

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11036

研究課題名(和文) 関節軟骨組織の発生・再生機序における転写因子Klf4の機能解明

研究課題名(英文) Function of Klf4 in the cartilage homeostasis and potential as a target for OA gene therapy

研究代表者

寺村 岳士 (TERAMURA, Takeshi)

近畿大学・大学病院・講師

研究者番号：40460901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではKlf4が軟骨細胞の分化および軟骨特異的細胞外マトリクス(ECM)の発現に重要な役割を担っていることを検証した。RNAseqおよびNET-CAGE解析により、Klf4の強制発現はECM発現を活性化することが明らかになった。Klf4コンディショナルKOマウスでは、ECM遺伝子が野生型に比べ有意に低下していた。マウスにおいて作製したOAモデルでは、野生型とKO間で病態の進行速度、変性度に差は認められなかったが、遺伝子治療を想定して行ったステルスRNAウイルスを用いたヒト軟骨細胞へのKlf4導入実験では、Klf4の導入により細胞増殖速度の低下と軟骨基質の発現上昇が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症(OA)は代表的な加齢性運動器疾患の一つであるが、効果的な治療法は存在していない。我々は、OAの根本的な治療用は変性箇所において脱分化あるいは増殖による出現した未成熟の軟骨細胞を効率的に再分化させる処置が有効であると考えた。本研究では軟骨分化制御のハブとなる候補分子としてKlf4に注目し、機能と介入の可能性について検証した。その結果、Klf4は軟骨ECMの発現に重要な役割をもつことが明らかとなり、遺伝子治療を想定して行ったステルスRNAウイルスを用いたヒト軟骨細胞へのKlf4導入実験では、軟骨分化の促進・成熟という期待した成果が得られうることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate molecular function of Klf4 and demonstrate that Klf4 is a promising molecule for gene family of osteoarthritis (OA). RNAseq and NET-CAGEseq analysis showed that overexpression of Klf4 activates promoter/enhancer activity of cartilage specific ECM-related genes. Furthermore, RNAseq analysis with cartilage tissue from cartilage-specific Klf4 conditional knockout mice showed that the ECM related gene expressions were suppressed by Klf4 deletion. To demonstrate that delivery of KLF4 is useful for OA therapeutics, we used sendavirus (SeV) system, and found that cartilage-specific ECM and Sox9 were significantly improved by transfection of SeV-KLF4 in human chondrocytes. In conclusion, we identified Klf4 as a candidate gene for important transcription factor in maintenance of chondrocyte homeostasis, and showed its function as a transcriptional activator for cartilage matrix genes.

研究分野：再生医療

キーワード：変形性関節症 転写因子 遺伝子治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会化が進む我が国において、高齢者の社会参加ならびに関連医療費の低減は極めて重要な問題である。変形性膝関節症(OA)は代表的な加齢性運動器疾患の一つであり、高齢者のQOLを維持する上でその予防と治療は喫緊の課題である。しかしOAの分子メカニズムは殆ど解明されておらず、効果的な治療法は存在していない。

OAの病態は関節軟骨基質の磨耗あるいは破壊と軟骨細胞の喪失、変性が主たる要因の一つであると考えられる。関節軟骨はストレスや炎症性サイトカインあるいは加齢によって変質し、細胞外基質の発現能力が低下する。あるいは、軟骨組織が変性し局所的な細胞増殖を生じる場所においては脱分化細胞の蓄積が認められる。正常な機能をもつ細胞が損傷した場所に軟骨細胞を移植する再生医療も行われているが、欠損箇所が大きい場合や、患者が高齢である場合には、自己細胞を用いた再生医療は困難である。

多くの症例で軟骨組織を修復させるためには、残存する変性細胞を正常化させる処置、あるいは移植細胞に十分な基質産生能をもたせるような治療が有用であると考えられる。これを達成するためには、関節軟骨の発生、分化、基質産生制御の中心となる分子を明らかにし、これを用いた遺伝子治療が有効であると考えられる。一方、単独で軟骨分化を制御し、基質産生を誘導するような転写因子は知られていなかった。我々は、OA患者あるいは健常者の膝関節軟骨組織を検体とした全RNA sequence、miRNA sequenceを行うことで「軟骨分化制御のハブとなる分子」を探索し、その後の詳細なスクリーニングによりKLF4を候補分子として抽出した。

ヒト臨床検体を用いたトランスクリプトーム解析については、正常軟骨とOA軟骨との比較<sup>1</sup>など多くの研究が行われてきた。あるいは、OAモデル動物や、近年ではNGSを用いた老化変性軟骨組織における遺伝子発現の変化を網羅的に観察した例がある。しかし、いずれの報告においてもKLFファミリーが重要な研究対象として挙げられることはなかった。

KLFファミリーは様々な組織で『分化制御の門番』として機能している。しかし、骨軟骨系組織での知見は非常に少ない。マウスの骨分化においてKlf4が抑制的に働いていること<sup>2,3</sup>、内軟骨骨化の過程ではKlf5が重要な役割を担うことが報告されていたが<sup>4</sup>、軟骨分化、軟骨恒常性の中でKLFタンパク質がどのように機能しているかは未解明である。

もしKLF4が関節軟骨の恒常性制御に関わる充用な転写因子であることが明らかになれば、これを賦活することで軟骨細胞の遺伝子発現を正常化し、変性軟骨組織を再生へと導くことができる可能性がある。

## 2. 研究の目的

これまでに、KLF4が軟骨細胞の正常な機能発現に重要であるという報告はない。本研究では、関節軟骨細胞の分化、基質発現におけるKLF4の重要性を明らかにし、遺伝子治療の可能性を提案することを目的に研究を行なった。

## 3. 研究の方法

### KLF4発現細胞におけるトランスクリプトーム解析

KLF4を強制発現させた細胞を用いてRNAseqを行った。ヒト株化軟骨細胞TC28にpCMV-KLF4-IRES-EGFPを発現させ、トランスフェクションから48時間後にFACSにてGFP陽性細胞のみを回収RNA抽出とライブラリ作成ののちNextSeqによりRNAseqを行った。またKLF4の作用部位について、従来のChIPseqではなく、高い解像度でゲノムの活性化部位を観察することが可能なNET-CAGE法を用いた解析を行った。NET-CAGE法は共同研究者の村川らの方法(Hirabayashi et al., Nature Genetics 2019)に沿って実施した。

### KLF4コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析

軟骨組織の発生、生体内での組織維持における KLF4 の機能を解明するため、Martin Lotz 教授（スクリプス研究所・カリフォルニア，研究協力者）と共同作製した  $Klf4^{flox/flox};Col2-Cre$  マウスを用い、大腿骨関節軟骨組織を採取、RNAseq により遺伝子発現の変化を観察した。また、同マウスにおいて Destabilized Medial Meniscus (DMM) 処理を行い人為的に OA を誘導し、OA 病態の早期発現や増悪について観察した。

### 組織特異的誘導性トランスジェニックマウス (CET5-KLF4ER) の作製と、KLF4 の *in vivo* での機能解明

KLF4 は軟骨基質の発現を正に制御していることから、KLF4 を一過性に発現させてやることで軟骨損傷からの回復あるいは OA の抑制が誘導できる可能性がある。本検討を行うため、両端に LoxP 配列を配した EGFP の下流に KLF4 とマウス ER 融合遺伝子を挿入したトランスジェニックマウスを開発した（鹿児島大学佐藤正宏教授、大阪大学伊川正人教授との共同研究）。同マウスは普段全身性に EGFP を発現しているが、 $Col2-Cre$  マウスとの交配により軟骨組織でのみ KLF4ER 融合遺伝子を発現するようになる。KLF4ER 融合遺伝子からは NLS が除去してあるため、タモキシフェン投与時のみ KLF4 が機能する。CET5-KLF4ER マウスを  $Col2-Cre$  マウスと交配することで軟骨細胞でのみ  $Klf4ER$  融合遺伝子が発現するマウスが得られる。同 TG マウス 10 週齢雄個体について、イソフルラン麻酔下に DMM 処置を施し、手術 1 週間後よりタモキシフェン腹腔内投与を行い、軟骨組織特異的に強制発現された  $Klf4$  の核移行を誘導する。免疫組織化学的に軟骨組織の再生ならびに OA で観察される内軟骨骨化、骨棘形成等が阻害されるかどうかを観察することで、KLF4 が OA の抑止および損傷軟骨の回復に機能することを確認した。

### RNA ウイルスを用いた KLF4 の強制発現による軟骨分化促進、治療効果の検討

KLF4 が非軟骨細胞でどのような影響を及ぼすか、また、分化を促進するかどうかを検討するため MSC での KLF4 の強制発現を行う。一般的に初代軟骨細胞あるいは MSC への遺伝子導入は困難であり、恒常発現株を作製することがほぼ不可能なため長期間の観察は困難であった。我々は、ヒト正常細胞のストレス応答を回避しつつ高効率な遺伝子導入を達成するため、中西真人教授（産総研・ときわバイオ株式会社、分担者）らと共にステルス型次世代センダイウイルスベクター (SeVdp) を用いほぼ 100% の効率で長期間 KLF4 を発現させる系を構築した。

## 4 . 研究成果

### 関節軟骨細胞における KLF4 の機能解析: RNAseq と NET-CAGE 解析

現在まで、軟骨細胞における KLF4 の機能ならびにその標的遺伝子は明らかになっていない。そこで、ヒト軟骨細胞株 TC28 に対し KLF4-IRES-EGFP プラスミドの強制発現を行い、48 時間後に RNAseq を行った。その結果、 $Col2A1$  遺伝子、 $Acan$ 、 $COMP$  等の転写因子の発現が上昇していることが明らかになった。次に、KLF4 を強制発現した細胞をサンプリング、アマニチン処理による RNA 新生の抑制と核分画ののち、短鎖 RNA を含む全 RNA を精製し RNAseq を行った。その結果、 $Acan$ 、 $Col2a1$ 、 $Col11a1$ 、 $COMP$  など通常の RNAseq で上昇が認められた遺伝子についてプロモーター領域での RNA 合成活性が上

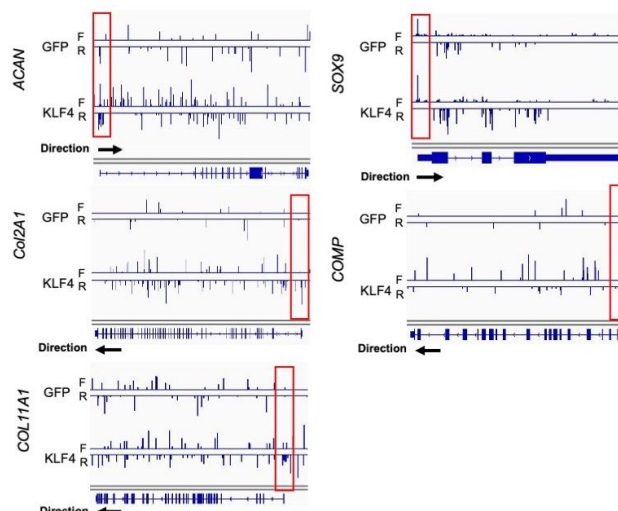


図1. NET-CAGE解析。KLF4強制発現により軟骨マトリクス関連遺伝子のプロモーター活性の上昇が認められる。

昇していること、Sox9 では遺伝子内部に存在するエンハンサー領域でも活性の上昇が認められることが明らかになった(図1)。また、Acan 遺伝子については TSS から 10kb 以上上流のエンハンサーと考えられる領域においても、エンハンサー活性を示唆する双方向性の RNA 合成が認められた。これにより、KLF4 は軟骨基質合成に関わる様々な遺伝子の転写活性、エンハンサー活性に関わることが明らかになった。

### Klf4 コンディショナル KO マウスを用いた個体レベルでの機能解析

Klf4 ノックアウトマウスは皮膚上皮組織の形成不全による体液漏出を発症し新生児致死となることがわかっている。そのため、成長期、成熟期の軟骨細胞での機能は不明であった。本研究では、Klf4<sup>flx/flx</sup>:Col2-Cre および Klf4<sup>flx/flx</sup>:Col11-Cre マウスを作製、10 週齢雄個体について、イソフルラン麻酔下に DMM 処置を施し OA 病態増悪の有無を観察した。また関節軟骨組織を採取し、NGS により網羅的に比較を行った。コンディショナル KO マウスの関節軟骨を用いた RNAseq では Klf4 の発現が著しく低下していること、また、in vitro での強制発現実験の結果を裏付けるように、軟骨基質関連遺伝子の発現低下が認められた(図2)。一方、DMM モデルにおいては、当初予想していたようなコンディショナル KO マウスでの早期 OA 発症あるいは重篤化は認められなかった。この点について、Klf ファミリー分子である Klf2 を株化軟骨細胞に強制発現することでも Col2a1、Acan の発現を促進できることがわかっており、Klf4 の発現喪失を補償している可能性が考えられた。

図2. Klf4コンディショナルKOマウスにおける軟骨基質関連遺伝子の発現低下。

Fold change in KO cartilage				
	Name	BaseMean	log2fc	p value
Matrix	Klf4 (exon2)	175.844	-3.558	0.0000
	Acan	168709.664	-0.784	0.0000
	Col9a2	4192.951	-0.77	0.0000
	Col9a3	3994.903	-0.428	0.0010
	Col27a1	20142.758	-0.536	0.0000
	Col10a1	104298.738	-0.827	0.0000
	Col11a1	21319.21	-0.373	0.0010
	Comp	54393.534	-0.701	0.0000
	Prg4	2187173.45	-0.734	0.0000
	Transcription factors	Sox8	1412.063	-1.177
Sox9		16766.496	-0.665	0.0000
Foxo3		1396.582	-0.588	0.0010
Epas1		8046.914	-0.689	0.0000
Tgfb/BMP-Smads		Tgfb3	951.36	-0.517
	Tgfb1	4896.673	-0.351	0.0200
	Bmp2	1504.076	-0.984	0.0000
	Bmp6	1185.402	-0.51	0.0090
	Bmpr1b	286.238	-1.841	0.0390
	Smad2	1119.431	-0.369	0.0170
	Smad3	4978.33	-0.276	0.0190
	Smad4	1514.558	-0.306	0.0310
Catabolic molecules	Smad7	508.162	-0.561	0.0200
	Mmp2	706.127	0.552	0.0060
	Mmp19	53.289	2.728	0.0000
	Adamts1	414.216	-0.721	0.0010
	Adam10	778.656	-0.37	0.0420

### DMM モデルでの Klf4 発現誘導による OA の抑止、再生の誘導

本研究で作製した CAG-CET5-EGFP<sup>flx/flx</sup>-KLF4ER プラスミド(図3)を B6DBA2F1 マウス前核に注入し、7ラインの TG マウスを得た。軟骨組織を含む全身組織で最も強く GFP を発現した系統について B6 系統へのバッククロスを行い、安定的な TG ライン(以下 CET5 マウス)を作製した。コンストラクトが機能していることを確認するため、CET5 マウスを Col2Cre と交配して得た胎仔より繊維芽細胞を樹立、Cre タンパク質をトランスフェクションさせたのち 40HT 投与を行った。その結果、Cre のトランスフェクションにより KLF4ER が発現すること、40HT 投与により Klf4 標的遺伝子である Crabp2、Igf1bp2 などの遺伝子発現が

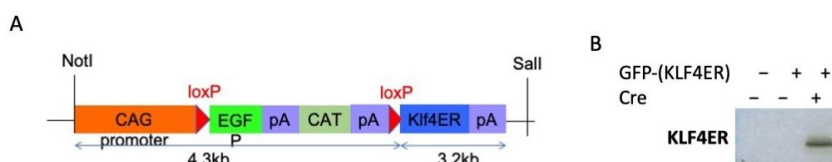


図3. 軟骨特異的核移行誘導性KLF4融合遺伝子(CET5)の構造。  
A) TGマウスへの導入部分のコンストラクト  
B) 同遺伝子を株化細胞へ導入後、Creを作用させることでGFP→KLF4ER遺伝子に切り替わる。

上昇することを確認するため、CET5 マウスを Col2Cre と交配して得た胎仔より繊維芽細胞を樹立、Cre タンパク質をトランスフェクションさせたのち 40HT 投与を行った。その結果、Cre のトランスフェクションにより KLF4ER が発現すること、40HT 投与により Klf4 標的遺伝子である Crabp2、Igf1bp2 などの遺伝子発現が

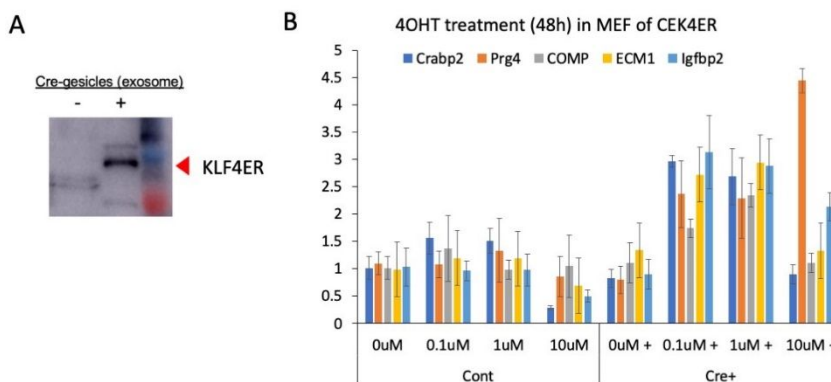


図4. CET5-TGマウスの動作確認。  
A) TGマウスMEFへのCreタンパク質導入によるGFP→KLF4ER発現への切り替わり  
B) Cre処理後、40HT処理を行うことでKlf4の標的遺伝子発現が上昇する。



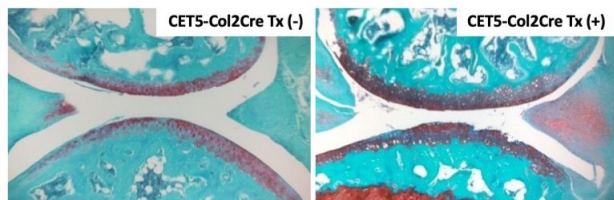


図5. CET5-TGマウスを用いたKlf4によるOA治療効果の確認。タモキシフェン投与により軟骨基質の発現が維持されている傾向が認められる。

なわち Klf4 発現による OA の軽減を認めたが ( 図 5 ) 同軟骨組織での基質産生等はむしろ低下傾向が見られた。同現象はコントロールマウスへのタモキシフェン投与でも見られたことから、タモキシフェンが軟骨細胞の恒常性に関わる遺伝子の発現に影響した可能性が考えられた。

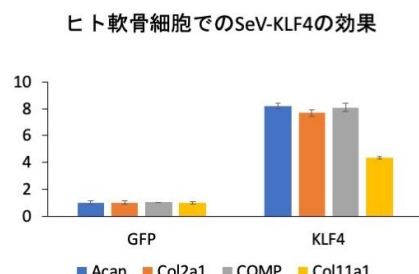
### RNA ウイルスを用いた KLF4 遺伝子治療の可能性

タモキシフェンによる TG マウスでの Klf4 発現誘導はアーティファクトを誘起する可能性が否定できない。そこでより実践的かつ全く異なるアプローチとして、RNA ウイルスを用いてヒト正常軟骨細胞および現在再生医療で最も重要な細胞材料となっている MSC に KLF4 を発現させ、表現系の変化を観察した。ヒト初代軟骨細胞に Klf4 発現 RNA ウイルス ( SeV-KLF4 ) を導入し、マイクロアレイおよび qRT-PCR で解析したところ、Col2A1、Acan、Sox9 を始め多くの軟骨基質関連遺伝子が著しく上昇することがわかった ( 図 6 )。また、興味深いことに、未分化な MSC に SeV-KLF4 を作用させるだけで、軟骨基質の発現を誘起できることが明らかになった。

以上のように、本研究事業を通して Klf4 は軟骨細胞の細胞外マトリクス関連遺伝子発現を活性化する重要な転写因子であることが明らかになった。またその作用はプロモーター活性だけでなく、エンハンサー活性にも影響しうることが示唆された。さらに、当該事業では将来の遺伝子治療

Gene	Microarray score		Expression change
	SRV-GFP	SRV-Klf4	
COL9A3	8.49	11.8	962.0712952
COL11A2	10.76	14.01	719.0757764
COMP	14.02	16.89	156.4979555
ACAN	13.09	15.61	53.07645093
COL2A1	12.92	15.41	49.8665331
COL11A1	14.11	16.4	29.44600482
SOX9	10.85	13.05	23.75237713
ECM2	10.77	12.79	16.79546694
COL5A1	12.52	14.26	10.056107
WWP2	13.76	15.46	9.579829637
COL27A1	8.08	9.57	7.06162397
COL15A1	12.13	13.63	7.012845771
COL8A1	12.09	13.33	5.169411323
COL4A1	6.25	7.43	4.789914818

図6. 遺伝子治療用SeV-KLF4を用いたヒト軟骨細胞での細胞外マトリクス関連遺伝子発現の上昇。



の可能性を示唆する RNA ウイルスの有用性を示す結果も得られた。一方、Klf4 の強制発現は MSC において細胞周期の停止などを誘発することも観察されており、毒性やその他の影響についても慎重に検討していく必要があると考えられた。

### 参考文献

- 1 Sato, T. *et al.* Comparative analysis of gene expression profiles in intact and damaged regions of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 2006 **54**, 808-817.
- 2 Kim, J. H. *et al.* Kruppel-like factor 4 attenuates osteoblast formation, function, and cross talk with osteoclasts. *The Journal of cell biology* **204**, 1063-1074, doi:10.1083/jcb.201308102 (2014).
- 3 Michikami, I. *et al.* Kruppel-like factor 4 regulates membranous and endochondral ossification. *Experimental cell research* 2012, **318**, 311-325.
- 4 Shinoda, Y. *et al.* Kruppel-like factor 5 causes cartilage degradation through transactivation of matrix metalloproteinase 9. *The Journal of biological chemistry* 2008 **283**.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Onodera Yuta, Teramura Takeshi, Takehara Toshiyuki, Itokazu Maki, Mori Tatsufumi, Fukuda Kanji	4. 巻 13
2. 論文標題 Inflammation-associated miR-155 activates differentiation of muscular satellite cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 204860-204881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0204860	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Teramura Takeshi, Matsuda Koichi, Takehara Toshiyuki, Shinohara Kenji, Miyashita Yuji, Mieno Yasumichi, Mori Tatsufumi, Fukuda Kanji, Suzuki Koichi, Suemori Hirofumi	4. 巻 503
2. 論文標題 Laser-assisted cell removing (LACR) technology contributes to the purification process of the undifferentiated cell fraction during pluripotent stem cell culture	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 3114~3120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.08.101	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Teramura Takeshi, Onodera Yuta	4. 巻 10
2. 論文標題 Stem cell depletion by inflammation-associated miR-155	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 17~18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/aging.101374	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Houri Kei, Mori Tatsufumi, Onodera Yuta, Tsujimoto Takatoshi, Takehara Toshiyuki, Nakao Shinichi, Teramura Takeshi, Fukuda Kanji	4. 巻 10
2. 論文標題 miR-142 induces accumulation of reactive oxygen species (ROS) by inhibiting pexophagy in aged bone marrow mesenchymal stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60346-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsujimoto Takatoshi、Mori Tatsufumi、Houri Kei、Onodera Yuta、Takehara Toshiyuki、Shigi Kanae、Nakao Shinichi、Teramura Takeshi、Fukuda Kanji	4. 巻 523
2. 論文標題 miR-155 inhibits mitophagy through suppression of BAG5, a partner protein of PINK1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 707 ~ 712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.022	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onodera Yuta、Teramura Takeshi、Takehara Toshiyuki、Fukuda Kanji	4. 巻 37
2. 論文標題 Transforming Growth Factor -Activated Kinase 1 Regulates Mesenchymal Stem Cell Proliferation Through Stabilization of Yap1/Taz Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 STEM CELLS	6. 最初と最後の頁 1595 ~ 1605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.3083	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 寺村 岳士、浅原 弘嗣、福田 寛二
2. 発表標題 間葉系幹細胞の分化誘導、幹細胞維持におけるTWIST1の機能
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 寺村 岳士
2. 発表標題 多能性幹細胞からの間葉系幹細胞の分化誘導
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中西 真人  (NAKANISHI Mahito)  (10172355)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・招聘 研究員   (82626)	
研究分担者	福田 寛二  (FUKUDA Kanji)  (50201744)	近畿大学・医学部・教授   (34419)	
研究分担者	浅原 弘嗣  (ASAHARA Hiroshi)  (70294460)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授   (12602)	