

関節軟骨を守る2つの遺伝子 ——転写因子 Runx2、Runx3 による関節軟骨維持機構——

1. 発表者：

- 永田 向生（東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機能医学講座 整形外科
学 医学博士課程 [研究当時]）
田中 栄（東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機能医学講座 整形外科
学／東京大学医学部附属病院 整形外科・脊椎外科 教授）
齋藤 琢（東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機能医学講座 整形外科
学／東京大学医学部附属病院 整形外科・脊椎外科 准教授）

2. 発表のポイント：

- ◆ 遺伝子改変マウスや最新の転写解析技術を駆使して、転写因子である Runx2 と Runx3 がそれぞれ異なるメカニズムで関節軟骨を保持していることを明らかにしました。
- ◆ Runx2 は骨格形成を司る中心的な転写因子である一方で、成体の関節軟骨ではタンパク分解酵素を誘導して変形性関節症を進行させてしまうことが知られていましたが、炎症下では軟骨を構成するタンパクの産生をサポートしていることを新たに見出しました。また関節での作用が知られていなかった Runx3 が軟骨を構成するタンパクの産生を通じて関節保護に貢献していることも明らかにしました。
- ◆ 変形性関節症の患者数は膨大ですが、有効な治療薬はありません。Runx3 の関節保護作用のほか、Runx2 にも隠れた関節保護作用があることを示した本成果は、病態解明のみならず、新たな治療法開発に繋がることが期待されます。

3. 発表概要：

東京大学大学院医学系研究科の永田向生（医学博士課程 [研究当時]）、田中栄教授、齋藤琢准教授らのグループは、関節軟骨を守る2つの遺伝子を見出し、その作用を明らかにしました。

関節軟骨は2型コラーゲン（注1）などのタンパクによって構成され、表面はルブリシン（注2）などの滑らかなタンパクによって覆われています。これらのタンパクが減少すると軟骨が変性し、変形性関節症に至ります。この度、研究グループは Runx2（注3）、Runx3 という2つの転写因子（注4）がこれらのタンパクを作り出し、関節軟骨を保護していることを明らかにしました。Runx3 の関節軟骨での作用はこれまで知られていませんでしたし、Runx2 はむしろ変形性関節症を悪くすると考えられてきました。Runx3 の関節保護作用のほか、Runx2 にも隠れた関節保護作用があることを示した本成果は、変形性関節症の病態解明のみならず、治療法開発にも貢献すると期待されます。

本研究成果は2022年10月19日に英国科学誌「Nature Communications」のオンライン版に掲載されました。

4. 発表内容：

<研究の背景・先行研究における問題点>

関節軟骨の変性、すり減りは変形性関節症を引き起こします。変形性関節症は中高年の関節痛の最大の原因であり、約20年前の疫学調査では、膝関節だけで国内に2,530万人の患者が

おり、その内約 780 万人が日常生活に支障を来すほどの痛みを抱えていると報告されています。関節軟骨には血管がなく、軟骨細胞は血流からの豊富な栄養が届きにくい環境で、日々過酷な力学的負荷に耐え続けながら、2 型コラーゲンやアグリカン（注 5）などの軟骨を構成するタンパクを作って軟骨組織を維持し、またルブリシンなどを分泌して関節の表面を滑らかにすることで、関節が壊れないよう軟骨を守っています。

これまで本研究グループを始め、世界中の研究者が変形性関節症の病態を研究し、軟骨が変性するメカニズムを解明してきましたが、変形性関節症の進行を止めたり、すり減った軟骨を元に戻す方法はいまだ確立していません。転写因子 Sox9（注 6）が軟骨細胞の発生・分化に必須であり、Sox9 がなければ 2 型コラーゲンやアグリカンなど軟骨構成タンパクがほとんど産生されなくなることが分かっていますが、変形性関節症が進む中で Sox9 がどのように振舞うのか、軟骨構成タンパクや軟骨表面を保護するタンパクの産生がどのように制御されているのかは詳しくは分かっていませんでした。また変形性関節症を悪くしてしまう因子として、転写因子 Runx2 が知られていました。Runx2 は骨芽細胞の発生・分化に必須であり、Runx2 がなければ骨がほとんど作られないのですが、その一方で成体の関節軟骨においては 2 型コラーゲンを分解する MMP-13（注 7）という酵素を誘導し、軟骨破壊を促進してしまうことが知られていました。研究グループは以前、Runx2 と似た構造を持つ Runx1 が、Sox9 と協調して 2 型コラーゲンの産生を促し、軟骨を保護することを報告しました（Sci Rep. 9:7666, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-43948-3）。このことから、Runx2 にも軟骨を保護する作用があるのではないかと、また Runx ファミリーのもう一つの分子、Runx3 にも何か作用があるのではないかと考え、本研究を行いました。

< 研究内容（具体的な手法など詳細） >

マウスの膝を不安定にすることによって強い力学的負荷をかけて軟骨に炎症を引き起こし、変形性関節症を誘発するモデルを作成した上で、免疫組織染色によってタンパクの発現量を見たところ、Sox9 と Runx3 は次第に減少する一方、Runx2 には大きな変化はありませんでした。健全な軟骨では Runx3 は軟骨の表層から中間層あたりに多く発現しており、マウスにおいて軟骨でのみ Runx3 をノックアウトする（発現しないようにする）と表層ではルブリシン、中間層ではアグリカンの発現量が減り、変形性関節症が加速してしまいました（図 1）。RNA シーケンシング（注 8）、ChIP シーケンシング（注 9）によって、Runx3 がこの 2 つの分子の転写を直接制御していることも確認できました。次に、軟骨でのみ Runx2 の発現量を減らす実験を行ったところ、まず Runx2 の発現量を半分程度に減らした場合では過去の報告通り変形性関節症は抑制されましたが、Runx2 の発現量を 9 割以上減らしたところ、反対に変形性関節症は加速してしまいました（図 2）。Runx2 には従来から言われていた通り、MMP-13 を誘導して軟骨を分解してしまう作用もありますが、このような軟骨にとって悪い作用は Runx2 の量を半分にしてしまうと消えてしまい、変形性関節症の進行が抑えられました。一方で Runx2 は、炎症下の Sox9 が減少した状況において、2 型コラーゲンなどの軟骨構成タンパクの転写が減少しないよう、下支えしていることが、ChIP シーケンシングやレポーターアッセイなどによって分かりました。このような軟骨にとって良い作用は Runx2 の量が半分になっても十分発揮されていましたが、Runx2 の発現量を 9 割以上減らすと失われてしまい、その結果変形性関節症が進行してしまっただと考えられました。最後にウイルスベクター（注 10）を用いてマウス膝の軟骨に Runx3 を大量に発現させたところ、変形性関節症の進行を防ぐことが出来ました。

<社会的意義・今後の予定>

本研究では、軟骨を構成するタンパクの転写が、関節の状況に応じて複雑に制御されていることを明らかにしました。核酸医薬の技術の進歩により、転写因子も疾患治療の標的になりうる時代が到来しましたが、Runxファミリーによる関節軟骨の制御機構の解明は、関節軟骨の維持機構の理解を広げるだけでなく、治療法開発の一助にもなりうると期待されます。

なお本研究は、科研費「基盤研究(S) 骨・関節細胞のダイナミクスと免疫系の制御を包括した統合運動器学の確立（課題番号: 19H05654）」「国際共同研究強化(B) Prg4 に立脚した、細胞・分子の多層的アプローチによる関節形成・維持機構の解明（課題番号：18KK0254）」「基盤研究(C) Runx2,3 による関節軟骨の統合的制御機構の解明（課題番号：20K09451）」などにより実施されました。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Nature Communications」（オンライン版：10月19日）

論文タイトル：Runx2 and Runx3 differentially regulate articular chondrocytes during surgically induced osteoarthritis development

著者：Kosei Nagata, Hironori Hojo, Song Ho Chang, Hiroyuki Okada, Fumiko Yano, Ryota Chijimatsu, Yasunori Omata, Daisuke Mori, Yuma Makii, Manabu Kawata, Taizo Kaneko, Yasuhide Iwanaga, Hideki Nakamoto, Yuji Maenohara, Naohiro Tachibana, Hisatoshi Ishikura, Junya Higuchi, Yuki Taniguchi, Shinsuke Ohba, Ung-il Chung, Sakae Tanaka and Taku Saito*

DOI 番号：10.1038/s41467-022-33744-5

アブストラクト URL：https://doi.org/10.1038/s41467-022-33744-5

6. 問い合わせ先：

<研究内容に関するお問い合わせ先>

東京大学医学部附属病院 整形外科・脊椎外科

准教授 齋藤 琢（さいとう たく）

<広報担当者連絡先>

東京大学医学部附属病院 パブリック・リレーションセンター

担当：渡部、小岩井

電話：03-5800-9188（直通） E-mail：pr@adm.h.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

注1：2型コラーゲン

軟骨を形成するコラーゲンであり、軟骨組織を構成するタンパクの中で最も豊富であり、中心的な役割を果たす。

注2：ルブリシン

関節の表面を滑らかにするタンパクであり、関節軟骨の最表層の細胞から分泌される。

注 3 : Runx2

Runx related transcription factor 2 の略であり、転写因子の一種である。Runx ファミリーには Runx1, Runx2, Runx3 の 3 種類が知られており、構造は似ているが、それぞれ異なる作用も有する。Runx2 は骨芽細胞の発生・分化に必須であり、Runx2 をノックアウトすると骨がほとんど形成されないことが知られている。

注 4 : 転写因子

DNA の特定の配列に結合し、遺伝子の発現を制御するタンパクのこと。

注 5 : アグリカン

2 型コラーゲンとともに軟骨組織を構成するタンパクであり、水分の保持に重要な役割を果たす。

注 6 : Sox9

Sex determining region Y-box 9 の略であり、転写因子の一種である。Sox9 は胎生期に性分化の決定に関わるほか、軟骨細胞の発生・分化にも必須であり、Sox9 をノックアウトすると軟骨が形成されなくなる。2 型コラーゲン、アグリカンなど軟骨組織を構成する分子の転写を直接誘導する。

注 7 : MMP-13

Matrix metalloproteinase 13 の略であり、タンパク分解酵素の一種である。軟骨では主に 2 型コラーゲンの分解に関わり、変形性関節症を促進する分子の一つとして知られている。Runx2 は MMP-13 の転写誘導に関わることも報告されている。

注 8 : RNA シーケンシング

次世代シーケンサーを用いた解析技術の一つで、遺伝子の発現量を網羅的に解析する手法である。

注 9 : ChIP シーケンシング

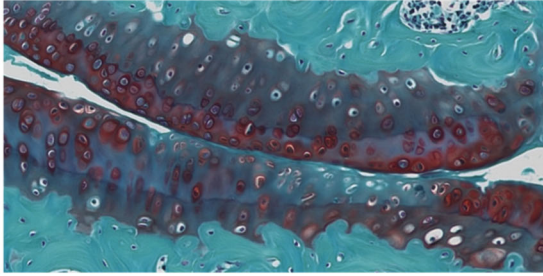
次世代シーケンサーを用いた解析技術の一つで、DNA に結合するタンパクに対する抗体を用いてタンパクと DNA の複合体を免疫沈降し、DNA の配列をシーケンシングすることによって、そのタンパクが転写制御する遺伝子を網羅的に調べることができる。

注 10 : ウイルスベクター

ベクターとは遺伝子を細胞に送達する手段を指すが、ウイルスベクターはウイルスを改造して作ったベクターのことを指す。

8. 添付資料：

対照群のマウス



軟骨でのみRunx3を
ノックアウトしたマウス

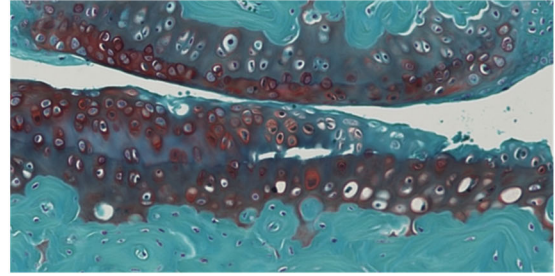
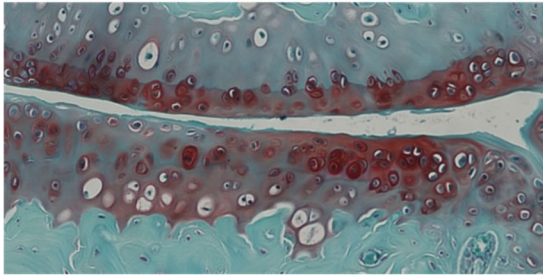


図1 Runx3の軟骨特異的ノックアウトマウスにおける変形性関節症の進行

マウスにおいて骨格成長後に軟骨細胞でのみRunx3をノックアウトし、外科的処置によって変形性膝関節症を誘発し、8週間後に解析を行った。Runx3をノックアウトしていないマウスを対照群とし、同様に外科的処置によって変形性膝関節症を誘発して比較した。赤が軟骨組織、水色が骨組織であるが、右のノックアウトマウスの関節は表面が不整で、軟骨組織の変性、破壊がより進行していた。

対照群のマウス



軟骨でのみRunx2を
ノックアウトしたマウス

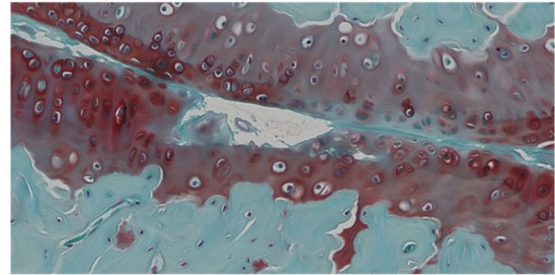


図2 Runx2の軟骨特異的ノックアウトマウスにおける変形性関節症の進行

マウスにおいて骨格成長後に軟骨細胞でのみRunx2をノックアウトし、外科的処置によって変形性膝関節症を誘発し、8週間後に解析を行った。Runx2をノックアウトしていないマウスを対照群とし、同様に外科的処置によって変形性膝関節症を誘発して比較した。赤が軟骨組織、水色が骨組織であるが、右のノックアウトマウスの関節では軟骨組織の変性、破壊がより進行していた。