行を抑制する。

スにおいて、RelAをヘテロノックアウトしたところ、種々の臓器において細胞老化を抑制できたという報告があり（76）、老化と密接に関係する変形性関節症においても‘適度な’NF- κ Bシグナルの抑制によって、その進行を抑制できる可能性は十分にあると考えられる。以上のようにNF- κ Bシグナルには、諸刃の剣の作用があると考えられるため、今後は、ヘテロノックアウトマウスを用いた解析や、NF- κ B阻害剤を用いた解析を行い、NF- κ Bシグナルが変形性関節症の治療ターゲットとなりうるか否かを検討していきたい。

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 中村耕三前教授、田中栄教授に謹んで感謝致します。

さらに、基礎研究の初歩から終始にわたり御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜った整形外科学教室 川口浩准教授、東京大学医学部附属病院ティッシュ・エンジニアリング部 齋藤琢准教授に謹んで感謝致します。

また、有益な御助言を賜った東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 鄭雄一教授、有形無形の力でご協力を頂いた同門の先輩、同期、後輩の先生方に感謝の言葉を申し上げます。

最後に、全力で自分をサポートしてくれた妻・さやか、心の支えとなってくれた長男・虹朗、次男・和楽に深い感謝の念を示したいと思います。

引用文献

1. Yoshimura N. [Progress of research in osteoarthritis. Epidemiology of osteoarthritis in Japanese population. ~ The ROAD study ~]. *Clin Calcium*. 19(11):1572-7, 2009
2. Kronenberg H.M., Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423(6937):332-6, 2003
3. Sharma L. & Kapoor D., Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical Management 4th edition, eds Moskowitz R.E., Altman R.D., Hochberg M.C., Buckwalter J.A., & Goldberg V.M. (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), pp 3-26, 2007
4. Kawaguchi H., Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells* 25(1): 1-6, 2008
5. Meffert M.K., Baltimore D., Physiological functions for brain NF- κ B. *Trends Neurosci* 28:37e43, 2005
6. Li Q., Withoff S., Verma I.M., Inflammation-associated cancer: NF- κ B is the lynchpin. *Trends Immunol* 26:318e25, 2005
7. Bonizzi G., Karin M., The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25:280e8, 2004
8. Hayden M.S., Ghosh S., Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* 18: 2195e224, 2004
9. Chen L.F., Greene W.C., Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:392e401, 2004
10. Soysa N.S., Alles N., NF-kappaB functions in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 378:1-5, 2009
11. Takeda K., Takeuchi O., Tsujimura T., Itami S., Adachi O., Kawai T., Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK α . *Science* 284:313e6, 1999

12. Ushita, M., Saito, T., Ikeda, T., Yano, F., Higashikawa, A., Ogata, N., Chung, U.I., Nakamura, K., and Kawaguchi, H., Transcriptional induction of SOX9 by NF- κ B family member RelA in chondrogenic cells. *Osteoarthritis Cartilage* 17:1065-1075, 2009
13. Itoh, S., Saito, T., Hirata, M., Ushita, M., Ikeda, T., Woodgett, J. R., Algul, H., Schmid, R. M., Chung, U. I., and Kawaguchi, H. GSK-3 α and GSK-3 β proteins are involved in early stages of chondrocyte differentiation with functional redundancy through RelA protein phosphorylation. *J Biol Chem* 287: 29227-29236, 2012
14. Saito, T., Fukai, A., Mabuchi, A., Ikeda, T., Yano, F., Ohba, S., Nishida, N., Akune, T., Yoshimura, N., Nakagawa, T., Nakamura, K., Tokunaga, K., Chung, U. I., and Kawaguchi, H., Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 α during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med* 16: 678-686, 2010
15. Kobayashi H., Hirata M., Saito T., Itoh S., Chung U.I., Kawaguchi H., Transcriptional induction of ADAMTS5 by an NF- κ B family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. *J Biol Chem*. Aug 20., 2013 [Epub ahead of print]
16. Park, M., Yong, Y., Choi, S. W., Kim, J. H., Lee, J. E., and Kim, D. W., Constitutive RelA activation mediated by Nkx3.2 controls chondrocyte viability. *Nat Cell Biol* 9: 287-298, 2007
17. Gosset M., F. Berenbaum, S. Thirion, and C. Jacques, Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc.* 3(8):1253-1260, 2008
18. 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
19. Pritzker K.P., S. Gay, S.A. Jimenez, K. Ostergaard, J.P. Pelletier, P.A. Revell, D. Salter, and W.B. van den Berg, Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 14(1): p. 13-29. 2006.
 20. 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
 21. Algül H., Treiber M., Lesina M., Nakhai H., Saur D., Geisler F., Pfeifer A., Paxian S., Schmid R.M., Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis. *J Clin Invest*. 117(6):1490-1501, 2007
 22. Logan M., Martin J.F., Nagy A., Lobe C., Olson E.N., Tabin C.J., Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer. *Genesis*. 33(2):77-80, 2002
 23. Daniel J. Van Antwerp, Seamus J. Martin, Tal Kafri, Douglas R. Green, Inder M. Verma, Suppression of TNF- α -Induced Apoptosis by NF- κ B. *Science* 274:787-789, 1996
 24. Vasudevan K.M., Gurumurthy S., Rangnekar V.M., Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis. *Mol Cell Biol*. 24(3):1007-21, 2004
 25. Moujalled D., Weston R., Anderton H., Ninnis R., Goel P., Coley A., Huang D.C., Wu L., Strasser A., Puthalakath H., Cyclic-AMP-dependent protein kinase A regulates apoptosis by stabilizing the BH3-only protein Bim. *EMBO Rep*. 12(1):77-83, 2011

26. Stav Simsa-Maziel, Efrat Monsonogo-Ornan, Interleukin-1 β Promotes Proliferation and inhibits differentiation of chondrocytes through a mechanism involving down-regulation of FGFR-3 and p21. *Endocrinology* 153:2296-2310, 2012
27. Merz D., Liu R., Johnson K., Terkeltaub R., IL-8/CXCL8 and growth-related oncogene alpha/CXCL1 induce chondrocyte hypertrophic differentiation. *J Immunol* 171:4406–15, 2003
28. Borzi R.M., Mazzetti I., Macor S., Silvestri T., Bassi A., Cattini L., Facchini A., Flow cytometric analysis of intracellular chemokines in chondrocytes in vivo: constitutive expression and enhancement in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett* 455:238–42, 1999
29. Sandell L.J., Xing X., Franz C., Davies S., Chang L.W., Patra D., Exuberant expression of chemokine genes by adult human articular chondrocytes in response to IL-1beta. *Osteoarthritis Cartilage* 16:1560–71, 2008
30. Murakami S., Lefebvre V., de Crombrughe B., Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 275:3687–92, 2000
31. Sitcheran R., Cogswell P.C., Baldwin A.S. Jr., NF-kappaB mediates inhibition of mesenchymal cell differentiation through a posttranscriptional gene silencing mechanism. *Genes Dev* 17:2368–73, 2003
32. D'Angelo M., Yan Z., Nooreyazdan M., Pacifici M., Sarment D.S., Billings P.C., Leboy P.S., MMP-13 is induced during chondrocyte hypertrophy. *J Cell Biochem* 77:678–93, 2000
33. Ijiri K., Zerbini L.F., Peng H., Correa R.G., Lu B., Walsh N., Zhao Y., Taniguchi N., Huang X.L., Otu H., Wang H., Wang J. Fei, Komiya S., Ducey P., Rahman M.U.,

- Flavell R.A., Libermann T.A., Gravallesse E.M., Oettgen P., Goldring M.B., A novel role for GADD45beta as a mediator of MMP-13 gene expression during chondrocyte terminal differentiation. *J Biol Chem* 280:38544–55, 2005
34. Minina E., Wenzel H.M., Kreschel C., Karp S., Gaffield W., McMahon A.P., Vortkamp A., BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 128:4523–34, 2001
35. Feng J.Q., Xing L., Zhang J.H., Zhao M., Horn D., Chan J., Boyce B.F., Harris S.E., Mundy G.R., Chen D., NF-kappaB specifically activates BMP-2 gene expression in growth plate chondrocytes in vivo and in a chondrocyte cell line in vitro. *J Biol Chem* 278:29130–5, 2003
36. R. Tracy Ballock, Regis J. O’Keefe., Physiology and Pathophysiology of the Growth Plate. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69:123–143, 2003
37. Oshima Y., Akiyama T., Hikita A., Iwasawa M., Nagase Y., Nakamura M., Wakeyama H., Kawamura N., Ikeda T., Chung U.I., Hennighausen L., Kawaguchi H., Nakamura K., Tanaka S., Pivotal Role of Bcl-2 Family Proteins in the Regulation of Chondrocyte Apoptosis *J Biol Chem* 26;283(39):26499-508, 2008
38. Irving M. Shapiro, Christopher S. Adams, Theresa Freeman, Vickram Srinivas, Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. *Birth Defects Res.* 75:330-339, 2005
39. Gracia S., Dirat B., Toqnacci., Rochet N., Mouska X., Bonnafous S., Patouraux S., Tran A., Gual P., Le Marchand-Brustel Y, Gennero I., Gouze E., Postnatal soluble FGFR3 therapy rescues achondroplasia symptoms and restores bone growth in mice. *Sci Transl Med.* 18;5(203):203ra124, 2013
40. Hirai T., Chagin A.S., Kobayashi T., Mackem S., Kronenberg H.M., Parathyroid

- hormone/parathyroid hormone-related protein receptor signaling is required for maintenance of the growth plate in postnatal life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 4;108(1):191-6, 2011
41. Amling, M., Neff, L., Tanaka, S., Inoue, D., Kuida, K., Weir, E., Philbrick, W. M., Broadus, A. E., and Baron, R. Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J. Cell Biol.* 136, 205–213, 1997
 42. Provot S, Kempf H, Murtaugh LC, Chung UI, Kim DW, Chyung J, Kronenberg HM, Lassar AB. Nkx3.2/Bapx1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation. *Development* 133(4):651-62, 2006
 43. Fernandes J.C., Martel-Pelletier J., Pelletier J.P., The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology.*39(1-2):237-46, 2002
 44. Marino M.W., Dunn A., Grail D., Inglese M., Noguchi Y., Richards E., Jungbluth A., Wada H., Moore M., Williamson B., Basu S., Old L.J., Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22;94(15):8093-8, 1997
 45. Doi T.S., Marino M.W., Takahashi T., Yoshida T., Sakakura T., Old L.J., Obata Y., Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16;96(6):2994-9, 1999
 46. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med.* 11;17(10):1235-41, 2011
 47. Guilak F., Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 25(6): 815-23, 2011
 48. Issa R.I. and T.M. Griffin, Pathobiology of obesity and osteoarthritis: integrating

- biomechanics and inflammation. *Pathobiol Aging Age Relat Dis.* 2(2012), 2012
49. Berenbaum F., Signaling transduction: target in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 16(5): 616-22, 2004
 50. Goldring M., Marcu K., Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapy* 11:224–39, 2009
 51. 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
 52. 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
 53. 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
 54. Berenbaum F., Signaling transduction: target in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 16:616–22, 2004
 55. 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
 56. Kim H.A., Cho M.L., Choi H.Y., Yoon C.S., Jhun J.Y., Oh H.J., Kim H.Y., The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum* 54:2152–63, 2006

57. Zhang Q., Hui W., Litherland G.J., Barter M.J., Davidson R., Darrah C., Donell S.T., Clark I.M., Cawston T.E., Robinson J.H., Rowan A.D., Young D.A., Differential Toll-like receptor-dependent collagenase expression in chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 67:1633–41, 2008
58. Pulai J.I., Chen H., Im H.J., Kumar S., Hanning C., Hegde P.S., Loeser R.F., NF-kappa B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *J Immunol* 174:5781–8, 2005
59. Lotz M., Loeser R.F., Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone* 51(2):241-8, 2012
60. Roach H.I., Yamada N., Cheung K.S., Tilley S., Clarke N.M., Oreffo R.O., Kokubun S., Bronner F., Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum* 52:3110–24, 2005
61. Roach H.I., Aigner T., DNA methylation in osteoarthritic chondrocytes: a new molecular target. *Osteoarthritis Cartilage* 15:128–37, 2007
62. da Silva M.A., Yamada N., Clarke N.M., Roach H.I., Cellular and epigenetic features of a young healthy and a young osteoarthritic cartilage compared with aged control and OA cartilage. *J Orthop Res.* 27:593–601, 2009
63. DeGroot J., Verzijl N., Wenting-van Wijk M.J., Jacobs K.M., Van El B., Van Roermund P.M., Bank R.A., Bijlsma J.W., TeKoppele J.M., Lafeber F.P., Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 50:1207–15, 2004
64. Cecil D.L., Johnson K., Rediske J., Lotz M., Schmidt A.M., Terkeltaub R.,

- Inflammation-induced chondrocyte hypertrophy is driven by receptor for advanced glycation end products. *J Immunol.* 175:8296–302, 2005
65. Yammani R.R., Carlson C.S., Bresnick A.R., Loeser R.F., Increase in production of matrix metalloproteinase 13 by human articular chondrocytes due to stimulation with S100A4: Role of the receptor for advanced glycation end products. *Arthritis Rheum.* 54:2901–11, 2006
 66. Steenvoorden M.M., Huizinga T.W., Verzijl N., Bank R.A., Roodman C.D., Luning H.A., Lefeber F.P., Toes R.E., DeGroot J., Activation of receptor for advanced glycation end products in osteoarthritis leads to increased stimulation of chondrocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 54:253–63, 2006
 67. Chen L.X., Lin L., Wang H.J., Wei X.L., Fu X., Zhang J.Y., Yu C.L., Suppression of early experimental osteoarthritis by in vivo delivery of the adenoviral vector-mediated NF- κ B-specific siRNA. *Osteoarthritis Cartilage* 16(2):174-84, 2008
 68. Beg A.A., Sha W.C., Bronson R.T., Ghosh S., Baltimore D., Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature* 376(6536):167-70, 1995
 69. Barkett M., Gilmore T.D., Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene.* 22;18(49):6910-24, 1999
 70. Cun-Yu Wang, Marty W. Mayo, Robert G. Korneluk, David V. Goeddel, Albert S. Baldwin Jr., NF- κ B Antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to Suppress Caspase-8 Activation. *Science* 281(5383):1680-1683, 1998
 71. Chen C., Edelstein L.C., Gélinas C., The Rel/NF- κ B family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl- χ (L). *Mol Cell Biol.* 20(8):2687-95, 2000

72. Catz S.D., Johnson J.L., Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 1;20(50):7342-51, 2001
73. Weber G.L., Parat M.O., Binder Z.A., Gallia G.L., Riggins G.J., Abrogation of PIK3CA or PIK3R1 reduces proliferation, migration, and invasion in glioblastoma multiforme cells. *Oncotarget* 2(11):833-49, 2011
74. Chen L.W., Egan L., Li Z.W., Greten F.R., Kagnoff M.F., Karin M., The two faces of IKK and NF- κ B inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion *Nat Med.* 9(5): 575-81, 2003
75. Hayakawa Y., Maeda S., Nakagawa H., Hikiba Y., Shibata W., Sakamoto K., Yanai A., Hirata Y., Ogura K., Muto K., Itai A., Omata M., Effectiveness of I κ B kinase inhibitors in murine colitis-associated tumorigenesis *J Gastroenterol* 44:935–943, 2009
76. Tilstra J.S., Robinson A.R., Wang J., Gregg S.Q., Clauson C.L., Reay D.P., Nasto L.A., St Croix C.M., Usas A., Vo N., Huard J., Clemens P.R., Stolz D.B., Guttridge D.C., Watkins S.C., Garinis G.A., Wang Y., Niedernhofer L.J., Robbins P.D., NF- κ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Invest.* 2;122(7): 2601-12, 2012