

Title	WntアンタゴニストFRZBの関節軟骨における発現動態とその発現制御機構の解明
Author(s)	八木, 寛子
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/61669">https://doi.org/10.18910/61669</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

学位論文

Wnt アンタゴニスト **FRZB** の関節軟骨における発現動態と  
その発現制御機構の解明

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

分子病態口腔科学講座

(歯周病分子病態学教室)

八木 寛子

## 緒言

近年、超高齢者社会を迎え、骨粗鬆症や変形性関節症などの運動器疾患が急増し、そのため日常生活動作 (ADL)あるいは生活の質 (QOL)の低下を招き、国民医療経済にも大きな影響を与えている。骨粗鬆症は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスが骨吸収優位となることで発症および進行することが明らかとなっている<sup>1)2)3)</sup>。これらの知見に基づいて、様々な骨粗鬆症に対する有効な治療薬が開発されている<sup>4)5)6)7)8)</sup>。一方、変形性関節症は関節軟骨表層の摩耗、変性あるいは断裂から始まり、関節軟骨の破壊や関節周囲への骨棘形成により、関節構造の変形および機能障害を招く疾患である。膝関節および股関節に好発し、変形性膝関節症にいたっては、患者数は約 2500 万人におよぶと報告されている<sup>9)</sup>。また変形性関節症は、歯科領域においても発症し、IV 型顎関節症として知られており、治療が困難とされている。関節軟骨組織は、II 型コラーゲン<sup>10)11)</sup>および PRG4 (proteoglycan 4)<sup>12)13)</sup>などの関節軟骨特異的な非コラーゲン基質に富み、これら関節軟骨基質が関節組織に潤滑性あるいは衝撃吸収性を賦与させている<sup>14)15)16)</sup>。しかし関節軟骨への過度な機械的刺激あるいは加齢などの要因が、関節軟骨細胞の肥大化、関節軟骨組織における X 型コラーゲンの発現増加、関節軟骨基質分解酵素である MMP (matrix metalloproteinase) および ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs)の発現上昇あるいは活性化を誘発し、関節軟骨組織を破壊し、変形

性関節症を引き起こすと考えられている<sup>17) 18) 19) 20) 21) 22)</sup>。しかしながら、これら関節軟骨の変性を誘発する詳細な分子メカニズムが不明であるため、骨粗鬆症の治療法開発と比較して、変形性関節症に対する治療法の開発は滞っている。現時点では、変形性関節症の治療法は、理学療法による補足的な進行抑制および消炎鎮痛剤による疼痛コントロールなどの対症療法が主体であり、著しい関節の変形あるいは運動障害をきたす症例に対しては手術侵襲の大きい人工関節置換術が適応されている状況である<sup>23)</sup>。人工関節置換術も術部関節の可動域が限定され、日常生活の活動は制限されるだけでなく、人工関節置換術を施しても難治性の症例が少なくない。したがって、既存の治療法では変形性関節症により低下した ADL および QOL を回復させることは未だ大きな課題である。以上から、変形性関節症の発症メカニズムの解明と、その知見に基づく科学的に有効な原因療法の確立が渴望されている。

変形性関節症の発症メカニズムの解明を目的として、ヒトゲノムにおける変形性関節症疾患感受性遺伝子の探索が行われている。近年、FRZB (frizzled-related protein B) 遺伝子のアルギニン 200 (R200W) およびアルギニン 324 (R324G) の遺伝子多型が、変形性関節症の発症に関与することが報告されている<sup>24)</sup>。また、*Frzb* ノックアウトマウスを用いた変形性関節症モデルにおいても、*Mmp3* 発現上昇を伴う関節軟骨の破壊が認められ、変形性関節症と *Frzb* の関連性が示されている<sup>25) 26)</sup>。これら知見より、*Frzb* が変形性関節症発症抑制因子として機能していると示唆される。FRZB は分子量約 36kDa の分泌型糖タンパク質で

あり、Wnt 受容体 **Frizzled** と相同なシステインリッチドメインを有しており、Wnt に結合して Wnt アンタゴニストとして機能することが知られている<sup>27)28)</sup>。前述の **R200W** および **R324G** の **FRZB** 変異体では、Wnt アンタゴニストとしての機能が低下することが示されている<sup>24)</sup>。Wnt は、**Frizzled** と共役受容体 **LRP5/6** (low density lipoprotein receptor-related protein 5/6) と結合して、Wnt シグナル分子  **$\beta$ -catenin** を活性化する<sup>29)30)</sup>。 **$\beta$ -catenin** は核内に移行し、転写因子 **Tcf** (T-cell factor)あるいは **LEF1** (lymphoid enhancer-binding factor 1) と結合して、生物学的作用を発揮する<sup>31)32)</sup>。Wnt は、骨形成および骨代謝の制御において重要な役割を果たすことが知られており<sup>29)</sup>、Wnt のアンタゴニスト **Sclerostin** に対するヒト型抗体が骨粗鬆症に応用されつつある<sup>6)</sup>。一方、Wnt シグナルは、関節軟骨に対して変形性関節症のリスクファクターと考え始められている<sup>33)34)</sup>。関節軟骨特異的に活性化型  **$\beta$ -catenin** を発現するトランスジェニックマウスが、関節軟骨における **MMP13** および X 型コラーゲンの発現上昇と、それに伴う関節軟骨破壊の促進および骨棘形成などの変形性関節症の病態を呈する<sup>34)</sup>。注目すべき点として、ヒト変形性関節症関節軟骨では、 **$\beta$ -catenin** のタンパク質が関節軟骨細胞に蓄積し、その蓄積の程度が変形性関節症の病態進行に相関することが示されている<sup>34)</sup>。

以上の研究結果から、関節軟骨における Wnt シグナルの抑制が、変形性関節症の抑止に貢献すると考えられ、その治療標的分子として **FRZB** の役割が期待される。そこで本研究では、**FRZB** の発現制御機構を解明することにより、変形性関節症の治療法の確立に寄与す

ることを目指した。

## 方法

### 1. 細胞培養

ヒト軟骨細胞様株 SW1353、ヒト胎児腎臓由来細胞株変異体 293 およびチャイニーズハムスター卵巣由来細胞株 CHO-K1 は理研細胞バンク (埼玉, 日本)より購入した。293 よりトランスフェクション効率の良い亜株、293FT は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)より購入した。レンチウイルスパッケージング細胞、LentiX-293T は TAKARA (京都, 日本)より購入した。SW1353 細胞、293 細胞、293FT 細胞および LentiX-293T 細胞は 10% ウシ胎仔血清 (FBS, JHR Bioscience, Lenexa, KA, USA) および硫酸カナマイシン 125 mg/l (ファルマ株式会社, 東京, 日本)を含む DMEM 培地 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) にて、CHO-K1 細胞は 10 % FBS およびペニシリン-ストレプトマイシン-L-グルタミン溶液 (x100) (Wako, 大阪, 日本)を含む $\alpha$ -MEM 培地(Sigma-Aldrich)にて、37°C、5% 二酸化炭素気相下で培養した。

### 2. トランスフェクション

細胞へのトランスフェクションはリポフェクション法により行った。リポフェクションには、X-treme GENE 9 (Roche, Basel, Schweiz)あるいは PEI 'Max'<sup>35)</sup>を用いた。目的遺伝子を組み込んだプラスミド (1 $\mu$ g) と X-Treme Gene 9 あるいは PEI 'Max'との混和液を FBS

非含有 DMEM 中で、30 分間室温にて反応させ、DNA-リポソーム複合体形成させ、細胞培養液中に添加してトランスフェクションを行った。

### 3. 発現ベクター、レンチウイルスおよびアデノウイルスの作製

6xMyc-Osterix 発現ベクター<sup>36)</sup>を EcoR I および Xba I にて制限酵素処理にて切り出した Osterix cDNA を、Flag タグを付与した pLV5IN-CMV-Pur (TAKARA, 京都, 日本) の EcoR I および Xba I 切断部位にライゲーションして、Flag-Osterix レンチウイルスベクターを作製した。Flag-Osterix レンチウイルスは、Flag-Osterix レンチウイルスベクターを Lentiviral High Titer Packaging Mix (TAKARA) と共に Lenti X-293T 細胞にトランスフェクションして作製した。

BMP2、Smad6、Runx2、Dominant-Negative (DN)-Runx2、Osterix、Msx2、および Ihh アデノウイルスは過去の論文に従って用いた<sup>37)</sup>。Wnt3a アデノウイルスベクターは、Wnt3a (addgene, MA, USA) cDNA をアデノウイルスベクター pAxCawt (TAKARA) に挿入して作製した。Wnt3a アデノウイルスベクターを Adenovirus genome DNA-TPC (TAKARA) とともに、293 細胞にトランスフェクションし、Saito らの方法にて<sup>38)</sup> Wnt3a アデノウイルスを作製した。



#### 4. リコンビナント BMP2 作製

Ichida らの方法にて<sup>39)</sup>CHO-K1 細胞に BMP2 アデノウイルスを感染させ、24 時間培養後に 10% FBS 含有 $\alpha$ -MEM と培地交換し、さらに 72 時間培養した。培養後、遠心 (1200rpm、5 分間) にて上清を回収し、リコンビナント BMP2 として実験に用いた。

#### 5. Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)による mRNA の定量

生後 0 日齢 C57BL マウス (日本 SLC, 静岡, 日本)より、脳、心臓、肺、胃、肝、腸、腎、皮膚、頭蓋骨、上顎骨、胸骨、四肢骨および肋骨を採取し、RNA later (Ambion, Austin, TX, USA)に浸漬した後、組織粉碎専用機 Micro Smash (TOMY, 東京, 日本)を用いて粉碎 ((遠心 4000rpm、30 秒間、氷上留置、1 分間) x2 回)し、得られた上清から NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Duren, Germany)を用いて全 RNA を精製した。培養細胞の全 RNA は NucleoSpin RNA Plus (TAKARA) を用いて精製した。精製した全 RNA を 65°C、10 分間変性させた後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, 大阪, 日本) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。mRNA 発現の定量は、得られた cDNA を鋳型として、Taqman PCR protocol に従い、StepOnePlus (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA) を用いて行った。使用した Taqman プローブおよびプライマーは、表 1 に示す。

## 6. マウス関節軟骨細胞の採取

生後 4 日齢 ICR マウス (日本 SLC) の膝関節より、実体顕微鏡下で関節軟骨を採取し、0.25% トリプシン (Sigma-Aldrich) 含有 HBSS (-) ハンクス平衡塩溶液 (Wako) にて 37°C、60 分間インキュベーション後、さらに 0.25% コラゲナーゼ含有 DMEM にて 37°C、60 分間処理を行った。セルストレイナー (Corning, NY, USA) で濾過後、濾過液を遠心 (1200rpm、5 分間) して細胞を回収した。回収した細胞を 10% FBS 含有 DMEM に懸濁し、ファイブロネクチンコートディッシュ (Corning) に播種し、37°C、5% 二酸化炭素気相下で 20 分間培養した。細胞培養液をアスピレーターで吸引し、リン酸緩衝生理的食塩水 (以下 PBS) (Wako) にて洗浄後、ディッシュに付着している細胞をマウス関節軟骨細胞として、10% FBS 含有 DMEM 存在下で培養を行った<sup>40)</sup>。

## 7. マウス大腿骨骨頭の採取と器官培養

3 週齢の ICR マウス (日本 SLC) の大腿骨より実体顕微鏡下で骨頭を採取し、FBS 非含有 DMEM 培養液に浸漬させ、IL-1 $\alpha$  (10ng/ml) 存在下あるいは非存在下で、37°C、5% 二酸化炭素気相下で 6 時間培養した。6 時間培養後に 10% FBS 含有 DMEM と培地交換し、5 日間培養を行った。培養した各サンプルを、4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (Wako) にて 4°C で 1 週間固定を行った後、5% エチレンジアミン四酢酸、4°C にて 1 週間の脱灰処理を行った<sup>41)</sup>。その後、通法に従ってパラフィンに包埋し、厚さ 4 $\mu$ m の組織切

片を作製した。

#### 8. ファストグリーン・サフラニン O 二重染色

パラフィン組織切片を通法に従って脱パラフィン処理後、0.1% ファストグリーン染色液 (Wako) に 10 分間浸漬し、1% 酢酸 (2 分間、2 回) にて脱色後、0.2% サフラニン O 染色液 (Wako) にて 20 分間染色を行った。無水エタノールによる脱色後、封入し、顕微鏡下で観察した。

#### 9. ウェスタンブロッティング法

細胞を PBS で洗浄後、細胞溶解液 (20mM HEPES pH7.4、150mM 塩化ナトリウム、1mM グリコールエーテルジアミン四酢酸、1.5mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール、1% Triton X-100、10 $\mu$ g/ml アプロチニン、10 $\mu$ g/ml ロイペプチン、1mM ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩、0.2mM オルソバナジン酸ナトリウム) に溶解し、この細胞溶解液を遠心 (15000g、20 分間) の後、上清を 0.5M メルカプトエタノール含有ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) サンプルバッファーで熱溶解 (95°C、5 分間) し、サンプルとした。サンプルを 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法により分離し、ニトロセルロースメンブレンに転写後、一次抗体として、マウス抗 $\beta$ -Actin 抗体 (MBL, 名古屋, 日本)、マウス抗 Flag 抗体 (Sigma-Aldrich)、ウサギ抗 Sp7/Osterix 抗体 (abcam, Cambridge, UK) あるいは

はヤギ抗 Myc 抗体 (abcam)と反応させ、二次抗体として西洋わさび過酸化酵素を付与した抗マウス IgG 抗体、抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson Immuno Research, PA, USA) 、あるいは抗ヤギ IgG 抗体 (MBL)と反応させた。イムノスターLD (Wako)を用いて発光シグナルを増幅した後、X線フィルム (Kodak, New York, NY, USA) に現像した。

#### 10. *FRZB* 遺伝子プロモータールシフェラーゼレポータープラスミドの作製

ヒト軟骨細胞様株 SW1353 より nexttec 1-step (clean columns) (TOHO, 東京, 日本)を用いてゲノム DNA を精製した。精製したゲノム DNA を用いて、*FRZB* 遺伝子プロモーター 2729 bp の領域を Hind III あるいは Xho I 配列を付与したプライマー (表 2) にて PCR 増幅した。PCR 産物を Hind III および Xho I にて制限酵素処理した pGL4.10 ルシフェラーゼベクター (Promega, Madison, WI, USA) にライゲーションし、レポータープラスミドを作製した。この 2729 bp の範囲を 1500 bp、1000 bp および 500 bp の長さとなるように、各々 Hind III あるいは Xho I 配列を付与したプライマー (表 2) を用いて PCR を行った。PCR 産物を、同様に、ルシフェラーゼベクターにライゲーションし、各レポータープラスミドを作製した。

#### 11. ルシフェラーゼアッセイ法

作製したルシフェラーゼレポータープラスミドを X-treme GENE 9 を用いて SW1353 細

胞にトランスフェクションし、12 時間培養後に 10% FBS 含有 DMEM と培地交換を行い、BMP2、Msx2 および Osterix 発現アデノウイルスを添加した。アデノウイルス添加 48 時間後にルシフェラーゼアッセイ用細胞溶解液にて細胞を溶解し、サンプルとした。すべてのサンプルは、ルシフェラーゼ基質液 (Promega) と混合した後、Glomax 96 microplate Luminomater (Promega) を用いて発光量を計測した。

## 12. OSTERIX のノックダウン

siDirect (<http://sidirect2.nai.jp/>)にて OSTERIX mRNA 3'非翻訳領域に対する標的配列を決定し、その標的配列に対するプライマー (表 3) を、通法によりアニーリングし、2 本鎖リンカーを作製した。リンカーを、Age I および EcoR I による制限酵素処理を行った pLKO.1-TRC cloning vector (addgene) にライゲーションし、OSTERIX shRNA ベクターを作製した。OSTERIX shRNA ベクターを pCMV-VSV-G (addgene) 、pRSV-Rev (addgene) および pMDLg/pRRE (addgene) と共に Lenti X-293T 細胞にトランスフェクションし、OSTERIX shRNA レンチウイルスを作製した。作製した OSTERIX shRNA レンチウイルスは、ポリブレン (5µg/ml) 存在下で SW1353 細胞に感染させた。感染 24 時間後に 10% FBS 含有 DMEM と培地交換を行い、さらに 48 時間培養を行った。レンチウイルス感染 72 時間後、FBS 非含有 DMEM と培地交換した。12 時間のスタベーションを行い、リコンビナント BMP2 存在下あるいは非存在下で 24 時間培養後に RNA およびタンパク質を回収した。

OSTERIX のノックダウン効果はウエスタンブロッティング法にて確認した。

### 13. クロマチン免疫沈降法

Flag-Osterix レンチウイルスベクターを Lenticular High Titer Packaging Mix と共に Lenti X-293T 細胞にトランスフェクションして、レンチウイルスを作製し、ポリブレン (5 $\mu$ g/ml) 存在下で SW1353 細胞に感染させた。感染 24 時間後、10% FBS 含有 DMEM と培地交換を行い、さらに 48 時間培養を行った。レンチウイルス感染 72 時間後に FBS 非含有 DMEM と培地交換して 12 時間のスタベーションを行い、リコンビナント BMP2 存在下あるいは非存在下で 24 時間した。培養液中に 1% ホルムアルデヒド (Wako) を添加し、室温にて 10 分間 DNA/タンパク質結合のクロスリンク操作を行った。細胞溶解液 (50mM トリス塩酸緩衝液 [pH8.0]、1% ドデシル硫酸ナトリウム、10mM エチレンジアミン四酢酸、10 $\mu$ g/ml アプロチニン、10 $\mu$ g/ml ロイペプチン)に懸濁し、Bioruptor (Cosmo Bio, 東京, 日本)にてソニケーション (氷冷中で 30 秒間ソニケーション、30 秒間静置を 15 サイクル) により DNA を断片化し、遠心 (4 $^{\circ}$ C、13000rpm、10 分間)後、細胞溶解液を作製した。この細胞溶解液に、マウス抗 Flag 抗体 (Sigma-Aldrich) 1 $\mu$ g を結合させた Dynabeads Protein G (Life Technologies)を添加し、各細胞溶解液を 4 $^{\circ}$ C、16 時間反応させてクロマチン免疫沈降を行った。この免疫沈降サンプルを脱架橋、RNase 処理 (37 $^{\circ}$ C、1 時間)およびプロテアーゼ処理 (45 $^{\circ}$ C、1 時間)を行って DNA サンプルとした。この DNA サンプルを FRZB 遺伝子プロ

モーター500 bp の領域を認識する各プライマー (表 4) と KOD FX-neo (TOYOBO)を用いて PCR 反応 ((94°C 2 分間) x1 サイクル、(98°C 10 秒間、60°C 30 秒間、68°C 30 秒間) x35 サイクル、(68°C 30 秒間) x1 サイクル)を行い、1%アガロース(Wako)ゲルにて電気泳動(100V、20 分間)を行い、ChemiDoc™ XRS+ (BIO-RAD, CA, USA)にて撮影を行った。

#### 14. 免疫共沈降法

293FT 細胞に、Flag-Osterix-pLVSiN-CMV-Pur ベクター、6xMyc-Msx2-pcDNA3 ベクター<sup>42)</sup>のいずれかまたは両者をトランスフェクションし、48 時間培養後に細胞を PBS にて洗浄し、細胞溶解液に溶解した。この細胞溶解液を遠心し (4°C、15000g、20 分間)、上清を全タンパク質抽出液とした。このサンプルにマウス抗 Flag 抗体 (Sigma-Aldrich) 1µg を添加し、4°C、3 時間反応後、Dynabeads Protein G を添加して 4°C、1 時間反応させた。反応後、サンプルを PBS にて 5 回洗浄し、0.5M メルカプトエタノール含有 SDS サンプルバッファーで熱溶解 (95°C、5 分間)した。このサンプルを 7.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離し、一次抗体にヤギ抗 Myc 抗体を用いてウエスタンブロッティング法を行った。

## 15. 統計処理

実験結果は、平均値±標準偏差 (S.D.)で表した。2 群間比較には Student-*t* 検定を、3 群間以上の比較には Tukey 法を用いて多重比較検定を行った。



## 結果

### 1. マウスにおける *Frzb* 発現組織および細胞の検討

マウス組織における *Frzb* の発現部位を探索するために、生後 0 日齢 C57BL マウスより脳、心臓、肺、胃、肝、腸、腎、皮膚、頭蓋骨、上顎骨、胸骨、長管骨および肋骨から全 RNA を採取し、RT-qPCR 法により *Frzb* mRNA の発現を検討した。その結果、胸骨、長管骨ならびに肋骨において *Frzb* の高い発現を認めた (図 1)。骨および軟骨を含む組織で *Frzb* の高い発現を認めたので、骨および軟骨を構成する細胞における *Frzb* の発現を検索するために、生後 4 日齢 ICR マウスより骨芽細胞、肋軟骨細胞および関節軟骨細胞を採取し、RT-qPCR 法にて *Frzb* の発現を比較検討した。その結果、骨芽細胞では *Frzb* の発現は認めなかったが、肋軟骨細胞で *Frzb* の強い発現を、関節軟骨細胞でさらに高い発現を認めた (図 2)。以上の結果より、*Frzb* は関節軟骨に高発現し、その機能制御に関与していると推察された。

### 2. 変形性関節症様状況下における *Frzb* 発現検討

変形性関節症と *Frzb* 発現の関連を検討するために、過去の論文を参考にして<sup>22) 43)</sup>、炎症性サイトカイン IL-1 $\alpha$ を用いて、変形性関節症様の状況を作成し、その状況における *Frzb* の発現を実験的に検討した。生後 3 週齢オス ICR マウス大腿骨骨頭を用いた器官培養系に、

IL-1 $\alpha$ を作用させると、関節軟骨表層におけるサフラニン O 染色性の低下を伴う関節軟骨の破壊を認めた (図 3A)。また生後 4 日齢 ICR マウス由来の関節軟骨細胞に IL-1 $\alpha$ を添加すると、変形性関節症マーカーである *Adamts4* および *Adamts5* の発現上昇を認めた (図 3B)。このように関節軟骨組織あるいは関節軟骨細胞に IL-1 $\alpha$ を作用させると、変形性関節症様状況が誘発できることが確認された。そこで、関節軟骨細胞に IL-1 $\alpha$ を添加した時の *Frzb* の発現を検討したところ、*Frzb* の発現が顕著に抑制された (図 3C)。したがって、変形性関節症においては *Frzb* の発現が低下し、そのことが、発症要因の一つである可能性が推察された。

### 3. *FRZB* の発現の誘導シグナル経路の検討

*FRZB* が関節軟骨で高発現し、変形性関節症との関連性が示唆されたので、*FRZB* の発現を誘導するシグナル経路を検討することとした。*FRZB* の発現機構を解析するためのモデルとして、関節軟骨に関する実験によく用いられるヒト軟骨細胞様株 SW1353 を選択した<sup>44)</sup>。まず、SW1353 細胞に IL-1 $\alpha$ を作用させると、変形性関節症マーカーである *MMP13* の発現上昇が認められた (図 4)。そこで、*FRZB* を発現誘導するサイトカインを検索するために、軟骨および骨形成に関与するサイトカイン BMP2、Wnt3a およびインディアンヘッジホッグの *FRZB* 発現に対する関与を検討した。SW1353 細胞に BMP2 を作用させると *FRZB* の発現は顕著に促進されたが、Wnt3a およびインディアンヘッジホッグは *FRZB* の発現に効

果を示さなかった (図 5)。次に、*FRZB* の発現に対する *BMP2* シグナルの関与を検討するため、*BMP2* シグナル分子 *Smad* の阻害分子である *Smad6* を過剰発現させ、*FRZB* の発現に対する影響を検索した。その結果、*Smad6* の過剰発現は *BMP2* の *FRZB* 発現誘導効果を阻害した (図 6)。以上から、*BMP2* は *Smad* シグナルを介して *FRZB* の発現を誘導することが示唆された。さらに *FRZB* の発現制御メカニズムを探索するために、*BMP2* の下流で機能する転写因子 *Runx2*<sup>45)</sup>、*Osterix*<sup>46)</sup> および *Msx2*<sup>47)</sup> の *FRZB* の発現に対する効果を検討した。その結果、*Osterix* および *Msx2* の過剰発現は *FRZB* の発現を促進した (図 7)。一方、*Runx2* の過剰発現は効果を示さなかった。*Runx2* が *FRZB* 発現に関与しないことをさらに検証するために、Dominant-Negative *Runx2* (DN-*Runx2*)を用いて検討した。DN-*Runx2* の過剰発現は、*BMP2* 誘導性 *ALP* 発現誘導を阻害したが (図 8A)、*BMP2* による *FRZB* の発現誘導を低下させなかった (図 8B)。このことから、*BMP2* により誘導される *FRZB* の発現に *Runx2* が関与しないと考えられた。以上の結果より、*BMP2* は、*Osterix* および *Msx2* を介して *FRZB* の発現を促進することが示唆された。

#### 4. *FRZB* 遺伝子プロモーターに対する *Osterix* および *Msx2* の効果

*BMP2* 誘導性 *FRZB* 発現上昇に *Osterix* および *Msx2* の関与が示唆されたので、*FRZB* 遺伝子プロモーターに対する *Osterix* ならびに *Msx2* の効果を検討した。*FRZB* 遺伝子プロモーター領域の 2729 bp、1500 bp、1000 bp および 500 bp の *FRZB* 遺伝子プロモーターを

ルシフェラーゼレポーター遺伝子に融合したコンストラクトを作製し、ルシフェラーゼ活性に対する BMP2、Osterix および Msx2 の効果を検討した。その結果、いずれの *FRZB* 遺伝子プロモーターコンストラクトにおいても、BMP2 および Msx2 は、*FRZB* 遺伝子転写活性において増加傾向を示した。さらに Osterix は著明に *FRZB* 遺伝子の転写活性をした (図 9)。したがって、Osterix および Msx2 は *FRZB* 遺伝子の発現を調節する転写因子であることが示唆された。

#### 5. BMP2 誘導性 *FRZB* 発現に対する Osterix の役割

BMP2 誘導性の *FRZB* 発現上昇に対する Osterix の関与をさらに検討するために、OSTERIX に対する shRNA レンチウイルスを作製し、実験を行った。OSTERIX shRNA レンチウイルスは、BMP2 誘導性の OSTERIX の発現を阻害した (図 10A)。次に OSTERIX をノックダウンした際の *FRZB* の発現を検討したところ、OSTERIX のノックダウンにより、BMP2 誘導性 *FRZB* 発現上昇は顕著に抑制された (図 10B)。したがって、BMP2 による *FRZB* 発現誘導には OSTERIX が必要であることが明らかとなった。次に Osterix の *FRZB* 遺伝子プロモーター領域への結合をクロマチン免疫沈降法にて評価した。*FRZB* 遺伝子プロモーターアッセイの実験結果より、Osterix は *FRZB* 遺伝子プロモーターの 500bp 周辺の領域を介してその転写活性を制御することが示されたので、この領域を図 11A のように 4 つの領域に分けて、クロマチン免疫沈降法を行った。SW1353 細胞に Flag-Osterix を感染させ (図

11B)、実験を行った。その結果、Flag-Osterix が BMP2 刺激依存性に *FRZB* 遺伝子プロモーター領域に結合することが示された (図 11C)。以上の実験から、Osterix は *FRZB* 遺伝子プロモーターの 500bp 周辺の領域を介して、*FRZB* 遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。

## 6. Osterix および Msx2 の物理的結合性の評価

*FRZB* 遺伝子の発現誘導における Osterix と Msx2 の相互関係を明らかにするために、Osterix および Msx2 の物理的結合を免疫共沈降法により検討した。実験の結果、Osterix と Msx2 の物理的結合を認めた (図 12)。以上の実験結果より、Osterix および Msx2 は、互いに結合することにより、*FRZB* 遺伝子発現の制御に関与している可能性が示唆された。

## 考察

本研究では、まず変形性関節症の疾患関連候補遺伝子の一つとして同定されている *FRZB* の発現分布とその発現動態について検討を行った。その結果、*Frzb* が関節軟骨細胞に高発現していること、さらに *IL-1 $\alpha$* が関節軟骨細胞における *Frzb* の発現を著明に低下させることを見出した。したがって、*FRZB* は、関節軟骨組織の恒常性維持に関与する因子であることが示唆された。これらの研究結果は、ヒト変形性関節症と *FRZB* 遺伝子の多型性に関する報告<sup>24)</sup>と *Frzb* 遺伝子欠損マウスを用いた知見<sup>25)</sup>にもよく符合する。変形性関節症の発症における *FRZB* の発現の重要性をさらに検証するために、現在、マウス関節軟骨を *IL-1 $\alpha$*  存在下で器官培養し、変形性関節症様状況下での *Frzb* の発現変動を検索している。この実験により、変形性関節症の発症過程における *FRZB* の関与が明らかになると思われる。また *FRZB* は、関節軟骨代謝のバイオマーカーとなる可能性も期待され、変形性関節症の診断および治療効果の判定などに寄与できると考えられる。そのためには、血液中および関節組織における *FRZB* を簡便かつ鋭敏に検出できる解析法の開発が必要である。

変形性関節症の関節滑膜細胞において、*IL-1 $\alpha$* 、*IL-1 $\beta$* あるいは *TNF- $\alpha$* などの炎症性サイトカインの分泌が増加することが報告されている<sup>48)</sup>。これら炎症性サイトカインの細胞内シグナルでは *I $\kappa$ B* のリン酸化とタンパク質分解が起こり、この結果 *NF- $\kappa$ B* が活性化され転写因子として機能する<sup>49) 50)</sup>。*NF- $\kappa$ B* は、関節軟骨において *MMP13*<sup>51) 52)</sup>あるいは *ADAMTS5*

<sup>53)</sup>の発現を誘導するので、変形性関節症を惹起する要因の一つと考えられている<sup>54) 55)</sup>。一方 **NF-κB** は、特定の細胞内シグナル伝達因子の活性を抑制することが示されている<sup>56)</sup>。**IL-1α**が関節軟骨細胞において **Frzb** の発現を抑制するメカニズムとして、このような **NF-κB** による細胞内シグナル伝達抑制因子としての機能が関与していると推察される。さらに、**Frzb** ノックアウトマウスの関節軟骨細胞において、**IL-1β**による **Mmp13** 発現上昇効果が増強されることが報告されている<sup>57)</sup>。以上から、変形性関節症において **FRZB** 発現が低下することが、炎症性サイトカインによる関節軟骨基質分解酵素の発現を誘導され、さらに変形性関節症の進行が憎悪する可能性が考えられる。したがって、炎症性サイトカインが **FRZB** の発現を阻害する分子メカニズムが明らかになれば、そのステップをブロックする変形性関節症に対する新たな治療戦略を構築できると期待される。

変形性関節症の診断および治療の標的分子となり得る **FRZB** の発現制御メカニズムの解明を試みた結果、**BMP2-Smad** シグナルが重要な役割を果たしていることを見出した。また **FRZB** の発現に関与する転写因子について検討を行い、**Osterix** および **Msx2** が **FRZB** の発現制御に関与していることを明らかにした。特に、ノックダウン実験、**ChIP** 解析および **FRZB** 遺伝子プロモーターレポーターアッセイの実験結果から、**Osterix** が **FRZB** の発現制御過程において必須的役割を果たしていることが示された。興味あることに、**Msx2** の過剰発現が **FRZB** の発現を誘導すること、そして **Msx2** が **Osterix** と物理的に結合することを明らかにした。したがって、**BMP2-Smad** シグナルは、**Osterix** と **Msx2** の連携を介して、**FRZB**

遺伝子の発現を制御していると示唆される。**Osterix** は **Zinc finger domain** を有する **Sp** ファミリー転写因子の一つで、遺伝子プロモーター領域の **GC** リッチ配列に結合することが知られている<sup>46)</sup>。また、**Osterix** は、**Runx2** や **NFAT** など様々な転写因子と転写複合体を形成し、標的遺伝子の転写発現制御に関与することが報告されている<sup>36) 58)</sup>。これに対して、**Osterix** はホメオボックス型転写因子 **Dlx5** と結合し、**Dlx5** が遺伝子プロモーター領域の **AT** リッチ配列に結合し、**Osterix** と標的遺伝子との結合は間接的であると報告されている<sup>59)</sup>。以上の知見から、**Osterix** はパートナーとなる転写因子によって、標的遺伝子のプロモーターに対して、異なる結合様式を有していると考えられる。これら報告と本実験結果を考慮すると、**Osterix** は、**Msx2** と転写複合体を形成し、**FRZB** 遺伝子プロモーター領域の **GC** リッチ配列に直接結合する可能性と **Msx2** が認識すると考えられる **AT** リッチ配列<sup>60) 61)</sup>を介して間接的に **FRZB** 遺伝子の転写制御を行っている可能性が考えられる。しかしながら、**FRZB** 遺伝子プロモーター活性に対する **Msx2** の効果は、**Osterix** と異なり軽微であった。したがって **Osterix** と **Msx2** は、転写複合体を形成しながらも **FRZB** 遺伝子プロモーター活性に対する作用の程度に差があり、**FRZB** 遺伝子の発現においては **Osterix** が主体となっていると推測される。今後、**Msx2** のノックダウン実験あるいは **Osterix** と **Msx2** の結合を阻害する実験系での解析により、この点をさらに明確にできると思われる。**Runx2** も **BMP2-Smad** シグナルに連携し<sup>45)</sup>、骨および軟骨の形成に必須的役割を果たしているので<sup>62)</sup>、**FRZB** の発現制御に関与している可能性が推察された。しかしながら、**Runx2** の過剰発



現実実験および DN-Runx2 を用いた loss-of-function の実験により、Runx2 は *FRZB* 発現には関与しないことが示された。またこの知見は、Runx2 遺伝子欠損由来マウス頭蓋骨由来細胞株 C2 に BMP2 を作用させると、*Frzb* の発現が上昇する実験結果によっても支持される(結果示さず)。Osterix は、Runx2 の下流で発現し、機能する転写因子であるが<sup>46)</sup>、*Msx2* が Runx2 非依存的に Osterix の発現制御に関与していることが報告されている<sup>63)</sup>。したがって、*FRZB* の発現誘導過程においては *Msx2* 等を介した Runx2 非依存的な経路が関与している可能性が考えられる。

BMP シグナルが、関節軟骨特異的プロテオグリカン PRG4 の発現<sup>64) 65) 66) 67)</sup>および II 型コラーゲンの発現を誘導することと、関節軟骨の形成および関節軟骨構造維持に寄与することが報告されている<sup>68) 69) 70) 71) 72)</sup>。一方、変形性関節症患者および変形性関節症モデルマウスの関節軟骨において、BMP2 および BMP2 下流で機能する転写因子の発現が上昇することが示されている<sup>19) 73) 74) 75) 76)</sup>。Runx2 ヘテロ遺伝子欠損マウスを用いた変形性関節症モデルによる解析から、BMP2 が関節軟骨における X 型コラーゲンおよび *Mmp13* の発現を上昇させ、関節軟骨細胞の肥大化を誘導して、変形性関節症発症に関与することが示されている<sup>73)</sup>。これら知見を総合的に鑑みると、BMP2 は関節軟骨の形成および維持と変形性関節症の発症において相反する作用を有しており、その相反する作用は、細胞環境や時間的な要因により、振り分けられていると推察される。

変形性関節症患者および変形性関節症モデル動物の関節軟骨において、Wnt<sup>74) 77) 78) 79)</sup>お

よびβ-catenin<sup>34) 74) 80)</sup>の発現が上昇することすることが報告されている<sup>81)</sup>。Wntが関節軟骨細胞においてPRG4の発現を抑制すること<sup>82)</sup>、関節軟骨破壊を促進すること<sup>80) 83)</sup>が、報告されている。関節軟骨特異的に活性型β-cateninを発現するトランスジェニックマウスでは、X型コラーゲンおよびMmp13の発現が上昇し、関節軟骨細胞の肥大化が促進することが示されている<sup>34)</sup>。過度の機械的刺激が関節軟骨に加わるとWntシグナルが活性化され<sup>78) 84)</sup>、MMP3、MMP13およびADAMTS5の発現が誘導されること<sup>84) 85)</sup>が示されている。また、Wntシグナルが亢進した状況下では機械的刺激によるMMP13およびADAMTS5の発現および活性を増強すること<sup>86)</sup>が報告されている。これら報告を鑑みると、関節軟骨疾患の発症によりFRZBの発現が低下し<sup>78) 84) 87)</sup>、その結果、Wntシグナルがさらに亢進し、変形性関節症が進行する負のスパイラルの可能性が存在すると考えられる。したがって、関節軟骨特異的にWntシグナルを遮断する技術が開発できれば、変形性関節症の治療につながると期待される。Wntアンタゴニストとしては、FRZBのほかにDKK1 (dickkopf-related protein 1)<sup>88)</sup>あるいはSclerostinが存在している<sup>89)</sup>。DKK1は関節軟骨細胞においてMmp13およびAdamts4の発現を抑制する<sup>90)</sup>のに対して、関節滑膜細胞においてはMmp3およびAdamts5の発現を上昇することが示されており<sup>91)</sup>、細胞によって作用が異なることが報告されており、変形性関節症治療の標的とするには難しいと考えられている<sup>92)</sup>。また、Sclerostinは骨細胞に高発現しており<sup>93)</sup>、骨形成を阻害し骨粗鬆症などの骨代謝性疾患を引き起こす可能性が懸念される。Frzbは内軟骨性骨形成過程にある肥大化軟骨において発

現し、Wnt による内軟骨性骨形成過程において後期過程への進行を抑制することが報告されている<sup>94)</sup>。したがって、FRZB は、関節軟骨においても、Wnt による関節軟骨細胞の肥大化を阻害し、変形性関節症の発症および進行を抑制する効果があると期待される。以上の報告と FRZB の関節軟骨特異的な発現を考慮すると、Wnt アンタゴニストの中でも FRZB が変形性関節症に対して非常に有効な標的分子と考えられる。しかしながら、FRZB が、関節軟骨細胞において Wnt の作用を抑制する点は明らかにされていない。今後は、関節軟骨における FRZB の生理学的役割の解明、および変形性関節症発症あるいは進行に対する FRZB の抑制効果の検証が必要である。

本研究において、FRZB の発現制御について明らかとなったので、今後は、得られた知見をどのように変形性関節症の新規治療に応用するかが、大きな課題である。その課題に応えるべく、現在、ゲノム編集技術の応用法で遺伝子ノックインシステムである CRIS-PITCh (v2)法<sup>95)</sup>を用いて、FRZB を発現誘導できる低分子化合物を探索するハイスループットアッセイシステムを構築している。このシステムが完成すれば、変形性関節症に対する新規治療法の開発に大きく貢献できると期待される。今後は FRZB の生理的役割とさらに詳細な遺伝子発現の制御機構について理解を深め、変形性関節症に対する治療法開発とバイオマーカーとしての臨床応用に寄与したいと考えている。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、始終御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 分子病態口腔科学講座 歯周病分子病態学教室、村上伸也教授ならびに同口腔分子免疫制御学講座 生化学教室、西村理行教授に深甚なる謝意を表します。そして、本研究にあたり終始御懇篤なる御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 生化学教室、波多賢二准教授に心より感謝申し上げます。さらに本研究を行うに際し、多大な御援助、御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 生化学教室、村上智彦講師ならびに高畑佳史助教に深く感謝します。最後にこの研究に対して多大なる御協力と御助言を戴いた大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 生化学教室ならびに分子病態口腔科学講座 歯周病分子病態学教室の諸先生方に厚くお礼申し上げます。また、Wnt3a cDNA、pLKO.1-TRC cloning vector、pCMV-VSV-G、pRSV-Rev および pMDLg/pRRE レンチウイルスパッケージングベクターの供与に関して、addgene に深謝いたします。

## 引用文献

- 1) Parfitt, A. M. The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab Bone Dis Relat Res*, **4**, 1-6 (1982)
- 2) Eriksen, E. F. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normal and in metabolic bone disease. *Endocr Rev*, **7**, 379-408 (1986)
- 3) Raisz, L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest*, **115**, 3318-3325 (2005)
- 4) Plotkin, H., Gundberg, C. , Mitnick, M. and Stewart, A. F. Dissociation of bone formation from resorption during 2-week treatment with human parathyroid hormone-related peptide- (1-36) in humans: potential as an anabolic therapy for osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 2786-2791 (1998)

- 5) Cummings, S. R. , San Martin, J. , McClung, M. R. , Siris, E. S. , Eastell, R. Reid, I. R. , Delmas, P. , Zoog, H. B. , Austin, M. , Wang, A. , Kutilek, S. , Adami, S. , Zanchetta, J. , Libanati, C. , Siddhanti, S. and Christiansen, C. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*, **361**, 756-765 (2009)
  
- 6) Padhi, D. , Jang, G. , Stouch, B. , Fang, L. and Posvar, E. Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. *J Bone Miner Res*, **26**, 19-26 (2011)
  
- 7) Lindsay, R. Preventing osteoporosis with a tissue selective estrogen complex (TSEC) containing bazedoxifene/conjugated estrogens (BZA/CE). *Osteoporos Int*, **22**, 447-451 (2011)
  
- 8) Langdahl, B. , Binkley, N. , Bone, H. , Gilchrist, N. , Resch, H. , Rodriguez Portales, J. , Denker, A. , Lombardi, A. , Le Bailly De Tillegem, C. , DaSilva, C. , Rosenberg, E. and Leung, A. Odanacatib in the treatment of postmenopausal women with low bone mineral density: five years of continued therapy in a phase 2 study. *J Bone Miner Res*, **27**, 2251-2258 (2012)

- 9) Yoshimura, N. , Muraki, S. , Oka, H. , Mabuchi, A. , En-Yo, Y. , Yoshida, M. , Saika, A. , Yoshida, H. , Suzuki, T. , Yamamoto, S. , Ishibashi, H. , Kawaguchi, H. , Nakamura, K. and Akune, T. Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab*, **27**, 620-628 (2009)
- 10) Ninomiya, Y. and Olsen, B. R. Synthesis and characterization of cDNA encoding a cartilage-specific short collagen. *Proc Natl Acad Sci*, **81**, 3014-3018 (1984)
- 11) Eyre, D. R. , Apon, S. , Wu, J. J. , Ericsson, L. H. and Walsh, K. A. Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage. *FEBS Lett*, **220**, 337-341 (1987)
- 12) Schumacher, B. L. , Block, J. A. , Schmid, T. M. , Aydelotte, M. B. and Kuettner, K. E. A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys*, **311**, 144-152 (1994)
- 13) Jay, G. D. , Tantravahi, U. , Britt, D. E. , Barrach, H. J. and Cha, C. J. Homology of

lubricin and superficial zone protein (SZP): products of megakaryocyte stimulating factor (MSF) gene expression by human synovial fibroblasts and articular chondrocytes localized to chromosome 1q25. *J Orthop Res*, **19**, 677-687 (2001)

14) Silver, F. H. and Bradica, G. Mechanobiology of cartilage: how do internal and external stresses affect mechanochemical transduction and elastic energy storage? *Biomech Model Mechanobiol*, **1**, 219-238 (2002)

15) Jay, G. D. , Torres, J. R. , Warman, M. L. , Laderer, M. C. and Breuer, K. S. The role of lubricin in the mechanical behavior of synovial fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 6194-6199 (2007)

16) Flannery, C. R. , Zollner, R. , Corcoran, C. , Jones, A. R. , Root, A. , Rivera-Bermúdez, M. A. , Blanchet, T. , Gleghorn, J. P. , Bonassar, L. J. , Bendele, A. M. , Morris, E. A. and Glasson, S. S. Prevention of cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by intraarticular treatment with recombinant lubricin. *Arthritis Rheum*, **60**, 840-847 (2009)

17) von der Mark, K. , Kirsch, T. , Nerlich, A. , Kuss, A. , Weseloh, G. , Glückert, K. and



Stöss, H. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum*, **35**, 806-811 (1992)

18) Kamekura, S. , Hoshi, K. , Shimoaka, T. , Chung, U. , Chikuda, H. , Yamada, T. , Uchida, M. , Ogata, N. , Seichi, A. , Nakamura, K. and Kawaguchi, H. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage*, **13**, 632-641 (2005)

19) Kawaguchi, H. Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells*, **25**, 1-6 (2008)

20) Reboul, P. , Pelletier, J. P. , Tardif, G. , Cloutier, J. M. and Martel-Pelletier, J. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest*, **97**, 2011-2019 (1996)

21) Glasson, S. S. , Askew, R. , Sheppard, B. , Carito, B. , Blanchet, T. , Ma, H. L. , Flannery, C. R. , Peluso, D. , Kanki, K. , Yang, Z. , Majumdar, M. K. and Morris, E. A. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis.

*Nature*, **434**, 644-648 (2005)

22) Stanton, H. , Rogerson, F. M. , East, C. J. , Golub, S. B. , Lawlor, K. E. , Meeker, C. T. , Little, C. B. , Last, K. , Farmer, P. J. , Campbell, I. K. , Fourle, A. M. and Fosang, A. J. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature*, **434**, 648-652 (2005)

23) McKee, G. K. and Watson-Farrar, J. Replacement of arthritic hips by the McKee-Farrar prosthesis. *J Bone Joint Surg Br*, **48**, 245-259 (1966)

24) Loughlin, J. , Dowling, B. , Chapman, K. , Marcelline, L. , Mustafa, Z. , Southam, L. , Ferreira, A. , Ciesielski, C. , Carson, D. A. and Corr, M. Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9757-9762 (2004)

25) Lories, R. J. U. , Peeters, J. , Bakker, A. , Tylzanowski, P. , Derese, I. , Schrooten, J. , Thomas, J. T. and Luyten, F. P. Articular cartilage and biomechanical properties of the long bones in Frzb-knockout mice. *Arthritis Rheum*, **56**, 4095-4103 (2007)

- 26) Thysen, S. , Luyten, F. P. and Lories, R. J. Loss of Frzb and Sfrp1 differentially affects joint homeostasis in instability-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, **23**, 275-279 (2015)
- 27) Hoang, B. , Moos, M. Jr. , Vukicevic, S. and Luyten, F. P. Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to *Drosophila* frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *J Bio Chem*, **271**, 26131-26137 (1996)
- 28) Leyns, L. , Bouwmeester, T. , Kim, S. H. , Piccolo, S. and De Robertis, E. M. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell*, **88**, 747-756 (1997)
- 29) Gong, Y. , Slee, R. B. , Fukai, N. , Rawadi, G. , Roman-Roman, S. , Reginato, A. M. , Wang, H. , Cundy, T. , Glorieux, F. H. , Lev, D. , Zacharin, M. , Oexle, K. , Marcelino, J. , Suwairi, W. , Heeger, S. , Sabatakos, G. , Apte, S. , Adkins, W. N. , Allgrove, J. , Arslan-Kirchner, M. , Batch, J. A. , Beighton, P. , Black, G. C. , Boles, R. G. , Boon, L. M. , Borrone, C. , Brunner, H. G. , Carle, G. F. , Dallapiccola, B. , De Paepe, A. , Floege, B. , Halfhide, M. L. , Hall, B. , Hennekam, R. C. , Hirose, T. , Jans, A. , Jüppner, H. , Kim,

C. A. , Keppler-Noreuil, K. , Kohlschuetter, A. , LaCombe, D. , Lambert, M. , Lemyre, E. ,  
Letteboer, T. , Peltonen, L. , Ramesar, R. S. , Romanengo, M. , Somer, H. ,  
Steichen-Gersdorf, E. , Steinmann, B. , Sullivan, B. , Superti-Furga, A. , Swoboda, W. ,  
van den Boogaard, M. J. , Van Hul, W. , Vikkula, M. , Votruba, M. , Zabel, B. , Garcia, T. ,  
Baron, R. , Olsen, B. R. and Warman, M. L. LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5)  
Affects Bone Accrual and Eye Development. *Cell*, **107**, 513-523 (2001)

30) Yost, C. , Torres, M. , Miller, J. R. , Huang, E. , Kimelman, D. and Moon, R. T. The  
axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in  
Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev*, **10**, 1443-54 (1996)

31) Behrens, J. , von Kries, J. P. , Kühl, M. , Bruhn, L. , Wedlich, D. , Grosschedl, R. and  
Birchmeier, W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1.  
*Nature*, **382**, 638-642 (1996)

32) Eastman, Q. and Grosschedl, R. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt  
and other signals. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 233-240 (1999)

- 33) Kawaguchi, H. Regulation of osteoarthritis development by Wnt-beta-catenin signaling through the endochondral ossification process. *J Bone Miner Res*, **24**, 8-11 (2009)
- 34) Zhu, M. , Tang, D. , Wu, Q. , Hao, S. , Chen, M. , Xie, C. , Rosier, R. N. , O'Keefe, R. J. , Zuscik, M. and Chen, D. Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. *J Bone Miner Res*, **24**, 12-21 (2009)
- 35) Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M. S. and Leahy, D. J. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol*, **529**, 227–40 (2013)
- 36) Nishimura, R. , Wakabayashi, M. , Hata, K. , Matsubara, T. , Honma, S. , Wakisaka, S. , Kiyonari, H. , Shioi, G. , Yamaguchi, A. , Tumaki, N. , Akiyama, H. and Yoneda, T. Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *J Biol Chem*, **287**, 33179-33190 (2012)
- 37) Takigawa, Y., Hata, K., Muramatsu, S., Amano, K., Ono, K., Wakabayashi, M., Matsuda,

- A., Takada, K., Nishimura, R. and Yoneda, T. The transcription factor Znf219 regulates chondrocyte differentiation by assembling a transcription factory with Sox9. *J Cell Sci*, **123**, 3780-3788 (2010)
- 38) Miyake, S. , Makimura, M. , Kanegae, Y. , Harada, S. , Sato, Y. , Takamori, K. , Tokuda, C. and Saito, I. Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1320-1324 (1996)
- 39) Ichida, F. , Nishimura, R. , Hata, K. , Matsubara, T. , Ikeda, F. , Hisada, K. , Yatani, H. , Cao, X. , Komori, T. , Yamaguchi, A. and Yoneda, T. Reciprocal roles of Msx2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **279**, 34015-34022 (2004)
- 40) Gosset, M. , Berenbaum, F. , Thirion, S. and Jacques, C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc*, **3**, 1253-1260 (2008)
- 41) Stanton, H. , Golub, S. B. , Rogerson, F. M. , Last, K. Little, C. B. and Fosang, A. J.

Investigating ADAMTS-mediated aggrecanolytic activity in mouse cartilage. *Nat Protoc*, **6**, 388-404 (2011)

42) Amano, K., Hata, K., Muramatsu, S., Wakabayashi, M., Takigawa, Y., Ono, K., Nakanishi, M., Takashima, R., Kogo, M., Matsuda, A., Nishimura, R. and Yoneda, T. Arid5a cooperates with Sox9 to stimulate chondrocyte-specific transcription. *Mol Biol Cell*. **22**, 1300–1311 (2011).

43) Rogerson, F. M., Chung, Y. M. , Deutscher, M. E. , Last, K. and Fosang, A. J. Cytokine-induced increases in ADAMTS-4 messenger RNA expression do not lead to increased aggrecanase activity in ADAMTS-5-deficient mice. *Arthritis Rheum*, **62**, 3365-3373 (2010)

44) Gebauer, M. , Saas, J. , Sohler, F. , Haag, J. , Söder, S. , Pieper, M. , Bartnik, E. , Beninga, J. , Zimmer, R. and Aigner, T. Comparison of the chondrosarcoma cell line SW1353 with primary human adult articular chondrocytes with regard to their gene expression profile and reactivity to IL-1 beta. *Osteoarthritis Cartilage*, **13**, 697-708 (2005)

- 45) Lee, K. S. , Kin, H. J., Li, Q. L. , Chi, X. Z. , Ueta, C. , Komori, T. , Wozney, J. M., Kim, E. G. , Choi, J. Y. , Ryoo, H. M. and Bae, S. C. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol*, **20**, 8783-8792 (2000)
- 46) Nakashima, K. , Zhou, X. , Kunkel, G. , Zhang, Z. , Deng, J. M. , Behringer, R. R. and de Crombrughe, B. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, **108**, 17-29 (2002)
- 47) Graham, A. , Francis-West, P. , Brickell, P. and Lumsden, A. The signaling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature*, **372**, 684-686 (1994)
- 48) Smith, M. D. , Triantafillou, S. , Parker, A. , Youssef, P. P. and Coleman, M. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol*, **24**, 365-371 (1997)



- 49) Shirakawa, F. , Chedid, M. , Suttles, J. , Pollok, B. A. and Mizel, S. B. Interleukin 1 and cyclic AMP induce  $\kappa$  immunoglobulin light-chain expression via activation of an NF-kappa B-like DNA-binding protein. *Mol Cell Biol*, **9**, 959-964 (1989)
- 50) Osborn, L. , Kunkel, S. and Nabel, G. J. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2336-2340 (1989)
- 51) Pendás, A. M. , Balbín, M. , Llano, E. , Jiménez, M. G. and López-Otín, C. Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). *Genomics*, **40**, 222-233 (1997)
- 52) Mengshol, J. A. , Vincenti, M. P. , Coon, C. I. , Barchowsky, A. and Brinckerhoff, C. E. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappa B: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum*, **43**, 801-811 (2000)

- 53) Kobayashi, H. , Hirata, M. , Saito, T. , Itoh, S. , Chung, U. I. and Kawaguchi, H.  
Transcriptional induction of ADAMTS5 protein by nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. *J Biol Chem*, **288**, 28620-28629 (2013)
- 54) Goldring, M. B. , Otero, M. Plumb, D. A. , Dragomir, C. , Fevero, M. , El Hachem, K. , Hashimoto, K. , Roach, H. I. , Olivotto, E. , Borzì, R. M. and Marcu, K. B. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater*, **21**, 202-220 (2011)
- 55) Rigoglou, S. and Papavassiliou, A. G. The NF- $\kappa$ B signalling pathway in osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol*, **45**, 2580-2584 (2013)
- 56) Yamazaki, M. , Fukushima, H. , Shin, M. , Katagiri, T. , Doi, T. , Takahashi, T. and Jimi, E.  
TNF- $\alpha$  represses BMP signaling by interfering with the DNA binding of SMAD through the activation of NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem*, **284**, 35987-35995 (2009)

- 57) Bougault, C. , Priam, S. , Houard, X. , Pigenet, A. , Sudre, L. , Lories, R. J. , Jacques, C. and Berenbaum, F. Protective role of frizzled-related protein B on matrix metalloproteinase induction in mouse chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, **16**, R137 (2014)
- 58) Koga, T. , Matsui, Y. , Asagiri, M. , Kodama, T. , de Crombrughe, B. , Nakashima, K. and Takayanagi, H. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med*, **11**, 880-885 (2005)
- 59) Hojo, H. , Ohba, S. , He, X. , Lai, L. P. and McMahon, A. P. Sp7/Osterix is restricted to bone-forming vertebrates where it acts as a Dlx co-factor in osteoblast specification. *Dev Cell*, **37**, 238-253 (2016)
- 60) Catron, K. M. , Iler, N. and Abate, C. Nucleotides flanking a conserved TAAT core dictate the DNA binding specificity of three murine homeodomain proteins. *Mol Cell Biol*, **13**, 2354-2365 (1993)
- 61) Gehring, W. J. , Qian, Y. Q. , Billeter, M. , Furukubo-Tokunaga, K. , Schier, A. F. ,

Resendez-Perez, D. , Affolter, M. , Otting, G. and Wüthrich, K. Homeodomain-DNA recognition. *Cell*, **78**, 211-223 (1994)

62) Komori, T. , Yagi, H. , Nomura, S. , Yamaguchi, A. , Sasaki, K. , Deguchi, K. , Shimizu, Y. , Bronson, R. T. , Gao, Y. H. , Inada, M. , Sato, M. , Okamoto, R. , Kitamura, Y. , Yoshiki, S. and Kishimoto, T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblast. *Cell*, **89**, 755-764 (1997)

63) Matsubara, T. , Kida, K., Yamaguchi, A. , Hata, K. , Ichida, F. , Meguro, H. , Aburatani, H. , Nishimura , R. and Yoneda, T. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem*, **283**, 29119-29125 (2008)

64) Glansbeek, H. , van Beuningen, H. M. , Vitters, E. L. , Morris, E. A. , van der Kraan, P. M. and van den Berg, W. B. Bone morphogenetic protein 2 stimulates articular cartilage proteoglycan synthesis in vivo but does not counteract interleukin-1 alpha effects on proteoglycan synthesis and content. *Arthritis Rheum*, **40**, 1020-1028 (1997)

65) Niikura, T. and Reddi, A. H. Differential regulation of lubricin/superficial zone protein by

transforming growth factor beta/bone morphogenetic protein superfamily members in articular chondrocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum*, **56**, 2312-2321 (2007)

66) Lee, S. Y. , Nakagawa, T. and Reddi, A. H. Induction of chondrogenesis and expression of superficial zone protein (SZP)/lubricin by mesenchymal progenitors in the infrapatellar fat pad of the knee joint treated with TGF-beta1 and BMP7. *Biochem Biophys Res Commun*, **376**, 148-153 (2008)

67) Andrades, J. M. , Motaung, S. C. , Jiménez-Palomo, P. , Claros, S. , López-Puerta, J. M. , Becerra, J. , Schmid, T. M. and Reddi, A. H. Induction of superficial zone protein (SZP)/lubricin/PRG4 in muscle-derived mesenchymal stem/progenitor cells by transforming growth factor- $\beta$ 1 and bone morphogenetic protein-7. *Arthritis Res Ther*, **14**, R72 (2012)

68) Tsumaki, N. , Nakase, T. , Miyaji, T. , Kakiuchi, M. , Kimura, T. , Ochi, T. and Yoshikawa, H. Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis. *J Bone Miner Res*, **17**, 898-906 (2002)

- 69) Rountree, R. B. , Schoor, M. , Chen, H. , Marks, M. E. , Harley, V. , Mishina, Y. and Kingsley, D. M. BMP receptor signaling is required for postnatal maintenance of articular cartilage. *PLoS Biol*, **2**, 1815-1827 (2004)
- 70) Sekiya, I. , Larson, B. L. , Vuoristo, J. T. , Reger, R. L. and Prockop, D. J. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res*, **320**, 269-276 (2005)
- 71) Tsuji, K. , Bandyopadhyay, A. , Harfe, B. D. , Cox, K. , Kakar, S. , Gerstenfeld, L. , Einhorn, T. , Tabin, C. J. and Rosen, V. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet*, **38**, 1424-1429 (2006)
- 72) Yamashita, A. , Morioka, M. , Yahara, Y. , Okada, M. , Kobayashi, T. , Kuriyama, S. , Matsuda, S. and Tsumaki, N. Generation of scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports*, **4**, 404-418 (2015)
- 73) Kamekura, S. , Kawasaki, Y. , Hoshi, K. , Shimoaka, T. , Chikuda, H. , Maruyama, Z. ,

Komori, T. , Sato, S. , Takeda, S. , Karsenty, G. , Nakamura, K. , Chung, U. and Kawaguchi, H. Contribution of Runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum*, **54**, 2462-2470 (2006)

74) Hopwood, B. , Tsykin, A. , Findlay, D. M. and Fazzalari, N. L. Microarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodeling , WNT and transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein signalling. *Arthritis Res Ther*, **9**, R100 (2007)

75) Karlsson, C. , Dehne, T. , Lindahl, A. , Brittberg, M. , Pruss, A. , Sittinger, M. and Ringe, J. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, **18**, 581-592 (2010)

76) Papathanasiou, I. , Malizos, K. N. and Tsezou, A. Bone porphogenetic protein-2-induced Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway activation through enhanced low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 catabolic activity contributes to hypertrophy in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, **14**, R82 (2012)

- 77) Nakamura, Y. , Nawata, M. and Wakitani, S. Expression profiles and functional analyses of Wnt-related genes in human joint disorders. *Am J Pathol*, **167**, 97-105 (2005)
- 78) Dell'Accio, F. , de Bari, C. , Eltaeil, N. M. , Vanhummelen, P. and Pitzalis, C. Identification of the molecular response of articular cartilage to injury, by microarray screening: Wnt-16 expression and signaling after injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, **58**, 1410-1421 (2008)
- 79) Blom, A. B. , Brockbank, S. M. , van Lent, P. L. , van Beuningen, H. M. , Geurts, J. , Takahashi, N. , van der Kraan, P. M. , van de Loo, F. A. , Wim Schreurs, B. , Clements, K. , Newham, P. and van den Berg, W. B. Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: prominent role of Wnt-induced signaling protein 1. *Arthritis Rheum*, **60**, 501-512 (2009)
- 80) Yuasa, T. , Otani, T. , Koike, T. , Iwamoto, M. and Enomoto-Iwamoto, M. Wnt/beta-catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. *Lab Invest*, **88**, 264-274 (2008)



- 81) Usami, Y. , Gunawardena, A. T. , Iwamoto, M. and Enomoto-Iwamoto, M. Wnt signaling in cartilage development and diseases: lessons from animal studies. *Lab Invest*, **96**, 186-196 (2016)
- 82) Iwakura, T. , Inui, A. and Reddi, A. H. Stimulation of superficial zone protein accumulation by Hedgehog and Wnt signaling in surface zone bovine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, **65**, 408-417 (2013)
- 83) van den Bosch, M. H. , Blom, A. B. , Sloetjes, A. W. , Koenders, M. I. , van de Loo, F. A. , van den Berg, W. B. , van Lent, P. L. and van der Kraan, P. M. Induction of canonical Wnt signaling by synovial overexpression of selected Wnts leads to protease activity and early osteoarthritis-like cartilage damage. *Am J Pathol*, **185**, 1970-1980 (2015)
- 84) Dell'Accio, F. , de Bari, C. , El Tawil, N. M. , Barone, F. , Mitsiadis, T. A. , O'Dowd, J. and Pitzalis, C. Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury. *Arthritis Res Ther*, **8**, R139 (2006)
- 85) Lee, J. H. , Fitzgerald, J. B. , Dimicco, M. A. and Grodzinsky, A. J. Mechanical injury of

cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. *Arthritis Rheum*, **52**, 2386-2395 (2005)

86) Thomas, R. S. , Clarke, A. R. , Duance, V. C. and Blain, E. J. Effects of Wnt3A and mechanical load on cartilage chondrocyte homeostasis. *Arthritis Res Ther*, **13**, R203 (2011)

87) Zhong, L. , Huang, X. , Karperien, M. and Post, J. N. Correlation between gene expression and osteoarthritis progression in human. *Int J Mol Sci*, **17**, 1126 (2016)

88) Glinka, A. , Wu, W. , Delius, H. , Monaghan, A. P. , Blumenstock, C. and Niehrs, C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, **391**, 357-362 (1998)

89) Winkler, D.G. , Sutherland, M. S. , Ojala, E. , Turcott, E. , Geoghegan, J. C. , Shpektor, D. , Skonier, J. E. , Yu, C. and Latham, J. A. Sclerostin inhibition of Wnt-3a-induced C3H10T1/2 cell differentiation is indirect and mediated by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem*, **280**, 2498-2502 (2005)

- 90) Oh, H. , Chun, C. H. and Chun, J. S. Dkk-1 expression in chondrocytes inhibits experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice. *Arthritis Rheum*, **64**, 2568-2578 (2012)
- 91) Weng, L. H. , Ko, J. Y. , Wang, C. J. , Sun, Y. C. and Wang, F. S. Dkk-1 promotes angiogenic responses and cartilage matrix proteinase secretion in synovial fibroblasts from osteoarthritic joints. *Arthritis Rheum*, **64**, 3267-3277
- 92) Loeser, R. F. Osteoarthritis year in review 2013: biology. *Osteoarthritis Cartilage*, **21**, 1436-1442 (2013)
- 93) Winkler, D. G. , Sutherland, M. K. , Geoghegan, J. C. , Yu, C. , Hayes, T. , Skonier, J. E. , Shpektor, D. , Jonas, M. , Kovacevich, B. R. , Staehling-Hampton, K. , Appleby, M. , Brunkow, M. E. and Latham, J. A. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J*, **22**, 6267-6276 (2003)
- 94) Enomoto-Iwamoto, M. , Kitagaki, J. , Koyama, E. , Tamamura, Y. , Wu, C. , Kanatani, N. , Koike, T. , Okada, H. , Komori, T. , Yoneda, T. , Church, V. , Francis-West, P. H. , Kurisu,

K. , Nohno, T. , Pacifici, M. and Iwamoto, M. The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocyte maturation and long bone development during limb skeletogenesis. *Dev Biol*, **251**, 142-156 (2002)

95) Sakuma, T. , Nakade, S. , Sakane, Y. , Suzuki, K. T. and Yamamoto, T. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nat Protoc*, **11**, 118-133 (2016)

表1. Real-time qPCRに用いたプライマー

	標的遺伝子 (mouse)	Probeとprimer の配列
β-Actin	probe:	5'- TTAATTTCTGAATGGCCCAGGTCT -3'
	sense primer:	5'- ATTGGTCTCAAGTCAGTGACAGG -3'
	anti-sense primer:	5'- CCTGGCTGCCTCAACACCTCAACCC -3'
Frzb	probe:	5'- ACCAAGCCGATCCTTCCACTTCTCAGCT -3'
	sense primer:	5'- CCAGTTACTCTTGGTAGAAGGC -3'
	anti-sense primer:	5'- GGTGTCGGAGTTTCATATCCCAG -3'
Adamts4	probe:	5'- CAGCGATGTGGTCACGATCCCTGCG -3'
	sense primer:	5'- AGCAGTCGGGCTCCTTCAA -3'
	anti-sense primer:	5'- GCCAGGTAGATGCTCTTGAGAC -3'
Adamts5	probe:	5'- ACCACATAGTAGCCTGTGCCCTTAGCTCT -3'
	sense primer:	5'- GTCTGATGCAAAAGGAGTCAAAACA -3'
	anti-sense primer:	5'- CAGTCCCATCCGTAACCTTTGG -3'
	標的遺伝子 (human)	Probeとprimer の配列
β-ACTIN	probe:	5'- TGGCTGCCTCCACCCACTCCCA -3'
	sense primer:	5'- GATGTATGAAGGCTTTTGGTCTCC -3'
	anti-sense primer:	5'- CTGGTCTCAAGTCAGTGACAGG -3'
FRZB	probe:	5'- AGCTCCGTCGCAGTAACGATGGC -3'
	sense primer:	5'- AGCTGCCAGTGACGACAG -3'
	anti-sense primer:	5'- CCCTCTACAGTTCCGTTACTAGA -3'
ALP	probe:	5'- CACCCATCCCATCTCCCAGGAACATGAT -3'
	sense primer:	5'- AGACCAAGCGCAAGAGACAC -3'
	anti-sense primer:	5'- GCAGCCGTCAGTGTGGAG -3'
MMP13	probe:	5'- ACTCTCCTGTTCTCAGGAAACCAGGTCTGG -3'
	sense primer:	5'- AGCTGTTCACTTTGAGGATACAGG -3'
	anti-sense primer:	5'- GGAAGTCTTCTTATTAGTCTCGGA -3'

表2. *FRZB*遺伝子プロモータールシフェラーゼレポータープラスミド作製に用いたプライマー

ヒト <i>FRZB</i> 遺伝子プロモーター領域		Primerの配列
2729base pair	sense primer:	5'- aagCTCGAGCGGAATACTACCCAGCCAGA -3'
	anti-sense primer:	5'- gcgAAGCTTGTCTAAGCCTTCGGAAGCAGC -3'
1500base pair	sense primer:	5'- gaaCTCGAGGTGTTTTCTGACATTCCGGCA -3'
	anti-sense primer:	5'- gcgAAGCTTGTCTAAGCCTTCGGAAGCAGC -3'
1000base pair	sense primer:	5'- agaCTCGAGATGAACAGCATTCTTTGTT -3'
	anti-sense primer:	5'- gcgAAGCTTGTCTAAGCCTTCGGAAGCAGC -3'
500base pair	sense primer:	5'- aacCTCGAGCTCCATTCTCGGGAAGAGCA -3'
	anti-sense primer:	5'- gcgAAGCTTGTCTAAGCCTTCGGAAGCAGC -3'

表3. OSTERIX shRNA作製に用いたプライマー

OSTERIX shRNA 名称	Primerの配列
OSTERIX shRNA 1	sense primer: 5'- CCGGCTTCTTACACCATTGCTTTCCTTCAAGAGAGGAAAGCAATGGTGTAGAAGTTTTTTG -3'
	anti-sense primer: 5'- AATTCAAAAACTTCTTACACCATTGCTTTCCTCTCTTGAAGGAAAGCAATGGTGTAGAAG -3'
OSTERIX shRNA 2	sense primer: 5'- CCGGCCATTTCTGCTAAGGAAATTCCTCAAGAGAGAATTCCTTAGCAGAAATGGTTTTTTG -3'
	anti-sense primer: 5'- AATTCAAAAAACCATTTCTGCTAAGGAAATTCCTCTTGAAGAATTCCTTAGCAGAAATGG -3'

表4. FRZB遺伝子のChIP 解析に用いたプライマー

	Primerの名称	Primerの配列
ChIP-1	sense primer:	5'- aaagacgggtccctagtg-3'
	anti-sense primer:	5'- ggctctgcactttctacctc-3'
ChIP-2	sense primer:	5'- gggaggtaggaaagtgcagag-3'
	anti-sense primer:	5'- gcattaaattcccaaagtga-3'
ChIP-3	sense primer:	5'- tcccattaggagctttcctc-3'
	anti-sense primer:	5'- tctggcagaagcatcagactt-3'
ChIP-4	sense primer:	5'- ttatgtcttctcgctcct-3'
	anti-sense primer:	5'- cgcttcttgatcaaattc-3'



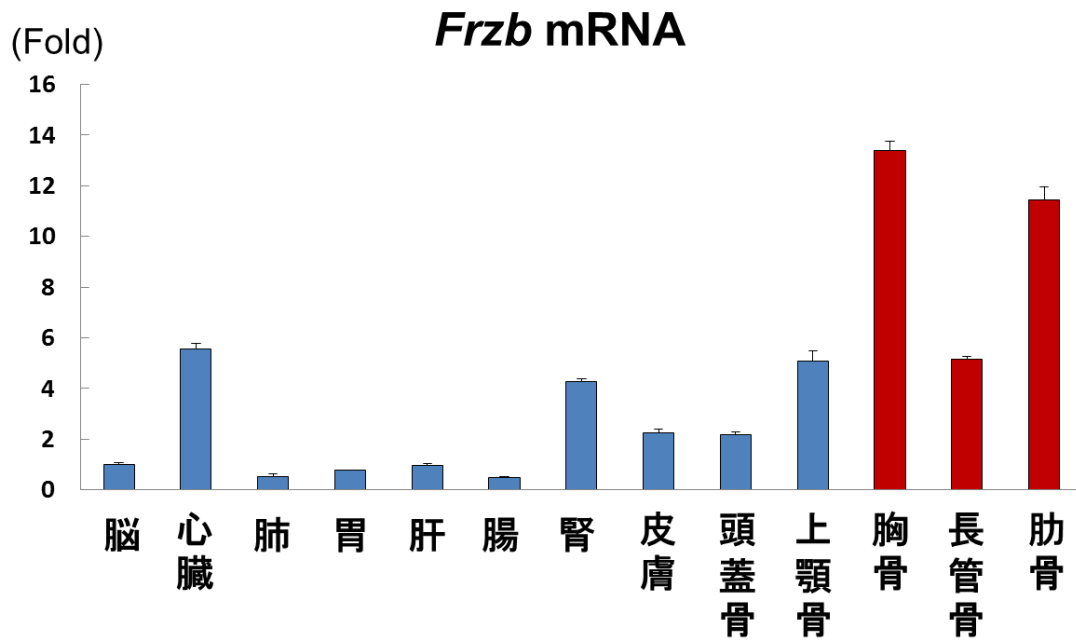


図 1. マウス組織における *Frzb* mRNA の発現分布

生後 0 日齢 C57BL マウスから採取した各組織における *Frzb* mRNA の発現を RT-qPCR にて解析した。各組織の *Frzb* mRNA 発現量は、 $\beta$ -*actin* mRNA 発現量で補正し、脳における発現量の倍数で示した (mean  $\pm$  S.D., n=3)。

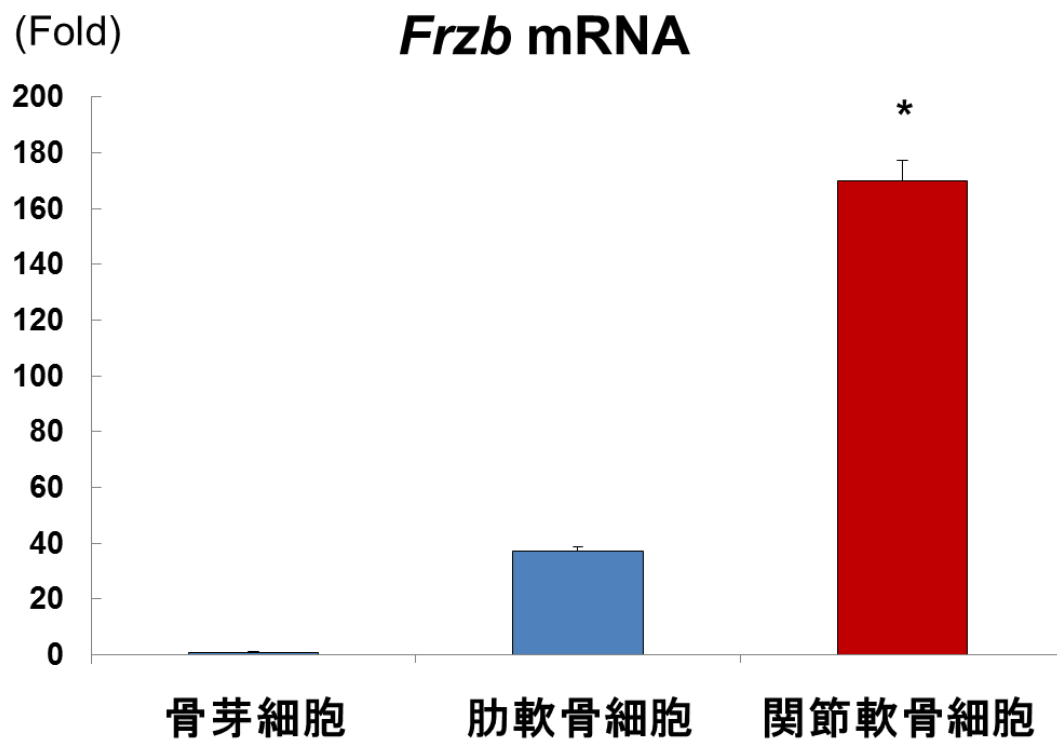


図 2. 骨芽細胞、肋軟骨細胞および関節軟骨細胞における *Frzb* mRNA の発現

生後 4 日齢 ICR マウスから採取した骨芽細胞、肋軟骨細胞および関節軟骨細胞における、*Frzb* mRNA の発現を RT-qPCR にて解析した。各細胞の *Frzb* mRNA 発現量は、 $\beta$ -actin mRNA 発現量で補正し、骨芽細胞における発現量の倍数で示した (mean  $\pm$  S.D., n=3, \*:  $p < 0.01$  vs 骨芽細胞グループ)。

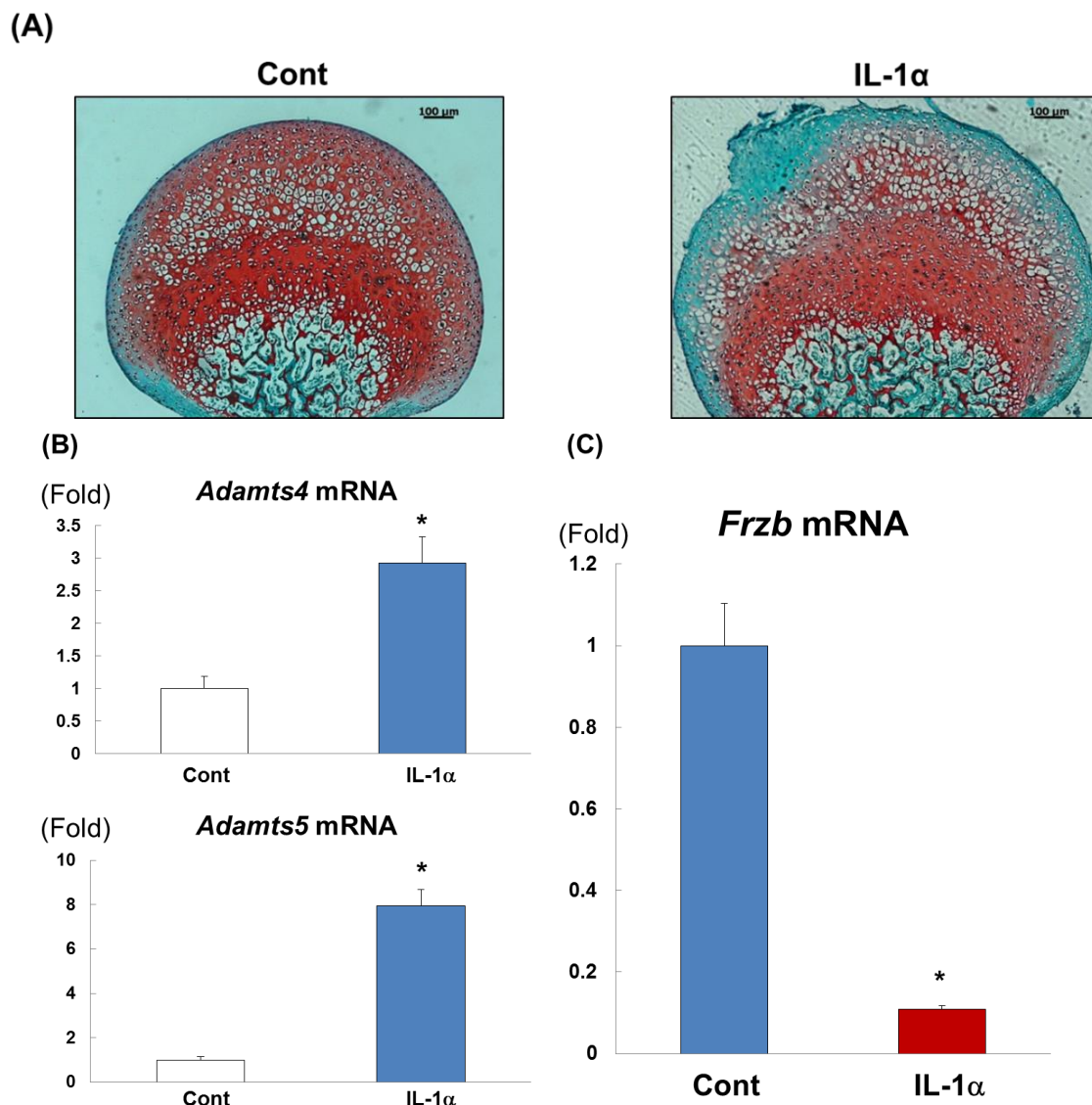
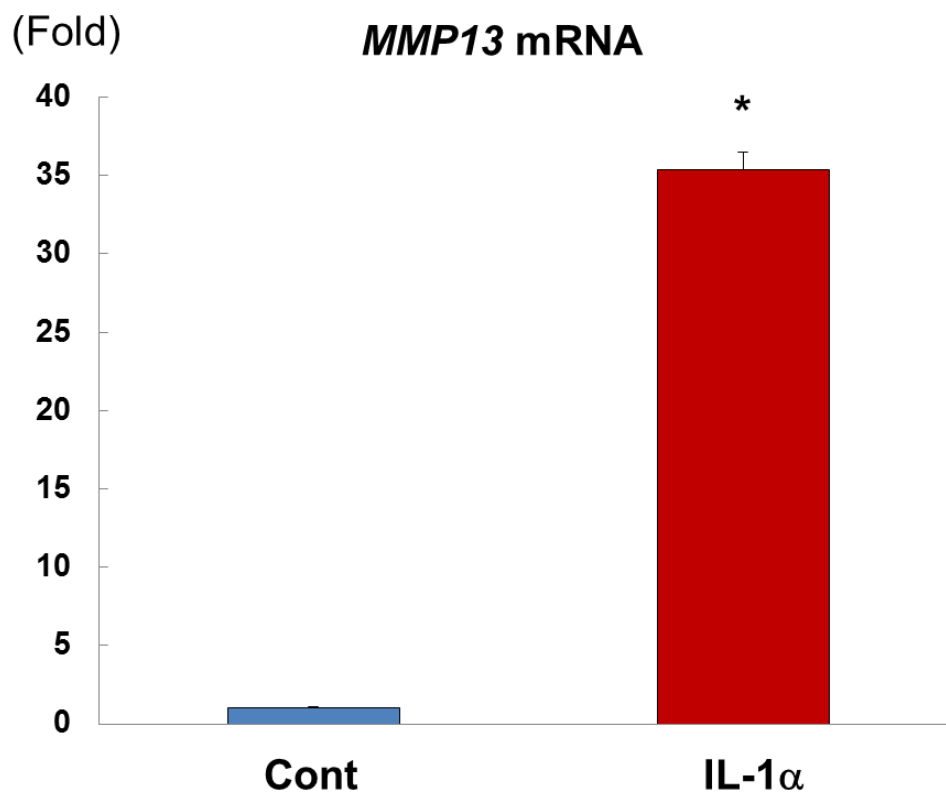


図 3. 関節軟骨および *Frzb* mRNA 発現に対する IL-1α の効果

(A) 生後 3 週齢オスの ICR マウスから採取した大腿骨骨頭を IL-1α (10ng/ml) 存在下あるいは非存在下 (Cont) で 5 日間器官培養後、各々の病理切片をファストグリーン・サフラニン O にて染色した。スケールバー: 100μm

(B) 生後 4 日齢 ICR マウスから採取した関節軟骨細胞を 48 時間培養後、スタベーションを 12 時間実施し、IL-1α (10ng/ml) 存在下あるいは非存在下 (Cont) で 24 時間培養後、*Adamts4* および *Adamts5* の mRNA 発現を RT-qPCR にて解析した。*Adamts4* および *Adamts5* の mRNA 発現量は、*β-actin* mRNA 発現量で補正し、IL-1α 非存在下培養の関節軟骨細胞における発現量の倍数で示した (mean ± S.D., n=3, \*:  $p < 0.05$  vs Cont グループ)。

(C) (B) のサンプルにおける *Frzb* mRNA を RT-qPCR にて解析した。*Frzb* mRNA 発現量は、*β-actin* mRNA 発現量で補正し、IL-1α 非存在下培養の関節軟骨細胞における発現量の倍数で示した (mean ± S.D., n=3, \*:  $p < 0.05$  vs Cont グループ)。



**図 4. SW1353 細胞における *MMP13* mRNA の発現に対する IL-1 $\alpha$  の効果**

SW1353 細胞を 12 時間スタベーション後、IL-1 $\alpha$  (3.0ng/ml)存在下あるいは非存在下 (Cont)にて、2 日間培養後、*MMP13* mRNA 発現量を RT-qPCR にて解析した。*MMP13* mRNA 発現量は、 $\beta$ -*ACTIN* mRNA 発現量で補正し、IL-1 $\alpha$ 非存在下培養の SW1353 細胞における発現量の倍数で示した (mean  $\pm$  S.D., n=3, \*:  $p < 0.05$  vs Cont グループ)。

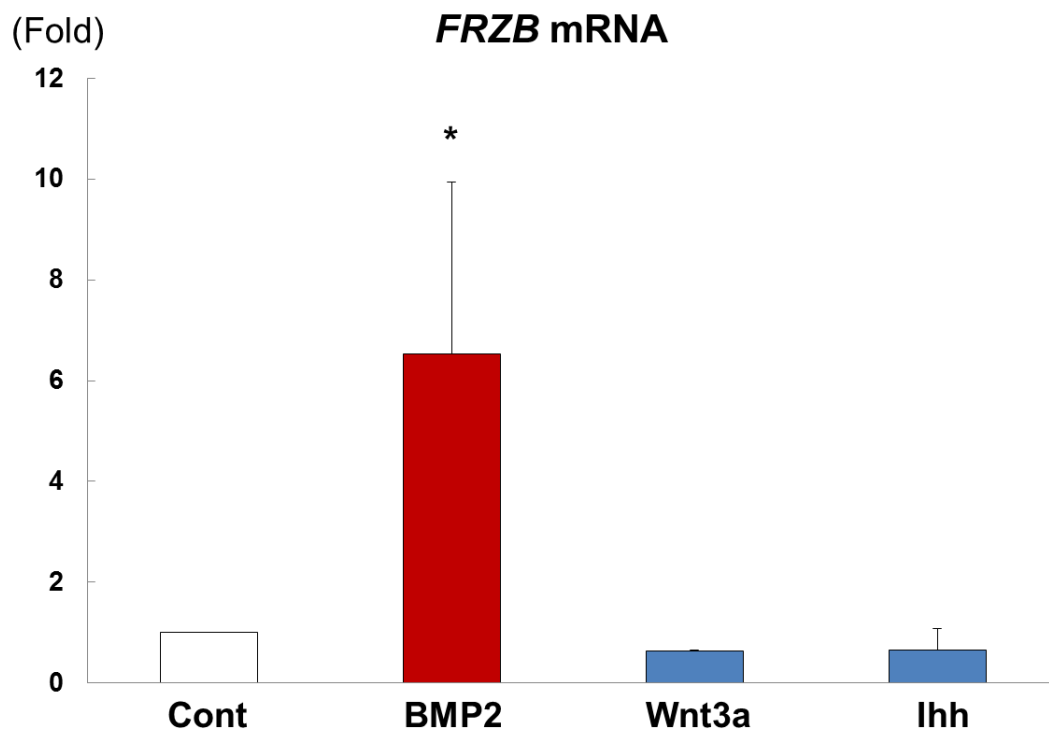


図 5. ヒト軟骨細胞様株 SW1353 における *FRZB* mRNA の発現に対する BMP2、Wnt3a および *Ihh* の効果

SW1353 細胞に Venus (Cont)、BMP2、Wnt3a あるいは *Ihh* アデノウイルスを感染させ 7 日間培養後、*FRZB* mRNA の発現を RT-qPCR にて解析した。*FRZB* mRNA 発現量は、 $\beta$ -*ACTIN* mRNA 発現量で補正し、Venus アデノウイルス感染の SW1353 細胞における発現量の倍数で示した (mean  $\pm$  S.D., n=3, \*:  $p < 0.05$  vs Cont グループ)。

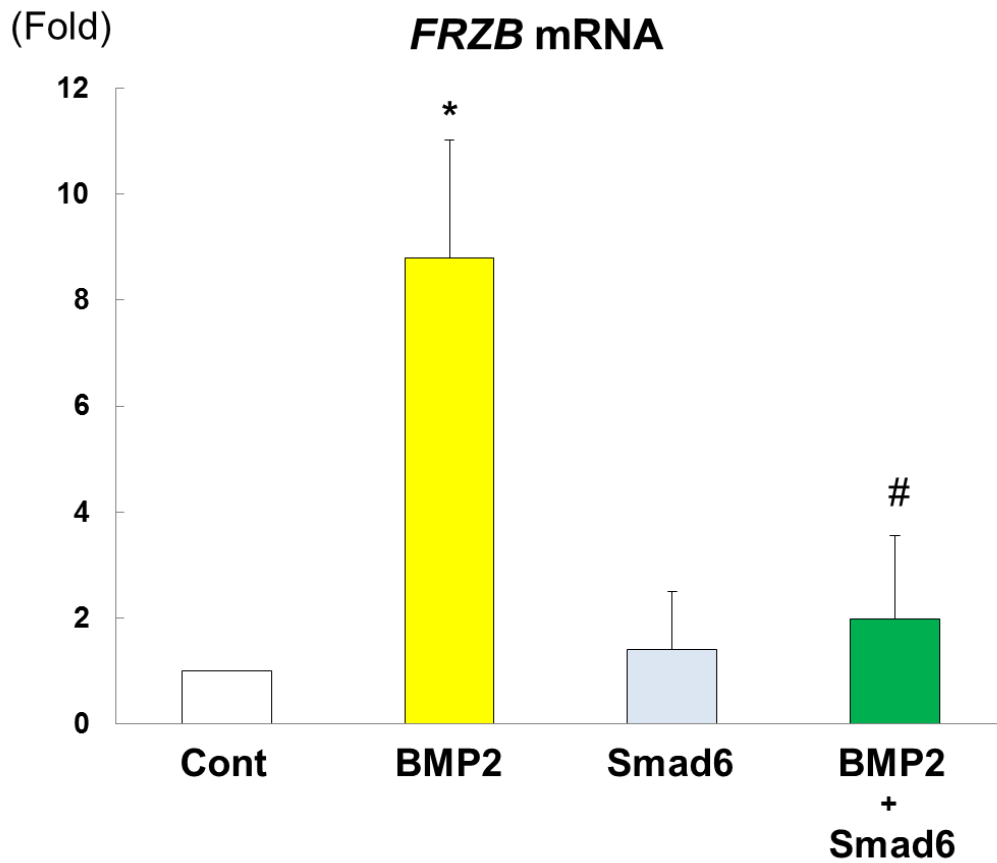


図 6. ヒト軟骨細胞様株 SW1353 における BMP2 誘導性 *FRZB* mRNA の発現に対する *Smad6* の効果

SW1353 細胞に Venus (Cont)、BMP2 あるいは *Smad6* アデノウイルスを感染させ 5 日間培養後、*FRZB* mRNA の発現を RT-qPCR にて解析した。*FRZB* mRNA 発現量は、 $\beta$ -*ACTIN* mRNA 発現量で補正し、Venus アデノウイルス感染の SW1353 細胞における発現量の倍数で示した (mean  $\pm$  S.D., n=3, \*:  $p < 0.05$  vs Cont グループ)。

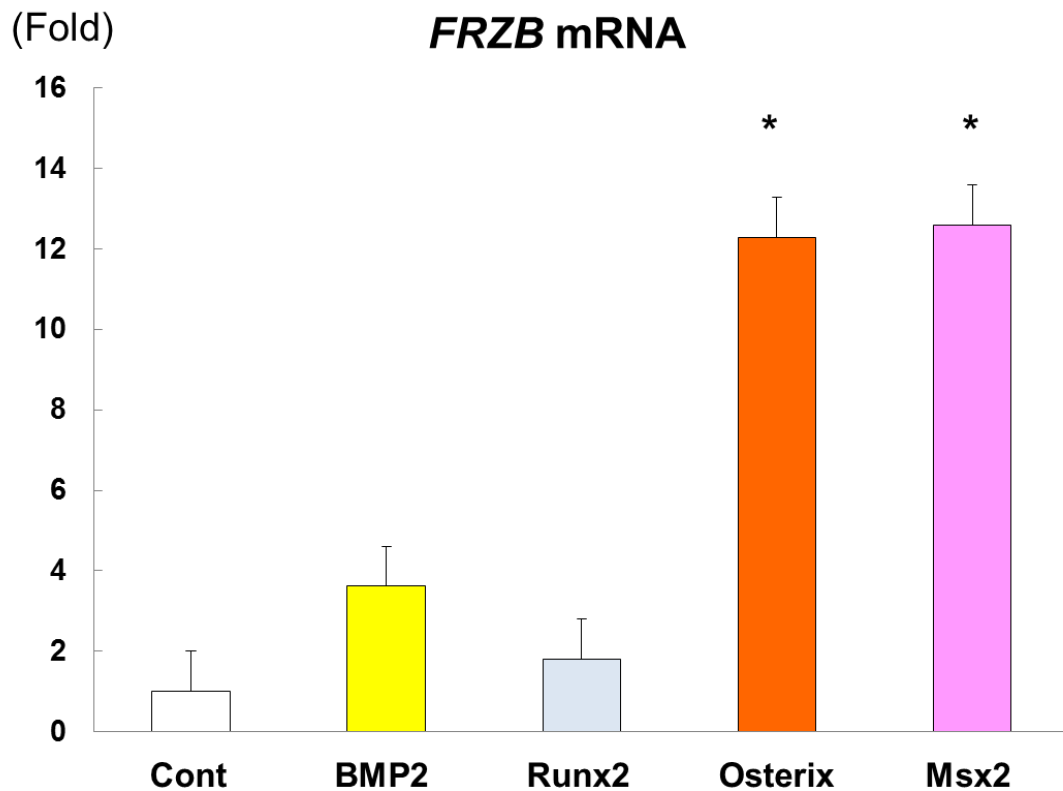
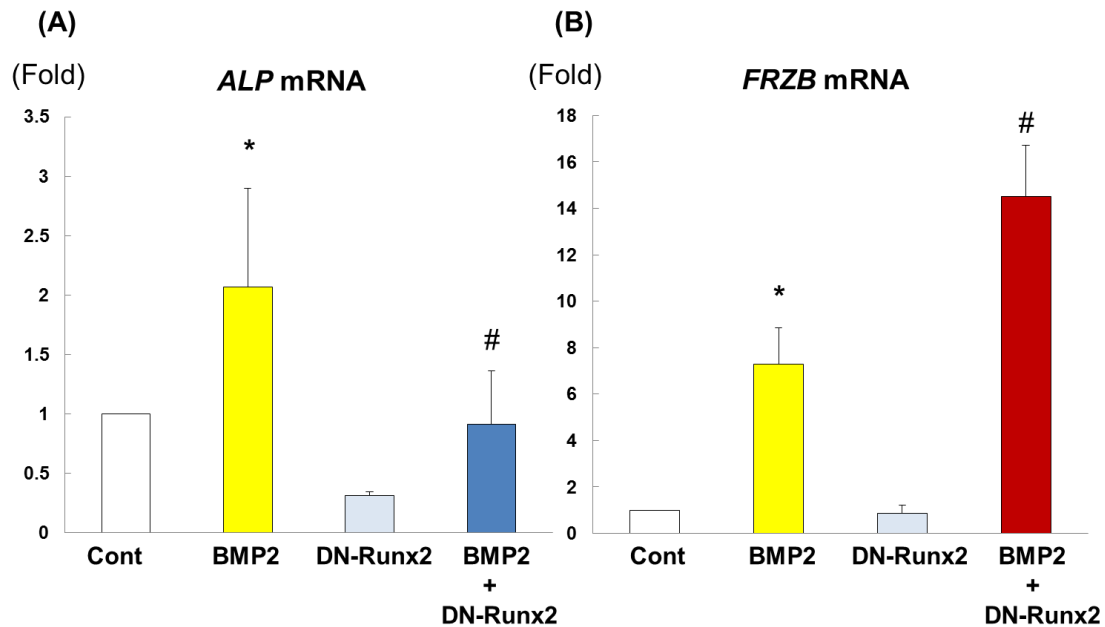


図 7. ヒト軟骨細胞様株 SW1353 における *FRZB* mRNA の発現に対する BMP2、Runx2、Osterix および Msx2 の効果

SW1353 細胞に Venus (Cont)、BMP2、Runx2、Osterix あるいは Msx2 アデノウイルスを感染させ 3 日間培養後、*FRZB* mRNA の発現を RT-qPCR にて解析した。*FRZB* mRNA 発現量は、 $\beta$ -ACTIN mRNA 発現量で補正し、Venus アデノウイルス感染の SW1353 細胞における発現量の倍数で示した (mean  $\pm$  S.D., n=3, \*:  $p < 0.05$  vs Cont グループ)。



**図 8. ヒト軟骨細胞様株 SW1353 における *FRZB* mRNA の発現に対する Dominant-Negative Runx2 (DN-Runx2) の効果**

SW1353 細胞に Venus (Cont) あるいは DN-Runx2 アデノウイルスを 24 時間感染させた後にリコンビナント BMP2 存在下または非存在下でさらに 3 日間 (A) あるいは 4 日間 (B) 培養後に RNA を回収した。*ALP* および *FRZB* の mRNA の発現量を RT-qPCR にて解析した。*ALP* mRNA (A) および *FRZB* mRNA (B) の発現量は、 $\beta$ -*ACTIN* mRNA 発現量で補正し、Venus アデノウイルス感染の SW1353 細胞における発現量の倍数で示した (mean  $\pm$  S.D., n=6, \*:  $p < 0.05$  vs Cont グループ, #:  $p < 0.05$  vs BMP2 グループ)。



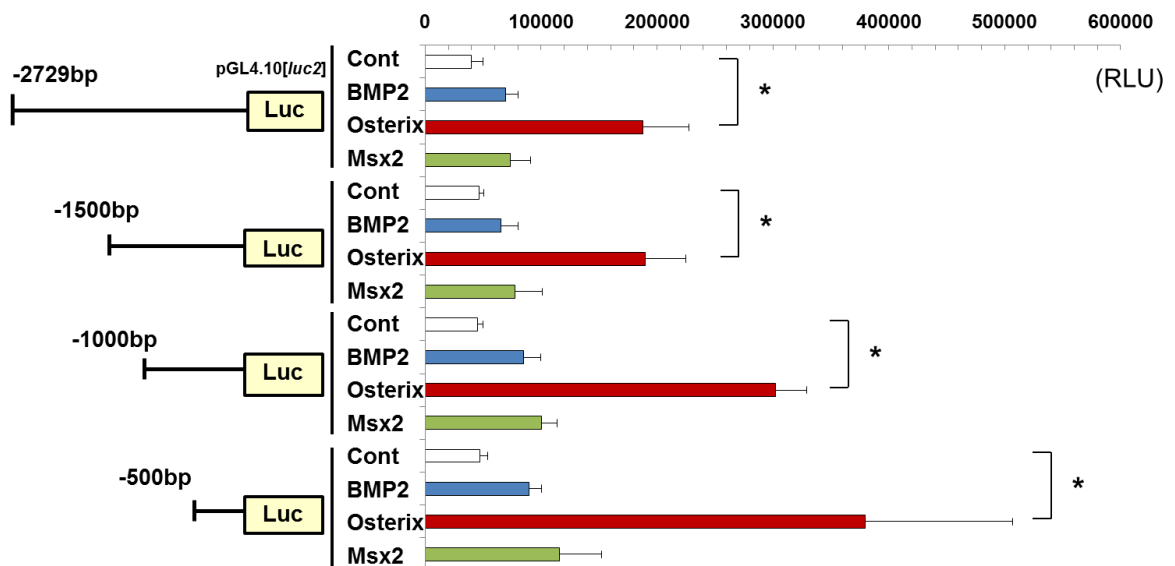


図 9. *FRZB* 遺伝子プロモーター活性に対する *BMP2*、*Osterix* および *Msx2* の効果

*FRZB* 遺伝子プロモーターの 2729bp、1500bp、1000bp および 500bp の領域をルシフェラーゼレポーター遺伝子に融合したコンストラクトを SW1353 細胞にトランスフェクションし、12 時間培養後に、*BMP2*、*Osterix* あるいは *Msx2* アデノウイルスを感染させ、さらに 48 時間培養後、各細胞のルシフェラーゼ活性を測定した (mean ± S.D., n=4, \*:  $p < 0.05$  vs Cont グループ)。

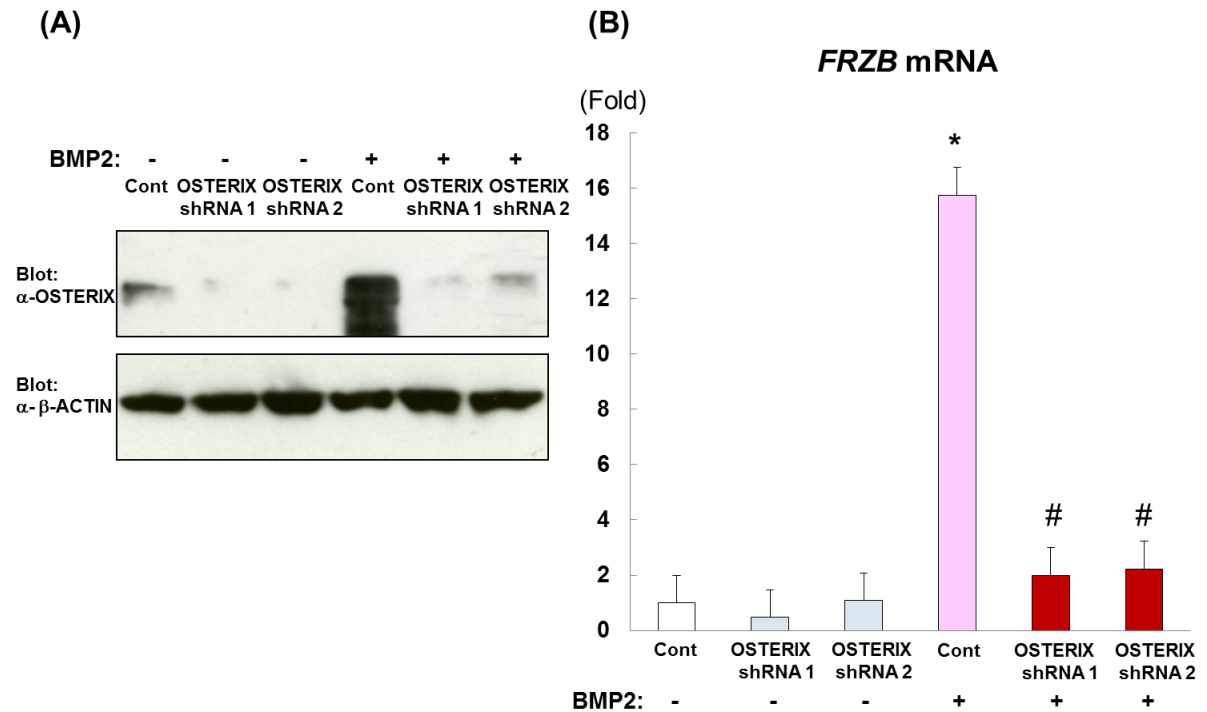


図 10. BMP2 誘導性の *FRZB* 発現に対する *OSTERIX* ノックダウンの効果

SW1353 細胞にコントロールレンチウイルス (Cont)あるいは *OSTERIX* shRNA レンチウイルスを感染、3 日間培養後、スタベーションを 12 時間行った。リコンビナント BMP2 存在下または非存在下で、さらに培養し 24 時間後にタンパク質および RNA を回収した。

*OSTERIX* の発現は抗 *OSTERIX* 抗体を用いたウエスタンブロッティング法にて (A)、*FRZB* mRNA の発現は RT-qPCR 法 (B)にて評価した。*FRZB* mRNA 発現量は、 $\beta$ -*ACTIN* mRNA 発現量で補正し、コントロールレンチウイルス感染の SW1353 細胞における発現量の倍数で示した (mean  $\pm$  S.D., n=3, \*:  $p < 0.05$  vs BMP2 非添加 Cont ウイルスグループ, #:  $p < 0.05$  vs BMP2 添加 Cont ウイルスグループ)。

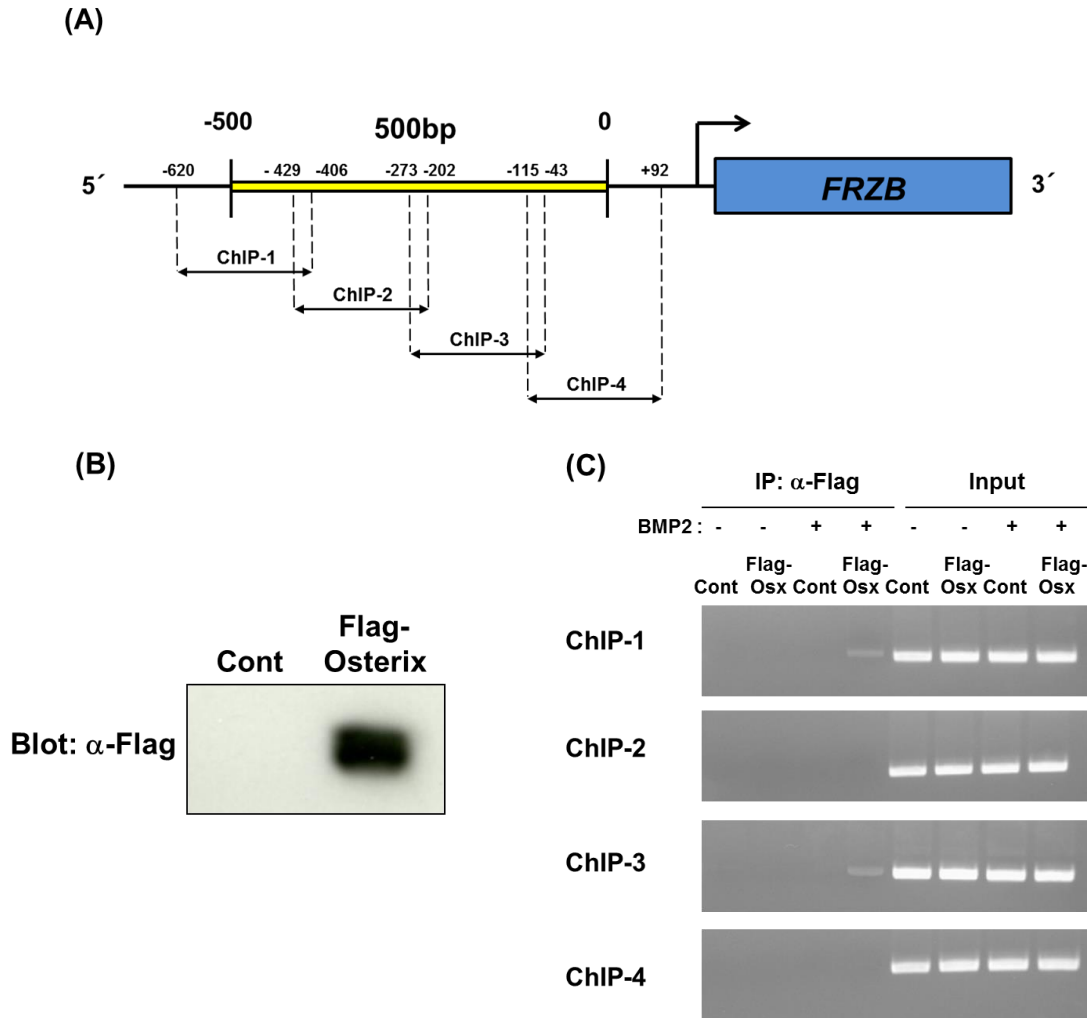


図 11. *FRZB* 遺伝子プロモーターへの *Osterix* 結合性の評価

(A) クロマチン免疫沈降解析に用いたプライマー領域

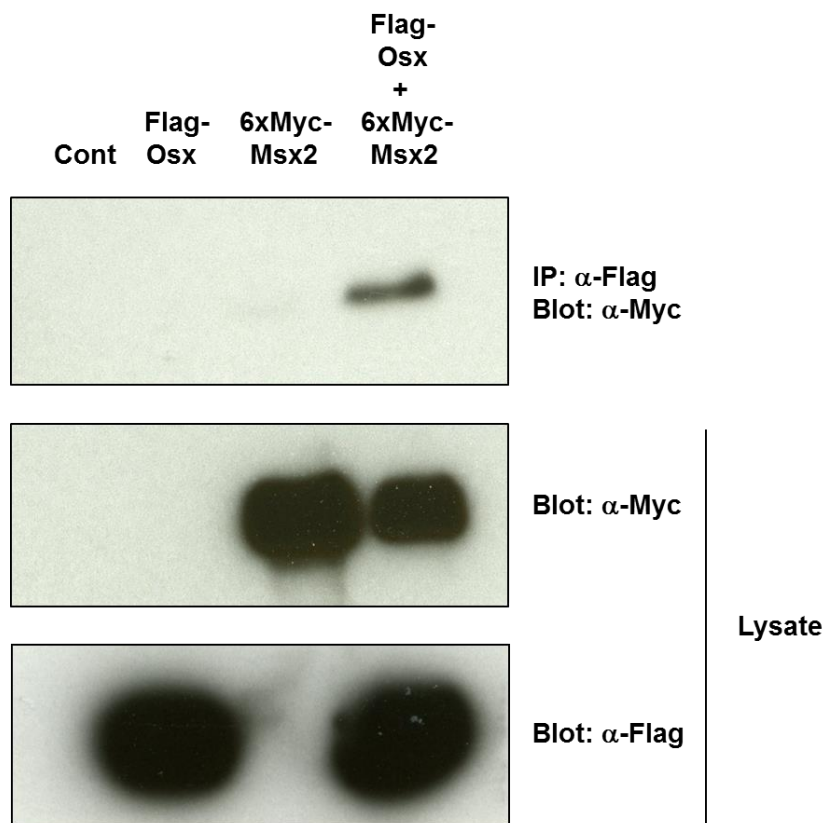
(B) Flag-Osterix レンチウイルスの発現検討

SW1353 細胞に Venus レンチウイルス (Cont)あるいは Flag-Osterix レンチウイルスを感染させ、72 時間培養後に細胞溶解し、得られたタンパク質を抗 Flag 抗体でウェスタンブロッティングを行った。

(C) クロマチン免疫沈降法による結合評価

SW1353 細胞に Venus レンチウイルス (Cont)あるいは Flag-Osterix レンチウイルス (Flag-Osx)を感染させ、72 時間培養後、スタベーションを 12 時間行った。リコンビナント BMP2 存在下または非存在下で 24 時間培養後、ホルムアルデヒド固定、細胞抽出液の採取および断片化クロマチン分画調整し、抗 Flag 抗体にて免疫沈降を行った。免疫沈降で得られたサンプルを、特異的プライマーを用いて PCR し、電気泳動にて解析した。

IP: 免疫沈降サンプル、Input: 免疫沈降前のサンプル



**図 12. Osterix と Msx2 の物理的結合**

293FT 細胞に、Flag-Osterix (Flag-Osx)-pLV5IN-CMV-Pur、6xMyc-Msx2-pcDNA3 のいずれか、または両者をトランスフェクションし、48 時間培養後、細胞溶解液を回収した。細胞溶解液を抗 Flag 抗体にて免疫共沈降後、免疫共沈降サンプルを抗 Myc 抗体を用いたウエスタンブロッティング法にて解析した (パネル最上段)。6xMyc-Msx2 および Flag-Osterix の発現レベルは抗 Myc 抗体 (パネル中段) および抗 Flag 抗体 (パネル最下段) を用いたウエスタンブロッティング法により確認した。