



|              |                                                                                     |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 関節軟骨細胞におけるGDF5 の役割の解明                                                               |
| Author(s)    | 大川, 真季                                                                              |
| Citation     | 大阪大学歯学雑誌. 2022, 66(2), p. 23-40                                                     |
| Version Type | VoR                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/93190">https://hdl.handle.net/11094/93190</a> |
| rights       |                                                                                     |
| Note         |                                                                                     |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

# 関節軟骨細胞における GDF5 の役割の解明

大川 真季\*

(令和 4 年 2 月 22 日受付)

## 緒 言

変形性関節症は、日本では推定約 2,500 万人の患者がいると言われており、関節軟骨が変性、破壊され、関節構造の変形と機能障害を引き起こす非可逆的な運動器疾患で、歯科領域では顎関節症Ⅳ型が属するとして知られている<sup>1)</sup>。変形性関節症患者では、関節に疼痛が生じ、関節可動域が減少すると、日常生活に支障をきたし、QOL が低下することが問題になっている。変形性関節症は、加齢・外傷・体重負荷などの環境要因と遺伝的要因が関与して発症することが示唆されているものの、その発症機序は未だほとんど明らかになっていない。そのため変形性関節症の治療法は、消炎鎮痛剤投与等の対症療法や人工関節置換術に限られている。したがって、より有効で侵襲性の少ない原因療法の確立が求められている<sup>1)</sup>。

関節軟骨組織では、関節軟骨細胞は比較的疎に分布し、その周囲に細胞外マトリックスが高密度で存在している。関節軟骨の細胞外マトリックスは、主に水、コラーゲン、プロテオグリカンで構成されている<sup>2,3)</sup>。生体のほとんどの組織と異なり、関節軟骨組織には血管、リンパ管および神経がなく、関節軟骨細胞は、細胞外マトリックスを産生するが、細胞の代謝は非常に緩やかで関節軟骨細胞の分化段階を維持している<sup>2,3)</sup>。このため、関節軟骨組織は再生能力が極めて低く、一旦損傷すると線維軟骨に置換され、関節軟骨の機能低下が引き起こされる<sup>1-3)</sup>。

椎骨、肋骨および四肢の長管骨などの多くの骨格は、成長軟骨細胞による内軟骨性骨形成により形成され

る<sup>4-7)</sup>。内軟骨性骨形成では、まず、未分化間葉系細胞が凝集し、静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞へと分化・成熟し、軟骨組織を形成する<sup>4-7)</sup>。その後、軟骨組織の中心で肥大化した軟骨細胞がアポトーシスを生じ、軟骨マトリックスの石灰化と分解が生じ、軟骨組織に生じた間隙に血管が侵入する。血管に含まれる未分化間葉系細胞が骨芽細胞へと分化し、軟骨組織が骨組織へ置換され、一次骨化中心を構成する<sup>4-7)</sup>。この内軟骨性骨形成の一連の流れは、骨幹端でも起こり、二次骨化中心が形成される<sup>4-7)</sup>。両骨端の骨化中心の間の軟骨は、骨の成長中に成長板軟骨となる。関節腔と二次骨化中心の間の部分では、関節軟骨細胞が中心となり関節を構成している。骨端部では、将来関節になる予定の部位に存在する未分化間葉系細胞が関節軟骨細胞に分化し、関節軟骨組織を形成すると推察されている<sup>8,9)</sup>。関節軟骨細胞は、成長軟骨細胞と異なり、分化段階を維持し、その形質を保つことにより関節軟骨の機能を担っている。

関節軟骨細胞に特異的に発現するサイトカインとして growth and differentiation factor 5 (GDF5) が知られている<sup>10-12)</sup>。GDF5 は bone morphogenetic protein (BMP) ファミリーメンバーの一員で、軟骨および歯などの様々な組織の発生に重要であることが知られている<sup>10-14)</sup>。Gdf5 は、マウス肢芽では胎生 11.5 日頃から軟骨前駆領域に弱い発現を認め、胎生 14.5 日にかけて関節形成領域に限局して強く発現するようになり、その後の成長とともに関節における発現が減少する<sup>14,15)</sup>。短指症を示す Gdf5 遺伝子の自然発生変異マウスである Gdf5<sup>bp-3j</sup> マウスでは、GDF5 は関節形成領域を越えて、

\* 大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座

軟骨前駆領域まで持続的に強く発現し、指関節が融合し、関節が形成されないことが示されている<sup>11)</sup>。*Rosa26-tdTomato* マウスと *Gdf5-CreER* マウスを用いて、関節組織の形成過程における *Gdf5* の発現をトレースした研究は、*Gdf5* 陽性細胞が関節周囲の組織から関節領域に流入し、関節軟骨、半月板、靱帯、滑膜などの関節の構造の形成に関与することを示している<sup>16)</sup>。さらに将来の関節形成部位の空隙に存在する細胞は、*Gdf5* の発現を失って骨端軟骨に移動することが認められている<sup>16)</sup>。以上の報告から、GDF5 は関節の形成に重要な役割を果たしていると考えられる。また *Gdf5* 遺伝子に変異を有するマウスが、変形性関節症に対して高い感受性を示すことが明らかにされている<sup>17)</sup>。ヒト変形性関節症の遺伝子解析研究より、*GDF5* の遺伝子多型が変形性関節症に密接に関係していることが示されている<sup>18-20)</sup>。これらの遺伝学的研究は、GDF5 が変形性関節症の発症に抑止的に機能している可能性を示している。

ヒト iPS 細胞から軟骨分化させる実験系で、BMP2 に加えて GDF5 が必要であることが示されている<sup>21)</sup>。この研究報告は、GDF5 が関節軟骨の発生や維持においては、同じファミリーである BMP2 と異なる作用を有している可能性を示唆している。しかしながら GDF5 が軟骨細胞分化誘導作用を有する<sup>10, 22, 23)</sup> 一方で、関節軟骨を石灰化させずに細胞の恒常性を維持するメカニズムは明らかになっていない。

そこで本研究では、変形性関節症の発症機序の解明と新規治療法の開発に貢献することを目的として、関節軟骨細胞における GDF5 の役割および作用メカニズムの解明を目指した。

## 材料と方法

### 1. 細胞培養

マウス胚細胞由来間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞およびマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞は、理化学研究所（埼玉，日本）より購入した。Lenti-X 293T 細胞は、TAKARA（滋賀，日本）より購入した。C3H10T1/2 細胞，C2C12 細胞および Lenti-X 293T 細胞は、10% ウシ胎仔血清（FBS）（Cell Culture Bioscience, St. Louis, MO, USA）および硫酸カナマイシン 250mg/ml（ファルマ株式会社，東京，日本）を含むダルベッコ改変イーグル（DMEM）培地（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）にて 37℃，5% CO<sub>2</sub> 気相下で培養した。

### 2. マウス肢芽細胞の単離およびマイクロマスカルチャー

胎生 11 日齢の ICR マウス（オリエンタル酵母工業，東京，日本）の肢芽を実体顕微鏡下にて分離し，0.1% コラゲナーゼ（富士フィルム和光純薬，大阪，日本）および 0.1% トリプシン（Sigma-Aldrich）を含む DMEM を用いて消化した。消化後，セルストレーナーでろ過し，ろ過液中の細胞を遠心して，肢芽細胞を単離した。細胞濃度が  $2 \times 10^7$  細胞 /ml になるように 10% FBS を含む DMEM を追加し，20μl ずつ 5% CO<sub>2</sub> 気相下で 120 分間培養した。ディッシュ底面に細胞が接着したのを確認後，10% FBS を含む DMEM を追加し，マイクロマスカルチャーした<sup>24)</sup>。

### 3. マウス関節軟骨表層（SFZ）細胞の単離および培養

生後 3 日齢の ICR マウス（オリエンタル酵母工業）の膝関節を実体顕微鏡下にて分離し，0.25% トリプシン（Sigma-Aldrich）を含む HBSS（ナカライテスク，京都，日本）を用いて 1 時間消化後，0.25% コラゲナーゼ（富士フィルム和光純薬）を含む DMEM を用いて 1.5 時間消化した。消化後，セルストレーナーでろ過し，ろ過液中の細胞を遠心し，BioCoat™ Fibronectin Dish（コーニングインターナショナル株式会社，東京，日本）にて 20 分培養し，DMEM にて 2 回 Wash し，Dish 底面に接着した細胞を SFZ 細胞とし，10% FBS を含む DMEM にて培養した<sup>25)</sup>。

### 4. トランスフェクション

培養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って行った。リポフェクションには，X-treme GENE 9（Roche, Basel, Schweiz）を用いて行った。目的遺伝子を組み込んだプラスミドと X-treme GENE 9 溶液を FBS 非含有 DMEM 中で 15 分間室温にて反応させ，DNA-リボソーム複合体の形成後，細胞培養液中に DNA-リボソーム複合体を添加することによりトランスフェクションを行った。

### 5. リコンビナント BMP2 の作製

BMP2 プラスミドを Lenti-X 293T 細胞にトランスフェクションし，24 時間後に培養液を 10% FBS 含有高グルコース DMEM（Sigma-Aldrich）に交換した。さらに 48 時間後に Lenti-X 293T 細胞培養液を回収し，フィルター滅菌した培養上清をリコンビナント BMP2 として実験に用いた。作成したリコンビナント BMP2 の

効果は C2C12 細胞のアルカリフォスファターゼ活性の促進効果により確認した。C2C12 細胞をリコンビナント BMP2 の存在下あるいは非存在下の  $\alpha$ -MEM 培地 (Sigma-Aldrich) にて 6 日間培養し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (富士フイルム和光純薬) にて洗浄後、4%ホルマリン溶液 (富士フイルム和光純薬) にて 10 分間固定し、330ng/ml nitro blue tetrazolium (Sigma-Aldrich), 165ng/ml bromochloroindoryl phosphate (Sigma-Aldrich), 100mM NaCl および 5mM  $MgCl_2$  を含む 100mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.5) にて反応させ、染色を行った。

## 6. ルシフェラーゼアッセイ

BMP 応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を C3H10T1/2 細胞にトランスフェクションし、6 時間後に BMP2 あるいは GDF5 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を添加した。さらに 48 時間培養後、細胞を溶解した。溶解したサンプルをルシフェラーゼ基質液 (Luciferase Assay Substrate) (Promega, Madison, WI, USA) と混合した後、Glomax 96 microplate Luminometer (Promega) を用いて、単位時間当たりの相対発光強度 (RLU) を計測した。

## 7. ウエスタンブロッティング

細胞を PBS にて 2 回洗浄後、細胞溶解溶液 (20mM HEPES 緩衝液 (pH7.5), 150mM NaCl, 1mM グリコールエーテルジアミン四酢酸 (Sigma-Aldrich), 1.5mM  $MgCl_2$ , 10%グリセロール (富士フイルム和光純薬), 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 0.1mM オルソバナジン酸ナトリウム (Sigma-Aldrich), 10 $\mu$ g/ml アプロチニン (Sigma-Aldrich), 10 $\mu$ g/ml ロイペプチン (Sigma-Aldrich), 1mM ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩 (Sigma-Aldrich) にて溶解した。この細胞溶解溶液を遠心分離し (15,000g, 4 $^{\circ}$ C, 20 分), その上清に 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 (富士フイルム和光純薬) を添加し、熱溶解後 (95 $^{\circ}$ C, 5 分), サンプルとした。サンプルを 10% SDS- ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロースメンブレンに転写後、一次抗体として、抗リン酸化 Smad1/5 抗体 (#9516, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) と反応させた。TBS-T (Tris Buffered Saline-Triton X-100) および TBS (Tris Buffered Saline) にて洗浄後、二次抗体として西洋わさび過酸化酵素を付与した抗ウサギ IgG 抗体 (MBL,

名古屋, 日本) と反応させた。ImmunoStar LD (富士フイルム和光純薬) 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。

## 8. Microarray 解析

胎生 11 日齢マウス胚芽細胞から Nucleo Spin RNA Plus (タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) を用いて全 RNA を精製し、得られた RNA から逆転写反応により cDNA を作製し、作製した cDNA から GeneChip 3' IVT PLUS Reagent Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, US) を用い、in vitro transcription により cRNA に転写してビオチン標識を行った。標識 cRNA をハイブリダイゼーションバッファーに加え、Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) 上で 16 時間のハイブリダイゼーションを行った。GeneChip Scanner 3000 7G (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) でスキャンを行い、Affymetrix GeneChip Command Console Software (Affymetrix) にて画像解析 (CEL ファイルの作成), Affymetrix Expression Console<sup>TM</sup> Software (Affymetrix) を用いて数値化 (CHP ファイルの作成) を行った。

## 9. アルシアンブルー染色

細胞を PBS にて洗浄後、3.7%ホルマリン溶液 (富士フイルム和光純薬) にて固定し、70%エタノール (ナカライテスク) に浸漬した。5%酢酸 (pH1.0) (富士フイルム和光純薬) にて 5 分間インキュベート後、1% アルシアンブルー溶液 (5%酢酸, 1% アルシアンブルー) (富士フイルム和光純薬) にて 10 分間反応させ、染色を行った。

## 10. アリザリンレッド染色

細胞を PBS にて洗浄後、70%エタノールにて 1 時間固定した。脱イオンした純水にて洗浄後、室温で 4% アリザリンレッド S 溶液 (Sigma-Aldrich) にて 10 分間反応させ、染色を行った。

## 11. RT-qPCR (Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction)

細胞を PBS にて洗浄後、NucleoSpin RNA Plus Kit (Marcheray Nagel, Duren, Germany) を用いて全 RNA を精製した。回収した全 RNA を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡, 大阪,

表 1. RT-qPCR に用いた Taqman プローブおよびプライマーの配列

| Target cDNA    | Probe and primer sequence (5'-3') |                                  |
|----------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| <i>β-Actin</i> | probe:                            | 5'-TTAATTTCTGAATGGCCCAGGTCT-3'   |
|                | sense primer:                     | 5'-ATTGGTCTCAAGTCAGTGTACAGG-3'   |
|                | anti-sense primer:                | 5'-CCTGGCTGCCTCAACACCTCAACCC-3'  |
| <i>Sox9</i>    | probe:                            | 5'-CCTTCAACCTTCCTCACTACAGC-3'    |
|                | sense primer:                     | 5'-GGTGGAGTAGAGCCCTGAGC-3'       |
|                | anti-sense primer:                | 5'-CCGCCCATCACCCGCTCGCAATAC-3'   |
| <i>Col2a1</i>  | probe:                            | 5'-CCTCCGTCTACTGTCCACTGAG-3'     |
|                | sense primer:                     | 5'-TGGAGCCCTGGATGAGCAAG-3'       |
|                | anti-sense primer:                | 5'-TGAGGTTGCCAGCCGCTTCGTCCA-3'   |
| <i>Acn</i>     | probe:                            | 5'-TCACTGTTACCGCCACTTTCC-3'      |
|                | sense primer:                     | 5'-TGCTGCTCAGATGTGACTGC-3'       |
|                | anti-sense primer:                | 5'-ACCGTCTCTCCGCATCCACCCAGG-3'   |
| <i>Col10a1</i> | probe:                            | 5'-GCCAAGCAGTCATGCCTGAT-3'       |
|                | sense primer:                     | 5'-GACACGGGCATACCTGTTACC-3'      |
|                | anti-sense primer:                | 5'-AGCACTGACAAGCGGCATCCCAGA-3'   |
| <i>Mmp13</i>   | probe:                            | 5'-GGTTATGACATTCTGGAAGTTATCC-3'  |
|                | sense primer:                     | 5'-CGTGGTTCTCAGAGAAGAAGAGG-3'    |
|                | anti-sense primer:                | 5'-CCCGTGTCTCAAAGTGAACCGCAGCG-3' |
| <i>Alp</i>     | probe:                            | 5'-ATCTTTGGTCTGGCTCCCATG-3'      |
|                | sense primer:                     | 5'-TTTCCCGTTACCGTCCAC-3'         |
|                | anti-sense primer:                | 5'-TGAGCGACACGGACAAGAAGCCCTT-3'  |
| <i>Ihh</i>     | probe:                            | 5'-GACTCATTGCCTCCCAGAACTG-3'     |
|                | sense primer:                     | 5'-CCAGGTAGTAGGGTCACATTGC-3'     |
|                | anti-sense primer:                | 5'-CCACAGCCAGCCTGGACATCCCGA-3'   |
| <i>Osterix</i> | probe:                            | 5'-AGCGACCACTTGAGCAAACAT-3'      |
|                | sense primer:                     | 5'-GCGGCTGATTGGCTTCTTCT-3'       |
|                | anti-sense primer:                | 5'-CCCGACGCTGCGACCCTCCC-3'       |
| <i>Runx2</i>   | probe:                            | 5'-CTCCTTCCAGGATGGTCCCA-3'       |
|                | sense primer:                     | 5'-CTTCCGTCAGCGTCAACACC-3'       |
|                | anti-sense primer:                | 5'-CACCACCTCGAATGGCAGCAGCT-3'    |

日本)により逆転写反応を行い, cDNA を合成した。遺伝子発現の定量は, Taqman PCR protocol にしたがって FastStart TaqMan Probe Master (Roche) ならびに Step One Plus real-time PCR system (Applied Biosystems) 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。

## 12. *Gdf5* 遺伝子ノックアウト (KO) マウスの作製

*Gdf5* 遺伝子の第 1 エキシソンの開始コドン直下に, *ZsGreen* 遺伝子が挿入されるように設計し, CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて *Gdf5*-KO マウスを作製した (図 1)。crRNA と tracrRNA をアニーリングし, ガイド RNA (gRNA) を作製した。TAKE 法<sup>26)</sup>にて C57BL6/J マウスの前核期受精卵に Cas9 タンパク質, gRNA, ssODN を導入し, 20 時間培養後, 2 細胞胚を偽妊娠 ICR 雌マウスの卵管に移植し, *Gdf5*-KO マウス (F0 世代) を作製し, PCR 解析により遺伝子型の確認を行っ

た。F0 マウスと C57BL6/J を交配させて, PCR 解析にて目的遺伝子の生殖系列への導入を確認し, *Gdf5* 遺伝子欠損ヘテロマウス (F1 世代) を樹立した。*Gdf5* 遺伝子欠損ヘテロマウス同士の交配により *Gdf5*-KO マウスを作製した。PCR 解析にて使用したプライマーは (図 2) に示すとおりである。

## 13. ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色

生後 3 日齢マウスの肘関節および膝関節を 4% パラホルムアルデヒド (富士フイルム和光純薬) に 4℃ にて一晩浸漬固定し, 10% エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶液 (pH 7.0) (武藤化学株式会社, 東京, 日本) にて 3 日間脱灰した。サンプルをパラフィン包埋し, 厚さ 6μm の切片を作製した。切片は脱パラフィン処理後, ヘマトキシリン溶液 (武藤化学株式会社) にて 5 分間染色し, 流水洗浄後, エオジン溶液 (武藤化学株式会社) にて 5 分間染色してから脱水した。

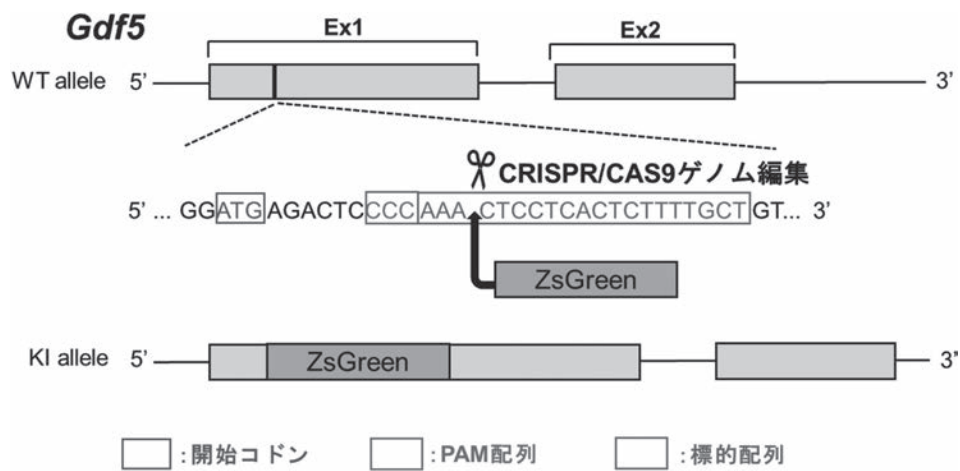


図1. *Gdf5*-KO マウスの設計

*Gdf5* 遺伝子の第1エクソンの開始コドン直下にある PAM 配列の3塩基下流を CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いて切断し, *ZsGreen* 遺伝子を挿入した。

Ex: エキソン, WT: 野生型, KI: ノックイン

(A)

|                                        |                              |
|----------------------------------------|------------------------------|
| <i>Gdf5</i> <i>ZsGreen</i> KI typing F | 5'- CTGCCTCTGAAGACCCACTC -3' |
| <i>Gdf5</i> <i>ZsGreen</i> KI typing R | 5'- CCAGCACAGTGCAGATGAGT -3' |

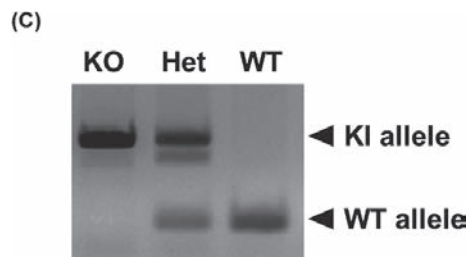
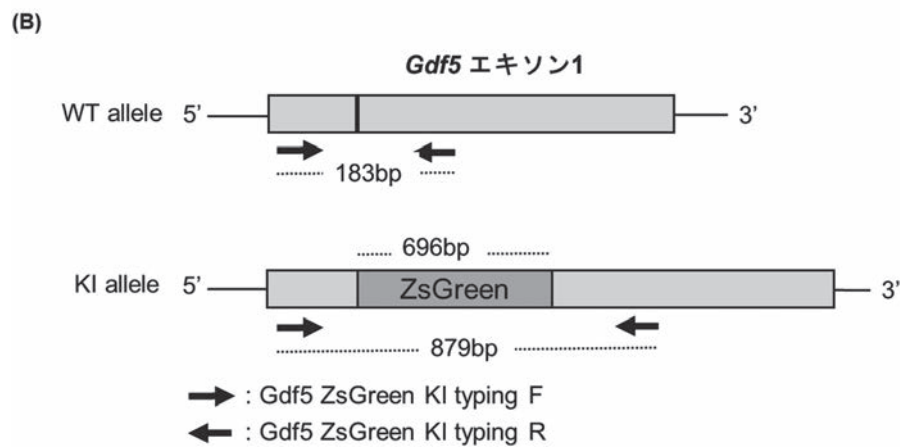


図2. *Gdf5*-KO マウスの遺伝子型の確認に用いた PCR プライマーの設計

(A) 各プライマーの塩基配列

(B) PCR プライマーの設計

(C) PCR 解析による各マウスの遺伝子型の確認

KO: *Gdf5*-KO, Het: ヘテロ変異型, WT: 野生型, KI: ノックイン

#### 14. サフラニン O 染色

生後3日齢マウスの肘関節および膝関節を4%パラホルムアルデヒドに4℃にて一晚浸漬固定し、10% EDTA 溶液 (pH7.0) にて3日間脱灰した。サンプルをパラフィン包埋し、厚さ6 $\mu$ mの切片を作製した。切片は脱パラフィン処理後、0.1% Fast Green 溶液 (富士フイルム和光純薬) にて5分間染色し、1%酢酸にて洗浄後、0.2% Safranin O 溶液 (Sigma-Aldrich) にて20分染色した。

#### 15. 免疫染色

生後3日齢マウス後肢を4%パラホルムアルデヒドに4℃にて一晚浸漬固定し、10% EDTA 溶液 (pH7.0) にて3日間脱灰した。サンプルをパラフィン包埋し、厚さ6 $\mu$ mの切片を作製した。切片は脱パラフィン処理後、1%ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich) でブロッキングし、一次抗体として抗マウス2型コラーゲン抗体 (Chondrex, Redmond, WA, USA) または抗ウサギ PAX1 抗体 (Abcam, Cambridge, UK) を用いて4℃にて一晚静置した。二次抗体として Alexa Fluor 555 標識抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) もしくは抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen) を反応させた後に、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) にて核を染色し封入した。

#### 16. RNA- シークエンス解析

生後3日齢 *Gdf5*-KO マウスおよび野生型マウスの SFZ 細胞から NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plus (Marchery Nagel) を用いて全 RNA を回収した。ライブラリー調整には TruSeq stranded mRNA sample prep kit (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いた。Illumina NovaSeq 6000 platform (Illumina) を用いてシークエンスを行った。シークエンスリードは TopHat v2.0.13 (Center for Computational Biology, Baltimore, MD, USA) と Bowtie2 ver. 2.2.3 (Center for Computational Biology) と SAMtools ver. 0.1.19 を用いて、マウスのリファレンスゲノム上にマッピングした。Cufflinks version 2.2.1. を用いて fragments per kilobase of exon per million mapped fragments (FPKM) を算出した。

#### 17. 統計処理

3群間の比較は、一元配置分散分析を用い、P値が5

%未満のものに対して Tukey-Kramer 法を用いて多重比較検定を行った。統計学的処理は SPSS (IBM, Chicago, IL, USA) を用いた。実験結果は、平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で表し、P値が5%未満のものを有意差ありとした。

### 結 果

#### 1. Smad シグナルに対する GDF5 の関与

BMP ファミリーメンバーである GDF5 が BMP2 と同様に Smad シグナル経路を活性化するか否かを検討するために、マウス胚細胞由来間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 に BMP 応答性ルシフェラーゼプラスミドをトランスフェクションし、BMP2 または GDF5 を添加し、その効果を検索した。その結果、GDF5 は BMP2 と同じく、BMP 応答性ルシフェラーゼの活性を促進した (図3 (A))。次に Smad1/5 のリン酸化を指標に、GDF5 が Smad シグナルを活性化するか否かを、抗リン酸化 Smad1/5 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により検討した。その結果、GDF5 は BMP2 と同様に Smad1/5 のリン酸化を促進した (図3 (B))。

#### 2. GDF5 と BMP2 の標的遺伝子の検討

GDF5 と BMP2 の生物学的作用の違いの有無を明らかにするために、マウス肢芽細胞とマウス SFZ 細胞における GDF5 と BMP2 の標的遺伝子を Microarray 解析により検索した。胎生11日齢マウスの肢芽細胞あるいは生後3日齢マウスの SFZ 細胞に、BMP2 または GDF5 を添加したサンプルを用いて Microarray 解析を行い、発現量がリガンド非添加群である対照群に対して2倍以上に上昇した遺伝子を標的遺伝子とした。マウス肢芽細胞においては、GDF5 の標的遺伝子の約3分の2が BMP2 の標的遺伝子と一致していた (図4 (A))。マウス SFZ 細胞においても GDF5 の標的遺伝子の多くが BMP2 の標的遺伝子と一致していた (図4 (B))。これらの結果より、少なくとも、マウス肢芽細胞および SFZ 細胞では、GDF5 と BMP2 は多くの共通の標的遺伝子を有していることが示された。したがって GDF5 は、マウス肢芽細胞および SFZ 細胞において BMP2 と同様の作用を有している可能性があると推察された。

#### 3. マウス肢芽細胞および SFZ 細胞の軟骨細胞分化に対する GDF5 と BMP2 の比較検討

マウス肢芽細胞における GDF5 と BMP2 の生物学的

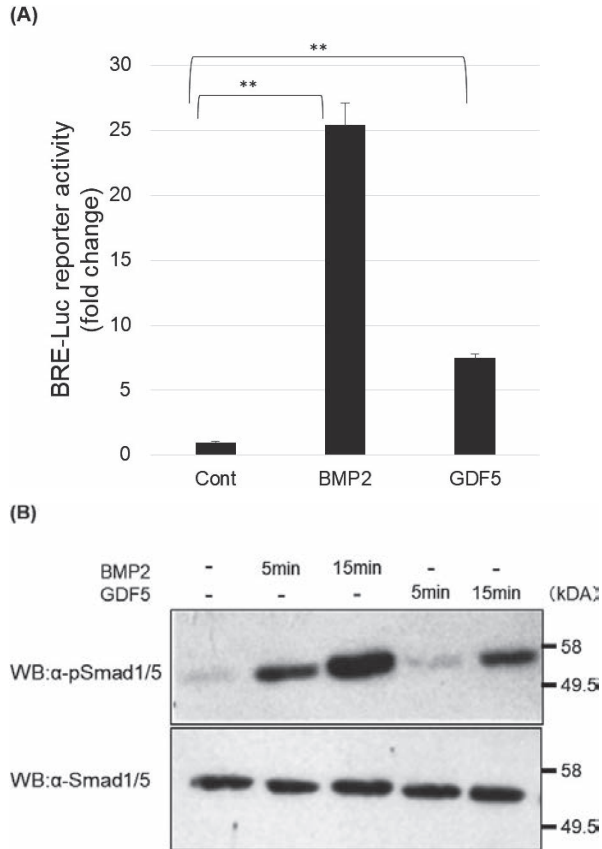


図3. Smad シグナルに対する GDF5 の関与

- (A) C3H10T1/2 細胞に BMP 応答性ルシフェラーゼプラスミド (BRE-Luc) をトランスフェクションし、6 時間後に DMEM に培地交換した。その後、GDF5 または BMP2 を添加し、48 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。グラフの値は平均値および標準偏差を示す。(n=4, \*\*P<0.01)
- (B) C2C12 細胞に GDF5 または BMP2 を添加し、5 分後あるいは 15 分後に細胞溶解し、細胞内のタンパク質を回収した。回収したタンパク質は SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分離し、抗リン酸化 Smad1/5 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により解析した。

作用の有無を検討するために、マウス肢芽細胞の軟骨細胞分化に対する GDF5 と BMP2 の効果をアルシアンブルー染色とアリザリンレッド染色を指標に比較検討した。その結果、GDF5 は BMP2 と同様に軟骨基質を軽度増加させ、軟骨細胞の初期分化を促進することが示された (図 5 (A))。また GDF5 および BMP2 は、マウス肢芽細胞の石灰化を促進した (図 5 (B))。これらの結果より、マイクロマスカルチャーによる軟骨分化を刺激する培養条件下では、GDF5 は BMP2 と同様に肢芽細胞の軟骨細胞分化を促進することが示された。これに対して BMP2 は SFZ 細胞基質の石灰化を誘

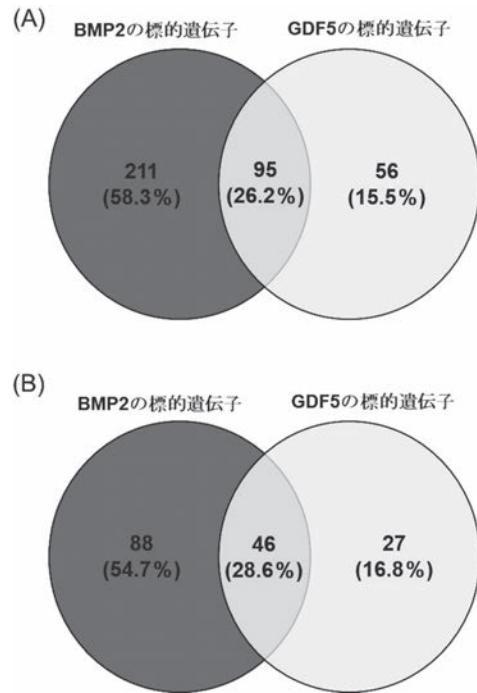


図4. GDF5 と BMP2 のマウス肢芽細胞および SFZ 細胞における標的遺伝子

- (A) 胎生 11 日齢 ICR マウスより肢芽細胞を採取し、GDF5 または BMP2 を添加し、24 時間後に全 RNA を回収し、Microarray 解析を行った。
- (B) 生後 3 日齢 ICR マウスより SFZ 細胞を採取し、GDF5 または BMP2 を添加し、24 時間後に全 RNA を回収し、Microarray 解析を行った。発現量がリガンド非添加群である対照群に対して 2 倍以上に上昇した遺伝子を標的遺伝子とした。数値は遺伝子数を示す。各グループの遺伝子数の割合を % で表示した。

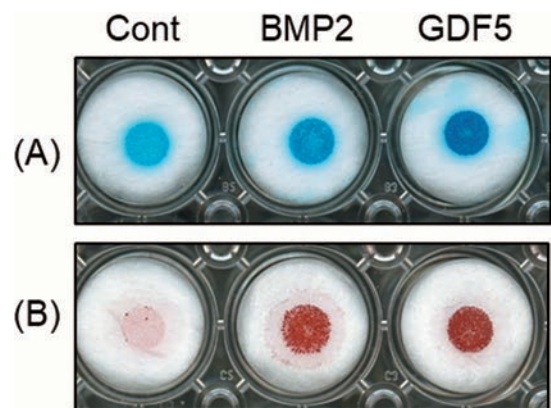


図5. マウス肢芽細胞の軟骨細胞分化に対する GDF5 と BMP2 の比較検討

胎生 11 日齢 ICR マウス肢芽細胞をマイクロマスカルチャーし、GDF5 または BMP2 を添加し、3 日間培養後アルシアンブルー染色 (A) し、また培養 3 日後にアスコルビン酸 (50μl/ml) および β グリセロリン酸 (5mM) を加え、さらにその 4 日後にアリザリンレッド染色 (B) した。

導したが、GDF5 は効果を示さなかった (図6)。この実験結果より、GDF5 は SFZ 細胞の永久軟骨細胞としての機能的恒常性の維持に関与している可能性が示唆された。

さらに、マウス肢芽細胞と SFZ 細胞の軟骨細胞分化

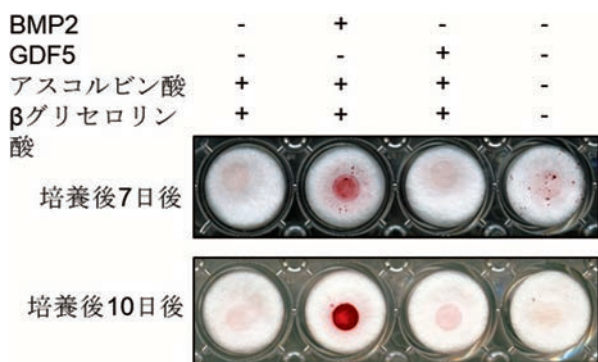


図6. マウス SFZ 細胞の軟骨細胞分化に対する GDF5 と BMP2 の比較検討

生後3日齢 ICR マウスより SFZ 細胞を採取し、マイクロマスカルチャーし、アスコルビン酸 (50 $\mu$ l/ml) および  $\beta$  グリセロリン酸 (5mM) を加え、GDF5 または BMP2 を添加し、培養後7日後と10日後にアリザリンレッド染色を行った。

に対する GDF5 の効果を検索するために、軟骨分化マーカー遺伝子発現を指標にその効果を RT-qPCR 解析にて検討した。胎生11日齢マウスより採取した肢芽細胞に GDF5 または BMP2 を添加し、24時間後に全 RNA を回収し、RT-qPCR 解析を行ったところ、GDF5 は BMP2 と同様に中・後期の軟骨分化マーカーであるアルカリフォスファターゼやインディアンヘッジホッグの発現を増加させた (図7)。また、胎生11日齢マウスより採取した肢芽細胞をマイクロマスカルチャーし、GDF5 または BMP2 を添加し、72時間後に全 RNA を回収し、RT-qPCR 解析を行ったところ、軟骨分化マーカーの増加はさらに顕著になり、GDF5 はマウス肢芽細胞では、BMP2 と同様に軟骨分化の初期マーカーである *Sox9*、2型コラーゲンおよびアグリカンや、中・後期の軟骨分化マーカーであるアルカリフォスファターゼやインディアンヘッジホッグの発現を増加させた (図8)。

一方、生後3日齢マウスより採取した SFZ 細胞に、GDF5 または BMP2 を添加し、24時間後あるいは72時間後に全 RNA を回収し、RT-qPCR 解析を行ったところ、GDF5 および BMP2 は SFZ 細胞の軟骨分化の初期

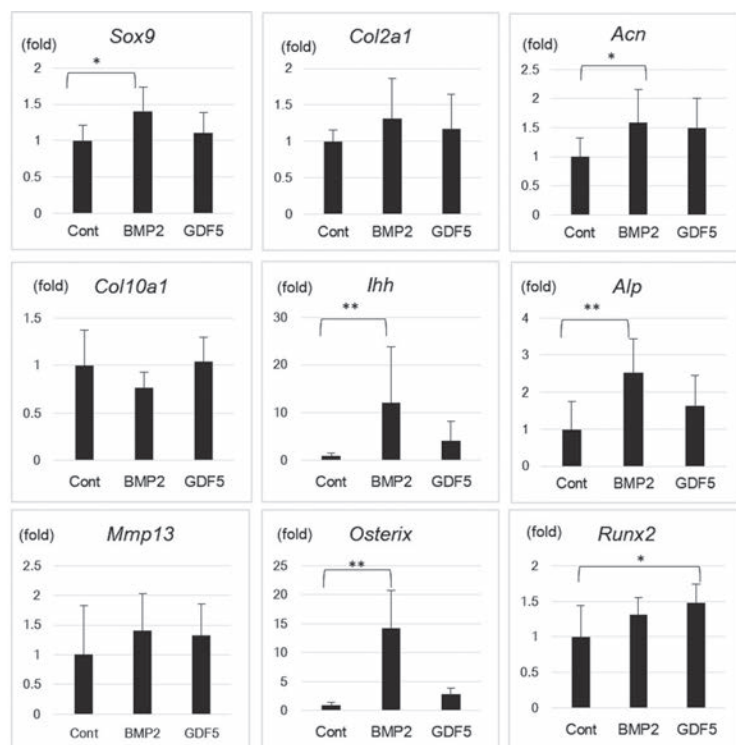


図7. マウス肢芽細胞の軟骨細胞分化に対する GDF5 と BMP2 の比較検討

胎生11日齢 ICR マウス肢芽細胞を採取し、GDF5 または BMP2 を添加し、その24時間後に全 RNA を精製し、RT-qPCR により、上記遺伝子の発現を定量し、 $\beta$ -アクトニンにて標準化した。グラフの値は、非添加群 (Cont) を1とした倍数にて算出した平均値および標準偏差を示す。(n = 3, \*P<0.05 \*\*P<0.01)

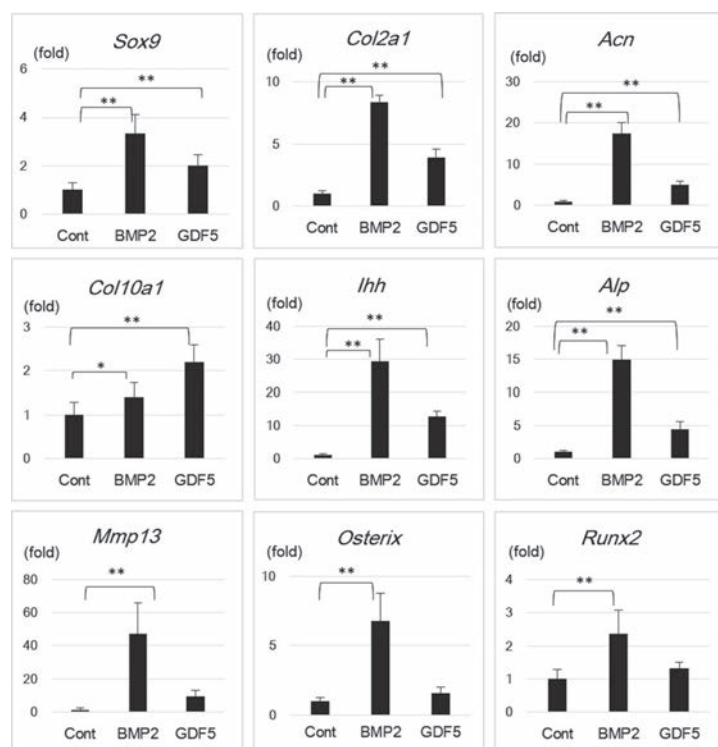


図 8. マイクロマスカルチャーしたマウス肢芽細胞の軟骨細胞分化に対する GDF5 と BMP2 の比較検討  
胎生 11 日齢 ICR マウス肢芽細胞をマイクロマスカルチャーし、GDF5 または BMP2 を添加し、その 72 時間後に全 RNA を精製し、RT-qPCR により、上記遺伝子の発現を定量し、 $\beta$ -アクトチンにて標準化した。グラフの値は、非添加群 (Cont) を 1 とした倍数にて算出した平均値および標準偏差を示す。(n = 3, \*P<0.05, \*\*P<0.01)

マーカーの発現に対しては効果を示さなかった (図 9, 図 10)。また、BMP2 はマウス SFZ 細胞において 10 型コラーゲン、アルカリフォスファターゼ、インディアンヘッジホッグおよび *Osterix* などの後期軟骨分化マーカーの発現を増加させたが、GDF5 はこれらの遺伝子の発現に対してはほとんど効果を示さなかった (図 9, 図 10)。この RT-qPCR 解析の実験結果は、GDF5 の SFZ 細胞の石灰化に対する効果と一致している。したがって、GDF5 は BMP2 と同様にマウス肢芽細胞に対しては軟骨細胞分化誘導作用を有するが、マウス SFZ 細胞に対しては BMP2 と異なり、石灰化誘導作用を有さず、関節軟骨の恒常性を維持する上で重要な役割を担っていると示唆された。

#### 4. *Gdf5*-KO マウスの解析

GDF5 が関節軟骨細胞の恒常性を維持するメカニズムを検討するために、*Gdf5*-KO マウスを作製した。生後 5 週齢において *Gdf5*-KO マウスの四肢や指は、野生型マウスよりも短縮しており、歩行異常を呈する等の変形性関節症様の病態を示した (図 11)。*Gdf5*-KO マウスの表現型をさらに検討するために、生後 3 日齢の

*Gdf5*-KO マウスの肘関節および膝関節を病理組織学的に検索した。その結果、生後 3 日齢 *Gdf5*-KO マウスの関節頭は縮小していた (図 12, 図 14)。関節軟骨および半月板の形態ならびに細胞に明確な差を認めなかったが、サフラニン O 染色陰性の関節軟骨表層の領域が *Gdf5*-KO マウスでは野生型マウスよりも菲薄化しており、特に関節軟骨が接している部位においてその傾向が顕著だった (図 13, 図 15)。

次に、マウス SFZ 細胞における GDF5 の標的遺伝子を検討するために、生後 3 日齢野生型および *Gdf5*-KO マウスより SFZ 細胞を採取し、24 時間後に全 RNA を回収し、RNA-シーケンス解析を行った。その結果、*Gdf5*-KO マウス由来 SFZ 細胞では、マウス肢芽および SFZ 細胞で高発現している、*Satb2*, *Slc13a5*, *Trpm5* および *Pax1* の発現が顕著に減少していた (表 2)。そこで免疫染色法により生後 3 日齢の野生型および *Gdf5*-KO マウスの PAX1 の発現を解析した。内軟骨性骨形成の前期マーカーである 2 型コラーゲンの発現は RNA-シーケンス解析の結果と同様に、野生型および *Gdf5*-KO マウスで同程度であった (図 16)。一方 PAX1 の発現は、RNA-シーケンス解析の実験結果に一致し

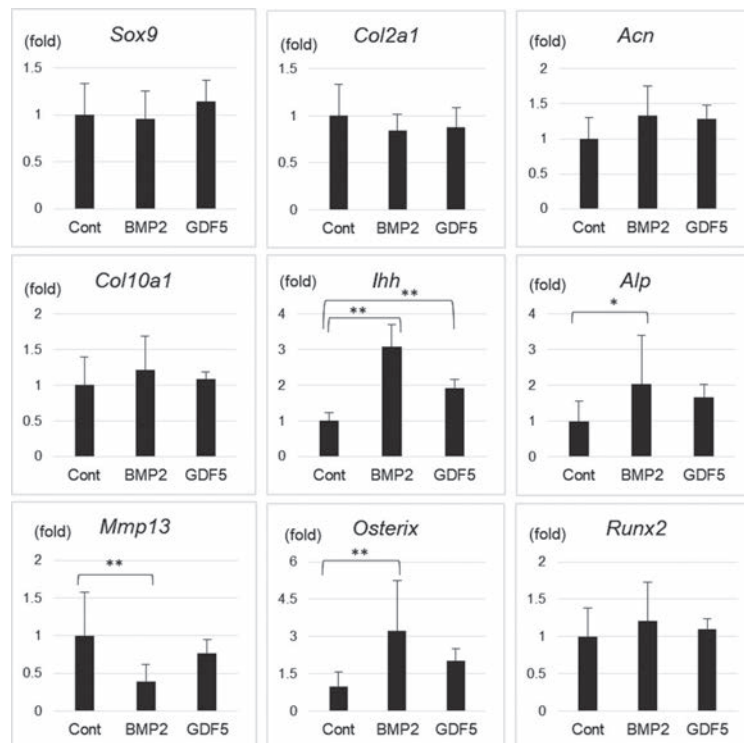


図 9. マウス SFZ 細胞の軟骨細胞分化に対する GDF5 と BMP2 の比較検討 (24 時間後)  
 生後 3 日齢 ICR マウス SFZ 細胞を採取し, GDF5 または BMP2 を添加し, 24 時間後に全 RNA を精製し, RT-qPCR により, 上記遺伝子の発現を定量し,  $\beta$ -アクチンにて標準化した。グラフの値は, 非添加群 (Cont) を 1 とした倍数にて算出した平均値および標準偏差を示す。(n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01)

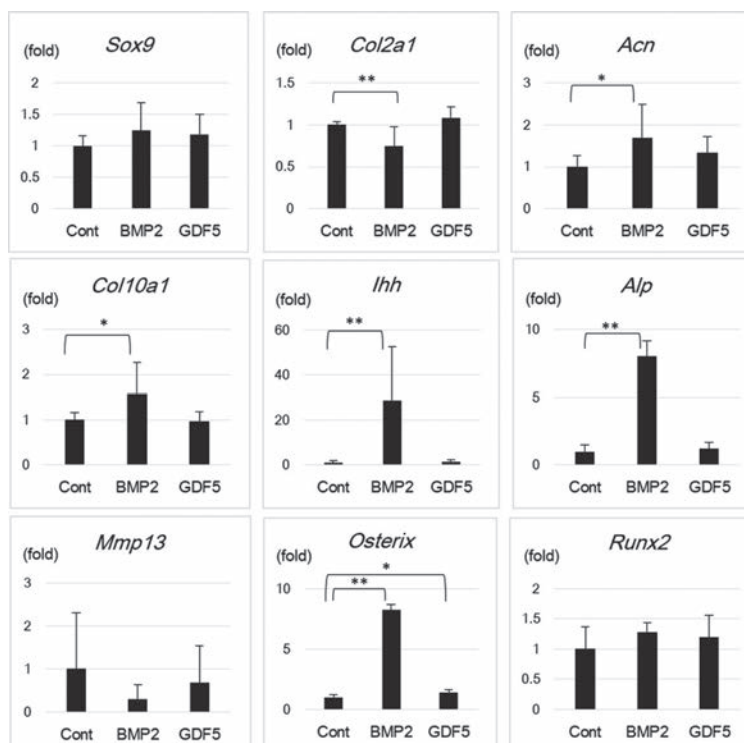


図 10. マウス SFZ 細胞の軟骨細胞分化に対する GDF5 と BMP2 の比較検討 (72 時間後)  
 生後 3 日齢 ICR マウス SFZ 細胞を採取し, GDF5 または BMP2 を添加し, 72 時間後に全 RNA を精製し, RT-qPCR により, 上記遺伝子の発現を定量し,  $\beta$ -アクチンにて標準化した。グラフの値は, 非添加群 (Cont) を 1 とした倍数にて算出した平均値および標準偏差を示す。(n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01)



WT KO

図 11. 生後 5 週齢 *Gdf5*-KO マウスの表現型  
生後 5 週齢の野生型マウスおよび同腹の *Gdf5*-KO マウスの全体像  
WT : 野生型マウス, KO : *Gdf5*-KO マウス

て, *Gdf5*-KO マウスで減少していた (図 16)。

## 考 察

ヒトおよびマウスの遺伝学的研究により, *GDF5* 遺伝子の変異が変形性関節症の発症に大きく関与していることが明らかにされつつある<sup>17-20)</sup>。また関節軟骨細胞の発生あるいは分化において, 表層関節軟骨細胞に特異的に発現する *GDF5* が密接に関与していることも示唆されている<sup>10, 11, 14, 16, 27, 28)</sup>。したがって, *GDF5* は関節軟骨細胞の形成や機能の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら, *GDF5* が関節軟骨細胞においてどのような役割を担っているかは未だ不明である。そこで本研究では, 関節軟骨細胞における *GDF5* が担っている役割を明らかにし, その作用メカニズムの解明を目指した。まず本研究では, *GDF5* とそのファミリー分子である *BMP2* との作用を比較し, *GDF5* が関節軟骨細胞において特異的機能を有するか否かを検討した。*GDF5* は, *Smad1/5* シグナルを活性化し, マウス肢芽細胞および SFZ 細胞において, *BMP2* と共通の標的遺伝子を多く有することが明らかとなった。したがって, *GDF5* は *Smad* 経路を介して, これら *BMP2* と共通の遺伝子の発現を制御しているとし唆された。一

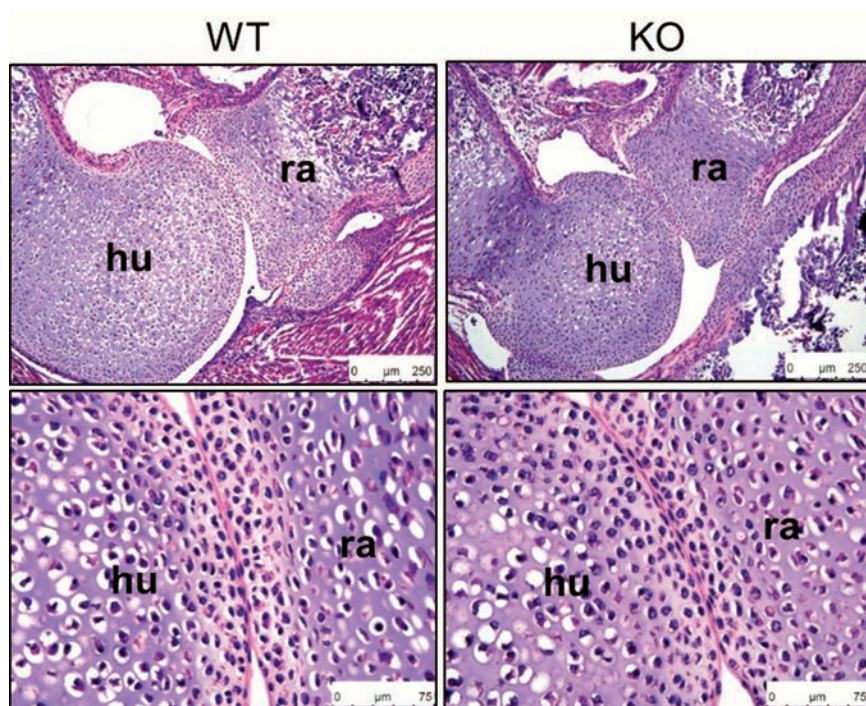


図 12. 生後 3 日齢 *Gdf5*-KO マウスの肘関節の縮小化  
生後 3 日齢野生型マウスおよび同腹 *Gdf5*-KO マウスの肘関節の HE 染色を行った。  
WT : 野生型マウス, KO : *Gdf5*-KO マウス, hu : 上腕骨, ra : 橈骨

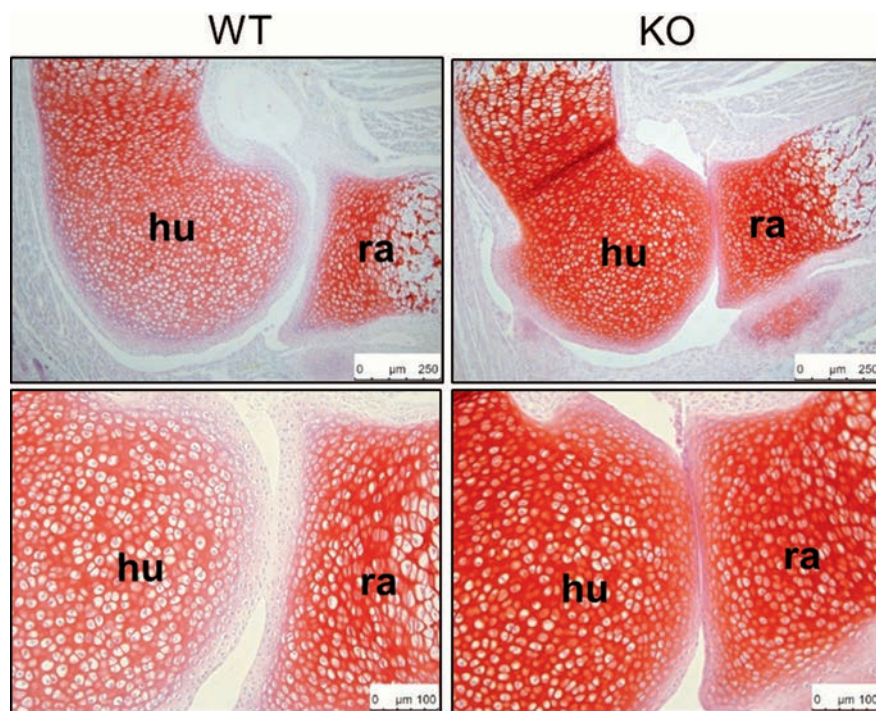


図 13. 生後 3 日齢 *Gdf5*-KO マウスの肘関節の関節軟骨表層領域の菲薄化  
生後 3 日齢野生型マウスおよび同腹 *Gdf5*-KO マウスの肘関節のサフラニン O 染色を行った。  
WT: 野生型マウス, KO: *Gdf5*-KO マウス, hu: 上腕骨, ra: 橈骨

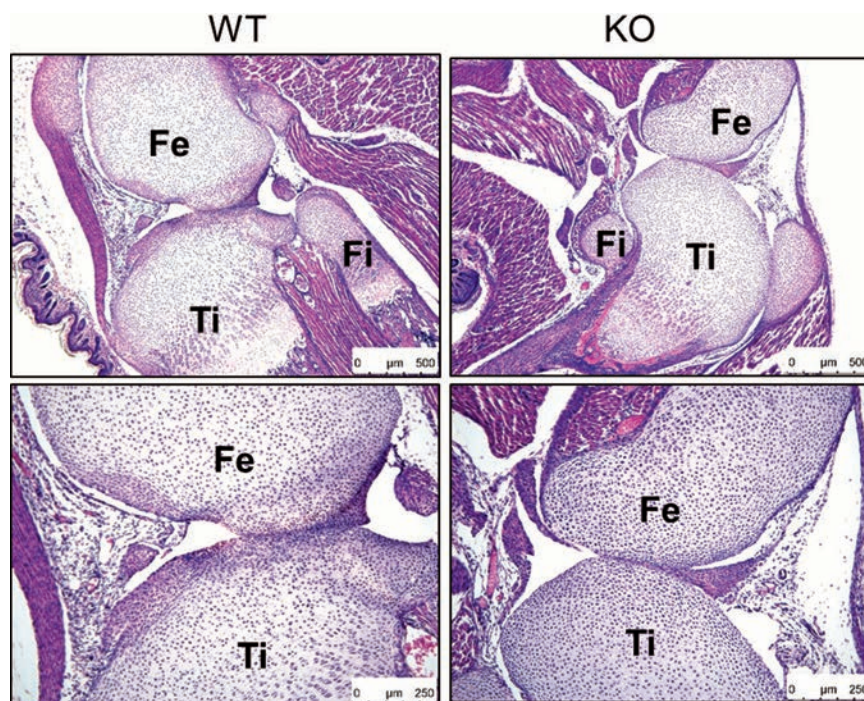


図 14. 生後 3 日齢 *Gdf5*-KO マウスの膝関節の縮小化  
生後 3 日齢野生型マウスおよび同腹 *Gdf5*-KO マウスの膝関節切片の HE 染色を行った。  
WT: 野生型マウス, KO: *Gdf5*-KO マウス, Fe: 大腿骨, Ti: 脛骨, Fi: 腓骨

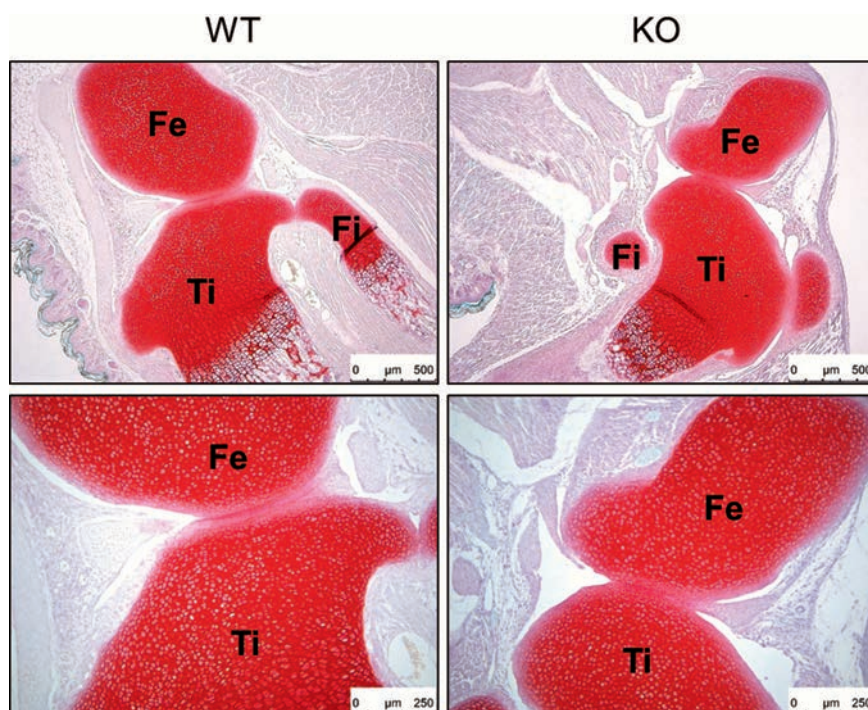


図 15. 生後 3 日齢 *Gdf5*-KO マウスの関節軟骨表層領域の菲薄化

生後 3 日齢野生型マウスおよび同腹 *Gdf5*-KO マウスの膝関節切片をサフランin O 染色した。

WT : 野生型マウス, KO : *Gdf5*-KO マウス, Fe : 大腿骨, Ti : 脛骨, Fi : 腓骨

表 2. 生後 3 日齢 *Gdf5*-KO マウスの SFZ 細胞において発現が減少した遺伝子

生後 3 日齢野生型マウスおよび同腹 *Gdf5*-KO マウスより SFZ 細胞を採取し, 24 時間後に全 RNA を回収後, RNA-シーケンス解析した。マウス肢芽に高発現しており, *Gdf5*-KO マウスで発現が半分以下に減少していた遺伝子を示す。

| 略 称            | 遺伝子名                                                               | Fold Change |
|----------------|--------------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>Satb2</i>   | special AT-rich sequence binding protein 2                         | 2.639       |
| <i>Slc13a5</i> | solute carrier family 13 member 5                                  | 4.731       |
| <i>Trpm5</i>   | transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5 | 3.294       |
| <i>Pax1</i>    | paired box 1                                                       | 2.937       |

方 GDF5 は, BMP2 と異なる標的遺伝子も多数有しており, GDF5 特異的なシグナル伝達経路が深く関与していると推測される。さらに, これら GDF5 に特異的な標的遺伝子は, マウス肢芽細胞および SFZ 細胞で異なっていたので, GDF5 特異的な標的遺伝子は, 細胞種に依存しており, その発現の制御には, 細胞それぞれによって異なるシグナル伝達あるいは転写制御機構が関与している可能性が考えられた。本研究では, GDF5 によって活性化される特異的なシグナル伝達経路や転写発現制御機構は明らかになっていないが, 関節軟骨細胞における GDF5 の分子作用メカニズムの解明の進展のために検討すべき研究課題である。

GDF5 は, BMP2 と同様に肢芽細胞および SFZ 細胞の双方に対しては軟骨細胞への分化誘導作用を有した。

興味深いことに, BMP2 が SFZ 細胞の石灰化を誘導したことに對し, GDF5 は石灰化の誘導に對して効果を示さなかった。成長軟骨細胞は, 2 型コラーゲンやアグリカンなどの軟骨特異的な細胞外マトリックスを分泌した後に, 肥大軟骨細胞に分化し, 軟骨細胞外マトリックスは, 石灰化され分解される<sup>4-7)</sup>。これに對して正常な関節軟骨細胞は肥大化せずに, その細胞外マトリックスも分解されず関節軟骨の機能の維持に大きく貢献している<sup>29)</sup>。しかし変形性関節症では, 関節軟骨細胞は 10 型コラーゲンや MMP13 を発現し, 肥大化し, 軟骨細胞外マトリックスは石灰化し骨棘を形成することが明らかにされている<sup>30-33)</sup>。最近, 変形性関節症の初期において, 関節軟骨部で骨棘形成が生じ, 半月板の逸脱を招き, 変形性関節症の病態が不可逆的に進行す

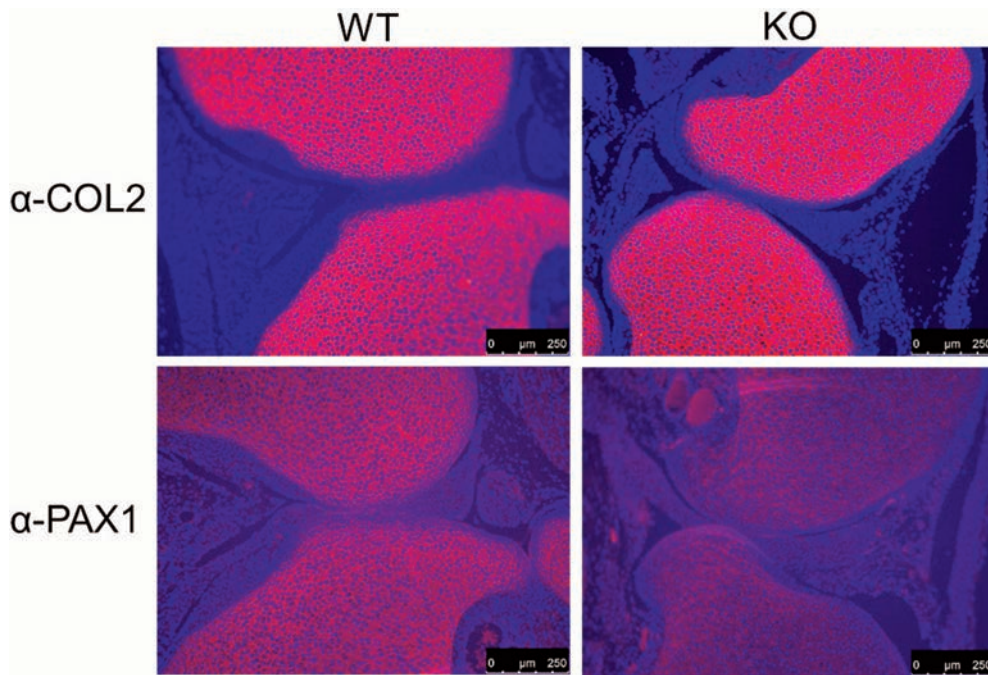


図 16. 生後 3 日齢 *Gdf5*-KO マウスの膝関節における PAX1 の発現減少

生後 3 日齢野生型マウスならびに同腹 *Gdf5*-KO マウスの膝関節切片を抗 2 型コラーゲン抗体 ( $\alpha$ -COL2) あるいは抗 PAX1 抗体 ( $\alpha$ -PAX1) を用いて免疫染色を行った後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

WT: 野生型マウス, KO: *Gdf5*-KO マウス

ることが示されている<sup>34)</sup>。このように、関節軟骨細胞が石灰化せずに、その分化段階を維持することは、変形性関節症の抑止に非常に重要な生物学的作用である。したがって、GDF5 が軟骨細胞分化誘導能を有するにも拘らず、石灰化機能を示さないことは、重要な知見であると示唆される。

細胞の分化および運命決定において、転写因子が中心的な役割を果たしている。成長軟骨細胞の分化・成熟においても転写因子 Sox9, Runx2 および Osterix が必須的役割を果たしている<sup>5, 35-40)</sup>。Sox9 は、軟骨の初期に不可欠な転写因子であり、2 型コラーゲンやアグリカンの遺伝子発現を誘導している<sup>35, 37)</sup>。Runx2 は、アルカリフォスファターゼ、インディアンヘッジホッグおよび 10 型コラーゲンの遺伝子発現を制御し、成長軟骨細胞の肥大化に必須的役割を果たしている<sup>39, 41)</sup>。Osterix は、Runx2 により発現制御されており、軟骨基質の分解を担う *Mmp13* の発現を誘導し、軟骨細胞外マトリックスの石灰化および分解に必須的役割を担っていることが示されている<sup>40)</sup>。本研究では、GDF5 が BMP2 と同様に、肢芽細胞においてアルカリフォスファターゼ、インディアンヘッジホッグおよび 10 型コラーゲンの遺伝子発現を増加させることを見出している。しかしながら、GDF5 は BMP2 と異なり、*Mmp13*,

*Osterix* および *Runx2* の発現を増加させなかった。さらに SFZ 細胞においては、GDF5 はアルカリフォスファターゼ、インディアンヘッジホッグおよび 10 型コラーゲンの遺伝子発現も増加させなかった。この結果からも、GDF5 は BMP2 と異なり、関節軟骨細胞の肥大化および石灰化には関与しないことが示され、その作用は SFZ 細胞でより顕著であることが遺伝子レベルでも確認された。すなわち GDF5 は、これらの遺伝子発現を増加させないことにより、関節軟骨細胞のさらなる分化や石灰化に対して抑制的に機能していると推察された。しかしながら、肢芽細胞において、*Runx2* や *Osterix* の発現を増加させないにも拘らず、アルカリフォスファターゼ、インディアンヘッジホッグおよび 10 型コラーゲンの遺伝子発現を増加させたメカニズムについては、さらなる検証が必要である。また近年の研究により、SFZ 細胞が成長軟骨細胞と異なる特性と遺伝子発現プロファイルを有していることが明らかにされている。SFZ 細胞は、GDF5 に加えて、プロテオグリカン *Prg4* を特異的に発現している<sup>42)</sup>。しかしながら軟骨細胞の特異的細胞外基質である 2 型コラーゲン遺伝子を全く発現していないことが示されている<sup>43)</sup>。したがって、SFZ 細胞は分化の初期段階で、成長軟骨細胞とは異なる分子メカニズムで制御されている可能性が示

唆される。肢芽細胞は、SFZ 細胞と成長軟骨細胞の両者の起源を有していると考えられるので、それぞれの分化機構がどのように制御されているのかは、非常に興味ある点であり、SFZ 細胞が石灰化しないメカニズムの解明に加えて、変形性関節症に対する再生医療の開発にも大きく貢献すると期待される。

マウスの関節の形成過程において、関節軟骨、靱帯、半月板における *Bmp2* と *Gdf5* の発現領域が異なることが明らかにされている。*Gdf5* は胎生 14 日齢では関節形成領域全体に強く発現し、胎生 16 日齢にかけて関節軟骨表層、半月板、および十字靱帯に強く発現するが、成長とともに発現がほとんど認められなくなる<sup>15)</sup>。一方、*Bmp2* は胎生 16 日齢で関節軟骨表層と半月板表層にわずかに発現し始め、生後 0 日齢では関節軟骨表層と半月板表層での発現を強め、成長とともに発現が減少するが、関節軟骨表層、半月板にわずかに発現し続ける<sup>15)</sup>。また SFZ 細胞特異的に *Bmp2* を欠損させたコンディショナル KO マウスでは、関節軟骨表層においては明らかな異常を認めなかったものの、半月板におけるプロテオグリカンが減少し、変形性関節症様病態を呈することが示されている<sup>15)</sup>。このように、GDF5 は BMP2 と異なる生物学的作用に加えて、発現領域の違いによっても関節の形成に特異的な作用を発揮していると示唆される。

本研究では、GDF5 が関節軟骨細胞の恒常性を維持するメカニズムを検討するために、*Gdf5*-KO マウスを作製した。*Gdf5*-KO マウス由来 SFZ 細胞を用いて RNA-シークエンス解析を行った結果、*Gdf5*-KO マウス由来 SFZ 細胞では、マウス肢芽組織および SFZ 細胞で高発現している *Pax1* の発現が顕著に減少していた。*Pax1* は胚発生過程で体節の硬節に発現し、脊柱の形成に重要な役割を担う転写因子として知られており、*Pax1* 遺伝子 KO マウスが椎体や椎間板の部分的欠損や形態異常を呈し、肋軟骨の近位端の石灰化の亢進を示すことが報告されている<sup>44)</sup>。これに一致して、ニワトリ胚の前肢に *Pax1* を過剰発現させると軟骨の成熟および肥大化が阻害されることが明らかになっている<sup>45)</sup>。*Pax1* と同じ *Pax* 遺伝子サブファミリーに属し、椎体や椎間板の発生に重要な役割を担う *Pax9* と、*Pax1* の二重変異マウスを比較した研究では、*Pax1*<sup>-/-</sup>;*Pax9*<sup>-/-</sup> マウスにおける *Sox5*、2 型コラーゲンならびにアグリカンの遺伝子発現が、*Pax1*<sup>+/+</sup>;*Pax9*<sup>-/-</sup> マウスに比べて減少することが示されている<sup>46)</sup>。また軟骨特異的に *Gdf5* を過剰発現させると、脊柱の形成過程において将来椎体になる部

位での *Pax1* の発現が減少し、椎体が形成されないことが報告されている<sup>47)</sup>。このように *Pax1* の発現が過剰であっても減少しても軟骨細胞の分化が阻害されることは興味深い。*Pax1* の発現が過剰な場合に負のフィードバックが働く可能性や、*Pax1* の発現の減少に対しては代償する機構が存在しない可能性が推測される。さらに、*Pax1* や *Pax9* の標的遺伝子と *Bmp4* の標的遺伝子や TGFβ の標的遺伝子の一部が一致するという報告があり<sup>46)</sup>、*Pax1* と BMP ファミリーのシグナル伝達が直接的あるいは間接的に作用している可能性も考えられる。これらの報告からも、*Pax1* が GDF5 の標的遺伝子として、下流で関節軟骨細胞の恒常性の維持に関与している可能性が示唆された。今後は *Gdf5*-KO 細胞由来の SFZ 細胞が石灰化能を有するのかを検討し、さらに理解を深めていきたい。

本研究で作製した *Gdf5*-KO マウスは、関節の構造はほぼ正常であったものの、野生型マウスより四肢や指が短縮しており、関節頭の縮小化を示した。また関節軟骨表層の領域は *Gdf5*-KO マウスでは、野生型マウスよりも菲薄化しており、特に関節軟骨が接している部位においてその傾向が顕著だった。過去の論文でも *Gdf5* 遺伝子の自然発生変異マウス、*Gdf5*<sup>bp-j</sup> マウスは、関節頭を形成するが縮小化を呈し、関節頭間の距離が短くなっていることが報告されている<sup>27)</sup>。*Gdf5* 遺伝子が欠失するにも拘らず関節が形成された要因として、他の因子が代償的に機能している可能性が推察される。自然発生変異マウスである *Gdf5*<sup>bp-j</sup> マウスと *Gdf6*-KO マウスを交配させた *Gdf5* 遺伝子と *Gdf6* 遺伝子の二重変異マウスは、*Gdf5* あるいは *Gdf6* 単独の遺伝子変異マウスよりも指節関節のより重度な変形を認めることから<sup>48)</sup>、*Gdf5* と *Gdf6* は互いに代償しあっている可能性が考えられる。GDF6 も BMP ファミリーメンバーの一員で、骨格や関節の形成に重要な役割を果たすことが知られている<sup>48)</sup>。GDF6 は間葉系前駆細胞の軟骨細胞分化を促進することが明らかになっている<sup>49)</sup>。また *Gdf6*-KO マウスは足根骨と手根骨の融合、中耳のツチ骨、キヌタ骨、アブミ骨の形態異常など複数の関節欠損を示すことや頭蓋骨において冠状縫合が融合することが報告されている<sup>48, 50)</sup>。これらの報告から *Gdf6* は、部分的に *Gdf5* を代償するとともに、変形性関節症の発症の抑止に関与していると推察される。関節軟骨の形成と恒常性の維持における GDF6 の役割の解明と GDF5 との相違に関する検討は今後の重要な課題である。

## 結 論

関節軟骨の恒常性を維持するメカニズムの解明は、変形性関節症の予防や新規治療法の開発に大きく貢献すると期待される。今後、関節軟骨細胞の特性やGDF5の生物学的機能を明らかにし、関節軟骨の形成や恒常性を維持する制御機構に対して理解を深め、変形性関節症の予防や治療法の開発の一助となれば幸いである。

## 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 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、本研究の遂行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、波多賢二准教授および高畑佳史助教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 生化学教室の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) Bijlsma JW, Berenbaum F, Lefeber FP. (2011): Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*, **377**, 2115-2126.
- 2) Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. (2009): The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*, **1**, 461-468.
- 3) Izadifar Z, Chen X, Kulyk W. (2012): Strategic design and fabrication of engineered scaffolds for articular cartilage repair. *J Funct Biomater*, **3**, 799-838.
- 4) Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. (1995): Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell*, **80**, 371-378.
- 5) Kronenberg HM. (2003): Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, **423**, 332-336.
- 6) Zelzer E, Olsen BR. (2003): The genetic basis for skeletal diseases. *Nature*, **423**, 343-348.
- 7) Egawa S, Miura S, Yokoyama H, Endo T, Tamura K. (2014): Growth and differentiation of a long bone in limb development, repair and regeneration. *Dev Growth Differ*, **56**, 410-424.
- 8) Chijimatsu R, Saito T. (2019): Mechanisms of synovial joint and articular cartilage development. *Cell Mol Life Sci*, **76**, 3939-3952.
- 9) Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M. (2005): Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries. *Birth Defects Res C Embryo Today*, **75**, 237-248.
- 10) Francis-West PH, Abdelfattah A, Chen P, Allen C, Parish J, Ladher R, et al. (1999): Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development*, **126**, 1305-1315.
- 11) Storm EE, Kingsley DM. (1999): GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol*, **209**, 11-27.
- 12) Stricker S, Mundlos S. (2011): Mechanisms of digit formation: Human malformation syndromes tell the story. *Dev Dyn*, **240**, 990-1004.
- 13) Morotome Y, Goseki-Sone M, Ishikawa I, Oida S. (1998): Gene expression of growth and differentiation factors-5, -6, and-7 in developing bovine tooth at the root forming stage. *Biochem Biophys Res Commun*, **244**, 85-90.
- 14) Rafipay A, Berg ALR, Erskine L, Vargesson N. (2018): Expression analysis of limb element markers during mouse embryonic development. *Dev Dyn*, **247**, 1217-1226.
- 15) Gamer LW, Pregizer S, Gamer J, Feigenson M, Ionescu A, Li Q, et al. (2018): The Role of Bmp2 in the Maturation and Maintenance of the Murine Knee Joint. *J Bone Miner Res*, **33**, 1708-1717.
- 16) Shwartz Y, Viukov S, Krief S, Zelzer E. (2016): Joint Development Involves a Continuous Influx of Gdf5-Positive Cells. *Cell Rep*, **15**, 2577-2587.
- 17) Masuya H, Nishida K, Furuichi T, Toki H, Nishimura G, Kawabata H, et al. (2007): A novel dominant-negative mutation in Gdf5 generated by ENU mutagenesis impairs joint formation and causes osteoarthritis in mice. *Hum Mol Genet*, **16**, 2366-2375.
- 18) Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, Kubo T, Takatori Y, Saito S, et al. (2007): A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet*, **39**, 529-533.
- 19) Zhang R, Yao J, Xu P, Ji B, Luck JV, Chin B, et al. (2015): A comprehensive meta-analysis of association between genetic variants of GDF5 and osteoarthritis of the knee, hip and hand. *Inflamm Res*, **64**, 405-414.
- 20) Dai J, Shi D, Zhu P, Qin J, Ni H, Xu Y, et al. (2008): Association of a single nucleotide polymorphism in growth differentiate factor 5 with congenital dysplasia of the hip: a case-control study. *Arthritis Res Ther*, **10**, R126.
- 21) Yamashita A, Morioka M, Yahara Y, Okada M, Kobayashi T, Kuriyama S, et al. (2015): Generation of

- scaffoldless hyaline cartilaginous tissue from human iPSCs. *Stem Cell Reports*, **4**, 404–418.
- 22) Coleman CM, Tuan RS. (2003): Growth/differentiation factor 5 enhances chondrocyte maturation. *Dev Dyn*, **228**, 208–216.
- 23) Coleman CM, Vaughan EE, Browe DC, Mooney E, Howard L, Barry F. (2013): Growth differentiation factor-5 enhances in vitro mesenchymal stromal cell chondrogenesis and hypertrophy. *Stem Cells Dev*, **22**, 1968–1976.
- 24) Takigawa Y, Hata K, Muramatsu S, Amano K, Ono K, Wakabayashi M, et al. (2010): The transcription factor Znf219 regulates chondrocyte differentiation by assembling a transcription factory with Sox9. *J Cell Sci*, **123**, 3780–3788.
- 25) Yasuhara R, Ohta Y, Yuasa T, Kondo N, Hoang T, Addya S, et al. (2011): Roles of  $\beta$ -catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells. *Lab Invest*, **91**, 1739–1752.
- 26) Kaneko T. (2017): Genome Editing in Mouse and Rat by Electroporation. *Methods Mol Biol*, **1630**, 81–89.
- 27) Harada M, Takahara M, Zhe P, Otsuji M, Iuchi Y, Takagi M, et al. (2007): Developmental failure of the intra-articular ligaments in mice with absence of growth differentiation factor 5. *Osteoarthritis Cartilage*, **15**, 468–474.
- 28) Baur ST, Mai JJ, Dymecki SM. (2000): Combinatorial signaling through BMP receptor IB and GDF5: shaping of the distal mouse limb and the genetics of distal limb diversity. *Development*, **127**, 605–619.
- 29) Binette F, McQuaid DP, Haudenschield DR, Yaeger PC, McPherson JM, Tubo R. (1998): Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *J Orthop Res*, **16**, 207–216.
- 30) von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Glückert K, et al. (1992): Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum*, **35**, 806–811.
- 31) Kirsch T, Nah HD, Shapiro IM, Pacifici M. (1997): Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol*, **137**, 1149–1160.
- 32) Fuerst M, Bertrand J, Lammers L, Dreier R, Echtermeyer F, Nitschke Y, et al. (2009): Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, **60**, 2694–2703.
- 33) Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, et al. (2005): Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage*, **13**, 632–641.
- 34) Hada S, Ishijima M, Kaneko H, Kinoshita M, Liu L, Sadatsuki R, et al. (2017): Association of medial meniscal extrusion with medial tibial osteophyte distance detected by T2 mapping MRI in patients with early-stage knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, **19**, 201.
- 35) Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, et al. (1997): SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet*, **16**, 174–178.
- 36) Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, Kou I, Seki S, Takato T, et al. (2004): The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum*, **50**, 3561–3573.
- 37) Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, et al. (2000): SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem*, **275**, 10738–10744.
- 38) Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. (2002): The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev*, **16**, 2813–2828.
- 39) Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, et al. (2004): Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev*, **18**, 952–963.
- 40) Nishimura R, Wakabayashi M, Hata K, Matsubara T, Honma S, Wakisaka S, et al. (2012): 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.
- 41) Fujita T, Azuma Y, Fukuyama R, Hattori Y, Yoshida C, Koida M, et al. (2004): Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. *J Cell Biol*, **166**, 85–95.
- 42) Rhee DK, Marcelino J, Baker M, Gong Y, Smits P, Lefebvre V, et al. (2005): The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest*, **115**, 622–631.
- 43) Takahata Y, Nakamura E, Hata K, Wakabayashi M, Murakami T, Wakamori K, et al. (2019): Sox4 is involved in osteoarthritic cartilage deterioration through induction of ADAMTS4 and ADAMTS5. *FASEB J*, **33**, 619–630.
- 44) Wilm B, Dahl E, Peters H, Balling R, Imai K. (1998): Targeted disruption of Pax1 defines its null phenotype and proves haploinsufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S*

- A, **95**, 8692-8697.
- 45) Takimoto A, Mohri H, Kokubu C, Hiraki Y, Shukunami C. (2013): Pax1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation. *Exp Cell Res*, **319**, 3128-3139.
- 46) Sivakamasundari V, Kraus P, Sun W, Hu X, Lim SL, Prabhakar S, et al. (2017): A developmental transcriptomic analysis of Pax1 and Pax9 in embryonic intervertebral disc development. *Biol Open*, **6**, 187-199.
- 47) Tsumaki N, Tanaka K, Arikawa-Hirasawa E, Nakase T, Kimura T, Thomas JT, et al. (1999): Role of CDMP-1 in skeletal morphogenesis: promotion of mesenchymal cell recruitment and chondrocyte differentiation. *J Cell Biol*, **144**, 161-173.
- 48) Settle SH, Rountree RB, Sinha A, Thacker A, Higgins K, Kingsley DM. (2003): Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse Gdf6 and Gdf5 genes. *Dev Biol*, **254**, 116-130.
- 49) Nochi H, Sung JH, Lou J, Adkisson HD, Maloney WJ, Hruska KA. (2004): Adenovirus mediated BMP-13 gene transfer induces chondrogenic differentiation of murine mesenchymal progenitor cells. *J Bone Miner Res*, **19**, 111-122.
- 50) Clendenning DE, Mortlock DP. (2012): The BMP ligand Gdf6 prevents differentiation of coronal suture mesenchyme in early cranial development. *PLoS One*, **7**, e36789.